T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ACTH SALGILAYAN HİPOFİZ ADENOMLARINDA GENETİK VE EPİGENETİK MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Nirva Sera KAYACAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK SEZGİN

II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Programı

Aralık, 2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Nirva Sera KAYACAN

Dedem Agop KAYACAN, Biricik Babaannem Kuharik KAYACAN ve
Büyük Dayım Püzant SİMSAR başta olmak üzere tüm Aileme ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

ACTH SALGILAYAN HİPOFİZ ADENOMLARINDA GENETİK VE EPİGENETİK MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 31415

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca her zaman bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, her daim bana destek olan ve ilk günden beri bana inanan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK SEZGİN'e, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na başladığım yüksek lisans öğrenciliğimden itibaren bugüne kadar değerli desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e, doktora tezimin başından sonuna kadar bana güvenen, çalışma hayatımda bana dönüm noktasını sağlayan, bilimsel desteği ve manevi katkılarından dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nurperi GAZİOĞLU'na, hem ikinci danışmanım hem manevi ablam olarak her koşulda yanımda olan ve beni sürekli motive eden Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI'ya, istatistik çalışmalarımda sabrı ve bilgisiyle bana destek olan Dr. Öğr. Üyesi Ömer UYSAL'a, doktora tez çalışmam süresince bilimsel katkılarıyla destek olan Prof. Dr. Pınar KADIOĞLU ve Prof. Dr. Nil ÇOMUNOĞLU'na, tez çalışmalarım süresince laboratuvarının imkanlarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Nur BUYRU'ya, lisansüstü eğitimim süresince her daim kendime inanmamı ve pes etmeden devam etmemi sağlayan, en yorulduğum zamanda bile azmimi tekrar ortaya çıkaran ve tüm deneylerimde yanımda olarak bana benden çok inanan Doç. Dr. Onur BAYKARA'ya, hem arkadaşlığıyla, hem deney ve istatistik çalışmalarımda yüksek çalışma özverisiyle bana sonsuz destek olan M.Sc Ceren ORHAN ve tüm moleküler genetik laboratuvar ekibine çok teşekkür ederim.

Doktora tez serüvenimde bana olan inancını her saniye hissettiren, birlikte mutlu ve huzurlu olduğum, kuzenden öte kardeşim olan can yoldaşım Telma KAYACAN'a teşekkür ederim.

Ve tüm hayatım boyunca her anımda, her koşulda sonuna kadar yanımda olan, beni asla yalnız bırakmayan, en büyük varlığım olan Canım Babam Rupen KAYACAN ile doğduğum andan itibaren beni kucağına alan ve bugünlere kadar beni sonsuz sevgisi ile yetiştiren En Kıymetlim İlda SİMSAR'a ve tüm destekleriyle yanımda olan kocaman Aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

Aralık 2022 **Nirva Sera KAYACAN**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **ii**
BEYAN ..... **iii**
BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **ix**
TABLO LİSTESİ ..... **x**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xiv**
ABSTRACT ..... **xvi**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **4**
2.1. HİPOFİZ BEZİ 4
2.1.1. Hipofiz Bezi Embriyolojisi ve Yapısı 4
2.1.2. 5
2.2. HİPOFİZ ADENOMU 7
2.2.1. Hipofiz Adenomu Epidemiyolojisi 7
2.2.2. Hipofiz Adenomlarının Patolojisi 7
2.2.3. Sınıflandırma 8
2.2.4. Hipofiz Adenomlarının Moleküler Genetiği 10
2.2.5. Klinik Belirti ve Bulgular 12
2.2.6. Hipofiz Adenomuna Bağlı Hastalıklar 13
2.3. CUSHING HASTALIĞI 14
2.3.1. Tedavi 19
2.3.2. Cushing Hastalığı Etyopatogenezi 20
2.3.3. Cushing Hastalığında Etkili Olası Genler 24

2.4. EPİGENETİK 36
2.4.1. Hipofiz Adenomları ve Metillenme 36
2.4.2. DNA Metillenmesi 37
3. YÖNTEM 39
3.1. KULLANILAN GEREÇLER 39
3.2. HASTA VE KONTROL GRUPLARI 39
3.3. KANTİTATİF-GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE GEN İFADESİNİN ÖLÇÜLMESİ 40
3.3.1. Parafine Gömülü Dokulardan RNA Eldesi 40
3.3.2. cDNA Eldesi 41
3.3.3. GZ-PZR (qRT-PCR) Yöntemi ile Gen İfadesinin Ölçülmesi 42
3.4. METİLLENMEYE ÖZGÜ POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ (MS-PZR) İLE GEN İFADESİNİ ETKİLEYEN EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN BELİRLENMESİ 43
3.4.1. Parafine Gömülü Dokulardan DNA Eldesi 43
3.4.2. MS-PZR ile Gendeki Metillenmenin ve Epigenetik Değişikliklerin Belirlenmesi 44
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER 47
4. BULGULAR 49
4.1. GZ-PZR YÖNTEMİ İLE GEN İFADESİNİN ÖLÇÜLMESİ 49
4.1.1. Gen İfadeleri Arasındaki Korelasyon Analizi 54
4.1.2. Genlerin İfade Düzeylerinin Birbirleri ile İlişkisi 56
4.2. CUSHING HASTALARINA AİT KLİNİK PARAMETRELER 58
4.2.1. Genlerin İfade Düzeylerinin Klinik Parametreler ile İlişkisi 59
4.3. METİLLENMEYE ÖZGÜ POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ (MS-PZR) İLE GEN İFADESİNİ ETKİLEYEN EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN BELİRLENMESİ 62
4.3.1. *p16* ve *USP8* Genlerinin Metillenme Analizi 63
4.3.2. *p16* Metillenme Düzeyinin Klinik Parametreler ile İlişkisi 66
5. TARTIŞMA 68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 83
KAYNAKLAR 84
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 101
ETİK KURUL İZİN YAZISI 102
KURUM İZNİ YAZILARI 104
ÖZGEÇMİŞ 105

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Hipofiz Bezi Yapısı (Barkhoudarian ve Kelly, 2017) 5

Şekil 2.2: Hipofiz bezinden salgılanan hormonlar ve hedef organları (Rawindraraj ve diğ., 2022) 6

Şekil 2.3: Knosp Evrelemesi (Knosp ve diğ., 1993) 10

Şekil 2.4: Hipofiz adenomlarının tümörogenezinde etkili olan genler (Caimari ve Korbonits, 2016) 12

Şekil 2.5: Cushing hastalığı ko-morbiditeleri (Ferrau ve Korbonits, 2015) 14

Şekil 2.6: Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal (HPA) eksende fizyolojik geri bildirimin kontrolü (Bowden ve diğ., 2019) 17

Şekil 2.7: Endojen Cushing Hastalığı alt tipleri (Raff ve Carroll, 2015) 18

Şekil 2.8: Cushing hastalığının gelişmesinde etkili olabileceği düşünülen olası genlerin birbirleri ile ilişkisi 21

Şekil 2.9: ACTH salgılayan hipofiz adenomunu uyaran *USP8* mekanizması (Reincke ve diğ., 2015) 22

Şekil 2.10: CABLES1'in p21 proteini üzerinden hücre döngüsünü baskılaması (Roussel-Gervais ve diğ., 2016) 23

Şekil 2.11: Biyoinformatik veri tabanında (*STRING*) belirlenen ve adenom oluşumuna katılacağı öngörülen *USP8* ve *CABLES1* ile olası ilişkili genler 25

Şekil 2.12: Epigenetik mekanizmalar (Srirangam Nadhamuni ve Korbonits, 2020) 36

Şekil 4.1: Dört farklı boyutta yer alan genlerin kümeler halinde ilişkisinin gösterilmesi 57

Şekil 4.2: Dört farklı boyutta yer alan genlerin birbirleri ile ilişkisi 57

Şekil 4.3: *p16* (151 bp) geninin promotör bölgesinin metillenmesinin incelenmesi 64

Şekil 4.4: *USP8* (110 bp) geninin promotör bölgesinin metillenmesinin incelenmesi 64

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Hipofiz tümöründe etkin olduğu bilinen genler ve sebep oldukları değişiklikler (Caimari ve Karbonits, 2016) 11

Tablo 3.1: GZ-PZR Reaksiyon İçeriği 43

Tablo 3.2: *p16* ve *USP8* için metillenmiş ve metillenmemiş bölgelere özgü tasarlanan ileri ve geri yönde primerler 44

Tablo 3.3: MS-PCR reaksiyon içeriği 45

Tablo 3.4: Meth Primer programı ile metillenmiş ve metillenmemiş bölgeye özgü primer çiftleri 46

Tablo 4.1: Hasta ve kontrol grubu örneklerinden elde edilen RNA'ların yoğunluk ve saflık tayini 50

Tablo 4.2: Hasta grubuna ait GZ-PZR yöntemi sonucu genlerin ifade değişimleri 51

Tablo 4.3: Hasta grubuna ait genlerin ifade analiz sonuçlarının yüzde oranları 51

Tablo 4.5: Tümör ve kontrol doku örneklerinde genlerinin Ct, ΔCt, ΔΔCt, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ve p değerleri 53

Tablo 4.7: Temel Bileşen Analizine göre genlerin birbirileri ile ilişkilerini gösteren boyutlar 56

Tablo 4.8: Genlerin birbirleriyle farklı boyutlardaki etki oranı 58

Tablo 4.9: Hastalara ait klinik parametreler 59

Tablo 4.10: Temel Bileşen Analizine göre genlerin hastalığın şiddeti ile ilişkisini gösteren boyutlar 60

Tablo 4.11: Genler ve hastalığın şiddeti üzerine boyutların etki oranı 61

Tablo 4.12: Temel Bileşen Analizine göre genlerin adenom tipi ve invazyon durumu ile ilişkisini gösteren boyutlar 61

Tablo 4.13: Genler ve adenom tipi ve invazyon durumu ile ilişkisi üzerine boyutların etki oranı 62

Tablo 4.14: Hasta ve kontrol grubu örneklerinden elde edilen DNA'ların yoğunluk ve saflık tayini 62

Tablo 4.15: *p16* ve *USP8*'in hasta ve kontrol gruplarındaki metillenme durumu.....65

Tablo 4.16: *p16* ve *USP8*'in metillenme oranları.....66

Tablo 4.17: Tümör ve normal doku örneklerinde *p16* metillenme düzeyinin klinik parametreler ile ilişkisi 66

Tablo 4.18: Temel Bileşen Analizine göre tümör dokularındaki *p16* metillenme düzeylerinin klinik parametreler ile ilişkisini gösteren boyutlar.....67

Tablo 4.19: Tümör dokularında *p16* metillenme durumunun klinik parametreler ile ilişkisi üzerine boyutların etki oranı.....67

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
µ	**:** Mikron
n	**:** Gözlem
p	**:** Değişken

Kısaltmalar	Açıklama
AC	**:** Adenilat siklaz
ACTH	**:** Adrenokortikotropik hormon
ADH	**:** Antidiüretik hormon / vazopressin
AIP	**:** Aril hidrokarbon reseptör etkileşimli protein
AKT1	**:** RAC-alfa serin / treonin protein kinaz 1
BÇ	**:** Baz çifti
BRG1	**:** Brahma – ilişkili protein 1
BMP-4	**:** Kemik morfojenik protein – 4
CABLES1	**:** Cdk5 ve Abl enzim substrat 1
CBG	**:** Kortikosteroid bağlayıcı globulin
CDH-1	**:** Kaderin – 1
CDK:	: Siklin bağımlı kinaz
CDK3	**:** Siklin bağımlı kinaz 3
CDKN2A	**:** Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A (p16)
CH	**:** Cushing hastalığı
CpG	**:** Sitozin-fosfat-guanin bölgeleri
CRH	**:** Kortikotropin salgılayıcı hormon
DNMT	**:** DNA metiltransferaz
DUB	**:** Deubikutinleştirici
DX	**:** Deksametazon
EGFR	**:** Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ESCRT	**:** Taşıma için gerekli endozomal kompleksler

FDA **:** Food and Drug Administration – Gıda ve İlaç İdaresi
FSH **:** Folikül stimülan (uyarıcı) hormon
GH **:** Büyüme (growth) hormonu
GZ-PZR **:** Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
HDAC2 **:** Histon deasetilaz 2
HPA **:** Hipotalamik Hipofiz-Adrenal eksen
IL-6 **:** İnterlökin 6
LH **:** Luteinleştirici hormon
MC2R **:** Melanokortin 2 reseptörü
MEN-1 **:** Çoklu (multiple) endokrin neoplazi tip 1
MS-PZR **:** Metillenme spesifik polimeraz zincir reaksiyonu
MVB **:** Multiveziküler gövde
NEUROD1 **:** Nöronal farklılaştırıcı 1
NF-κB **:** Nükleer faktör κB
NR4A1 **:** Nüklear reseptör 4.alt ailesi grup A üye 1
PKA **:** Protein kinaz A
PRL **:** Prolaktin
POMC **:** Proopiomelanokortin
RIPK1 **:** RIP reseptör etkileşimli serin / treonin kinaz 1
SOCS1 **:** Sitokin sinyal baskılayıcı 1 proteini
STAM2 **:** Sinyal iletme adaptörü molekülü 2
StAR **:** Steroidojenik akut regülatör proteini
SWI/SNF **:** SWItch / Sucrose non-fermentable
TBA **:** Temel Bileşen Analizi (PCA – Principle Component Analysis)
TNF-α **:** Tümör nekroz faktörü alfa
TSH **:** Tiroid stimülan (uyarıcı) hormon
Ub **:** Ubikutin
USP2 **:** Ubikutin Spesifik Peptidaz 2
USP8 : Ubikutin Spesifik Peptidaz 8
VP : Vazopressin
VPS28 **:** ESCRT-I altbirimi
WEE1 **:** Western Equine Ensefalit 1
WHO **:** Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ACTH SALGILAYAN HİPOFİZ ADENOMLARINDA GENETİK VE EPİGENETİK MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Nirva Sera KAYACAN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Programı

Danışman : Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK SEZGİN

II. Danışman : Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI

Cushing hastalığı (CH), vücudun fazla miktarda glukokortikoidlere maruz kalmasından dolayı meydana gelen nadir görülen bir hastalıktır. İnsan hipofiz adenomları ile ilgili yapılan birçok çalışma, Cushing hastalığının çeşitli genetik ve epigenetik faktörlerin etkisi altında olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada ACTH salgılayan hipofiz adenomlarının gelişimi üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak amacıyla *USP8* ve *CABLES1* ile ilişkili genlerden *USP2, STAM2, VPS28, HDAC2, IL-6, BRG1, EGFR, WEE1, p16, SİKLİN D1, NR4A1, NEUROD1* ve *RIPK1*'in gen ifadeleri ile *USP8* ve *p16* genlerinin metillenme düzeyleri araştırıldı. Endokrinoloji ve Metabolizma Polikliniğine başvuran ve CH tanısı konan, ardından Beyin Cerrahisi kliniğinde ameliyat olan hastalardan elde edilen dokular ile çalışıldı. Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden sağlanan 32 hasta ile 15 kontrol dokusu kullanıldı. Parafine gömülü dokulardan alınan yaklaşık 10 mikronluk kesitlerden DNA ve RNA izole edildi. RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı, genlerin ifadesi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) yöntemi ile analiz edildi. Sonuçlar $^{2-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak analiz edildi. Elde edilen tüm veriler IBM

SPSS Statistics 21 programı kullanılarak incelendi. *CABLES1* ve *NR4A1* ($p<0,05$) ile *SİKLİN D1*, *USP2*, *NEUROD1* ve *WEE1* ($p<0,005$) gen ifadelerinin istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği tespit edildi. Gendeki metillenme durumunu incelemek amacıyla parafine gömülü bloklardan elde edilen genomik DNA'ya Bisülfit Modifikasyonu uygulandı. Çalışma sonucunda *p16* geninde kısmi metillenme olduğu, *USP8* geninde ise metillenme olmadığı saptandı. *p16* metillenme durumunun Cushing hastalığında önemli bir role sahip olabileceği görüldü. Gen ifadelerinin birbirleri ile ilişkisini anlamaya yönelik olarak yapılan Spearman korelasyon testi ve Temel Bileşen Analizi sonucunda, *USP2*, *CABLES1*, *p16* ve *WEE1* genlerinin Cushing hastalığının etyopatogenezinde daha etkili olabileceği düşünüldü.
Aralık 2022 , 123. sayfa.

Anahtar kelimeler: Cushing, ACTH, hipofiz adenomu

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION OF GENETIC AND EPIGENETIC MECHANISMS IN ACTH-SECRETING PITUITARY ADENOMAS

Nirva Sera KAYACAN

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Medical Biology

Supervisor : Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK SEZGİN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI

Cushing's disease (CD) is a rare disease caused by the body's exposure to excessive amounts of glucocorticoids. Many studies on human pituitary adenomas suggest that CD is under the influence of various genetic and epigenetic factors. In this study, we investigated the gene expression of *USP8* and *CABLES1*-related genes *USP2, STAM2, VPS28, HDAC2, IL-6, BRG1, EGFR, WEE1, p16, CYCLIN D1, NR4A1, NEUROD1* and *RIPK1* and the methylation levels of *USP8* and *p16* genes to reveal their effects on the development of ACTH-secreting pituitary adenomas. Tissues obtained from patients who were admitted to the Endocrinology and Metabolism Outpatient Clinic, diagnosed with CD and then operated in the Neurosurgery Clinic were used. Thirty-two patients and 15 control tissues obtained from the archive of the Department of Medical Pathology were used. DNA and RNA were isolated from approximately 10 micron sections of paraffin-embedded tissues. cDNA was synthesized from RNA samples and gene expression was analyzed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. All data obtained were analyzed using IBM SPSS

Statistics 21 program. *CABLES1* and *NR4A1* ($p<0.05$), *CYCLIN D1*, *USP2*, *NEUROD1* and *WEE1* ($p<0.005$) gene expressions showed statistically significant differences. Bisulfite Modification was applied to the genomic DNA obtained from paraffin-embedded blocks to examine the methylation status of the gene. As a result of the study, partial methylation was found in the *p16* gene and no methylation was found in the *USP8* gene. *p16* methylation status may have an important role in CD. As a result of the Spearman correlation test and Principal Component Analysis performed to understand whether the gene expressions were related to each other, it was thought that *USP2*, *CABLES1*, *p16* and *WEE1* genes may be more effective in the etiopathogenesis of Cushing's disease.

December 2022, 123 pages.

Keywords: Cushing, ACTH, pituitary adenoma

1. GİRİŞ

Hipofiz bezi, merkezi sinir sistemi-hipotalamus-hipofiz aksı üzerinden vücut için gerekli olan birçok farklı hormonun salgılanmasını ve düzenlenmesini kontrol eden yaşamsal bezdir. Adenohipofiz (hipofiz ön lobu) ve nörohipofiz (hipofiz arka lobu) olmak üzere embriyolojik dönemde iki farklı yapıdan gelişmektedir (El Sayed ve diğ., 2021). Adenohipofiz, hormon sentez ve salgılanmasının yapıldığı ana bölgedir. Hipofiz bezinin embriyogenezi sırasında çeşitli transkripsiyon faktörlerinin kontrolü altında farklılaşarak gonadotrop, somatotrop, laktotrop, tirotrop ve kortikotrop olarak adlandırılan beş farklı hücre grubunu meydana getirmektedir (El Sayed ve diğ., 2021; Rawindraraj ve diğ., 2022).

Genellikle beynin sellar ve parasellar bölgesinde görülen hipofiz adenomları, primer beyin tümörlerin yaklaşık %10-15'inden sorumludur (Lim ve Korbonits, 2018). Büyüme hormonunun fazla salınması sonucunda akromegali, prolaktin hormonunun fazla salınması sonucunda prolaktinoma, ACTH hormonun fazla salınması sonucu Cushing hastalığı ve sessiz hipofiz adenomları olarak adlandırılan fonksiyonel olmayan hipofiz adenomları ortaya çıkmaktadır (Lim ve Korbonits, 2018; Tatsi ve Stratakis, 2019).

Harvey W. Cushing tarafından tanımlanan Cushing hastalığı, vücudun fazla miktarda kortizole maruz kalmasından dolayı meydana gelen, Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal (HPA) eksen ve sirkadyen ritimdeki bozulmalar ile ortaya çıkan çok sistemli nadir görülen kompleks bir hastalıktır (Albani ve diğ., 2018). ACTH salgılayan hipofiz adenomu olarak da adlandırılan Cushing hastalığının oluşumuna ve tedaviye rağmen yeniden nüks etmesine neden olan moleküler mekanizmalar halen tam olarak çözülememiştir. Gen ifadelerinde meydana gelen değişimlerle birlikte DNA metillenmesi, asetillenme, histon modifikasyonları, nükleozomların yeniden biçimlenmesi ve RNA aracılı hedeflemeyi içeren epigenetik değişikliklerin Cushing hastalığının oluşumunda rol oynayabildiği söylenmektedir (Fukuoka ve Takahashi, 2014; Chang ve diğ., 2020).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda hipofiz adenomlarında sıklıkla *AIP*, *Siklin 1*, *BMP-4* ve *MEN1* ifade değişimleri ile *BMP-4* mutasyon varlığı tespit edilmiştir (Niyazoglu ve diğ., 2014). Kortikotropik tümörlerden elde edilen doku örneklerinde, Siklin D1, Siklin E, EGFR, p16, p21, p27/Kip1, p14, PTTG gibi hücre döngüsü düzenleyicileri, çeşitli transkripsiyon faktörleri ve hücre sinyalleşmesinde etkili olan reseptörlerin gen ve protein düzeyinde birtakım

değişiklikler olduğu da saptanmıştır (Dong ve diğ., 2018). Ayrıca, *CDK1, P18, RB1, ZAC1, GADD45, FGFR2, WIF1, MEG3A, PTAG* ve *RASSF1A* genlerinin promotör bölgelerinde meydana gelen metillenmelerin de hipofiz adenomu oluşumuna katkısı gösterilmiştir (Vandeva ve diğ., 2010; Hauser ve diğ., 2019).

Son zamanlarda, bu hastalığın gelişmesinde etkili olabileceği düşünülen *USP8* ve *CABLES1* genleri tespit edilmiştir (Albani ve ark., 2018). *CABLES1* (Cdk5 ve ABL enzim substratı 1), siklin bağımlı kinazların aktivitesini arttırarak hücre çoğalmasını kontrol eden bir gendir. *CABLES1* ifadesinin kortikotrop adenomlarının yaklaşık %55'inde kaybolduğu gösterilmiştir. 14-3-3 ve β-katenin ile ilişkiye girerek hücre döngüsünde önemli rol üstlenen CABLES1, farklı kanser türlerinin gelişiminde de etkilidir (Huang ve diğ., 2017). *USP8* ise ubikutine özgü proteaz kodlayan bir gendir. USP8, hücre içerisinde çeşitli proteinlerin yıkılmasını önleyebilen ve proteinleri yeniden hücre membranına yönlendirebilen deubikitinleştirici bir enzimdir (Reincke ve diğ., 2015). ACTH salgılayan hipofiz adenomlu hastaların %35-62'sinde, *USP8* geninde saptanmıştır. USP8'in görevini yerine getirmesindeki en önemli substratı EGFR'dir. Mutant USP8'in hücre içi EGFR protein miktarını arttırdığı, bu duruma bağlı olarak da ACTH salgılanmasında öncü olan proopiomelanokortin (POMC) seviyelerinde artış meydana geldiği gözlenmiştir (Ma ve diğ., 2015; Reincke ve diğ., 2015). USP8'in mutasyon haricinde gen ifadesi değişimleri ile Cushing hastalığı arasında şimdiye kadar bir çalışma bildirilmemiştir.

Hipofiz adenom tümörogenezi, farklı genetik ve epigenetik mekanizmaların rol aldığı karmaşık bir süreçtir. Pek çok tümör baskılayıcı gen, onkogen, hücre döngüsü genleri, transkripsiyon faktörleri, çeşitli mutasyonlar, epigenetik düzenleyicileri ve mikroRNA'ların bu süreçte yer aldığı tanımlanmış olsa da, Cushing hastalığının moleküler temeli halen tam olarak aydınlatılamamıştır.

Son yıllarda, ACTH salgılayan hipofiz adenomlarının gelişmesinde etkili olduğu ileri sürülen USP8 ve CABLES1'in, Cushing hastalığının gelişim mekanizmaları ve bu genlerin hastalığın gelişimi ile ilişkili farklı genlerle olası etkileşimleri üzerine daha önce yapılmış az sayıda çalışma vardır (Ma ve diğ., 2015; Perez-Rivas ve diğ., 2015; Theodoropoulou ve diğ., 2015; Hayashi ve diğ., 2016; Roussel-Gervais ve diğ., 2016; Faucz ve diğ., 2017; Hernandez-Ramirez ve diğ., 2017).

Bu çalışmada, bu iki gen dikkate alınarak biyoinformatik veri tabanında (*STRING*) kullanılarak yapılan araştırma sonucunda birbirleriyle etkileşim halinde olduğu saptanan, Cushing hastalığının etyopatogenezinde rol alabileceği düşünülen 15 genin (*USP8, USP2,*

STAM2, VPS28, CABLES1, EGFR, p16, SİKLİN D1, WEE1, RIPK1, IL-6, NEUROD1, NR4A1, BRG1, HDAC2) ifadeleri, ayrıca *USP8* ve *p16* genlerinin metillenme profilleri incelenmiştir. Bu çalışma ile Cushing hastalığının altında yatan gen ve/veya gen gruplarının tespiti ile hastalığın gelişiminde etkili olan olası moleküler yolakların ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. HİPOFİZ BEZİ

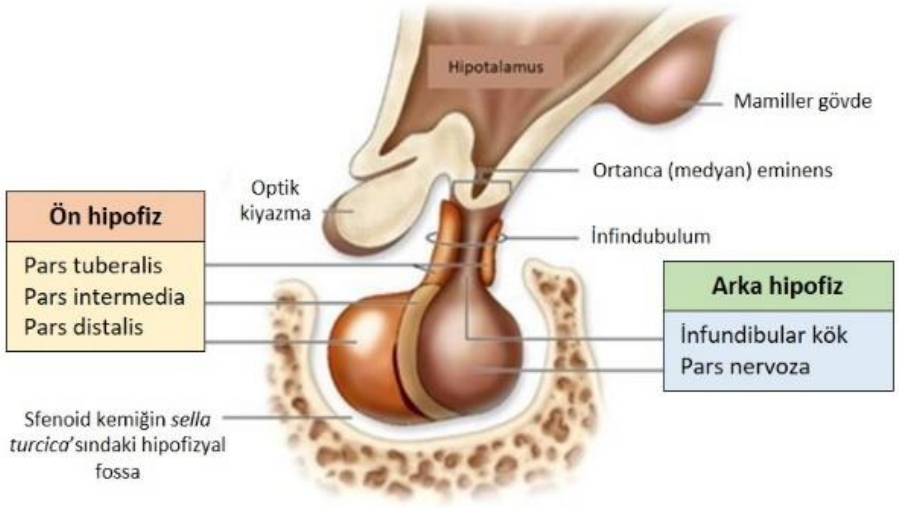
Hipofiz bezi, 0,5 – 0,6 gr ağırlığında ve yaklaşık 1,2 ve 1,5 cm çapında olup kafatasının tabanında yer alan "*sella turcica*" adlı bölgede bulunmaktadır (Melmed, 2002).

2.1.1. Hipofiz Bezi Embriyolojisi ve Yapısı

Hipofiz, embriyolojik evrede iki farklı yapıdan gelişen bir bezdir. Rathke kesesi olarak adlandırılan ektodermal bir yapıdan, hipofiz bezi ön lobu (adenohipofiz) ve diensefalon tabanından oluşan hipofiz bezi arka lobu (nörohipofiz) özelleşmektedir. Adenohipofiz, oral ektodermden köken alırken; nörohipofiz, nöroektodermden köken almaktadır (Amar ve Weiss, 2003; Perez-Castro ve diğ., 2012; Barkhoudarian ve Kelly, 2017).

Adenohipofiz, oral ektodermden köken alan, pars tuberalis, pars distalis ve pars intermediadan oluşan glandüler bir yapıdır. Gelişimine bağlı olarak, Rathke kesesinin ön duvarındaki hücresel proliferasyon sonucunda pars distalis ortaya çıkar. Bu oluşumdan sonra çoğalan hücreler infindibulumun etrafını sararak pars tuberalisi oluşturur. Kordonlaşmaya başlayan hücreler de kan damarlarının gelişmesi ile birlikte sinüzoidleri meydana getirir (Lamacz ve diğ., 1991).

Nörohipofiz, nöroektodermden köken alan bir sinir dokusu yapısıdır. Bu bölgedeki ince bir oluşum pars intermedianın gelişimini sağlamaktadır. Aralarında anastomozlar yaparak önceki yapılarını kaybeden hücre kordonları adenohipofizin parankimini meydana getirir. İnfindubulumdan infindibular kök, median eminens ve pars nervoza oluşur. Nöroepitelyal hücrelerin çoğalmasıyla birlikte infindibulum duvarı kalınlaşır (Şekil 2.1). Ardından bu hücreler pituisitlere (hipofiz hücreleri) farklılaşmaya başlar. Hipotalamik alandan nörohipofiz içine doğru sinir fibrilleri uzanır (Amar ve Weiss, 2003; Rosso ve Mienville, 2009; Barkhoudarian ve Kelly, 2017).



Şekil 2.1: Hipofiz Bezi Yapısı (Barkhoudarian ve Kelly, 2017)

Embriyonik evrenin 20. haftasında Hipotalamus-hipofiz aksı sistem dolaşımı oluşur. 8. haftada adrenokortikotropik hormon (ACTH) üreten hücreler, 9. haftada glikoprotein yapıdaki hormonların alt birimleri, 12. haftada ise Tiroid Stimulan Hormon (TSH), Folikül Stimulan Hormon (FSH), Luteinleştirici Hormon (LH) beta alt birimleri, 13.-16. haftalar arasında ise Prolaktin (PRL) hücreleri saptanmaya başlar (Hiller-Sturmhöfel ve Bartke, 1998; Perez-Castro ve diğ., 2012).

2.1.2. Hipofiz Bezi Fizyolojisi

Merkezi sinir sistemi hipotalamus-hipofiz aksı ile hormon sentezini sağlayarak homeostazın (iç denge) düzenlenmesine katkıda bulunur. Hipotalamus, hipofiz bezi üzerinden salgılamış olduğu hormonlar ile vücudun dengesini sağlayan bir yapıdır. Hipofiz bezinden salgılanan hormonlar hedef yapılara doğrudan etki ederken, diğer bir kısmı ise endokrin bezlerde hormon üretimini kontrol eder. Fizyolojik fonksiyonların kontrolünü sağlamak için hipotalamusun kontrolü altında hipofiz bezinden 8 adet hormon salgılanır.

Vücudun metabolik kontrolünü düzenleyen altı hormon, adenohipofizde yer alan beş farklı hücre grubundan salgılanmaktadır (Şekil 2.2) (Perez-Castro ve diğ., 2012; El Sayed ve diğ., 2022; Rawindraraj ve diğ., 2022).

Büyüme hormonu (growth hormone-GH): Adenohipofizdeki somatotrop hücreler tarafından sentezlenen bir hormondur. Doğum sonrasında büyüme ve gelişmeyi uyaran, vücut ve kemik kitlesini koruyan, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasını etkileyen bir hormondur.

Adrenokortikotropin (adrenocorticotropic hormone-ACTH): Adenohipofizdeki kortikotrop hücreler tarafından sentezlenir ve hedef dokusu adrenal kortekstir. Adrenal korteksin büyümesi ve steroid hormonlarının salgılanmasını düzenleyen bir hormondur.

Tiroid stimulan hormon (thyroid stimulating hormone-TSH): Adenohipofizde yer alan tirotrop hücreler tarafından salgılanarak, tiroid bezinin büyümesini ve metabolizmasını düzenler.

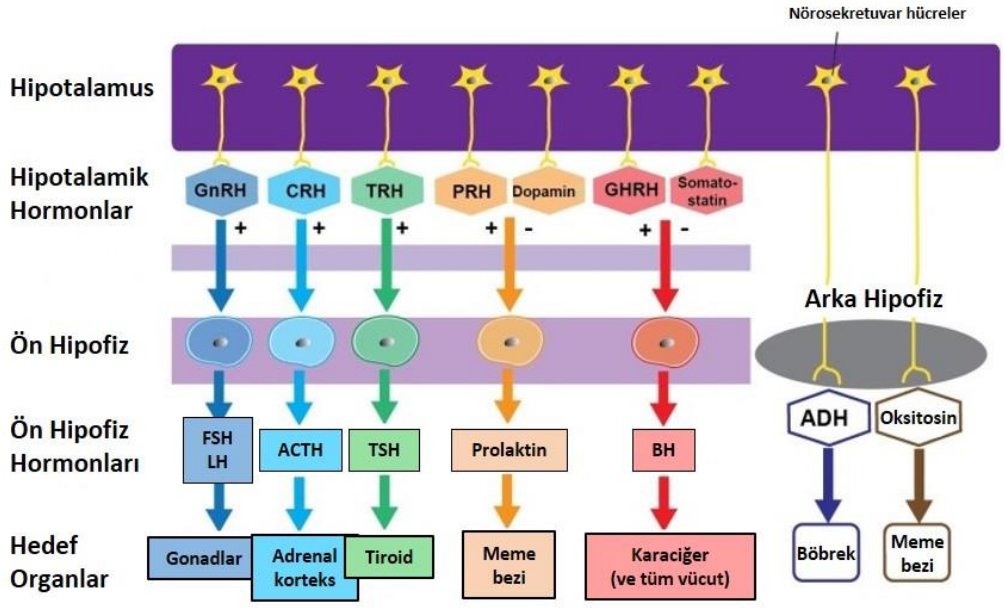
Prolaktin (prolactine-PRL): Adenohipofizde yer alan laktotrop hücrelerden salgılanan, meme gelişimi ve süt üretimini kontrol eden bir hormondur.

Folikül stimülan hormon (follicule stimulating hormone-FSH) ve Luteinizan hormon (luteinizing hormone-LH): Adenohipofizdeki gonadotrop hücrelerden salgılanan FSH ve LH; büyüme, gelişme, seksüel olgunlaşma, üreme ve steroid sentezinin düzenlenmesini sağlayan hormonlardır.

Hipotalamustan sentezlenen hormonlar ise sinüzoidler aracılığıyla nörohipofizden dolaşıma katılırlar.

Antidiüretik hormon (antidiuretic hormone-ADH/vasoporessin): Vücuttaki su miktarının düzenlenmesini sağlar ve kan basıncını kontrol eder.

Oksitosin: Doğum esnasında uterus kaslarının kasılmasına yardımcı olur, doğum sonrasında da meme bezlerinden süt çıkışını kontrol eder.



Şekil 2.2: Hipofiz bezinden salgılanan hormonlar ve hedef organları (Rawindraraj ve diğ., 2022)

2.2. HİPOFİZ ADENOMU

2.2.1. Hipofiz Adenomu Epidemiyolojisi

Hipofiz adenomları, primer beyin tümörlerinin yaklaşık %10-15'ini oluşturur. Epidemiyolojik tahminlere göre yıllık insidansı 8,2-14,7/100.000 vakadır. Yapılan çalışmalar toplam nüfusun %20-25'inde hipofiz mikroadenomlarının bulunduğunu göstermiştir. 30-60 yaş arası gruplarda yüksek oranda fonksiyonel olmayan adenomlar görülmesine rağmen, daha genç yaş gruplarında genellikle fonksiyonel tümörler ortaya çıkmaktadır. Hipofiz adenomları özellikle pediatrik beyin tümörlerinin yaklaşık %2'sini oluşturmakta ve yetişkinlere göre çocukluk döneminde hormon aktivitesi gösteren küçük boyutlu tümörler olarak saptanmaktadır (Lake ve diğ., 2013; Chin, 2020).

Cerrahi seriler incelendiğinde, pre-menopoz evresindeki kadınlarda daha fazla adenom oluşumu tespit edilmiştir. Bu olguların yaklaşık %3'ünün çoklu endokrin neoplazi tip 1 (*MEN-1*) sendromlu olduğu görülmüştür. MEN1 Sendromu haricindeki adenomlar, Aril hidrokarbon reseptör etkileşimli protein (*AIP*) geni ile ilişkili olduğu öne sürülen "Familial Isolated Pituitary Adenoma (FIPA)" olarak adlandırılmaktadır (Beckers ve diğ., 2013).

2.2.2. Hipofiz Adenomlarının Patolojisi

Hipofiz adenomları, en çok sellar ve parasellar bölgede görülen iyi huylu tümörlerdir. Hipofiz bezinin %80'ini oluşturan adenohipofiz, hormon sentez ve salınımının sağlandığı asıl bölgedir. İşlevsel ve yapısal olarak bez içerisinde topografik bir dağılım gösteren somatotrop, laktotrop, kortikotrop, tirotrop ve gonadotrop olarak adlandırılan beş farklı salgılayıcı hücre tipini içerir. Hipofiz bezine yatay kesi (insizyon) yapıldığı zaman iki adet lateral (yanal) kanat ve ikizkenar bir santral (merkezi) kanat görülmektedir. GH salgılayan hücreler özellikle lateral kanadın ön yüzeyine yakın olan kısımda çok fazla sayıda bulunur ve GH salgılayan mikroadenomlar bu bölgeden köken alır. PRL salgılayan hücreler genellikle bezin lateral kanadının arka tarafında, posterior loba komşu kısımda yer alır ve prolaktinomalar bu bölgeden köken alır. Santral kanadın ön kısmında küçük bir alanda yerleşik olan tirotrop hücreler, TSH salgılayan adenomların ana merkezidir. ACTH salgılayan kortikotrop hücreler merkezi kanatta arka lobun hemen önünde yer alır ve burası kortikotropinomların köken aldığı merkezdir. Gonadotrop hücreler anterior lobta bulunarak FSH ve LH salgılarlar, herhangi bir topografik yerleşim yeri yoktur. Makroskobik olarak incelendiğinde, hipofiz adenomları normal hipofiz bezi yapısından farklı olarak sarı-gri renkte, daha yumuşak ve kremsi bir yapıda gözlenirler. Adenomların en önemli karakteristik özelliği, hücresel monomorfizm ve asiner organizasyonun

olmamasıdır. Retiküler fiberler gümüşle boyanarak adenomlardaki asiner düzenin kaybı ortaya çıkarılır (Ezzat ve diğ., 2004; Osamura ve diğ., 2008; Dworakowska ve diğ., 2011).

2.2.3. Sınıflandırma

Hipofiz adenomları endokrin aktivite, boyut, sitoplazmik boyanma özellikleri, histolojik özellikler, hormon sentezi, yapısal özellikler ve büyüme paterni vb. gibi özelliklere göre sınıflandırılmıştır (Trouillas ve diğ., 2020; Liu ve diğ., 2021).

Patolojik Sınıflandırma: Hipofiz adenomlarının, asidofilik, bazofilik ve kromofobik olacak şekilde sitoplazmik boyanma özelliklerine göre sınıflandırılmasıdır. Kromofobik tümörler hormon inaktif olup boyanmazlar. GH salgılayan adenomlar asidofilik, ACTH salgılayan adenomlar ise bazofiliktir.

İmmünhistokimyasal/Elektron Mikroskobik Sınıflandırma: Hipofiz adenomu sınıflaması için altın standart metot olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemle tümör hücrelerindeki salgı granüllerinin içerisinde depolanan hipofiz hormonları belirlenmektedir. Elektron mikroskobu ile salgı granüllerinin üç boyutlu yapısı ve hormonal içerikler hakkında detaylı inceleme yapılabilmektedir.

Boyutsal Sınıflandırma: Tümör boyutuna göre makroskobik olarak yapılır. Makroadenomlar ve mikroadenomlar olarak iki tipe ayrılmakta ve eşik değer 1 cm olarak kabul edilmektedir.

Mikroadenom	<1 cm
Makroadenom	>1 cm

Fonksiyonel Sınıflandırma: Adenomlardaki hormon sentezi ile histolojik ve yapısal özelliklerin birlikte değerlendirilmesine dayanan klinik için güvenli bir sınıflama türüdür.

Fonksiyonel Adenomlar	Cushing hastalığı
	Akromegali
	Hipertiroidizm
	Hiperprolaktinemi
	FSH/LH yüksekliği
Fonksiyonel Olmayan Adenomlar	
Fonksiyon Durumu Bilinmeyen Adenomlar	

Hardy Sınıflandırması: Hipofiz adenomlarının büyüme karakterleri, hacimleri ve invazyon durumlarına göre yapılan radyolojik bir sınıflama sistemidir.

Grade 0	<1 cm çap, normal sella
Grade I	<1 cm çap, sellada küçük değişiklikler, intrapitüiter adenom
Grade II	>1 cm çap, genişleyen sella, intrasellar adenom
Grade III	>1 cm çap, genişleyen sella, diffüz adenom
Grade IV	>1 cm çap, kemik yapılarda ekstansif destrüksiyon, invaziv adenom

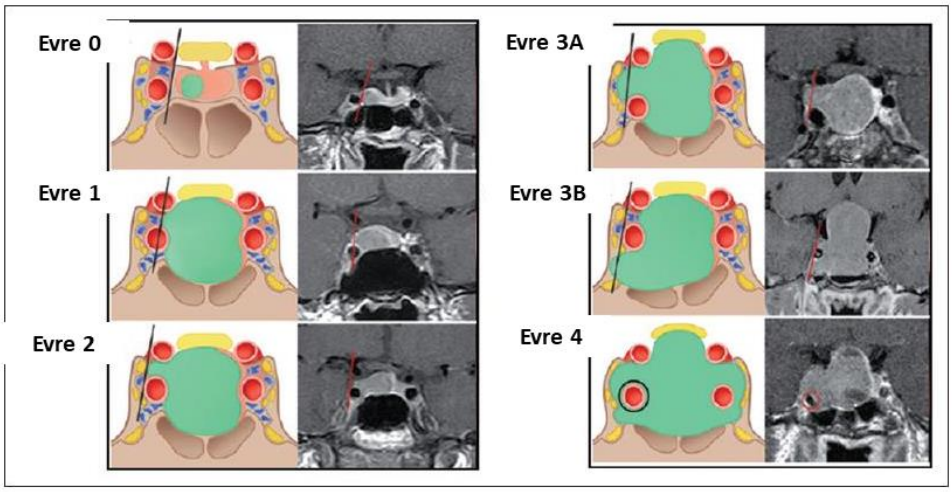
Vezina Sınıflandırması: Hipofiz adenomlarında sella görünümüne göre yapılan radyolojik bir sınıflandırmadır.

Evre I	Sella tabanı sağlam olup, sella normal sınırlar içerisindedir, tabanda incelme ve kabarıklık gözlenebilmektedir
Evre II	Sella asimetrik bir şekilde genişler
Evre III	Sella normal büyüklükte veya genişlemiştir
Evre IV	Sellanın kemik duvarı destruksiyona uğrar, sfenoid sinüs tümör dokusu ile dolar ve klivus kavernöz sinüse yayılır

Suprasellar Bölgeye Göre Sınıflandırma: Sellar uzanımlarına göre makroadenomların daha ileri düzeyde sınıflamasıdır.

Simetrik	
A	Sadece suprasellar sisterne büyümüş
B	3. Ventrikül reseslerine uzanmış
C	3. Ventrikül anteriorunun tamamını doldurmuş
Asimetrik	
D	İntrakranial intradural, anterior, medial, posterior
E	ekstrakranial, ekstradural (lateral kavernöz)

Knosp Evrelemesi: Adenomların kavernöz sinüs invazyonu ve parasellar uzanımına göre yapılan radyolojik sınıflamasıdır (Şekil 2.3) (Knosp ve diğ., 1993).



Şekil 2.3: Knosp Evrelemesi (Knosp ve diğ., 1993)

Evre 0: Adenom internal karotid arterin medialinden geçen hattı aşmaz, Evre 1: Adenom medial hattı geçer ama medyan hattı (interkarotid) aşamaz, Evre 2: Adenom interkarotid hattı geçer fakat lateral hattı aşamaz, Evre 3: Adenom lateral hattı aşar, 3A: Adenom lateral hattın dışına internal karotid arterin superiorundan uzanır, 3B: Adenom lateral hattın dışına internal karotid arterin inferiorundan uzanır, Evre 4: Adenom internal karotid arteri çepeçevre sarar.

WHO Sınıflandırması: Evrensel olarak kabul edilmiş WHO (World Health Organization - Dünya Sağlık Örgütü)'nun sınıflandırmasıdır. Var olan sınıflandırmaları birleştirmeye çalışan, adenomların patolojik ve klinik yönleriyle ilgili bilgilerin özetini sunan beşli adenohipofizyal sınıflandırmadır.

- ✓ *WHO sınıflandırmasında bakılan kriterler;*

1. Hormonların salgılaması ve klinik tablosu
2. Büyüklük ve yaygınlık (Hardy grade)
3. Histolojik özellikler
4. İmmünhistokimya profili
5. Üç boyutlu alt tip

2.2.4. Hipofiz Adenomlarının Moleküler Genetiği

Hipofiz adenomları kendiliğinden (sporadik), kalıtsal (herediter) veya ailesel sendromlar şeklinde ortaya çıkabilir. Tümör oluşumunda onkogenler, tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsü genleri, mikro RNA'lar (miRNA'lar) ve epigenetik değişiklikler rol oynamaktadır (Şekil 2.4). DNA'nın yapısında doğrudan meydana gelen değişiklikler (delesyon, mutasyon, insersiyon vb.) ve epigenetik düzenlemenin bozulması, DNA metillenmesi-asetillenmesi, histon modifikasyonu, nükleozomların yeniden biçimlenmesi ve RNA aracılı hedeflemedeki bozukluklar, hücresel döngünün işleyişini bozarak tümör oluşumuna yol açmaktadır. Hücre döngüsü düzenlemesindeki anormallikler, hipofiz adenomlarının

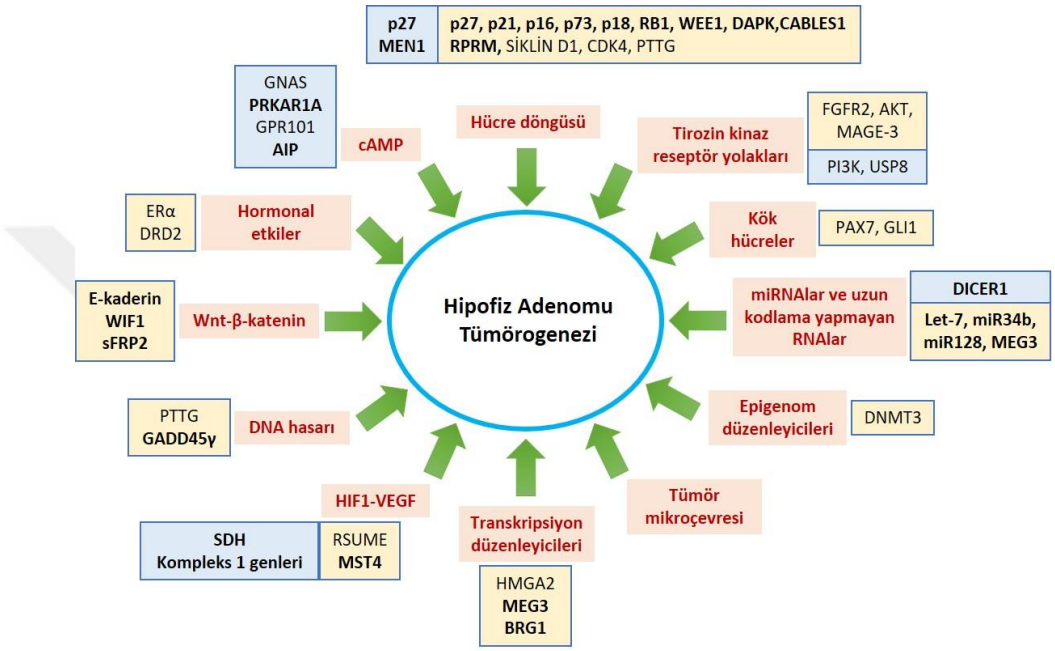
oluşumunda önemli bir role sahiptir. *p16* veya *p27* gibi siklin bağımlı kinaz (SBK-*CDK*) baskılayıcılarının kaybı veya *SİKLİN D* gibi CDK'lerin aşırı ifade edilmesi tümör gelişiminde rol oynamaktadır. İnsan hipofiz adenomlarının %80'inde en az bir hücre döngüsü düzenleyicisinde değişiklik olduğu tahmin edilmektedir. Tümörlerde; *Siklin 1*, aril hidrokarbon reseptörü etkileşimli protein (*AIP*), kemik morfojenik protein-4 (*BMP-4*), kaderin-1 (*CDH1*) ve sitokin sinyal baskılayıcı 1 (*SOCS1*) genlerinde de değişiklikler gözlenmektedir. Son çalışmalar, *AIP* ve çoklu endokrin neoplazi tip 1 (*MEN1*) mutasyonlarının sporadik hipofiz adenomlarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Tablo 2.1) (Beckers ve diğ., 2013; Aflorei ve Korbonits, 2014; Caimari ve Karbonits, 2016).

Tablo 2.1: Hipofiz tümöründe etkin olduğu bilinen genler ve sebep oldukları değişiklikler (Caimari ve Karbonits, 2016)

Gen	Moleküler bozukluk	Hipofiz tümörü
RB1	Promoter metilasyonu, Rb ifadesinde azalma	Çeşitli hipofiz adenomları
Siklin D1 (CCND1)	Aşırı gen ifadesi	Somatotropinomalar
Siklin D3 (CCND3)	Aşırı gen ifadesi	Çeşitli hipofiz adenomları
Siklin E (CCNE)	Aşırı gen ifadesi	Kortikotropinomalar
Siklin A (CCNA1)	Aşırı gen ifadesi	Çeşitli hipofiz adenomları
p15Ink4b (CDKN2B)	Promoter metilasyonu, gen ifadesinde azalma	Çeşitli hipofiz adenomları
p16Ink4a (CDKN2A)	Promoter metilasyonu, gen ifadesinde azalma	Çeşitli hipofiz adenomları
p18Ink4c (CDKN2c)	Gen ifadesinde azalma	Çeşitli hipofiz adenomları
P21cip1a (CDKN1a)	Aşırı gen ifadesi	Çeşitli hipofiz adenomları
PTTG	Aşırı gen ifadesi	Çeşitli hipofiz adenomları
GADD-45	Promoter metilasyonu, gen ifadesinde azalma	Çeşitli hipofiz adenomları
FGFR2	Promoter metilasyonu, gen ifadesinde azalma	Çeşitli hipofiz adenomları
MAGE-A3	Hipometilasyon	Çeşitli hipofiz adenomları
BMP-4	Gen ifadesinde azalma	Prolaktinoma
EGFR	Aşırı gen ifadesi	Kortikotropinomalar
PKC	Aşırı gen ifadesi, nokta mutasyonları	İnvaziv büyüme
PIK3CA	Somatik mutasyonlar, gen amplifikasyonu	İnvaziv büyüme
RAS	Nokta mutasyonlar, gen amplifikasyonu	İnvaziv büyüme
PTAG	Promoter metilasyonu, gen ifadesinde azalma	Çeşitli hipofiz adenomları
ODC	Aşırı gen ifadesi	Somatotropinomalar Kortikotropinomalar
GNAS	İnaktive edici mutasyonlar	Somatotropinomalar (%40)
MEN1	İnaktive edici mutasyonlar, gen ifadesinde azalma	Tüm hipofiz adenomları
P27kip1 (CDKN1B)	Eşey hücre mutasyonları, gen ifadesinde azalma	MEN1-benzeri sendrom, Sporadik adenomalar
PRKAR1A	Eşey hücre mutasyonları	Somatolaktotrop hiperplazi
AIP	Eşey hücre mutasyonları	Sporadik adenomalar

Ayrıca, hipofiz tümörlerinin ortaya çıkmasında RB1, p14 (ARF), p15 (INK4b), p16 (INK4a), p21 (Waf1/Cip1), ve p27 (Kip1) proteinlerini kodlayan genlerin metillenmesi sonucunda hücre döngüsünün bozulduğunu, bunun da hipofiz tümörlerinin ortaya çıkma ihtimalini güçlendirdiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte, 20-22

nükleotidlik küçük moleküller olan ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde, hücre çoğalmasında, farklılaşmada ve apoptozda görev yapan miRNA'ların da hipofiz tümörlerinin ortaya çıkmasında ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda, miR-145, miR-21, miR-141, let-7a, miR-150, miR-15a ve miR-16 ifadesindeki azalmanın ve miR-122 ve miR-493 ifadesindeki artışın hipofiz tümörlerinin gelişmesinde rolü olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.4) (Caimari ve Karbonits, 2016).



Şekil 2.4: Hipofiz adenomlarının tümörogenezinde etkili olan genler (Caimari ve Korbonits, 2016)

Mavi kutular; kalın olanlar – tümör baskılayıcı genleri, diğerleri ise onkogenleri; Turuncu kutular, gen ifadesi değişimlerini göstermektedir.

2.2.5. Klinik Belirti ve Bulgular

Hipofiz adenomları, hormon salgılanmasındaki artış veya kitle oluşumunun etkisine bağlı olarak genelde 3 tip klinik bulgu ile ortaya çıkar. Amenore-galaktore sendromu, akromegali, sekonder hipertiroidizm ve Cushing hastalığı gibi klinik tabloların ortaya çıkmasına aşırı miktarda PRL, GH, TSH ve ACTH salınımı neden olmaktadır. Bu adenomların neredeyse %70 kadarı endokrin olarak aktiftir. Genellikle gonadotrop hücreler ilk olarak etkilenirken, tirotrop, somatotrop ve kortikotrop hücreler daha sonra etkilenmektedir.

Hipofiz adenomlarında baş ağrısı, kitle etkisine bağlı olarak görülen ilk semptomdur. Görülen bir diğer semptom da yine kitle etkisine bağlı olarak kendisini gösteren görme bozukluklarıdır.

Hipotalamusa yayılabilen suprasellular uzanımlı adenomlar, uyku, yeme-içme, duygu-durum, davranış vb. bozukluklara da yol açabilmektedir. Lateral ve 3. ventrikül içine doğru ilerleyen adenomlar nedeniyle sinir felci ve hidrosefali görülebilir (Banskota ve Adamson, 2021).

2.2.6. Hipofiz Adenomuna Bağlı Hastalıklar

2.2.6.1. Prolaktinom

En sık görülen hipofiz adenomudur. Gebelik ve laktasyonda fizyolojik süreçte rol alan PRL, meme gelişimi ve süt salgılanmasını uyarır. Normal değeri kadınlarda 10-25 ng/ml, erkeklerde ise 10-20 ng/ml olup, bu değerlerin üstü hiperprolaktinemi olarak kabul edilmektedir. Prolaktin salgılayan hücrelerdeki kontrolsüz hücre çoğalmasına bağlı olarak tümör gelişiminin ortaya çıktığı gözlenmektedir.

2.2.6.2. Somatotrop adenom

Aşırı miktarda büyüme hormonu salgılanmasına bağlı olarak oluşan bu adenomlar, akromegali hastalığının gelişmesine yol açmaktadır. Ergenlik öncesi artan GH miktarı devliğe (jigantizm), ergenlik sonrası dönemde ise akromegaliye neden olmaktadır. El ve ayaklarda, yumuşak dokularda büyüme, prognatizm, kilo artışı vb. bulgular, en sık görülen semptomlar arasında yer almaktadır.

2.2.6.3. Gonadotrop adenom

Bası bulgularıyla ortaya çıkan FSH ve LH salgılayan adenomlardır. Fonksiyonel olmayan adenom veya hiperfonksiyonel adenom olacak şekilde klinik belirti verir ve patogenezi hala tam olarak açıklanamamaktadır.

2.2.6.4. Tirotrop adenom

Aşırı miktarda TSH salgılayan ve genellikle makroadenom olan hipofiz adenomlarıdır. Kitle basısına bağlı olarak sinir felçleri, baş ağrısı, görme sıkıntısı, bununla birlikte guatr ve hipertiroidi semptomlarına da neden olmaktadır.

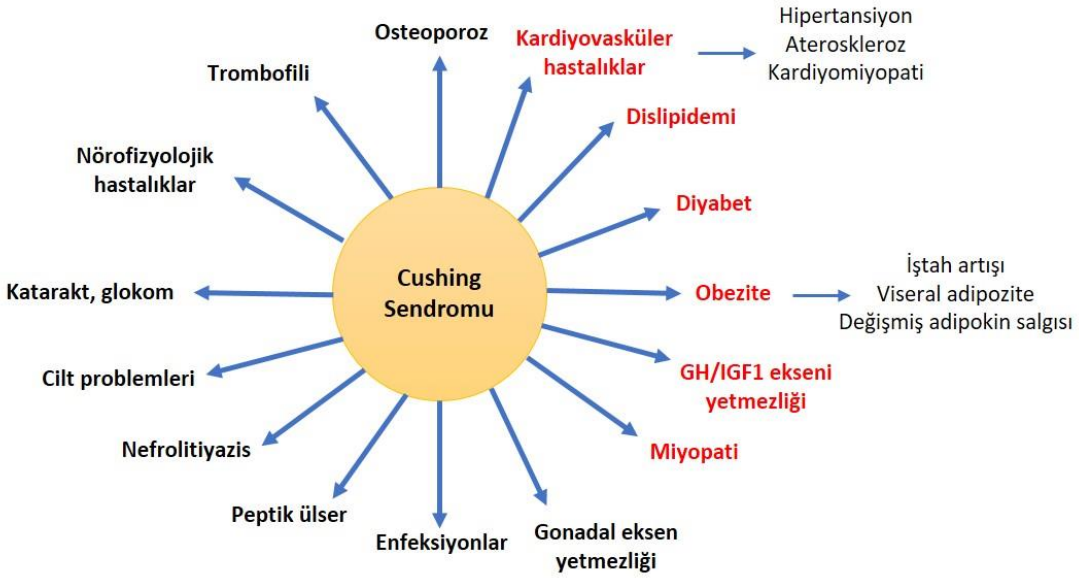
2.2.6.5. Kortikotrop adenom

Kortikotrop adenomlar, hipofiz adenomlarının yaklaşık %10-15'ini oluşturan ve yüksek miktarda ACTH salgılayan adenomlardır. Santral obezite, mor strialar, aydede yüz, bufalo ense gibi semptomlarla karakterizedir. Ayrıca yorgunluk, halsizlik, sekonder kas güçsüzlüğü ve proksimal miyopati de gözlenmektedir. %50'lik bir mortalite oranına sahip olan bu klinik tabloya "Cushing Hastalığı" adı verilmektedir (Mehta ve Lonser, 2017).

2.3. CUSHING HASTALIĞI

Dr. Harvey W. Cushing, 20. yüzyılın başlarında aşırı kortizol üretimine bağlı olarak hipofiz bezinde meydana gelen hormonal bir sendromu keşfetmiş ve bunu "*polyglandular sendrom* (*çoklu bez sendromu*)" olarak tanımlamıştır (Gunderman ve diğ., 2010). Günümüzde Cushing hastalığı (CH) olarak adlandırılan bu hastalık, ACTH salgılayan hipofiz adenomlarına bağlı olarak yüksek kortizol seviyesi sonucu ortaya çıkan çok sistemli nadir görülen kompleks bir hastalıktır (Bertagna ve diğ., 2009; Newell-Price, 2009; Gunderman ve diğ., 2010; Nieman, 2015; Cassarino ve diğ., 2017; Daniel ve Newell-Price, 2017).

Yaşam kalitesini ciddi oranda etkileyerek, toplum içerisinde mortalitenin artmasına neden olmaktadır. Şiddetli hiperkortizolizm durumunda hastalıkla ilgili bulgular da aynı şiddette ortaya çıkmaktadır. Özellikle proksimal kas güçsüzlüğü, karın gövde ve yüzde yağlanmış bölgeler en sık gözlenen bulgulardır. Genellikle jinekolojik (oligomenore, hirsiutizm, kısırlık), dermatolojik (kırmızı cilt, zayıf yara iyileşmesi, sivilce), ortopedik/romatolojik (kırıklar, düşük seviyede kemik mineralleri), kardiyovasküler (inme, miyokard enfarktüsü, pulmoner emboli), nörolojik (azalmış güç, baş ağrısı, hafıza kaybı ve hipertansiyon), metabolik (hipertansiyon, diyabet, dislipidemi), enfeksiyöz (immunsupresyon ile edinilmiş enfeksiyonlar), psikiyatrik (depresyon, kaygı, duygu-durum değişikliği), yorgunluk, sırt ağrısı, kilo artışı gibi birçok problem ve şikâyetler görülmektedir (Şekil 2.5) (Ferrau ve Korbonits, 2015; Nieman, 2015).



Şekil 2.5: Cushing hastalığı ko-morbiditeleri (Ferrau ve Korbonits, 2015)

Cushing hastalığı, çocukluk çağı olmak üzere her yaşta görülse de genellikle 20-40 yaşları arasında ortaya çıkmaktadır. Adrenal bezlerdeki tümör gelişimine bağlı olarak ortaya çıkan aşırı kortizol, kadınlarda erkeklere oranla üç kat daha fazladır ve özellikle hastaların neredeyse %70'inde hipofiz bezinden aşırı miktarda ACTH hormonu üretilmektedir. Çocuklarda ise Cushing hastalığının %65'i adrenal bezlerden kaynaklanmaktadır (Nieman, 2018).

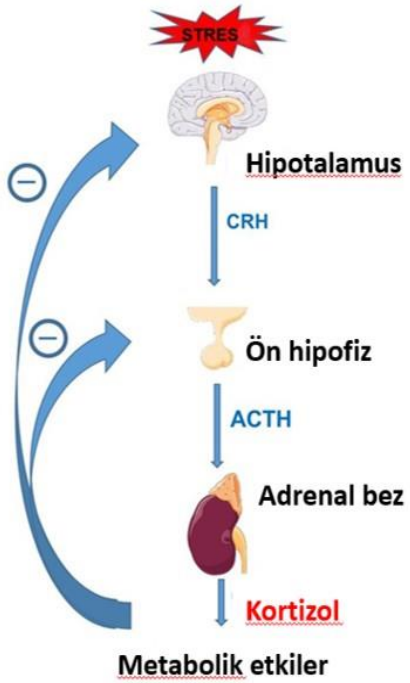
Çocuklarda trunkal obezite, yavaş büyüme, stria, hipertansiyon ve hirsiutizm ile karakterizedir. Çoğunlukla glukokortikoidlerin eksojen uygulanmasından kaynaklanır, ayrıca endojen Cushing hastalığı çocuklarda çok nadir gözlenmektedir. Endojen Cushing hastalığının genel insidansı yılda 1 milyon kişide yaklaşık 2-5 yeni vaka olup, bunların yaklaşık %10'u çocuklarda görülmektedir. Endojen Cushing hastalığının çocuklarda en sık görülme nedeni, 7 yaş üstü tüm vakaların yaklaşık %75'ini oluşturan bir hipofiz adenomu veya Cushing hastalığından kaynaklanan ACTH aşırı üretilmesidir. 7 yaşın altındaki çocuklarda, bilateral hiperplazi, adenom veya karsinom çocukluk çağı sendrom nedenlerinin %15'ini oluşturur. Ektopik ACTH ve kortikotropin salıcı hormon (CRH) üretimi, ergenlerde olguların %1'inden azını oluşturan Cushing hastalığının nadir bir nedenidir. Bronşlardaki karsinoid tümörler, pankreas veya timüs, akciğer karsinoması, ektopik ACTH kaynaklarıdır (Nieman, 2018).

Cushing hastalığında yeni genetik değişiklikler tespit edilmeye devam etmektedir. Bu farklı genetik nedenlerin doğal geçmişleri hakkındaki bilgiler, hastalar ve aileleri için önemli etkiler oluşturmaktadır. Çocuklarda görülen Cushing hastalığı için yeni tedavi yöntemleri geliştirilmektedir (Lodish, 2015).

Cushing hastalığı, glukokortikoidlerin aşırı ve kronik olarak salınması sonucu Hipotalamus-Hipofiz-Adrenal (HPA) eksen ve sirkadyen riitmdeki bozulmalar ile ortaya çıkmaktadır. HPA eksen, fizyolojik geri bildirimin kontrolü ile hipotalamusta CRH, anterior hipofizde ACTH (kortikotropin) ve adrenal kortekste kortizol sentezinin kontrolünü sağlamaktadır. Sirkadyen ve stres girdileri, hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinde CRH (paravasküler) nöronlarının aktivitesini değiştirir. CRH sentezleyen birçok hipotalamik nöron, aynı zamanda vazopressini (VP) sentezler. Bu hipofizyotropik sinirlerden CRH ile birlikte artan vazopressin salınımı, çeşitli uyaranlara karşı tam bir ACTH cevabı vermesi için gereklidir. Portal kan damarlarındaki CRH ve VP, ön hipofize girer ve ön hipofizdeki kortikotrop hücrelerinin aktivitesini uyararak geniş öncü molekül olan proopiomelanokortin (POMC)'i sentezler. Hipofiz kortikotropları, POMC'nin post-translasyonu ile ACTH üretirler ve böylece ACTH hipofiz kılcal damarlar içerisine salınır. ACTH, kortizol üretecek şekilde adrenal

korteksi uyarır. Kortizol, taşıyıcı proteinlere bağlandığı plazma bölgesinden serbest formda adrenal korteksten salınır. Kortikosteroid bağlayıcı globulin (CBG), karaciğer tarafından üretilen yüksek özgünlükte – düşük kapasiteli bir bağlanma proteinidir. Kortizol, aynı zamanda plazmada albumine bağlanır. Kortizolün çoğu (%95), plazmada CBG'ye bağlıdır. Kortizol, hedef dokuya yayılmak ve glukokortikoid veya mineralokortikoid reseptörüne bağlanmak için hedef dokunun kılcal damarlarındaki CBG'den ayrılmalıdır. HPA ekseninin fizyolojik ve klinik açıdan anlaşılabilmesi için en önemli nokta, kortizolün negatif geri bildirimidir. Asıl hedef, aşırı ACTH salgılanmasını önlemek ve stresli uyaranlara verilen yanıtları sona erdirmektir. Bu geri bildirim hem hipotalamusta, hem hipofiz seviyelerinde ve hem de merkezi sinir sisteminin diğer alanlarında gerçekleşmektedir (Briassoulis ve diğ., 2011; Raff ve Carroll, 2015; Lonser ve diğ., 2017).

ACTH'ın fazla üretilmesi adrenal korteksin uyarılmasını ve kortizolün salınmasını tetikler. Kortizol, taşıyıcı proteinlere bağlandığı plazma bölgesinden serbest formda adrenal korteksten salınır. Kortizol aynı zamanda plazma albümine de bağlanır. Kortizolün geri besleme mekanizması sayesinde ACTH'ın aşırı salınmasının önüne geçilmesi hedeflenir. Kortizol, bağışıklık sistemi (örn., iltihap önleyici ve bağışıklık baskılayıcı süreçler), karaciğer (örn., glukoneojenez), böbrekler (örn., elektrolit ve su dengesi), mide (örn., artan gastrik asit salgısı) ve kemikler (örn., azaltılmış kemik oluşumu) vb. çeşitli sistem ve organları etkilemektedir. Kandaki kortizol düzeyi, hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen aktivasyonu üzerindeki negatif geri bildirimi ile hem hipotalamus seviyesinde (CRH salınımında azalma) hem de hipofiz bezinde (ACTH salınımında azalma) kontrol edilmektedir (Smith ve Vale, 2006). Kortizol karaciğerde metabolize edilmekte ve metabolitleri idrarla atılmaktadır (Gibbison ve diğ., 2013). Kortizolün aşırı miktarda salınması birçok mekanizmayı etkileyerek Cushing hastalığının gelişimine yol açar (Şekil 2.6) (Bowden ve diğ., 2019). Adrenal bezlerdeki çeşitli genetik değişikliklerin, adrenal adenomlardan fazla kortizol salınımına ve adrenal genişlemeye neden olduğu tespit edilmiştir.



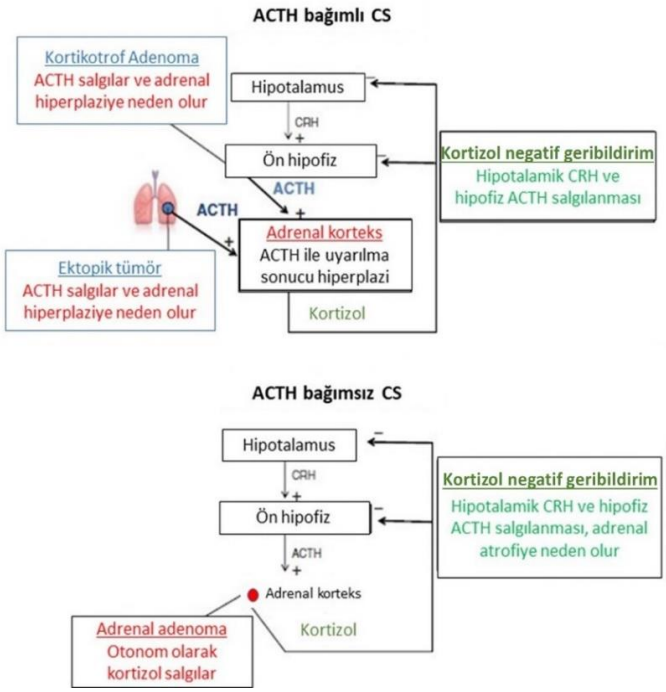
Şekil 2.6: Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal (HPA) eksende fizyolojik geri bildirimin kontrolü (Bowden ve diğ., 2019)

ACTH, melanokortin-2 reseptörüne (MC2R) bağlanır, adenilat siklazı (AC) aktive eder ve cAMP üretimini arttırır. Bu durum fosforillenme kaskadının başlamasına neden olur, böylece steroidojenik akut regülatör proteini (StAR) aktifleşir. Bu protein, kolesterolün sitoplazmadan mitokondriye geçişine aracılık eder. Burada kolesterol, CYP11A1 enzimi tarafından pregnenolona dönüştürülür. Pregnenolon, mitokondriden SAR'a diffüze olur ve enzimatik işlemlerle 11-deoksikortizol'e dönüştürülür. 11-deoksikortizol, CYP11B1 tarafından kortizole dönüştürülmek üzere mitokondriye diffüze olur. Kortizol hücrede depolanmaz, hücre dışı sıvı içerisine ve ardından kılcal damarlara geçer.

Endojen Cushing hastalığının kortizol salgılanmasındaki artışa bağlı olarak ACTH-bağımlı ve ACTH-bağımsız Cushing hastalığı olmak üzere iki tipi vardır (Şekil 2.7). ACTH-bağımlı Cushing hastalığına genellikle ACTH salgılayan benign kortikotrop adenom neden olur. Çok nadiren ektopik bir tümör ACTH'yı sentezleyebilir ve salabilir. Her iki durumda da adrenal korteks hiperplazik hale gelir ve artmış kortizolün negatif geri bildirimi hipotalamik CRH salınımını baskılar. ACTH-bağımsız Cushing hastalığında temel neden, otonom olarak kortizol salgılayan benign bir adenomdur. Bu, negatif geri bildirim yoluyla CRH ve ACTH salınımını baskılar (Raff ve Carroll, 2015).

ACTH-bağımlı Cushing hastalığı: Adrenal korteks, MC2R'yi aşırı uyarmış, anormal ve yüksek miktarda kortizol salınımına yol açmıştır. Aşırı ACTH salınımının iki kaynağı; ACTH-salgılayan bir hipofiz adenomu ve nöroendokrinal bir tümöre bağlı olarak ektopik ACTH salgılanmasıdır. En yaygın nedeni "hipofiz adenomları"dır. ACTH salgılayan tümörlerin gelişiminde birtakım hücresel mekanizmalar görülmektedir. Genellikle hipofizyal kortikotropik hormonların doğasında klonal olduğu kabul edilmektedir. Kortikotropik tümörlerde; *Siklin 1*, *AIP*, *BMP-4*, *CDH1* ve *SOCS1* genlerinde değişiklikler gözlenmektedir.

ACTH-bağımsız Cushing hastalığı: İki tipi vardır. Her iki tipinde de ACTH uyarısı olmadan dolaşımda yer alan glukokortikoidlerin faaliyeti arttırılır. Endojen ACTH'dan bağımsız yolda, adrenal bezler ACTH uyarımı olmaksızın otonom olarak kortizol üretir. Bu genellikle benign bir adrenokortikal adenoma veya nadir olarak görülen bilateral adrenal hastalık çeşitlerine bağlıdır. İkincisinde, eksojen glukokortikoidlerin uygulanmasıyla aşırı glukokortikoid aktivitesi gerçekleşir. En yaygın nedeni, çeşitli inflamatuar hastalıkların tedavisi için suprafizyolojik dozlarda kullanılan oral glukukortikoid tedavisidir (örn, *prednisone*). Bu tedavinin hipertansiyon, obezite, osteoporoz ve glokom gibi hastalıklara neden olabilen ciddi yan etkileri vardır. İntraartiküler, intratekal, inhale, epidural, topikal veya oküler glukokortikoidler gibi diğer yollar da bu hastalığa neden olmaktadır (van der Pas, 2012; Raff ve Carroll, 2015; Daniel ve Newell-Price, 2017; Lonser ve diğ., 2017).



Şekil 2.7: Endojen Cushing Hastalığı alt tipleri (Raff ve Carroll, 2015)

Adrenal bezlerdeki çeşitli genetik değişikliklerin, adrenal adenomalardan fazla kortizol salınımına ve adrenal genişlemeye neden olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, McCune-Albright Sendromu'nda adrenal bezdeki Gsα'nın mutasyonu, yaşamın erken dönemlerinde Cushing hastalığının gelişimine yol açar. Carney kompleksinde, *PRKAR1A* mutasyonu, protein kinaz A (*PKA*)'nın ve adrenal nodüllerin fazla kortizolünün düzenlenmesine neden olur. *PKA*; adrenal sinyalleşme ve düzenleme de dahil olmak üzere birçok yolda etkili olan cAMP'ye bağımlı bir kinazdır. *PKA*, 2 katalitik birim ve 2 düzenleyici alt birimden oluşan bir komplekstir. Normal durumda, ACTH, MC2R'ye bağlanır ve sitozolik cAMP seviyelerini arttırır. Bu hücre içi cAMP artışı, PKA regülatör alt biriminin bağlanmasına, sitoplazma ve çekirdekteki hedefleri fosforile eden PKA alt biriminin (PRKACA) salınmasına neden olur. Yapılan son çalışmalarda, kortizol salgılayan adrenal adenomlarda *PRKACA*'da aynı L206R mutasyonu tanımlanmıştır. Bu mutasyon, kortizol salgılayan adenomların %35'inden %69'una kadar saptanmıştır (Ghorayeb ve diğ., 2015).

2.3.1. Tedavi

Kortizol fazlalığının tümöral nedeni belirlendiğinde, atılacak olan ilk adım tümörün cerrahi yöntemle çıkarılmasıdır. Kortizol salgılayan adrenal adenom durumunda en iyi yaklaşım tek taraflı adrenolektomi olup, genellikle laparoskopik olarak minimal morbidite ve mortaliteye sahiptir. Post-operatif olarak ölümcül sekonder adrenal yetmezliği önleyebilmek için glukokortikoid replasman tedavisi gereklidir.

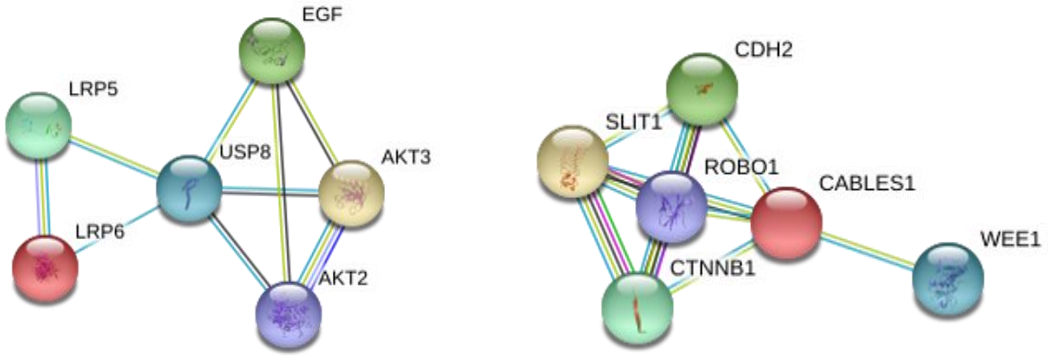
Cushing hastalığı için seçilecek cerrahi yöntem, diğer hipofiz fonksiyonlarını bozmadan transsfenoidal hipofiz ameliyatı ile hipofiz kortikotrop adenomunun çıkarılmasıdır. Kronik ACTH salgılayan tümörün tamamının çıkartılması sekonder adrenal yetmezlik ile sonuçlanır. Bu durumda adrenal korteks atrofik değil, hiperatrofiktir. Bununla birlikte fazla kortizol, hipotalamustan CRH sekresyonu ve aynı zamanda daha önce normal olan kortikotroplardan ACTH sekresyonunu baskılamıştır. Bu nedenle bu hastalara da post-operatif glukokortikoid tedavisi verilmelidir. Cerrahi operasyona rağmen hastalığın yeniden nüks etmemesi için hastaların uzun yıllar boyunca takip edilmesi gerekmektedir. Şu anda günümüzde Cushing hastalığı tedavisinde 3 temel hedef mevcuttur.

a) Hipofiz bezi (ACTH üretimi)
b) Adrenal bezler (kortizol üretimi)
c) Periferik dokular (glukokortikoid etkileri)

Bu üç grupta yer alan ajanlar arasında FDA (*Food and Drug Administration* – Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından onaylanmış iki ilaç bulunmaktadır. Bunlardan ilki glukokortikoid reseptör antagonisti olan *Mifepriston*'dur. Kortizolden daha yüksek bir afiniteye sahip olan kortizol inhibitörüdür. Yeterli dozda kullanıldığında fazla kortizolün etkileri de engellenebilmektedir. İkincisi ise kortikotropik adenomlarda ACTH üretimini hedefleyen bir somatostatin olan *Pasireotid*'tir. Kortikotropik adenomlar, özellikle somatostatin reseptör tip 5'i daha yüksek yoğunlukta ifade eder. İlaç tercihen somatostatin tip 5 reseptörüne bağlanır ve kortikotrop adenomlarından ACTH salgılanmasını azaltır. İlacın ektopik ACTH salgılayan tümörlerde (reseptör ekspresyon farklılıkları nedeniyle) etkili olamayacağı düşünülmüş ve kapsamlı olarak incelenmemiştir. Tedavide kullanılan en eski ilaçlar böbreküstü bezlerine yöneliktir. Bu ilaçlar steroidogeneze müdahale ederek kortizol üretimini azaltır ve bu nedenle steroidogenez inhibitörleri olarak da adlandırılırlar. Tek başına veya diğer inhibitörler ile kombine halde olan *metyrapone* (11β-hidroksilaz inhibitörü), adrenal steroidogenezi azaltmak için yıllardır kullanılmaktadır. En sık kullanılan inhibitör ise antifungal bir ajan olan *ketocanazole*'dür. *Ketocanazole*, mantar hücresinin zarında hayati önem taşıyan ergosterolü baskılayarak mantar önleyici etkisini gösterir. Ayrıca steroid biyosentez yolunda yer alan birçok enzimi de (C17-20 liyaz, 17α-hidroksilazlar, 11β-hidroksilaz) baskılar. Kortizol sentezindeki son adımı katalizlediği için 11β-hidroksilaz'ın inhibisyonu Cushing hastalığı tedavisinde kilit noktalardan biri olmaktadır (Varlamov ve diğ., 2019; Liu ve diğ., 2021).

2.3.2. Cushing Hastalığı Etyopatogenezi

Cushing hastalığının oluşması ve tedavi sonrası yeniden gelişmesi hakkında çeşitli çalışmalar yapılmasına rağmen hala tam anlamıyla bu hastalığa neden olan genetik mekanizmalar moleküler düzeylerde çözülememiştir. Son zamanlarda kortikotrop tümörlerin patofizyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalarda bu hastalığın gelişmesinde etkili olabileceği düşünülen birtakım genler tespit edilmiştir (Şekil 2.8). Bu genler arasında *USP8, EGFR* ve *CABLES1* yer almaktadır (Ghorayeb ve diğ., 2015; Cassarino ve diğ., 2017; Albani ve diğ., 2018).

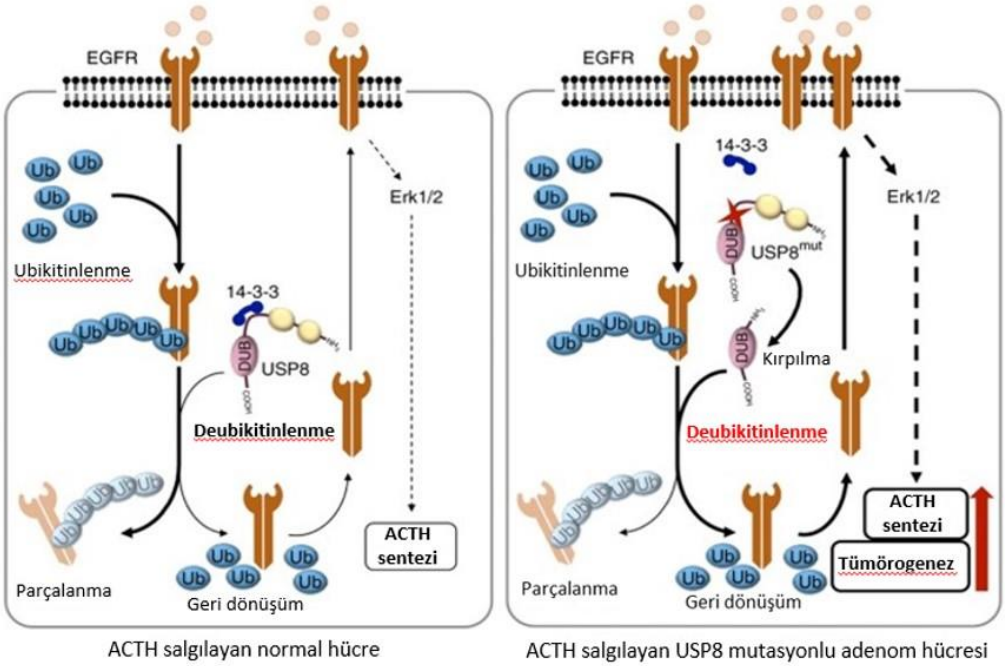


Şekil 2.8: Cushing hastalığının gelişmesinde etkili olabileceği düşünülen olası genlerin birbirleri ile ilişkisi

Son çalışmalar, *AIP* geni ve *MEN1* mutasyonlarının sporadik hipofiz adenomlarla ilişkili olduğunu göstermiştir (Daly ve diğ., 2006; Lecoq ve diğ., 2015). Gen mutasyonu sonucu hipofiz salgılayan hormonların dengesindeki bozulma ölümcül sonuçlara yol açabilmektedir. Bu nedenle, CS'nin erken teşhisinde ve CS hastalarının genetik danışmanlığında ilgili gen mutasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir.

Ubikutinlenme, ubikutin (Ub) moleküllerinin spesifik proteinlere bağlanmasından oluşan post-translasyonel bir süreçtir. Ubikutinlenmeden sonra peptidler 26S proteazom kompleksi tarafından proteolitik bozunmaya uğrar (Mevissen ve Komander, 2017). Deubikutinasyon enzimleri (DUB'lar) ise konjuge Ub moleküllerini hedef proteinlerden uzaklaştırabilir ve böylece bozunmalarını önleyebilir (Dufner ve Knobeloch, 2019).

USP8, çeşitli proteinlerin yıkılmasını önleyebilen en etkili deubikutinleştirici enzimlerden birisidir. *USP8*'in görevini yerine getirmesindeki en önemli faktör *EGFR*'dir. USP8, 14-3-3 proteini ile fosforillendikten sonra bütün işlevini kaybedebilmektedir (Perez-Rivas ve diğ., 2015). *USP8*'in mutasyona uğraması durumunda, açığa çıkan USP8'in 40-kDa C-terminali parçası, *EGFR*'yi ubikutinlenmekten kurtarır ve yeniden hücre membranına gönderir. Bunun sonucunda, EGFR aşırı miktarda ifade edilir ve bu durum POMC transkripsiyonunun artmasına neden olarak ACTH'ın fazla miktarda salınmasını sağlar (Şekil 2.9) (Reincke ve diğ., 2015; Miao ve diğ., 2021).



Şekil 2.9: ACTH salgılayan hipofiz adenomunu uyaran *USP8* mekanizması (Reincke ve diğ., 2015)

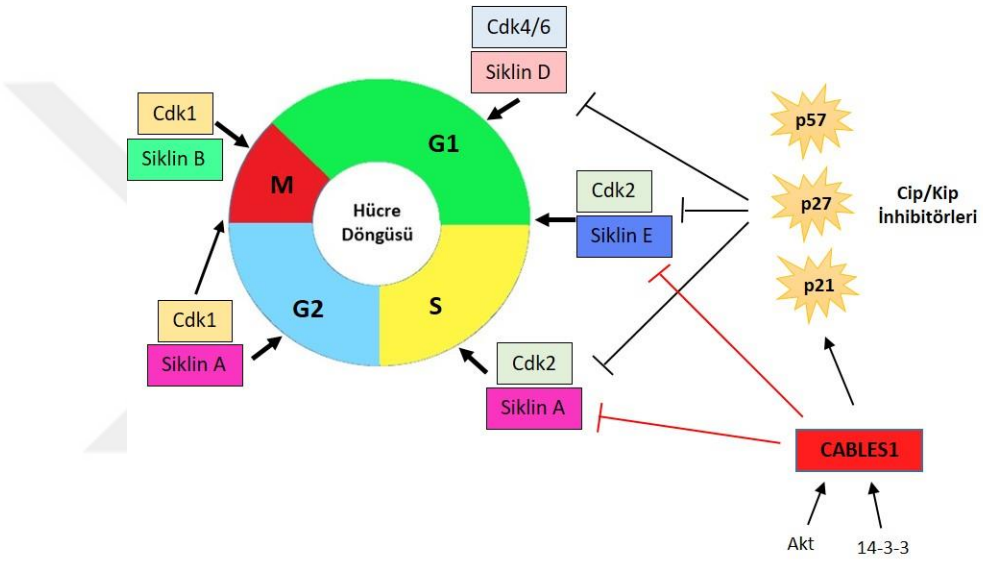
Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda Cushing hastalığının genetik temelinde, kortikotrop tümörlerin neredeyse yarısında bulunan somatik USP8 mutasyonlarının önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Reincke ve diğ., 2015; Faucz ve diğ., 2017; Perez-Rivas ve diğ., 2015; Neou ve diğ., 2020). Şiddetli Cushing hastalığına sahip pediatrik bir vakada saptanan USP8 germline mutasyonu haricinde diğer mutasyonların tamamının somatik olduğu bildirilmiştir (Coopmans ve Karbonits, 2022).

CABLES1 proteini ilk olarak siklin bağımlı kinaz-3'ün (CDK3) substratı olarak tanımlanmıştır (Matsuoka ve diğ., 2000). Hücre döngüsünün G1 evresinin sonlarında, çoğalan hücrelerde yüksek oranda *CABLES1* ifade edilmektedir (Yamochi ve diğ., 2001). *CDKN1A* (*p21*), *CDK5R1* (*p35*) ve *TP63* gibi hücre döngüsünün düzenleyicilerini sabitleyerek parçalanmasını önler (Shi ve diğ., 2015a), ayrıca *TP53* ve *TP73* ile etkileşerek apoptozu tetiklemektedir (Tsuji ve diğ., 2002).

CABLES1 geni, kortikotrop hücrelerde hücre döngüsü ilerlemesinin negatif bir düzenleyicisi olarak çalışır (Roussel-Gervais ve diğ., 2016). 14-3-3 veya AKT-aracılı fosforillenme ile genin tümör baskılayıcı aktivitesi baskılanmaktadır (Shi ve diğ., 2015b). Yapılan çalışmalarda özellikle kortikotropinomaların yaklaşık yarısında CABLES1 protein ifadesinin kaybolduğu bildirilmiştir (Roussel-Gervais ve diğ., 2010; Roussel-Gervais ve diğ., 2016). CABLES1, ACTH salgılayan hipofiz adenomlarında hem EGFR yolağının

etkinleşmesine hem de CDK/siklin bağımlı hücre döngüsü düzenlemesinin bozulmasına neden olmaktadır. Bu sayede her iki moleküler mekanizma arasında önemli bir bağlantı sağlayabilmektedir (Fukuoka ve diğ., 2011).

Son çalışmalarda, CABLES1 seviyesinin Akt fosforillenmesi ile kontrol edildiği ve CABLES1'in hücre döngüsü baskılayıcılarından *p21* proteinini sabitlediği (Şekil 2.10) bildirilmiştir (Roussel-Gervais ve diğ., 2010; Roussel-Gervais ve diğ., 2016). Bu nedenle, kortikotrop hücrelerde *CABLES1* ifade kaybının kortikotropinoma gelişimine katkıda bulunabildiği belirtilmektedir (Roussel-Gervais ve diğ., 2016).



Şekil 2.10: CABLES1'in p21 proteini üzerinden hücre döngüsünü baskılaması (Roussel-Gervais ve diğ., 2016)

Son zamanlarda hipofiz tümörü oluşmasında, epigenetik deregülasyon, DNA metillenmesi, histon modifikasyonu, nükleozomların yeniden biçimlenmesi ve RNA aracılı hedeflemeyi içeren epigenetik değişimlerin etkili olduğu gösterilmiştir. Tüm memeli promotörlerinin yaklaşık %70'inde bulunan CpG adalarında meydana gelen metillenme değişiklikleri, kanser türlerinde en iyi çalışılan epigenetik değişimlerdir. Metillenme, transkripsiyonu düzenlemede önemli bir rol oynamakta ve genellikle malign transformasyonda etkili olmaktadır (Fukuoka ve Takahashi, 2014).

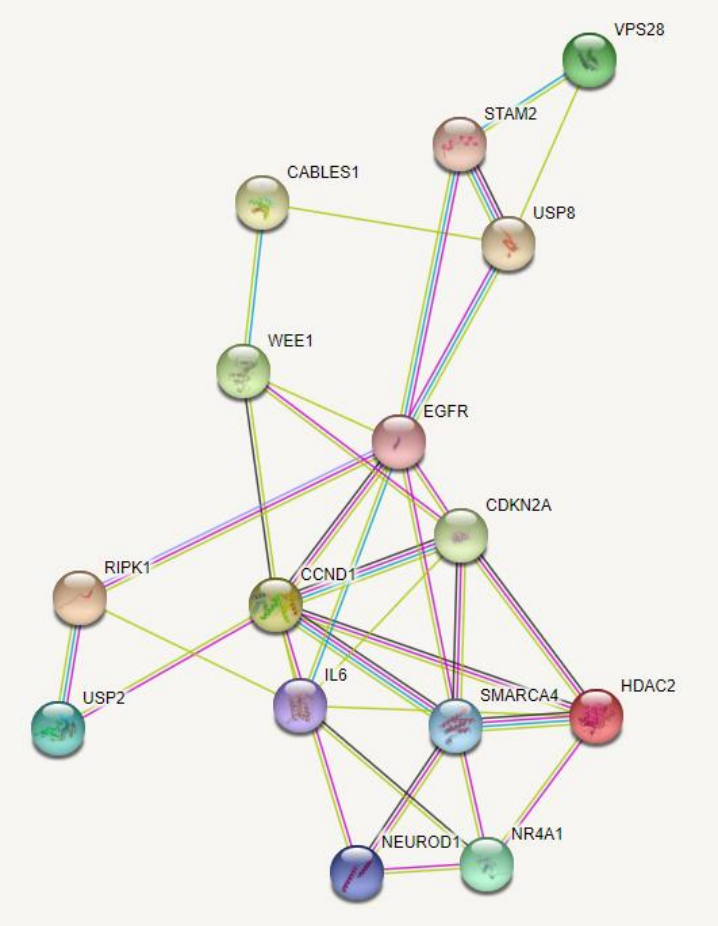
Bu tez çalışmasında, tüm bu bilgilere dayanarak Cushing hastalarında *USP8* ve *CABLES1* genleri ile olası ilişkili diğer genler arasındaki etkileşimlerin moleküler düzeylerde açığa çıkarılması amaçlanmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilecek bulgular Cushing

hastalığının altında yatan genetik ve epigenetik mekanizmaların anlaşılmasına, tanı ve tedavide hücresel yolaklarda etkili önemli genlerin ortaya çıkarılmasına katkıda bulunacaktır.

2.3.3. Cushing Hastalığında Etkili Olası Genler

İnsan hipofiz adenomları üzerine birçok çalışma olmasına rağmen hastalığın patogenezi ve hastalığı etkileyen faktörler hala tam olarak açıklanamamıştır. Cushing hastalığının gerek ortaya çıkışı gerekse tedaviye rağmen yeniden gelişebilmesi konusunda bu hastalığa neden olan genetik ve moleküler mekanizmalar hala tam anlamıyla çözülememiştir. Çeşitli gen mutasyonları, ayrıca genlerin metillenmesi, asetillenmesi, sumoylenmesi gibi çeşitli epigenetik faktörler hastalığın patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Son çalışmalarda hipofiz tümörünün oluşumunda, DNA'nın metillenmesi, histon modifikasyonları, nükleozomların yeniden şekillenmesi ve kodlama yapmayan RNA'ların da dahil olduğu epigenetik düzenlemelerin rol oynadığı gösterilmiştir (Pease ve diğ., 2013; Fukuoka ve Takahashi, 2014; Ma ve diğ., 2015).

USP8 ve *CABLES1*'in Cushing hastalığındaki mekanizmaları üzerinde, hastalığın gelişimi ile ilişkili farklı genlerle olası etkileşimleri üzerine daha önce yapılmış az sayıda çalışma vardır (Ma ve diğ., 2015; Perez-Rivas ve diğ., 2015; Theodoropoulou ve diğ., 2015; Hayashi ve diğ., 2016; Roussel-Gervais ve diğ., 2016; Faucz ve diğ., 2017; Hernandez-Ramirez ve diğ., 2017). Biyoinformatik veri tabanında (*STRING*) (Szlarczyk ve diğ., 2021) (Şekil 2.11) yapılan araştırma ile *USP8* ve *CABLES1* ile olası ilişkili genler belirlenmiş ve daha önce çalışılmamış olan adenom oluşumuna katılacağı öngörülen olası genler seçilmiştir.



Şekil 2.11: Biyoinformatik veri tabanında (*STRING*) belirlenen ve adenom oluşumuna katılacağı öngörülen *USP8* ve *CABLES1* ile olası ilişkili genler

Hasta ve normal dokularda *USP8*, *USP2*, *VPS28*, *STAM2* (deubikutinlenme enzimleri), *CABLES1*, *BRG1* (*SMARCA4*), *EGFR*, *WEE1*, *p16* (*CDKN2A*), *SİKLİN D1* (*CCND1*), *HDAC2*, *IL-6* (senesens, hücre döngüsü, tümör baskılayıcı genler), *NR4A1* (*NUR77*) (transkripsiyon faktörü), *NEUROD1* (kök hücre ile ilgili gen) ve *RIPK1* (hücre ölümü ile ilgili gen) genlerinin ifade düzeyleriyle birlikte *USP8* ve *p16*'nın epigenetik değişimleri ile Cushing hastalığı arasındaki ilişkilerin araştırılması amaçlanmıştır.

USP-8

USP8 (Ubiquitin Specific Peptidase 8), ubikutine özgü işlem yapan proteaz protein ailesine ait bir proteini kodlar. Kodlanan bu protein, organel endozomunun morfolojisini düzenler ve erken endozom aşamasında kargo ayrıştırma ve membran taşınmasında rol alır. Bu protein hücrenin, hücre döngüsünün S fazına girmesi için gereklidir ve ayrıca gelişimde rol oynayan Hedgehog sinyal yolunda pozitif bir düzenleyici olarak işlev görür. 2. ve 6. kromozomlarda bu genin psödogenleri bulunur ve alternatif kırpılma sonucunda birçok transkript meydana gelebilir (Tanno ve Komada, 2013).

USP8 ile ilişkili hastalıklar arasında Hipofiz Adenomu 4, ACTH-Salgılayan ve Otozomal Resesif Spastik Parapleji Tip 59 yer alır. İlgili yollar arasında ERBB2 ile sinyalleşme ve ErbB1'in hücre içine alınması yer alır. SH3 domaini bağlar ve thiol'e bağımlı ubikutine spesifik proteaz aktivitesi vardır. Bu genin önemli bir paralogu *USP19*'dur. Konjuge ubikutini proteinlerden ayırır ve bu nedenle degradasyonu önleyerek protein döngüsü seviyesinde önemli bir düzenleyici rol oynar. Hem 'Lys-48' hem de 'Lys-63' bağlantılı ubikutin zincirlerini dönüştürür. Katalitik aktivite M fazında arttırılır. Hücre proliferasyonunda görevlidir. Serum stimülasyonuna yanıt olarak S fazına girişte gereklidir. *STAM2* ve *RASGRF1*'in stabilitesini düzenler. Endozomal ubikutin dinamiği, kargo ayrımı, erken endozomlarda membran trafiği ve ESCRT-0 stabilitesinin korunmasını düzenler. Endozomlardaki protein ubikutinlenme seviyesi, organelin morfolojisini korumak için gereklidir. EPS15'i deubikutinler ve tirozin kinaz stabilitesini kontrol eder. *EGFR*'den konjuge ubikutini çıkarır, böylece *EGFR* degradasyonunu ve aşağı akış (downstream) MAPK sinyallemesini düzenler. Spermatid ESCRT-0 kompleksi ve mikrotübüllerle etkileşim yoluyla akrozom biyogenezine dahil olur. BIRC6 / bruce ve KIF23 / MKLP1'i deubikutinler. Lizozomal degradasyonunu inhibe eden BACE1'i deubikutinler (Nijman ve diğ., 2005; Mizuno ve diğ., 2007; Nicholson ve diğ., 2007).

USP-2

USP2 (Ubiquitin Specific Peptidase 2) peptidaz C19 süper familyasına ait deubikutinleştirici enzimler ailesinin bir üyesi olan bir proteini kodlar. Kodlanmış olan protein, TNF-α (tümör nekroz faktörü alfa) kaynaklı NF-κB (nükleer faktör κB) sinyallemesi için gerekli olan ubikutine spesifik bir proteazdır. Bu protein, yağ asidi sentaz, murin double minute 2 (MDM2), MDM4 / MDMX ve Siklin D1 gibi poliubikutinlenmiş hedef proteinleri deubikute eder. MDM2 ve MDM4, p53 tümör baskılayıcısının negatif düzenleyicileridir ve hücre döngüsü G1 / S geçişi için Siklin D1 gereklidir. Farklı izoformları kodlayan birden fazla alternatif olarak kırpılmış transkript varyantı tanımlanmıştır (Chau ve diğ., 1989; Stevenson ve diğ., 2007).

USP2 ile ilişkili hastalıklar arasında Over Seröz Kistadenokarsinom da bulunur. İlgili yolaklar arasında *TNF* sinyali ve *TP53* etkinliğinin düzenlenmesi de bulunmaktadır. Gen ontolojisi çalışmaları özdeş protein bağladığını ve sistein tipi endopeptidaz aktivitesi olduğunu göstermiştir. Bu genin önemli bir paralogu *USP21*'dir. MDM2, MDM4 ve CCND1 gibi poliubikutinlenmiş hedef proteinleri deubikute eden hidrolazdır. İzoform 1 ve izoform 4, hem ubikutine spesifik peptidaz hem de izopeptidaz aktivitelerine sahiptir. MDM2 aracılı p53 / TP53 ubikutinleşmeyi tersine çevirmeden MDM2'yi deubikutinler ve böylece dolaylı olarak p53 / TP53 degradasyonunu teşvik edip, p53 aktivitesini sınırlar. P53 / TP53'e karşı deubikutinaz aktivitesi yoktur. MDM4'ün MDM2 aracılı bozunmasını önler. Normal hücreler ve kanser hücrelerinde G1 / S hücre döngüsü ilerlemesinde rol oynar. Sirkadyen saati, içsel sirkadyen ritmini ve dış işaretlere cevap verme kapasitesini modüle ederek düzenler. Embriyonik kas hücrelerinin miyojenik farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynar (Stevenson ve diğ., 2007; Shan ve diğ., 2009; Allende-Vega ve diğ., 2010; Bhattacharya ve Ghosh, 2014).

CABLES1

CABLES1 (Cdk5 ve Abl Enzim Substrat 1), birkaç sikline bağımlı kinaz ile etkileşerek hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alan bir proteini kodlar. Kolorektal kanserlerde bu genin ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Genin farklı izoformları vardır. *CABLES1* ile ilişkili hastalıklar arasında Endometrial Hiperplazi bulunur. Megakaryosit gelişimi ve trombosit üretiminde rol oynar. Sikline bağlı protein serin / treonin kinaz düzenleyici aktivitesi vardır. Bu genin önemli bir paralogu *CABLES2*'dir. Sikline bağlı kinaz bağlayıcı proteindir. Non-reseptör tirozin kinazlar ile siklin bağımlı tirozin kinaz fosforillenmesini arttırır. Örneğin, ABL1'in CDK5'i aktive etmesiyle CDK5 aktivitesi artar ki bu durum nöronal gelişim için önemlidir. Ayrıca *WEE1*'in CDK2'yi aktive etmesi sonucunda CDK2 aktivitesi azalır ve büyüme inhibisyonu durur. Nöronal büyümeyi olumlu yönde etkiler. P53 / p73 kaynaklı hücre ölümü için düzenleyici bir rol oynar (Zukerberg ve diğ., 2000; Wu ve diğ., 2001; Shi ve diğ., 2015b).

***BRG1* (*SMARCA4*)**

SMARCA4 (SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4) protein kodlayan bir gendir. *BRG1* (Brahma-related gene 1) (*SMARCA4*) hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda nükleozom yeniden modelleme kompleksi olan SWI/SNF (**SWI**tch/**S**ucrose **N**on-**F**ermentable)'nin ATPaz altbirimi olup kromatini yeniden düzenleyici bir enzim olarak adlandırılmaktadır (Bilodeau ve diğ., 2006; Herpel ve diğ., 2017). Hücre yaşlanmasında etkili olan genlerden *SIRT1*'e bağlanıp, *SIRT1*

aracılı *p53* deasetilasyonuna neden olarak yaşlanmayı uyarmaktadır. Özellikle STAT1 ve STAT2 ile birlikte kompleks oluşturarak, IFN-α, IFN-γ, IL-6 gibi sitokinlerin promotör bölgelerini hedeflediği, IFN sinyalizasyonunun düzenlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Bilodeau ve diğ., 2006). Bu ailenin üyelerinin helikaz ve ATPaz aktiviteleri vardır ve bu genlerin çevresindeki kromatin yapısını değiştirerek bazı genlerin transkripsiyonunu düzenlediği düşünülmektedir. Kodlanmış protein, normalde kromatin tarafından represe edilen genlerin transkripsiyonel aktivasyonu için gerekli olan büyük ATP'ye bağlı kromatin yeniden modelleme kompleksi SNF / SWI'nin bir parçasıdır. Ayrıca, bu protein BRCA1'e bağlanabilir ve aynı zamanda tümörojenik protein olan CD44'ün ifadesini düzenleyebilir. Bu gendeki mutasyonlar rabdoid tümör yatkınlık sendromu tip 2'ye neden olur. Bu genin farklı izoformlarını kodlayan çoklu transkript varyantları vardır (Kadoch ve Crabtree, 2015; Herpel ve diğ., 2017).

SMARCA4 ile ilişkili hastalıklar arasında Coffin-Siris Sendromu 4 ve Rabdoid Tümör Predispozisyon Sendromu 2 bulunmaktadır. İlişkili olduğu yolaklar arasında Wnt aracılı beta katenin sinyalleşmesi, hedef gen transkripsiyonun düzenlenmesi ve bağışıklık sistemindeki sitokin sinyalleşmesi de vardır. Kromatine bağlanabilir ve transkripsiyon koaktivatör aktivitesi vardır. Bu genin önemli bir paraloğu *SMARCA2'*dir (Herpel ve diğ., 2017).

Kromatin yeniden modellenmesi (DNA-nükleozom topolojisinin değiştirilmesi) ile transkripsiyonel aktivasyon ve seçilmiş genlerin suprese edilmesinde işlevi vardır. Önemli enzimatik aktiviteleri gerçekleştiren SWI / SNF kromatin yeniden modelleme komplekslerinin bileşenidir, ATP'ye bağımlı olarak bir nükleozom içinde DNA-histon ilişkisini değiştirerek kromatin yapısını değiştirir (Kadoch ve Crabtree, 2015; Herpel ve diğ., 2017; Yoshida ve diğ., 2017).

EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)

EGFR, protein kodlayan bir gendir. Bu gen tarafından kodlanan protein, protein kinaz süper ailesinin bir üyesi olan transmembran bir glikoproteindir. Bu protein, epidermal büyüme faktörü ailesinin üyeleri için bir reseptör olarak görev yapar. Proteinlerin ligandlara bağlanması, reseptörlerin dimerizasyonunu ve tirozin otofosforilasyonunu uyarır ve hücre çoğalmasına yol açar (Lemmon ve Schlessinger, 2010).

EGFR, kanserdeki önemi ile tanınmaktadır. Amplifikasyon ve mutasyonların birçok kanser türünde olayları tetiklediği gösterilmiştir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), glioblastom ve meme kanserlerindeki rolü, birçok araştırma ve ilaç geliştirme çabasını teşvik

etmiştir. Tirozin kinaz inhibitörleri, *EGFR*'ye bağlı olarak çoğalan tümörlerde, özellikle *gefitinib* ve *erlotinib* ilaç tedavisi ile başarılı olmuştur. *EGFR* ile ilişkili hastalıklar arasında inflamatuar cilt ve bağırsak hastalığı ve akciğer kanseri bulunur. Transkripsiyon Androjen Reseptörü nükleer sinyalizasyon yolağında görevlidir ve vezikül aracılı taşımada rolü vardır. Protein kinaz aktivitesi vardır. Bu genin önemli bir paraloğu *ERBB4*'tür (Pines ve diğ., 2010; Lane ve diğ., 2014).

EGF'ye reseptör tirozin kinaz ligandı bağlandığı zaman dışarıdan gelen birçok sinyal hücre içine aktarılır. Bilinen ligandlar arasında EGF, TGFA / TGF-alfa, AREG, epigen / EPGN, BTC / betacellulin, epiregulin / EREG ve HBEGF / heparin bağlayıcı EGF vardır. Ligand bağlanması, önemli sitoplazmik uçlar üzerinde reseptör homo- ve / veya heterodimerizasyonu ve otofosforilasyonu tetikler. Fosforillenen reseptör, GRB2 gibi adaptör proteinlere bağlanır ve bu da karmaşık aşağı akış (down stream) sinyalleşmeyi başlatır. RAS-RAF-MEK-ERK, PI3 kinaz-AKT, PLCgamma-PKC ve STATs modülleri dahil olmak üzere en az 4 ana aşağı akış sinyal mekanizmasını etkinleştirir. Ayrıca NF-κB sinyal kaskadını aktive edebilir. Ayrıca doğrudan RGS16 gibi diğer proteinleri fosforile eder, GTPaz aktivitesini arttırır ve muhtemelen EGF reseptörü sinyali ile G proteini bağlı reseptör sinyalinin birlikte çalışmasını sağlar. Ayrıca MUC1'i fosforile eder ve SRC ve CTNNB1 / beta-katenin ile etkileşimini arttırır. Öğrenme ve hafıza performansını arttırmada rol oynar (Pines ve diğ., 2010; Nguyen ve diğ., 2013; Lane ve diğ., 2014; Needham ve diğ., 2016).

STAM2

STAM2 (Signal Transducing Adapter Molecule-Sinyal İletme Adaptörü Molekül 2) protein kodlayan bir gendir. Vezikül aracılı taşıma ve klatrin aracılı endositozda görevlidir. Bu genin önemli bir paraloğu *STAM1*'dir. Sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin aracılık ettiği hücre içi sinyal iletiminde görevlidir. IL-2 ve GM-CSL ile uyarıldığında, DNA sentezine ve MYC indüksiyonuna yol açan sinyal mekanizmasında rol oynar. T hücresi gelişiminde de rol oynayabilir. HGS (ESCRT-0 kompleksi) ile kompleks oluşturduğunda, multiveziküler gövdeler (MVB'ler) aracılığıyla reseptör tirozin kinazların aşağı düzenlenmesinde görev alır (Kapuralin ve diğ., 2015).

Bu gen tarafından kodlanan protein, her ikisi de bir SH3 alanı ve immünreseptör tirozin bazlı aktivasyon motifi (ITAM) içeren sitokin reseptörlerinin aşağı akış (down stream) sinyalizasyonunda yer alan bir adaptör protein olan STAM ile yakından ilişkilidir. STAM'a benzer şekilde, bu protein JAK kinazların aşağı akışında hareket eder ve sitokin uyarımına yanıt

olarak fosforillenir. Dolayısıyla bu proteinin ve STAM'ın sitokin uyarımı üzerine JAK kinazların aşağı akışındaki sinyal yolu üzerinde etkileri olduğu düşünülmektedir (Endo ve diğ., 2000).

VPS28

VPS28 (VCR28 ESCRT-I Subunit), protein kodlayan bir gendir. Bu gen, proteinlerin veziküllere taşınması ve sınıflandırılmasında görev yapan ESCRT-I kompleksinin (endosomal compleces required for transport - taşıma için gerekli endozomal kompleksler) bir protein alt birimini kodlar. Zarflı virüslerin hücre zarından tomurcuklanmasını kolaylaştırmak için de görev yapabilir. Alternatif kırpılma sonucunda birçok farklı transkript varyantı oluşur (Christ ve diğ., 2017; Vietri ve diğ., 2020). Ürünü olan protein, vezikül aracılı taşıma ve HIV yaşam döngüsünde görev yapar. Ubikutin bağlayan bir proteindir (Vietri ve diğ., 2020).

HDAC2

HDAC2 (Histon Deasetilaz 2) protein kodlayan bir gendir. *HDAC2* ile ilişkili hastalıklar arasında kolon adenomu ve serebellar ataksi, sağırlık ve narkolepsi vardır. İlişkili olduğu yolaklar arasında, Wnt aracılı beta katenin sinyal yolağı ve hedef gen transkripsiyonunun düzenlenmesi vardır. Bu genin önemli bir paraloğu *HDAC1*'dir. Bu genin ürünü olan protein histon deasetilaz ailesine aittir. Histon deasetilazlar büyük multiprotein komplekslerinin oluşumuna etki eder ve histonların (H2A, H2B, H3 ve H4) N-terminal kısmındaki lizin kalıntılarının deasetillenmesinden sorumludur. Histon deasetillenmesi epigenetik baskılamada önemlidir ve ve transkripsiyonel düzenleme, hücre döngüsünün ilerlemesi ve gelişimsel olaylarda önemli bir rol oynar. Bu protein, MAD, SIN3, YY1 ve N-COR ile birleşerek transkripsiyonel baskılayıcı kompleksleri oluşturur. DNMT1, DMAP1, PCNA, CAF1'den oluşan diğer transkripsiyonel baskılayıcı komplekslerde DNA replikasyonunun geç S fazında DNMT1 ile etkileşir. TSHZ3'ü deasetile eder ve transkripsiyonel baskılayıcı aktivitesini düzenler. Kan hücrelerinin gelişiminde rol oynar. CRY1'in aracılık ettiği histon deasetilasyonu yoluyla *PER1* gibi sirkadyen hedef genlerin transkripsiyonel baskısında rol oynayabilir. TFF1 ve CDKN1A'nın MTA1 aracılı transkripsiyonel baskılanmasında görev alır (Lawrence ve diğ., 2016; Eckschlager ve diğ., 2017). Alternatif kırpılma sonucunda birden fazla transkript varyantı meydana gelir (Lawrence ve diğ., 2016).

***SİKLİN D1* (*CCND1*)**

SİKLİN D1 (*CCND1*) protein kodlayan bir gendir. Bu gen tarafından kodlanan protein yüksek oranda korunmuş olan ve CDK kinazların düzenleyicileri olarak işlev gören siklin

ailesine aittir. Siklinler, her bir mitotik olayın koordinasyonuna katkıda bulunan farklı ifade paternleri sergiler. Bu siklin, hücre döngüsünde G1 / S geçişi için gerekli olan CDK4 veya CDK6'nın düzenleyicisi olarak görev görür ve bunlarla bir kompleks oluşturur. Tümör baskılayıcı protein Rb ile etkileşime girer ve bu genin ifadesi Rb tarafından pozitif olarak düzenlenmektedir. Hücre döngüsü ilerlemesini değiştiren bu genin mutasyonları, amplifikasyonu ve aşırı ifadesi, çeşitli tümörlerde sıklıkla gözlenir ve tümör oluşumuna katkıda bulunabilir. Siklin D'nin birçok kanser tipinde yanlış düzenlendiği gösterilmiştir. Onkogenik özelliklerine bağlı olarak, siklinler ve aktive ettikleri CDK'lar son on yılda önemli araştırma ve geliştirme çabalarının odağı olmuştur. Amplifikasyonlar veya promotör metillenmesindeki değişimler, siklinlerin düzenlenmesini etkiler. Siklin D2'nin gliomada önemli ölçüde deregüle olduğu bulunmuştur, ancak Siklin D1 neredeyse tüm kanser türlerinde aktiftir (Sherr, 1994; Ortiz ve diğ., 2017).

SİKLİN D1 ile ilişkili hastalıklar arasında Von Hippel-Lindau Sendromu ve Multipl Miyelom bulunmaktadır. İlişkide olduğu yolaklar Transkripsiyon Androjen Reseptörü nükleer sinyalizasyonu ve Wnt Sinyal Yolu ve Pluripotensidir. Protein kinaz aktivitesi vardır, enzim bağlama özelliği vardır. Bu genin önemli bir paraloğu *SİKLİN D2* (*CCND2)*'dir (Sherr, 1994).

***p16* (*CDKN2A*)**

p16 (*CDKN2A* - Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A), protein kodlayan bir gendir. *p16* ile ilişkili hastalıklar arasında Melanom, Kutanöz Malign 2 ve Melanom-Pankreas Kanseri Sendromu bulunur. İlişkili olduğu yolaklar arasında hücresel yaşlanma ve TP53 etkinliğinin düzenlenmesi vardır. Transkripsiyon faktörü bağlar. Bu genin önemli bir paraloğu *CDKN2B*'dir (Serra ve Chetty, 2018).

Bu gende meydana gelen alternatif kırpılma sonrasında farklı proteinleri kodlayan en az 3 farklı transkript üretilir. Bunlardan ikisi CDK4 kinaz inhibitörü olan yapısal izoformları kodlarken, diğer transkript ise genin 20 kb yukarısında (upstream) bulunan alternatif bir birinci ekson tarafından kodlanan, alternatif bir açık okuma çerçevesi [open reading frame (ARF)] oluşturan ve farklı bir protein kodlanmasına neden olan bir transkripttir. Bu alternatif okuma çerçevesi nedeniyle üretilen protein, p53'ün parçalanmasında rol oynayan E3 ubikutin-protein ligaz MDM2 ile etkileşime girerek ve MDM2'yi baskılayarak p53'ü dolaylı yoldan sabitler. Tüm bu yapısal ve işlevsel farklılıklara rağmen, bu genin kodladığı CDK inhibitörü izoformları ve ARF ürünü olan protein, CDK4 ve p53 aracılığıyla hücre döngüsünün G1 fazına ilerlemesinde görev yapar. p16'nın bir çok farklı kanser türünde mutasyona uğrayarak veya

tamamen kaybolarak tümör baskılayıcı işlevini kaybettiği ve kanser oluşumuna yol açtığı bilinmektedir (Serra ve Chetty, 2018; Green ve diğ., 2019).

Vakaların çoğunda, homozigot delesyonlar sonucunda *p16* etkinliğini kaybetmiştir. *p16* işlevinin kaybolmasına neden olan mekanizmalardan biri, promotör bölgesinin hipermetillenmesidir. Bununla birlikte, promotör hipermetillenmesinin prognostik etkisi nispeten belirsizdir. Birçok çalışmada, kolorektal, karaciğer ve genç akciğer kanseri hastalarında *p16* geninin hipermetillenmesi olan hastalar için daha kötü prognostik sonuçlara yol açtığını göstermiştir. Ayrıca, *p16* ifadesi, HPV enfeksiyonu için etkili bir belirteçtir (Chan ve diğ., 2021).

G1 ve G2 fazlarında hücre döngüsünün durmasını indükleyebilir. Bir tümör baskılayıcı görevi görür. MDM2'ye bağlanır ve nükleolusta hapsederek nükleositoplazmik taşınmasını durdurur. Bu durum, p53'ün MDM2 aracılı degradasyonunu bloke ederek ve p53'e bağlı transaktivasyonu ve apoptozu arttırarak MDM2'nin onkogenik etkisini inhibe eder. Ayrıca, siklin B1 / CDC2 komplekslerinin aktivasyonunu önleyerek hücre döngüsünün G2'de tutulmasını ve apoptozu p53'ten bağımsız bir şekilde indükler. BCL6'ya bağlanır ve BCL6 ile indüklenen transkripsiyonel baskıyı ters yönde düzenler (down regulation). E2F1 ve MYC'ye bağlanır ve bunların transkripsiyon başlatıcı etkinliklerini bloke eder, ancak MYC transkripsiyonel baskılama üzerinde hiçbir etkisi yoktur. TOP1/TOPOI'ye bağlanır ve aktivitesini uyarır. Bu kompleks rRNA gen promotörlerine bağlanır ve rRNA transkripsiyonunda ve/veya olgunlaşmasında rol oynayabilir. NPM1/B23 ile etkileşime girer ve bunların poliubikutinlenmesini ve degrade olmasını destekler, böylece rRNA işlenmesini engeller. COMMD1 ile etkileşime girer ve 'Lys63' bağlantılı poliubikutinlenmesini destekler. UBE2I/UBC9 ile etkileşime girer ve MDM2 ve E2F1 dahil olmak üzere bazı proteinlerin sumoylenmesini arttırır. HUWE1'e bağlanır ve ubikutin ligaz aktivitesini bastırır. Meme bezi gelişimi sırasında hücre proliferasyonunun ve apoptozunun kontrolünde rol oynayabilir (Serra ve Chetty, 2018; Chan ve diğ., 2021).

WEE1

WEE1 (WEE1 G2 Ckeckpoint kinase) (Western Equine Ensefalit), serin / treonin protein kinaz ailesine ait bir tirozin kinaz olan nükleer bir proteini kodlar. Bu protein, CDC2 / siklin B kinazın inhibitör tirozin fosforillenmesini katalize eder ve nükleusu sitoplazmada aktif olan CDC2 kinazdan koruyarak DNA replikasyonu ve mitoz arasındaki geçişi koordine eder. G2-M geçişinin negatif düzenleyicisidir. Spesifik olarak Siklin B1 ile bağlanmış CDK1'i fosforilleyip inaktive eder. Bu işlem M fazına girerken minimum, G2 fazına geçerken

maksimum seviyededir. Siklin B1-CDK1'in fosforillenmesi sadece 'Tyr-15' üzerinde meydana gelir ve monomerik CDK1 fosforillenmez. S ve G2 fazlarında aktivitesi artar ve hiperfosforillendiğinde M fazında azalır. Muhtemelen degrade olmasına bağlı olarak M/G1 fazında seviyesi azalır (Yoshida ve diğ., 2004).

WEE1 ile ilişkili hastalıklar arasında gene adını veren Western Equine Ensefalit ve Suppurative Lenfadenit bulunur. İlişkili olduğu yolaklar DNA çift iplik kırık tamiri ve hücre döngüsü düzenlemesinde 14-3-3 proteinin rolü bulunmaktadır. Bu genin transferaz aktivitesi, fosfor içeren grupların taşınması ve protein tirozin kinaz aktivitesi bulunur. Bu genin önemli bir paraloğu *WEE2*'dir (Backert ve diğ., 1999).

NEUROD1

NEUROD1 (Neuronal Differentiation 1), temel helix-loop-helix (bHLH) transkripsiyon faktörlerinin NEUROD ailesinin bir üyesini kodlar. Protein, diğer bHLH proteinleri ile birlikte heterodimerler oluşturur ve E-box olarak da bilinen özgün bir DNA sekansı içeren genlerin transkripsiyonunu aktifleştirir. İnsülin geninin ifadesini düzenler ve bu gende meydana gelen mutasyonlar tip II *Diabetes mellitus* ile sonuçlanır (Ferretti ve diğ., 2003; Lee ve diğ., 2014).

Bir transkripsiyon aktivatörü olarak işlev görür: E-box içeren promotör konsensüs çekirdek sekansları olan 5'-CANNTG-3 'e bağlanarak transkripsiyon aktivasyonuna aracılık eder. p300/CBP transkripsiyon koaktivatör kompleksi ile birleşerek *Sekretin* geninin ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan CDKN1A'yı kodlayan genin transkripsiyonunu uyarır. Erken retina ganglion hücrelerinin, iç kulak duyu nöronlarının, serebellumu veya hipokampusun dentat girus hücre tabakasını oluşturan granül hücrelerinin, pankreasın endokrin adacık hücrelerinin oluşumunu teşvik eden çeşitli hücre farklılaşma yollarının düzenlenmesine katkıda bulunur. PAX6 veya SIX3 ile birlikte hücre kaderinin düzenlenmesi için gereklidir. Dendrit morfogenezi ve serebellar kortekste işlemin devamı için de gereklidir. Nörogenezin önemli transkripsiyonel düzenleyicilerini kodlayan genlerdeki arttırıcı (enhancer) düzenleyici elementler ile kromatin arasında ilişki kurulmasını sağlar (Ferretti ve diğ., 2003; Pataskar ve diğ., 2016).

NEUROD1 ile ilişkili hastalıklar arasında İnsüline Bağımlı Olmayan *Diabetes mellitus* bulunur. İlişkili olduğu yolaklar gelişimsel biyoloji ve embriyonik ve uyarılmış pluripotent kök hücre farklılaşma yolaklarıdır. DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörü aktivitesi ve protein heterodimerizasyon aktivitesi bulunur. Bu genin önemli bir paralogu *NEUROD2*'dir (Lee ve diğ., 1995).

RIPK1

RIPK1 (Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1), serin/treonin protein kinazların reseptörle etkileşen protein (RIP-*receptor interacting protein*) ailesinin bir üyesini kodlar. Kodlanan protein, doku hasarına, patojen tanınmasına cevap olarak ve gelişimsel düzenlemenin bir parçası olarak inflamasyon ve hücre ölümünde rol oynar. RIPK1 / RIPK3 kinaz aracılı nekroz nekroptoz olarak adlandırılır. Farelerde bu genin genetik bozulması doğumdan kısa bir süre sonra ölümle sonuçlanır (Li ve diğ., 2012).

Ölüm reseptörlerinin ligasyonu, patojen tanıma reseptörlerinin (*pathogen recognition receptor*-PRR'ler) aktivasyonu ve DNA hasarını takiben inflamatuar ve hücre ölüm sinyallerini (programlanmış nekroz) dönüştüren serin-treonin kinazdır. TNFR1'in TNF-α ailesi sitokinleri tarafından aktivasyonu sonrasında, TRADD ve TRAF2 reseptöre bağlanır. DAB2IP'i 'Ser-728' de TNF-α'ya bağlı bir şekilde fosforiller ve böylece MAP3K5-JNK apoptotik kaskadını aktive eder. TRAF2'nin 'Lys-63' üzerinden ubikutinlenmesi, mitojenle aktifleştirilen protein kinaz (MAPK) yolağındaki ve NF-κB yolağındaki aşağı akım (downstream) sinyal ileticileri uyarır, bunun sonucunda da inflamatuar molekülleri kodlayan genler aktive olur. Poliubikutinlenmiş protein, NF-κB aktivasyonu için kritik bir olay olan ve IKK kompleksinin düzenleyici alt birimi olan IKBKG / NEMO'ya bağlanır. Diğer hücresel RHIM içeren adaptörler ile etkileşim, gen aktivasyonunu ve hücre ölümünü başlatır. Özellikle RIPK1 ve RIPK3 birliği, nekroza neden olan bir kompleks oluşturur (Park ve diğ., 2009; Li ve diğ., 2012).

RIPK1 ile ilişkili hastalıklar arasında immün yetmezlik ve immün disregülasyon-inflamatuar bağırsak hastalığı-artrit-tekrarlayan enfeksiyonlar-Lenfopeni sendromu bulunur. İlişkide bulunduğu yolaklar arasında nekroptoz ve c-FLIP ile düzenleme [(c-FLIP: Cellular FLICE (FADD-like IL-1β-converting enzyme)-inhibitory protein), anti-apoptotik bir proteindir, sitokindir ve sitokin ve kemoterapiyle indüklenen apoptozu baskılayan kemoterapi rezistans faktörüdür] bulunmaktadır. Özdeş proteinlere bağlanır ve protein kinaz aktivitesi bulunur. Bu genin önemli bir paraloğu *MAP3K9*'dur (Linkermann ve Green, 2014).

***NR4A1* (*NUR77*)**

NR4A1 (Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1), steroid-tiroid hormonu-retinoid reseptörü süper ailesinin bir üyesini kodlar. Genin ifadesi, insan lenfositlerindeki fitohemaglütinin ve fibroblastların serumdaki uyarımı ile indüklenir. Kodlanan protein nükleer bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Proteinin çekirdekten mitokondriye translokasyonu apoptozu indükler (Murphy ve diğ., 1996).

Orphan nükleer reseptörüdür (Biyokimyada orphan reseptör daha önceden tanımlanmış reseptörlere benzer yapısı olan ama endojen ligandı henüz tanımlanmamış reseptör çeşididir, yani ligandı olmayan reseptörlerdir). Karaciğer rejenerasyonu sırasında ifadesi gecikmiş erken genlerin (erken genler immün tepkimelerde hemen antikor vs. üreten, hızlı cevap veren genlerdir) ifadesinin düzenlenmesinde NURR1 ile birlikte hareket edebilir. IL-2'nin NF-κB transaktivasyonunu inhibe edebilir. STK11'i nukleusta hapsederek, sitoplazmik AMPK aktivasyonunu zayıflatır, enerji homeostazına katılır. Yaralanma durumunda vasküler yanıtta rol oynar (Kovalovsky ve diğ., 2002; Tian ve diğ., 2022).

NR4A1 ile ilişkili hastalıklar arasında tükürük bezi karsinomu ve tükürük bezi hastalığı bulunur. İlişkide olduğu yolaklar lenfositlerde kalsinörine bağımlı NFAT sinyalinin rolü ve PI3K/AKT aktivasyonudur. DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörü olarak görev yapar ve diziye özgün olarak DNA'ya bağlanır. Bu genin önemli bir paraloğu *NR4A2*'dir (Murphy ve diğ., 1996; Kovalovsky ve diğ., 2002).

IL-6

IL-6, inflamasyonda ve B hücrelerinin olgunlaşmasında işlev gören bir sitokini kodlar. Ayrıca, kodlanan proteinin, otoimmün hastalığı veya enfeksiyonu olan insanlarda ateş oluşumunu tetikleyebilen endojen bir pirojen olduğu gösterilmiştir. Protein öncelikle, akut ve kronik inflamasyon durumunda üretilir, seruma salınır ve IL-6RA üzerinden transkripsiyonel inflamatuar cevabı tetikler. Bu gen, *diabetes mellitus* ve sistemik juvenil romatoid artrit de dahil olmak üzere birçok inflamatuar hastalıkta rol oynar. Alternatif kırpılma sonucu, birden fazla transkript varyantı oluşur (Jones ve Jenkins, 2018).

Çok çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip bir sitokindir. Akut faz yanıtının güçlü bir indükleyicisidir. Lenfosit ve monosit farklılaşmasında yer alan B-hücrelerinin Ig salgılayan hücrelere son farklılaşmasında önemli bir rol oynar. B hücreleri, T hücreleri, hepatositler, hematopoietik progenitör hücreler ve MSS hücreleri üzerine etkilidir. T(H) 17 hücrelerinin üretimi için gereklidir. Ayrıca miyokin görevi görür. Kas kasılmasından sonra kan dolaşımına salınır ve yağların parçalanmasını arttırmak ve insülin direncini arttırmak için hareket eder. Miyelom ve plazmasitoma büyümesini ve sinir hücrelerinin farklılaşmasını indükler (Jones ve Jenkins, 2018; Murakami ve diğ., 2019).

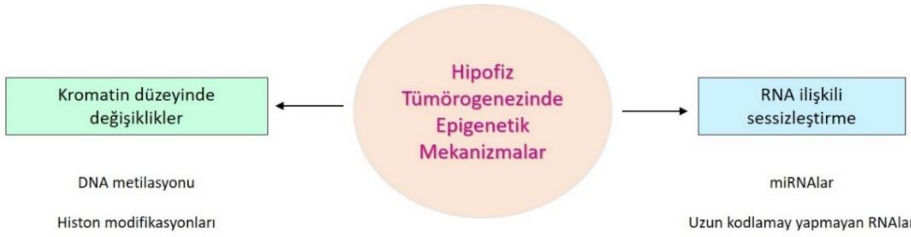
IL-6 (İnterlökin 6), hemopoietik çoğalmada, B hücrelerinin farklılaşmasında ve tümörogenezde fonksiyon gösteren önemli bir immünregülatör sitokindir. Büyük olasılıkla IL-6, çoğalmayı arttırıp apoptozu baskılayarak bu tür tümörleri uyarmaktadır. IL-6, tirozin

fosforillenmesini ve JAK'ların aktivasyonunu tetiklemektedir. Aktive edilmiş JAK'lar, bir homodimeri veya STAT3/1 heterodimeri oluşturan, çekirdeğe translokasyon yapan ve hedef lokustaki STAT bağlama alanına bağlanan STAT3'ü fosforiller (Hirano ve diğ., 1986; Jones ve Jenkins, 2018).

IL-6 ile ilişkili hastalıklar arasında Sistemik Juvenil Romatoid Artrit ve Kaposi Sarkom bulunur. İlişkili olduğu yolaklar transkripsiyon androjen reseptörü nükleer sinyalizasyonu ve hücresel yaşlanmadır. Sinyal reseptörlerine bağlanır ve büyüme faktörü aktivitesi vardır (Hirano ve diğ., 1986).

2.4. EPİGENETİK

Epigenetik, DNA üzerinde yapısal değişikliğe neden olmayan, ancak DNA'nın işlevini etkileyen kimyasal modifikasyonları inceleyen bir çalışma alanıdır. DNA üzerinde meydana gelen metillenme (CH3-metil gruplarının bağlanması/ayrılması), asetillenme, sumoylenme gibi kimyasal değişiklikler, genlerin işlevini ve ifadesini doğrudan etkilemektedir. Epigenetik mekanizmaların bazıları işlevi doğrudan etkilerken [DNA modifikasyonları (metillenme), kromatin modifikasyonları (asetillenme, metillenme, fosforillenme, ubikutinlenme, histon değişimleri, kromozomal etkileşimler)], bazıları da dolaylı yoldan etkilemektedir (post-transkripsiyonel mekanizmalar - mRNA susturulması) (Şekil 2.12) (Hauser ve diğ., 2019).



Şekil 2.12: Epigenetik mekanizmalar (Srirangam Nadhamuni ve Korbonits, 2020)

2.4.1. Hipofiz Adenomları ve Metillenme

Hipofiz tümörleri intrakraniyal neoplazmların en az %15'ini oluşturur (Gittleman ve diğ., 2014). Adenohipofiz, tümör oluşumuna neden olan kortikotrop, somatotrop, laktotrop, mammosomatotrop, tirotrop ve gonadotroplar dahil olmak üzere birçok hormon üreten hücre tipinden oluşur (Melmed, 2011). Son çalışmalar, "hipofiz tümörü" teriminin "hipofiz adenomu"ndan daha uygun olabileceğini, ancak bazı durumlarda literatürde bildirilen bulguları doğru bir şekilde yansıtmak için "adenom" teriminin kullanıldığını göstermektedir (Asa ve diğ., 2017). Bu tümörler, sistemik etkilerle soylarını yansıtan hormonlar üreterek fonksiyonel

olabilir veya zayıflamış hipofiz fonksiyonu ile sistemik sekeller üreterek non-fonksiyonel olabilirler.

Genetik mutasyonların birikmesi, sürekli hücre proliferasyonu, invazyon, anjiyogenez ve hücre ölümü direnci gibi çeşitli onkogenik değişiklikler hipofiz tümörlerinin oluşumuna zemin hazırlar (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bu mutasyonlar, DNA sekansındaki değişikliklerin yanı sıra kromozomal değişiklikler ve kopya sayısı değişikliklerinden de meydana gelebilir. Hipofiz adenomlarının alt tiplerinde meydana gelen çeşitli mutasyonlar büyük ölçekli genomik sekanslamalar sonucu ortaya çıkarmıştır (Lecoq ve diğ., 2015; Ma ve diğ., 2015; Reincke ve diğ., 2015; Bi ve diğ., 2017).

Epigenetik değişiklikler mRNA transkript seviyelerini de değiştirebilir, bu da gen ifadesinin yukarı regülasyonuna veya aşağı regülasyonuna neden olabilir. mRNA transkript seviyelerindeki değişiklikler onkogenik transformasyonun bir parçası olarak ortaya çıkabilir. mRNA ifadesindeki değişiklikler, protein ifade seviyelerinde aşağı akış değişikliklerini modüle edebilir ve bu da hücresel fonksiyonu yönlendirebilir. Buna ek olarak, uzun kodlama yapmayan RNA (lncRNA) ve miRNA'nın diferansiyel ifadesi, onkogeneze neden olabilir (Hauser ve diğ., 2019).

2.4.2. DNA Metillenmesi

DNA metillenmesi, özellikle de metillenmenin genellikle gen susturma ile ilişkili olduğu gen promotörlerindeki CpG adalarında incelenmiştir (Bird, 2002). Histon kuyruklarındaki belirli translasyon sonrası modifikasyon modellerinin gen düzenleyici süreçlerde sinyal olarak işlev görebileceğini belirten "histon kodu" hipotezi (Strahl ve Allis, 2000), hipofiz tümörlerinde histon modifikasyonlarını test eden az sayıda çalışmaya da yol açmıştır.

Gen promotörlerinin metillenmesi genellikle tümörlerde düzensizlik gösterir ve hipofiz tümörlerinde gen inaktivasyonu için ortak bir mekanizma gibi görünmektedir (Baylin ve Jones, 2011). DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri, CpG dinükleotitlerinde metillenmeyi katalize eder, DNMT3A ve DNMT3B enzimleri *de novo* metiltransferaz görevi görür ve DNMT1, bakım metiltransferazı olarak kullanılır (Hauser ve diğ., 2019).

Hücre büyümesi ve sinyalleşmesi ile ilgili çok sayıda gen, hücre döngüsünün düzenleyicileri [Sikline Bağımlı Kinaz 1 (*CDK1*) (Lidhar ve diğ., 1999), *CDKN1B* (Yoshino ve diğ., 2007), Hossain ve diğ., 2009), Retinoblastom Transkripsiyonel Corepressor 1 (*RB1*) (Simpson ve diğ., 2000; Yoshino ve diğ., 2007), CDKN2A proteini (p16INK4a) (Yoshino ve

diğ., 2007), CDKN1B proteini (p27kip1) (Nakayama ve diğ., 1996), Büyüme Tutukluğu ve DNA Hasarı 45g (*GADD45*) (Zhang ve diğ., 2002)]; sinyal iletim yollarının bileşenleri [Ras İlişkili Etki Alanı Ailesi Üyesi 1A (*RASSF1A*) (Qian ve diğ., 2005) ve Ras İlişkili Etki Alanı Ailesi Üyesi 3 (*RASSF3*)]; apoptotik regülatörler [Ölümle İlişkili Protein Kinaz (*DAPK*) (Simpson ve diğ., 2002) ve Hipofiz Tümörü Apoptoz Gen (*PTAG*) (Bahar ve diğ., 2004)]; gelişimsel gen Maternal Expressed 3 (*MEG3*) (Zhao ve diğ., 2005) ve büyüme faktörü sinyal bileşeni Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (*FGFR2*)'ndeki promotör metillenmeleri hipofiz tümörlerinin oluşmasına katkıda bulunabilmektedir (Zhu ve diğ., 2007).

Sonuç olarak, hipofiz tümörlerinin ve Cushing hastalığının gelişiminde genetik ve epigenetik faktörlerin ciddi bir etkisi bulunmaktadır. Bu çalışmada CS ile ilişkili olduğu düşünülen *USP8* ve *p16* genlerinin metillenme profilleri incelenmiştir. Bu sayede ileride hastalığın etyopatogenezinin ortaya çıkartılmasına katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

3. YÖNTEM

3.1. KULLANILAN GEREÇLER

Ayarlanabilir hacimli pipet seti (Eppendorf, Almanya)

Steril pipet uçları (10, 100, 1000 µl) (Fisher Scientific, ABD)

Buzdolabı (Ariston, İtalya)

Derin dondurucu (-20^{0}C) (Electrolux, İsveç)

-80^{0}C Derin Donducuru (Sanyo, Japonya)

Distile Su Cihazı (Nüve, Türkiye)

Hassas Terazi (Shimadzu, Japonya)

Soğutmalı Santrifüj (Hettich, Almanya)

Vorteks (Velp Scientifica, ABD)

Etüv (Hybaid, İngiltere)

Otoklav (Hirayama, Japonya)

LightCycler 480 Real-Time PCR (Bio-Rad, ABD)

Applied Biosystems StepOnePlus™ Instrument Real-Time PCR (Thermo Fisher, ABD)

3.2. HASTA VE KONTROL GRUPLARI

Çalışmada Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Polikliniğinde ACTH salgılayan hipofiz adenomu tanısı konan ve Cerrahpaşa Beyin Cerrahisi kliniğinde ameliyat edilmiş, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde adenom dokuları bulunan, ACTH düzeyi yüksek tespit edilerek Cushing hastalığı tanısı konulan ardışık 32 hastanın ve yaş ile cinsiyet uyumlu kadavralardan elde edilmiş 15 sağlıklı kontrolün parafine gömülmüş dokuları kullanıldı*. Bu dokulardan RNA elde edildikten sonra cDNA elde edildi, örnekler Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (GZ-PZT, Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemi ile hedef genlere uygun primerler kullanılarak incelendi ve gen ifadeleri belirlendi. Daha sonra yine parafine gömülü örneklerden DNA elde edildikten sonra metillenmeye özgü polimeraz zincir tepkimesi (MS-PZR) yöntemi kullanılarak genlerin

metillenme durumu incelendi ve metillenme durumları gen ifadeleri ile karşılaştırılarak ifadenin değişmesine neden olan epigenetik sebepler tespit edildi.

*Çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 21.09.2018 tarih ve 66018902-604.02.02-61829 sayılı yazı onayı ile yapılmıştır (Sayfa 103).

3.3. KANTİTATİF-GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE GEN İFADESİNİN ÖLÇÜLMESİ

3.3.1. Parafine Gömülü Dokulardan RNA Eldesi

Parafine gömülü hipofiz adenom dokularından RNA eldesi "*Purification of Total RNA from FFPE Tissue Sections (Qiagen, 73504, Almanya)"* kiti kullanılarak yapıldı.

1. Bloktaki fazla parafini uzaklaştırmak için 1,5 ml ependorf tüp içindeki 5 mikron kalınlığındaki doku kesitlerine 160 µl deparafinizasyon solüsyonu (ksilen) eklendi.
2. 10 sn vortekslendi ve örneklerin dibe çökmesi için (30 sn, 11.00xg) santrifüjlendi.
3. 56˚C'de 3 dk inkübe edildi, sonra oda ısısına gelene kadar soğutuldu.
4. 150 µl Buffer PKD eklenip, vorteksle karıştırıldı.
5. 1 dk 11.000xg'de santrifüjlendi.
6. Alttaki temiz faz üzerine 10 µl Proteinaz K eklendi. Pipetleyerek nazikçe karıştırıldı.
7. 56˚C'de 15 dk inkübasyon sonrasında sonra 80˚C'de 15 dk inkübe edildi.
8. Alttaki renksiz faz yeni bir 2 ml'lik santrifüj tüpüne alındı.
9. 3 dk buz üzerinde inkübe edildi. Daha sonra 15 dk 20.000xg'de santrifüj edildi.
10. Süpernatant (üst sıvı) yeni bir tüpe alındı.
11. Örneğin yaklaşık 1/10'u kadar olacak şekilde 16 µl DNAz Booster Tamponu ve 10 µl DNAz I stok solüsyon eklendi. Tüp altüst ederek karıştırıldı. Tüpün kenarlarında kalan sıvıyı indirmek için santrifüjlendi.
12. Oda ısısında 15 dk inkübe edildi.
13. 320 µl Buffer RBC eklendi, lizat hafifçe karıştırıldı.
14. Örneğe 720 µl etanol eklendi, pipetleyerek iyice karıştırıldı.
15. Örneğin 700 µl'si Rneasy MinElute tüpüne (filtreli tüp) alındı (2 ml tüp içinde olacak şekilde).
16. 15 sn 8.000xg'de santrifüjlendi. Alt sıvı atıldı. Aynı toplama tüpü yeniden kullanıldı.
17. Tüm örnek bitene kadar işlem tekrarlandı. Aynı toplama tüpü 19. adımda da kullanıldı.

18. Filtreli tüp üzerine 500 µl Buffer RPE eklendi. 15 sn 8.000xg'de santrifüjlendi. Alt sıvı atıldı. Aynı toplama tüpü 20. adımda da kullanıldı.
19. Filtreli tüp üzerine 500 µl Buffer RPE eklendi ve 2 dakika 8.000xg'de santrifüjlendi. Alttaki tüp içindeki sıvıyla birlikte atıldı.
20. Filtreli tüp (Rneasy MinElute tüp) yeni bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi, tüp kapağı açık şekilde 5 dk en yüksek hızda santrifüj edildi (kurutma adımı).
21. Rneasy MinElute filtreli tüp 1,5 ml'lik ependorf içine koyuldu.
22. 14-30 µl RNaz'sız su eklendi, 1 dk en yüksek hızda santrifüjlendi.
23. Daha fazla RNA alınmasını sağlamak için bu işlem 2 defa yapıldı.
24. Elde edilen RNA'ların yoğunluğu ve saflığı NanoDrop Spektrofotometrede ölçülerek örneklerin deneye uygunluğu kontrol edildi.

DNaz I hazırlanışı: Tüpün içinde örnek liyofilize toza 550 µl RNaz'sız su eklendi. Tüp altüst edilerek hafifçe karıştırıldı.

RPE (yıkama) Tamponu hazırlanışı: 11 ml RPE tamponu içeren tüp üzerine 4 hacim (44 ml) %96-100'lük etanol eklendi.

3.3.2. cDNA Eldesi

Çalışma için uygun olan RNA örneklerinden "cDNA Sentez Kiti" (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher, 4368814, ABD*) kullanılarak cDNA elde edildi.

2X RT ana karışımın (master mix'in) hazırlanması

• 10 RT tampon	2 µl
• 25x dNTP karışımı	0,8 µl
• 10x RT random primer	2 µl
• MultiScribe ters transkriptaz (*Reverse transcriptase*)	1 µl
• Nükleazsız su	4,2 µl
Total	10 µl

Bu 2x RT ana karışım buz üzerine hazırlandı ve nazikçe karıştırıldı.

Ters transkripsiyon reaksiyonun hazırlanması

1. Her örnek için eppendorfa 10 µl ana karışım eklendi.
2. Ana karışım üzerine 10 µl RNA eklendi, 2-3 defa pipetleyip karıştırıldı.
3. Kapağı kapatıldı.
4. Hava kabarcığı kalmayacak şekilde santrifüjlendi.
5. Termal döngü cihazına konana dek örnekler buz üzerinde saklandı.
6. Termal döngü cihazında 25˚C'de 10 dk, 37˚C'de 120 dk, 85˚C'de 5 dk ve en son +4˚C'de tutularak cDNA'lar elde edildi.

3.3.3. GZ-PZR (qRT-PCR) Yöntemi ile Gen İfadesinin Ölçülmesi

Genlerin kontrol ve adenomlu dokulardaki ifadesi *Applied Biosystems StepOnePlus™ Instrument Real-Time PCR (Thermo Fisher, ABD)* cihazında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) yöntemi ile analiz edildi. Deneyde incelenecek hedef genlere ilave olarak normalizasyon için 18S *housekeeping* referans genin de ifade analizi yapıldı. GZ-PZR yöntemi ile hedef ve *housekeeping* genlerin ifade analizini yapmak için bu genlerin mRNA transkriptlerinin kopya sayısı belirlendi. Bunun için de bu genlerin mRNA transkriptlerinden elde edilen cDNA'lar, incelenen genlerin cDNA dizisine özgü primer çifti kullanılarak polimeraz zincir tepkimesi (Tablo 3.1) ile çoğaltıldı ve çoğalan cDNA'ların kopya sayıları yine cDNA dizilerine özgül olarak tasarlanmış hibridizasyon probları kullanılarak tespit edildi. Elde edilen eşik döngü (*cycle threshold-Ct*) değerleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak hedef gen ve referans gen arasındaki ifade farklılıklarının belirlenmesinde kullanıldı. 0,9-1,1 arasındaki değerler gen ifadesinin değişmemiş olduğunu gösterirken, 0,9'dan küçük değerler gen ifadesinin azalmış olduğunu, 1,1'den yüksek değerler ise gen ifadesinin artmış olduğunu göstermektedir (Livak ve Schmittgen, 2001).

$$2^{-\Delta\Delta CT}=2^{-[\text{Tümörlü doku (Hedef gen CT'si-Referans gen CT'si)-Normal doku (Hedef gen CT'si-Referans gen CT'si)}]}$$

Tablo 3.1: GZ-PZR Reaksiyon İçeriği

İçerik Adı	Hacim (µl)
Ana karışım (master mix)	10
cDNA	2
Su	8

3.4. METİLLENMEYE ÖZGÜ POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ (MS-PZR) İLE GEN İFADESİNİ ETKİLEYEN EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN BELİRLENMESİ

3.4.1. Parafine Gömülü Dokulardan DNA Eldesi

Her numuneden dört adet 10 µ kalınlığında kesitler alınıp "*QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*" (*Qiagen, 56404, GmbH, Hilden, Almanya*) ile DNA izolasyonu yapıldı.

1. Parafin bloklardan 10 µ kalınlığında kesitler alındı.
2. Hızlı bir şekilde 2ml'lik mikrosantrifüj tüplerine kesitler aktarıldıktan sonra üzerlerine ksilen eklendi ve 10 sn vortekslendi.
3. Ardından yüksek hızda 2 dk santrifüjlendi.
4. Pipet yardımıyla üst sıvı atıldıktan sonra %96-100'lük etanol eklendi ve vortekslendi, hemen sonra yüksek hızda (11.000xg) 2 dk santrifüjlenip ardından üst sıvı uzaklaştırıldı.
5. Etanol uçana kadar mikrosantrifüj tüplerin kapağı açılacak 10 dk boyunca inkübe edildi.
6. Lizis tamponu eklenerek resüspanse edildi.
7. 20 µl proteinaz K eklenip vortekslendi.
8. İlk önce tamamen lizat haline gelmesi için 56˚C'de ve 90˚C'de birer saat inkübasyona bırakıldı, ardından saflaştırma tamponu eklenip vortekslendi ve etanol eklenip tekrar vortekslendi.
9. Elde edilen lizat QIAamp MinElute kolonuna aktarıldı ve 6.000xg'de 1 dk santrifüjlendi.
10. Önce AW1 yıkama tamponu eklenip 8.000xg'de 1 dk, hemen ardından AW2 yıkama tamponu eklenip 8.000xg'de santrifüjlendi, membranın kuruması için yüksek hızda 20.000xg'de santrifüjleme yapıldı ve elüsyon tamponu membran merkezine eklenip oda sıcaklığında 1dk kadar inkübe edildi.

11. Yüksek hızda 20.000xg'de 1 dk santrifüjlendi.
12. DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA'ların miktar ve saflık tayini Spektrofotometrede (Picodrop) yapıldı.
13. DNA'ların 260 ve 280 nm'deki absorbansları okunduktan sonra konsantrasyon ve saflıkları aşağıda belirtilen formüller ile hesaplandı.
    "DNA konsantrasyonu (mg/ml)= OD 260 nm x Seyreltme Faktörü x50, DNA Saflığı = OD 260/OD 280 = 1,8±0,2"

3.4.2. MS-PZR ile Gendeki Metillenmenin ve Epigenetik Değişikliklerin Belirlenmesi

USP8 ve *p16* (*CDKN2A*) genlerindeki metillenme durumunu incelemek amacıyla parafine gömülü hipofiz adenom doku bloklarından genomik DNA elde edildi ve sodyum bisülfit modifikasyon yöntemi uygulandı. Modifiye edilmiş DNA örnekleri hem metillenmiş hem de metillenmemiş bölgeye özgü primerler (Tablo 3.2) kullanılarak PZR yöntemi ile çoğaltıldı ve örnekler agaroz jel elektroforezi üzerinde yürütülerek incelendi. Protokolün en önemli adımı, sodyum bisülfitin DNA'daki 5-metilsitozine (5-MeC) karşı metillenmemiş sitozinleri seçerek, bunlarla kimyasal tepkimeye girmesidir. Bu işlem sadece tek zincir üzerinde gerçekleşmekte olup, sodyum bisülfit sayesinde DNA'daki metillenmemiş sitozinler amin gruplarını kaybederek urasile dönüşür. Bu tez çalışmasında sodyum bisülfit modifikasyonu "Bisülfit Modifikasyon Kiti *(EZ DNA Methylation-GoldTM Kit, D5005, ZymoResearch, ABD*)" kullanılarak yapıldı.

Tablo 3.2: *p16* ve *USP8* için metillenmiş ve metillenmemiş bölgelere özgü tasarlanan ileri ve geri yönde primerler

GEN	M (+) /MET (-)	İLERİ/GERİ	DİZİ	UZUNLUK (BP)
p16	Metillenmiş	İleri	TTATTAgAgggTggggCggATCgC	24
	Metillenmiş	Geri	gACCCCgAACCgCgACCgTAA	21
	Metillenmemiş	İleri	TTATTAgAgggTggggTggATTgT	24
	Metillenmemiş	Geri	CAACCCCAAACCACAACCATAA	22

USP8	Metillenmiş	İleri	TTTTATAATAAggTTTAggCgTCgT	25
	Metillenmiş	Geri	AAAAACgAAATTTCTCTAAATCgAA	25
	Metillenmemiş	İleri	TTTATAATAAggTTTAggTgTTgT	24
	Metillenmemiş	Geri	CAAAAACAAAATTTCTCTAAATCAAA	26

Sodyum Bisülfit Modifikasyonu;

1. 20 µl DNA üzerine CT dönüştürücü reaktif eklenip örnekler ısı döngü cihazında belirlenen sürelerde 95˚C'de ve 64˚C'de bekletildi.
2. Bu işlemi takiben örnekler toplama tüplerine yerleştirilip üzerlerine bağlanma tamponu eklendi.
3. 12.000xg'de 30 sn santrifüjlendikten sonra alttaki sıvı atıldı, örnekler üzerine yıkama tamponu eklendi.
4. Örnekler 12.000xg'de santrifüjlendikten sonra alttaki sıvı atıldı ve sülfonilsizleşme tamponu eklenip oda sıcaklığında 15-20 dk bekletildi.
5. Daha sonra 12.000xg'de 30 sn santrifüjlenip alttaki sıvı uzaklaştırıldı.
6. Yıkama tamponu eklenip 12.000xg'de 30 sn santrifüjlendi ve alttaki sıvı uzaklaştırıldı.
7. Yıkama aşaması bir kez daha tekrarlanıp örnekler 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve elüsyon tamponu eklenip 12.000xg'de 30 sn santrifüjlendi.
8. Örnekler kullanılana kadar -20˚C derin dondurucuda muhafaza edildi.

Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZR):

Bisülfit ile modifiye edilmiş DNA örnekleri, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Tablo 3.3) ile *LightCycler 480 Real-Time PCR (Bio-Rad, ABD)* cihazında çoğaltıldı.

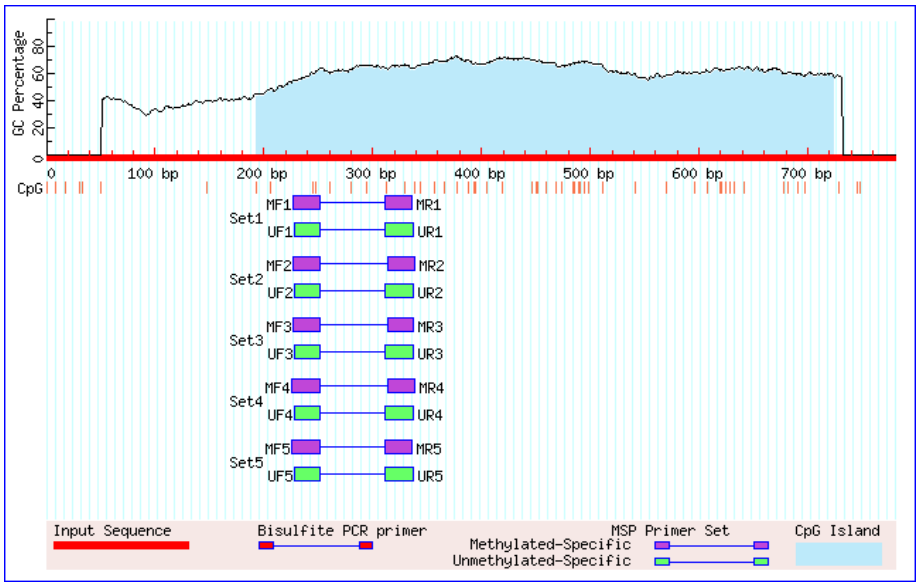
Tablo 3.3: MS-PCR reaksiyon içeriği

İçerik Adı	Hacim (µl)
dH_2O	8,2
Tampon	1,25

Mg	1,25
dNTP	0,2
İleri primer	0,5
Geri primer	0,5
Taq	0,15

Bu işlem için *USP8* ve *p16* genlerinin promotör bölgelerindeki metillenmiş ve metillenmemiş bölgelere özgü ayrı primer çiftleri "*Meth Primer*" (https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi) primer tasarlama programı (Tablo 3.4) kullanılarak tasarlandı. Bu amaçla, genlere ait promotör dizileri Ensembl veri tabanından bulundu ve Meth Primer programına yüklendi. Ürün boyutu min. 100 baz çifti (bç), max. 300 bç., primer boyutları 20-30 bç aralığında olacak şekilde uygun parametreler seçildi ve program tarafından üretilen primerler kullanıldı. Primerlerin ilgili diziye uygunluğu gözle ve Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) programı kullanılarak kontrol edildi.

Tablo 3.4: Meth Primer programı ile metillenmiş ve metillenmemiş bölgeye özgü primer çiftleri



Agaroz Jel Elektroforezi:

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda, agaroz jel elektroforezi yöntemi ile ürünlerin elde edilip edilemediği kontrol edildi. Etidyum bromür ile hazırlanmış %2'lik agaroz jele PCR ürünleri yüklendi, 120 V güç kaynağı ile yürütüldü ve bantlar UV altında incelendi.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Genlerin kontrol ve adenomlu dokulardaki ifadesi *Applied Biosystems StepOnePlus™ Instrument Real-Time PCR (Thermo Fisher, ABD)* cihazında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi ile tespit edildi. Elde edilen eşik döngü (*cycle threshold-Ct*) değerleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak hedef gen ve referans gen arasındaki ifade farklılıklarının belirlenmesinde kullanıldı. 0,9-1,1 arasındaki değerler gen ifadesinin değişmemiş olduğunu gösterirken, 0,9'dan küçük değerler gen ifadesinin azalmış olduğunu, 1,1'den yüksek değerler ise gen ifadesinin artmış olduğunu göstermektedir (Livak ve Schmittgen, 2001).

$$2^{-\Delta\Delta CT}=2^{-[\text{Tümörlü doku (Hedef gen CT'si-Referans gen CT'si)-Normal doku (Hedef gen CT'si-Referans gen CT'si)}]}$$

Çalışma sonucunda elde edilen tüm veriler *IBM SPSS Statistics 21* (IBM Corp. Released 2012 IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanılarak incelendi. Gen ifadeleri arasındaki karşılaştırmada Wilcoxon Signed Rank testi ve metillenme durumu ile klinik parametreler arasındaki karşılaştırmada Pearson's Ki-Kare kullanıldı. Genlerin ifadesindeki değişimlerin birbiri ile korelasyonu Spearman testi ile analiz edildi. $p<0,05$ olan değerler anlamlı olarak değerlendirildi.

Çok değişkenli analiz yöntemlerinden birisi olan ve faktör analizi uygulamaları içerisinde yer alan *Temel Bileşen Analizi (TBA) (Principle Component Analysis, PCA)* (The Jamovi Project, 2021) ile değişkenler arasındaki doğrusal ilişki belirlenmektedir. TBA; değişkenler arasındaki korelasyondan (doğrusal ilişki) yararlanan, bu sayede boyut indirgeyerek kombinasyonlardan yeni değişkenler elde eden ve bu sonuçları yorumlayabilen çok değişkenli istatistiksel bir yöntemdir (R Core Team, 2021). Değişkenlerin arasında bağımlılık olması ve birbirleriyle ilişkide olmaları durumunda özellikle bu yöntem kullanılmaktadır. Bu analizde, gözlem (n) ve değişkenden (p) oluşan veri matrisi, çok fazla sayıda noktadan oluşan bir topluluk gibi ifade edilmektedir. Eğer matris içerisinde ham veriler kullanılıyorsa ve bu verilerin ölçü birimleri aynıysa, varyans-kovaryans matrisinden yararlanılır.

Bu yöntemde amaç; verilerin birbirleriyle ilişkilerini açıklarken olabilecek en az bilgi kaybıyla korelasyonlar yani doğrusal bileşenler oluşturmaktır. Bu korelasyon aynı yönde (pozitif) olabileceği gibi zıt yönde (negatif) de olabilmektedir. Bu yöntemle değişkenler, en yüksek etkiden en düşük etkiye doğru hiyerarşik bir varyans yüzdesiyle sıralanıp boyutlanır. Boyutlara (varyans) indirgeme sayesinde de veriler arasındaki doğrusal ve/veya doğrusal olmayan ilişkiler bulunabilmektedir. Her bir boyut, kendi içerisinde özel bir ilişkide yer almakta ve önemli bilgileri sığdırmaktadır. Böylece, her bir boyutta yer alan değişkenler, kendi içerisinde daha kolay bir şekilde yorumlanabilmektedir (Revelle, 2019). Bu çalışmada, gen ifadelerinin birbirleri ve klinik parametrelerle ilişkisi ile *p16* kısmi metillenmesinin klinik parametrelerle ilişkisi Temel Bileşen Analizi yöntemine göre incelenerek yorumlandı.

4. BULGULAR

Çalışmada Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Polikliniğinde ACTH salgılayan hipofiz adenomu tanısı konan ve Cerrahpaşa Beyin Cerrahisi kliniğinde ameliyat edilmiş, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde adenom dokuları bulunan, ACTH düzeyi yüksek tespit edilerek Cushing hastalığı tanısı konulan ardışık 32 hasta ile yaş ve cinsiyet uyumlu 15 sağlıklı kontrolün parafine gömülmüş dokuları kullanıldı.

4.1. GZ-PZR YÖNTEMİ İLE GEN İFADESİNİN ÖLÇÜLMESİ

Parafine gömülü hasta ve kontrol grubu doku kesitlerinden elde edilen RNA'ların 260 nm / 280 nm dalga boylarındaki OD değerlerinin ~2,0 olduğu, yoğunluklarının ise 1,3-108 ng/µl olduğu tespit edildi (Tablo 4.1). Parafine gömülü arşiv dokularının farklı senelere ait olması, dokuların boyutundaki farklılıklar ve kesitlerden elde edilen doku miktarları, her bir hasta ve kontrol örneğinin yoğunluklarının farklı düzeylerde çıkmasına sebep olmuştur.

Tablo 4.1: Hasta ve kontrol grubu örneklerinden elde edilen RNA'ların yoğunluk ve saflık tayini

HASTA GRUBU	RNA		KONTROL GRUBU	RNA	
	Yoğunluk	Saflık		Yoğunluk	Saflık
CH1	1,3	1,98	**K1**	32,1	2,04
CH2	3,80	1,94	**K2**	19,3	1,96
CH3	10,00	2,02	**K3**	26,1	1,99
CH4	54,10	2,05	**K4**	14,6	2,05
CH5	23,90	1,97	**K5**	2,6	1,97
CH6	52,10	1,93	**K6**	7,1	1,96
CH7	1,90	1,92	**K7**	12,1	1,99
CH8	2,20	2,08	**K8**	28,7	2,04
CH9	16,00	2,01	**K9**	24,2	2,03
CH10	12,70	2,04	**K10**	2,4	1,92
CH11	1,90	2,03	**K11**	4,3	2,09
CH12	37,30	2,01	**K12**	11,3	2,01
CH13	4,30	1,95	**K13**	50,2	2,02
CH14	13,1	1,99	**K14**	2,1	1,96
CH15	16,30	1,9	**K15**	2,5	1,94
CH16	8,30	2,03			
CH17	15,4	1,98			
CH18	40,70	2,02			
CH19	18,70	1,99			
CH20	11,10	2,05			
CH21	2,70	1,93			
CH22	3,40	1,96			
CH23	2,50	1,95			
CH24	18,00	2,04			
CH25	57,40	2,02			
CH26	3,40	2,11			
CH27	14,00	1,95			
CH28	99,50	2,0			
CH29	11,10	2,06			
CH30	108,00	2.03			
CH31	5,70	1,96			
CH32	52,20	2,02			

***(CS:** Cushing Hastalığı, **K:** Kontrol grubu)*

32 Hasta ve 15 kontrol grubu dokusunda *USP-8*, *USP2*, *VPS28*, *STAM2* (deubikutinlenme enzimleri), *IL-6*, *BRG1* (*SMARCA4*), *EGFR*, *WEE1*, *p16* (*CDKN21*), *SİKLİN D1* (*CCND1*), *HDAC2*, *CABLES1* (inflamasyon, senesens, hücre döngüsü, tümör baskılayıcı genler), *NR4A1* (*NUR77*) (transkripsiyon faktörü), *NEUROD1* (kök hücre ile ilgili gen) ve *RIPK1* (hücre ölümü ile ilgili gen) genlerinin ifade analizi GZ-PZR yöntemi ile gerçekleştirildi (Tablo 4.2, Tablo 4.3). Gen ifade analiz sonuçları, hastaların yaş, cinsiyet, kilo, kortizol seviyeleri, ACTH seviyeleri, baskılama testleri, invazyon durumu ve adenom tipi gibi klinik ve patolojik parametrelerle birlikte değerlendirildi.

Tablo 4.2: Hasta grubuna ait GZ-PZR yöntemi sonucu genlerin ifade değişimleri

	CABLES1	SİKLİN D1	p16	EGFR	HDAC2	IL6	NEUROD1	NR4A1	RIPK1	BRG1	STAM2	USP2	USP8	VPS28	WEE1
CH1	0,21	0,24	0,00	0,49	0,36	0,01	0,15	2,43	0,01	0,14	0,11	0,67	0,09	0,40	0,47
CH2	2,31	2,74	1,63	1,31	6,06	7,22	0,95	1,28	3,04	1,98	0,46	3,46	1,36	26,37	8,71
CH3	6,12	23,37	0,61	0,49	2,27	2,71	0,36	15,95	1,14	0,74	0,17	1,30	0,51	0,30	6,20
CH4	1,18	34,93	178,69	0,10	1,49	0,19	21,64	21,50	0,85	3,20	5,18	17,27	0,06	2,21	47,13
CH5	346,51	156,83	3,09	34,80	2,43	2,89	0,38	14,77	1,22	0,79	6,08	1,38	0,55	12,22	24,12
CH6	31,85	27,94	0,83	26,93	3,07	3,66	4,03	15,93	13,00	16,56	8,33	1,75	0,69	42,68	87,43
CH7	0,03	0,02	0,02	0,02	0,09	0,10	0,01	0,02	0,04	0,03	0,01	0,05	0,02	0,01	0,01
CH8	0,21	1,69	0,15	2,04	0,56	0,67	0,09	0,12	0,28	0,18	0,04	0,32	0,13	0,07	0,30
CH9	0,25	6,85	0,18	4,73	0,66	0,79	0,75	3,60	0,33	0,22	0,05	0,38	0,15	0,09	2,18
CH10	43,92	20,12	0,35	2,47	0,18	0,21	3,56	21,19	0,09	2,78	2,72	1,12	1,28	1,65	5,79
CH11	0,61	3,39	0,43	0,34	1,59	1,89	16,84	0,33	0,80	0,52	0,12	0,91	0,36	0,21	2,84
CH12	44,31	7,42	1,96	10,24	3,61	0,53	0,32	43,42	0,22	4,78	4,36	0,25	3,27	0,06	7,36
CH13	0,00	0,23	0,00	0,02	0,01	0,01	0,00	0,28	0,01	0,68	0,00	0,01	0,00	0,00	0,06
CH14	0,24	0,31	0,00	0,24	0,08	0,01	0,00	0,02	0,06	0,03	0,09	0,09	0,02	0,05	1,77
CH15	5,51	2,56	10,33	8,28	38,38	45,76	1,10	8,08	19,26	12,58	2,89	21,91	8,65	5,21	6,60
CH16	17,67	1,53	0,08	0,63	0,35	0,42	0,97	0,07	0,18	0,12	0,31	0,81	0,08	0,76	3,04
CH17	0,51	0,48	0,02	0,17	0,07	0,08	0,00	1,31	0,39	0,02	4,19	0,58	0,26	0,07	2,51
CH18	6,02	94,06	12,45	1303,89	11,25	13,41	1,77	414,22	5,64	3,69	0,85	6,42	2,53	50,89	170,33
CH19	0,05	3,22	0,24	1,03	0,91	0,23	0,03	7,24	0,94	2,85	0,49	0,11	11,73	0,84	2,13
CH20	0,03	1,39	0,01	0,03	0,12	0,14	4,73	1,04	0,06	0,04	0,01	0,07	0,84	1,14	0,63
CH21	0,11	4,46	0,07	0,23	1,07	1,28	2,38	0,23	0,54	0,35	0,08	0,61	0,24	0,14	0,18
CH22	11,26	13,33	118,50	6,36	29,49	35,17	4,63	817,59	14,80	9,67	2,22	16,84	6,65	3,86	4,87
CH23	0,08	1,69	0,01	0,73	0,21	2,01	0,68	0,04	0,10	0,07	0,02	0,12	0,05	0,90	0,42
CH24	61,52	27,60	529,58	26,72	1,60	15,63	9,66	0,34	0,81	0,53	0,12	0,92	18,41	8,40	45,36
CH25	100,63	41,26	4,47	3,58	16,59	19,78	2,61	3,49	8,32	5,44	1,25	9,47	3,74	2,17	2,74
CH26	4,30	0,18	3,03	2,43	11,25	13,42	1,77	2,37	5,65	3,69	0,85	6,43	2,54	1,47	1,86
CH27	0,78	0,12	0,02	0,22	0,08	0,09	0,10	0,02	0,04	0,03	0,01	0,18	1,70	0,32	1,67
CH28	0,53	13,24	0,38	153,23	1,40	1,67	0,22	9,88	5,85	0,46	0,11	12,85	5,00	0,18	23,97
CH29	3,04	9,83	43,37	3,46	0,25	0,29	20,28	0,05	0,12	2,64	0,15	1,20	0,02	3,86	5,36
CH30	0,72	0,43	0,97	6,45	0,16	0,01	0,00	0,52	0,06	1,61	0,34	0,48	1,70	0,61	2,40
CH31	3,74	19,52	2,55	2,04	9,46	11,28	1,58	1,04	4,75	3,10	0,71	5,40	2,13	1,24	3,44
CH32	0,28	0,79	0,79	0,16	2,95	3,52	0,46	0,62	1,48	0,97	0,22	1,69	0,67	0,39	16,95

Tablo 4.3: Hasta grubuna ait genlerin ifade analiz sonuçlarının yüzde oranları

	ARTAN n (%)	AZALAN n (%)	DEĞİŞMEYEN n (%)
CABLES1	16 (%50)	16 (%50)	yok
SİKLİN D1	23 (%72)	9 (%27)	yok
p16	12 (%38)	19 (%59)	1 (%3)
EGFR	17 (%53)	14 (%44)	1 (%3)
HDAC2	16 (%50)	14 (%44)	2 (%6)
IL6	16 (%50)	16 (%50)	yok
NEUROD1	13 (%41)	16 (%50)	3 (%9)
NR4A1	16 (%50)	14 (%48)	2 (%6)
RIPK1	12 (%38)	19 (%59)	1 (%3)
BRG1	15 (%47)	16 (%50)	1 (%3)
STAM2	9 (%28)	23 (%72)	yok
USP2	15 (%47)	15 (%47)	2 (%6)
USP8	15 (%47)	17 (%53)	yok
VPS28	14 (%44)	17 (%53)	1 (%3)
WEE1	25 (%78)	7 (%22)	yok

CABLES1 geninin ifade analizi sonuçlarında normal doku örnekleri ile kıyaslandığında 32 tümör doku örneğinin 16'sında ifadede azalma (%50), diğer 16'sında (%50) ise artma görüldü (Tablo 4.3). Normal dokuya göre tümör dokularındaki *CABLES1* geni ifade düzeyindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,017) (Tablo 4.4). *SİKLİN D1*'in

ifadesi incelendiğinde örneklerin 23'ünde (%72) artış, 9'unda (%27) azalış, *p16* ifadesi için örneklerin 19'unda (%59) azalma, 12'sinde (%38) artış gözlenirken, doku örneklerinin 1'inde (%3) herhangi bir ifade değişimi saptanmadı (Tablo 4.3). Normal dokuya göre tümör dokularındaki *SİKLİN D1* geni ifade düzeyindeki artış istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulundu (p=0,004) (Tablo 4.4). *EGFR* ifadesi için örneklerin 17'sinde (%53) bir artış gözlenirken, 15'inde (%44) düşüş görüldü ancak 1'inde (%3) herhangi bir ifade değişimi görülmedi. *HDAC2* ifadesi için örneklerin 16'sında (%50) ifade artarken, 14'ünde (%44) azaldı, 2'sinde (%6) ise ifade değişimi saptanmadı (Tablo 4.3). *IL-6* ifadesi için örneklerin 16'sında (%50) azalma görülürken, diğer 16'sında (%50) artma görüldü (Tablo 4.3). *NEUROD1* ifadesi için örneklerin 16'sında (%50) azalma, 13'ünde artma (%41) görülürken, 3'ünde (%9) ise herhangi bir ifade değişimi görülmedi (Tablo 4.3). Normal dokuya göre tümör dokularındaki *NEUROD1* geni ifade düzeyindeki azalma istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulundu (p=0,001) (Tablo 4.4). *NR4A1* ifadesi açısından incelendiğinde, örneklerin 16'sında (%50) ifadenin arttığı, 14'ünde (%48) azaldığı saptanırken, 2'sinde (%6) ise ifade değişimi saptanmadı (Tablo 4.3). Normal dokuya göre tümör dokularındaki *NR4A1* geni ifade düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,018) (Tablo 4.4). *RIPK1* gen ifadesinde örneklerin 19'unda azalma (%59), 12'sinde (%38) artış gözlenirken, doku örneklerinin 1'inde (%3) herhangi bir ifade değişimi saptanmadı (Tablo 4.3). Örneklerin 16'sında (%50) *BRG1* ifadesinin azaldığı görülürken 15'inde (%47) artış saptandı, 1'inde ise (%3) herhangi bir ifade değişimi saptanmadı (Tablo 4.3). Örneklerin 23'ünde (%72) *STAM2* ifadesi azalırken, 9'unda (%28) ise artma görüldü (Tablo 4.3). *USP2* ifadesi örneklerin 15'inde (%47) azalırken, 15'inde (%47) artış görüldü, 2'sinde (%6) ise değişim saptanmadı (Tablo 4.3). Normal dokuya göre tümör dokularındaki *USP2* geni ifade düzeyindeki azalma istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulundu (p=0,002) (Tablo 4.4). Örneklerin 17'sinde (%53) *USP8* ifadesinde azalma, 15'inde ise (%47) artış görüldü (Tablo 4.3). *VPS28* ifadesin örneklerin 17'sinde (%53) azalırken, 14'ünde (%44) artış gözlendi, 1'inde (%3) herhangi bir ifade değişimi görülmedi (Tablo 4.3). *WEE1* gen ifadesi örneklerin 25'inde (%78) artarken, 7'sinde (%22) azaldı (Tablo 4.3). Normal dokuya göre tümör dokularındaki *WEE1* geni ifade düzeyindeki artış istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulundu (p=0,000) (Tablo 4.5).

Çalışmaya dahil edilen kontrol doku örneklerinin GZ-PZR sonucunda elde edilen ΔCt değerleri Tablo 4.4'te, tümör ve kontrol doku örneklerinin Ct, ΔCt, ΔΔCt ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.4: Kontrol grubuna ait gen ifadesi değerleri

	CABLES1	***SİKLİN D1***	***p16***	***EGFR***	***HDAC2***	***IL-6***	***NEUROD1***	***NR4A1***	***RIPK1***	***BRG1***	***STAM2***	***USP2***	***USP8***	***VPS28***	***WEE1***
K1	14,87	10,37	15,33	13,85	21,01	16,98	15,76	21,01	21,01	21,01	13,93	13,88	16,92	18,96	13,29
K2	14,94	10,96	12,95	14,78	16,25	20,79	14,44	12,67	15,94	14,97	12,84	15,49	13,86	11,98	13,93
K3	17,39	12,60	23,04	15,34	18,00	23,04	16,64	13,00	23,04	17,74	15,98	16,30	17,83	14,94	15,01
K4	20,11	9,10	14,97	13,45	19,41	19,95	13,88	12,89	19,95	14,77	12,26	16,94	19,95	12,92	12,91
K5	16,18	8,86	16,33	14,86	20,93	20,93	17,14	15,83	20,93	15,91	13,60	15,14	15,38	14,25	11,59
K6	13,21	7,60	11,61	12,06	14,00	19,10	12,37	8,60	14,66	17,36	11,76	12,61	12,36	9,62	11,21
K7	16,12	11,63	20,40	16,89	20,40	20,40	22,53	13,90	16,90	20,40	10,74	16,51	16,30	17,36	12,61
K8	24,04	17,13	27,05	27,05	27,05	27,05	27,05	22,67	21,98	27,05	19,15	27,05	27,05	27,05	20,45
K9	19,53	10,85	20,39	17,81	20,39	20,39	12,19	17,35	20,39	20,39	20,39	20,39	20,39	14,59	20,39
K10	13,70	10,16	13,77	14,90	16,79	23,29	11,84	16,64	16,93	17,27	11,37	16,12	15,52	13,45	14,25
K11	23,24	14,55	23,24	19,20	18,04	23,24	23,24	23,24	23,24	23,24	14,41	23,24	23,24	17,43	18,43
K12	17,22	12,24	26,24	16,40	20,24	24,27	24,27	20,16	19,48	20,14	16,22	19,24	19,91	17,83	13,11
K13	8,81	4,00	18,98	12,61	13,01	-	6,95	14,76	11,98	11,02	7,73	-	10,75	10,89	8,99
K14	14,22	16,23	14,11	9,49	13,79	7,93	12,19	15,24	13,23	13,71	10,05	-	12,52	-	14,25
K15	21,06	21,06	21,06	15,60	21,06	21,06	21,06	21,06	21,06	21,06	17,00	21,06	16,00	21,06	21,06

Tablo 4.5: Tümör ve kontrol doku örneklerinde genlerinin Ct, ΔCt, ΔΔCt, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ve p değerleri

		Hedef Ct Ort±SS	**Referans Ct Ort±SS**	**ΔCt Ort±SS**	**ΔΔCt**	**$2^{-\Delta\Delta Ct}$**	****p***
CABLES1	**Tümör**	41,80±3,54	27,62±3,35	14,18±4,23	-2,01	74,05	***0,017***
	Kontrol	39,84±3,65	23,20±2,53	16,20±0,56	0	1	
SİKLİN D1	**Tümör**	37,01±3,25	27,62±3,35	9,39±3,29	-2,58	37,96	***0,004***
	Kontrol	34,68±3,61	23,20±2,53	11,99±1,76	0	1	
p16	**Tümör**	42,66±3,75	27,62±3,35	15,04±4,99	0,39	42,11	0,913
	Kontrol	39,45±4,30	23,20±2,53	14,65±0,45	0	1	
EGFR	**Tümör**	41,31±3,47	27,62±3,35	13,69±3,74	-0,68	24,95	0,179
	Kontrol	37,75±2,69	23,20±2,53	14,37±0,59	0	1	
HDAC2	**Tümör**	43,52±2,82	27,62±3,35	15,90±3,40	-1,47	25,81	0,058
	Kontrol	41,28±3,41	23,20±2,53	17,37±1,00	0	1	
IL-6	**Tümör**	43,93±2,06	27,62±3,35	16,32±4,10	0,99	22,32	0,411
	Kontrol	43,22±3,85	23,20±2,53	15,33±0,60	0	1	

NEUROD1	**Tümör**	42,46±3,05	27,62±3,35	14,81±4,19	-1,20	26,44	***0,001***
	Kontrol	38,86±3,83	23,20±2,53	16,01±0,91	0	1	
NR4A1	**Tümör**	40,95±3,42	27,62±3,35	13,36±3,67	-1,23	50,45	***0,018***
	Kontrol	39,65±4,19	23,20±2,53	14,60±0,47	0	1	
RIPK1	**Tümör**	43,43±2,25	27,62±3,35	15,81±3,63	-0,87	23,60	0,285
	Kontrol	41,42±3,73	23,20±2,53	16,68±0,77	0	1	
BRG1	**Tümör**	42,19±2,98	27,62±3,35	14,74±3,09	-0,21	19,49	0,442
	Kontrol	40,08±3,83	23,20±2,53	14,95±0,30	0	1	
STAM2	**Tümör**	41,70±3,38	27,62±3,35	14,08±3,35	0,23	19,29	0,934
	Kontrol	36,74±3,42	23,20±2,53	13,85±0,87	0	1	
USP2	**Tümör**	42,88±2,58	27,62±3,35	15,26±3,17	-1,67	25,16	***0,002***
	Kontrol	41,14±3,71	23,20±2,53	16,93±0,89	0	1	
USP8	**Tümör**	42,39±3,11	27,62±3,35	14,77±3,42	0,82	18,63	0,621
	Kontrol	38,80±3,95	23,20±2,53	13,95±0,85	0	1	
VPS28	**Tümör**	41,35±3,04	27,62±3,35	13,73±3,34	0,05	20,16	0,913
	Kontrol	38,10±4,00	23,20±2,53	13,68±0,93	0	1	
WEE1	**Tümör**	39,94±3,11	27,62±3,35	12,48±2,84	-3,04	43,61	***0,000***
	Kontrol	38,27±3,15	23,20±2,53	15,36±0,54	0	1	

4.1.1. Gen İfadeleri Arasındaki Korelasyon Analizi

Çalışmaya dahil edilen 32 hastanın tümör ve kontrol doku örneklerinde çalışılan genlerin birbirleri ile korelasyonu Spearman testi kullanılarak analiz edildi. Genler arasındaki p ve r^2 değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

r^2 değerleri incelendiğinde, *USP2*, *RIPK1*, *HDAC2* ve *IL-6* genleri arasında yüksek derecede korelasyon tespit edildi. *USP2*'nin *SİKLİN D1*, *CABLES1*, *p16*, *NEUROD1* ve *VPS28* ile de ilişki gösterdiği saptandı. *USP8*, *EGFR* ve *BRG1* arasında yüksek korelasyon gözlenirken, *WEE1*, *EGFR* ve *BRG1* arasında ilişki tespit edildi. Ayrıca *WEE1*'in *CABLES1* ile *STAM2* ve *NR4A1*'in ise birbirleriyle yüksek derecede korele olduğu saptandı (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Gen ifadeleri arasındaki korelasyon

		CABLES1	*SİKLİN D1*	*p16*	*EGFR*	*HDAC2*	*IL-6*	*NEUROD1*	*NR4A1*	*RIPK1*	*BRG1*	*STAM2*	*USP2*	*USP8*	*VPS28*	*WEE1*
CABLES1	***p***		**0,005**	**0,000**	**0,000**	**0,000**	**0,034**	**0,001**	**0,009**	**0,005**	**0,000**	**0,005**	**0,000**	0,081	**0,000**	**0,002**
	r^2		0,237	0,547	0,364	0,343	0,140	0,323	0,207	0,230	0,443	0,237	0,504	0,006	0,532	0,279
SİKLİN D1	***p***	**0,005**		0,120	**0,036**	**0,024**	0,051	**0,009**	0,103	0,219	0,149	0,192	**0,044**	0,353	**0,012**	0,343
	r^2	0,237		0,078	0,139	0,158	0,121	0,207	0,085	0,049	0,068	0,056	0,128	0,028	0,191	0,029
p16	***p***	**0,000**	0,120		**0,000**	**0,000**	**0,049**	**0,009**	0,071	**0,020**	**0,000**	**0,046**	**0,001**	**0,005**	**0,000**	**0,013**
	r^2	0,547	0,078		0,455	0,338	0,122	0,207	0,104	0,168	0,352	0,126	0,316	0,231	0,488	0,187
EGFR	***p***	**0,000**	**0,036**	**0,000**		**0,008**	**0,049**	0,056	**0,004**	**0,003**	**0,001**	0,062	**0,001**	**0,000**	**0,000**	**0,001**
	r^2	0,364	0,139	0,455		0,211	0,122	0,116	0,241	0,252	0,336	0,111	0,312	0,367	0,341	0,306
HDAC2	***p***	**0,000**	**0,024**	**0,000**	**0,008**		**0,000**	**0,030**	**0,008**	**0,000**	**0,004**	0,073	**0,000**	0,067	**0,013**	**0,003**
	r^2	0,343	0,158	0,338	0,211		0,602	0,146	0,214	0,568	0,244	0,103	0,546	0,107	0,189	0,256
IL-6	***p***	**0,034**	0,051	**0,049**	**0,049**	**0,000**		**0,040**	0,285	**0,000**	0,219	0,705	**0,000**	0,303	**0,017**	0,212
	r^2	0,140	0,121	0,122	0,122	0,602		0,133	0,038	0,547	0,049	0,004	0,416	0,035	0,173	0,044
NEUROD1	***p***	**0,001**	**0,009**	**0,009**	0,056	**0,030**	**0,040**		0,554	0,321	**0,023**	0,250	**0,003**	0,102	**0,000**	0,294
	r^2	0,323	0,207	0,207	0,116	0,146	0,133		0,011	0,032	0,160	0,043	0,263	0,086	0,534	0,036
NR4A1	***p***	**0,009**	0,103	0,071	**0,004**	**0,008**	0,285	0,554		**0,001**	**0,004**	**0,001**	**0,007**	0,069	**0,040**	**0,028**
	r^2	0,207	0,085	0,104	0,241	0,214	0,081	0,011		0,292	0,248	0,329	0,220	0,106	0,133	0,150
RIPK1	***p***	**0,005**	0,219	**0,020**	**0,003**	**0,000**	**0,000**	0,321	**0,001**		**0,002**	0,248	**0,000**	**0,049**	**0,013**	**0,013**
	r^2	0,230	0,049	0,168	0,252	0,568	0,547	0,032	0,292		0,280	0,044	0,585	0,123	0,188	0,187
BRG1	***p***	**0,000**	0,149	**0,000**	**0,001**	**0,004**	0,219	**0,023**	**0,004**	**0,002**		**0,036**	**0,000**	**0,006**	**0,003**	**0,002**
	r^2	0,443	0,068	0,352	0,336	0,246	0,049	0,160	0,248	0,280		0,139	0,389	0,225	0,262	0,272
STAM2	***p***	**0,005**	0,192	**0,046**	0,062	0,073	0,705	0,250	**0,001**	0,248	**0,036**		**0,044**	0,553	**0,019**	0,064
	r^2	0,237	0,056	0,126	0,111	0,103	0,004	0,043	0,329	0,044	0,139		0,128	0,011	0,170	0,109
USP2	***p***	**0,000**	**0,044**	**0,001**	**0,001**	**0,000**	**0,000**	**0,003**	**0,007**	**0,000**	**0,000**	**0,044**		0,153	**0,000**	**0,001**
	r^2	0,504	0,128	0.316	0,312	0,546	0,416	0,263	0,220	0,585	0,389	0,128		0,067	0,473	0,299
USP8	***p***	0,081	0,353	**0,005**	**0,000**	0,067	0,303	0,102	0,069	**0,049**	**0,006**	0,553	0,153		**0,021**	0,053
	r^2	0,097	0,028	0,231	0,367	0,107	0,035	0,086	0,106	0,123	0,225	0,011	0,067		0,165	0,119
VPS28	***p***	**0,000**	**0,012**	**0,000**	**0,000**	**0,013**	**0,017**	**0,000**	**0,040**	**0,013**	**0,003**	**0,019**	**0,000**	**0,021**		0,163
	r^2	0,532	0,191	0,488	0,341	0,189	0,173	0,534	0,133	0,188	0,262	0,170	0,473	0,165		0,063
WEE1	***p***	**0,002**	0,343	**0,013**	**0,001**	**0,003**	0,212	0,294	**0,028**	**0,013**	**0,002**	0,064	**0,001**	0,053	0,163	
	r^2	0,279	0,029	0,187	0,306	0,256	0,051	0,036	0,150	0,187	0,272	0,109	0,299	0,119	0,063	

4.1.2. Genlerin İfade Düzeylerinin Birbirleri ile İlişkisi

Çalışmaya dahil edilen 32 hastanın tümör ve normal doku örneklerinde ifade düzeyi çalışılan genlerin birbirleri ile doğrusal olmayan (negatif yönde) veya doğrusal (pozitif yönde) ilişkili olup olmadığı *Temel Bileşen Analizi* (*Principle Component Analysis - PCA*) yöntemi kullanılarak tespit edildi. Temel bileşen analizi, gözlem kümesindeki birbiriyle ilişkili değişkenlerin ortogonal (üç boyutlu eksenlerde birbirine dik olan koordinat kümesi) dönüşümüyle doğrusal ilişkisiz değişkenlere dönüştürülen bir yöntemdir. Çok sayıdaki değişken arasındaki korelasyondan yararlanan bu yöntemle, gen ilişkilerinden boyut indirgeyerek yeni kombinasyonlar elde edildi.

Analiz sonucunda gen ifadelerindeki değişimlerin (Tablo 4.2) ve korelasyon ilişkilerinin (Tablo 4.6) birbirleri ile olan etkileşiminde 4 farklı boyutun bulunduğu saptandı (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Temel Bileşen Analizine göre genlerin birbirileri ile ilişkilerini gösteren boyutlar

	Bileşen			
Genler	**1**	**2**	**3**	**4**
IL-6	0,900			
RIPK1	0,858			
HDAC2	0,805			
USP2	0,677	0,423		
NEUROD1		0,861		
VPS28		0,779		
SİKLİN D1		0,646		
CABLES1		0,617		0,427
USP8			0,852	
EGFR			0,730	
BRG1			0,620	
p16		0,502	0,605	
WEE1			0,543	0,413
STAM2				0,851
NR4A1				0,752

(*Bileşen:* birbirleriyle ilişkisi kurulacak değişkenlerin kümesi)

Birinci boyutta *IL-6, RIPK1, HDAC2* ve *USP2* yer alırken, ikinci boyutta *NEUROD1, VPS28, SİKLİN D1, CABLES1* genleri yer aldı. Üçüncü boyutta *USP8, EGFR, BRG1, p16, WEE1*'in olduğu görülürken, dördüncü boyutta ise *STAM2* ve *NR4A1* genlerinin bulunduğu saptandı. Özellikle *USP2, CABLES1, p16* ve *WEE1* genlerinin 2 farklı boyut düzeyinde yer

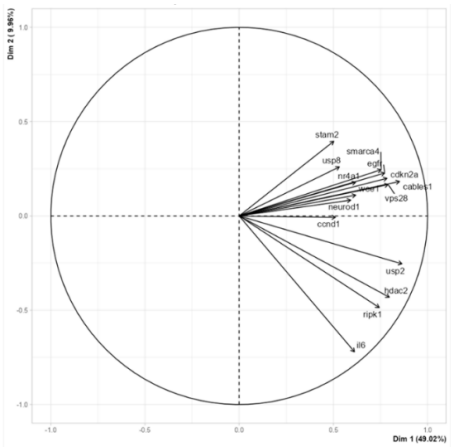
aldığı görüldü. Bu sonuç, Cushing hastalığının etyopatogenezinde *USP2*, *CABLES1*, *p16* ve *WEE1* genlerinin daha etkili olabileceğini göstermiş oldu (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Dört farklı boyutta yer alan genlerin kümeler halinde ilişkisinin gösterilmesi

1 (mavi küme); birinci boyutta yer alan genleri, 2 (sarı küme); ikinci boyutta yer alan genleri, 3 (yeşil küme); üçüncü boyutta yer alan genleri, 4 (gri küme); dördüncü boyutta yer alan genleri göstermektedir.

Her bir boyutta yer alan genlerin birbirini pozitif yönde etkilediği yani doğrusal ilişkide oldukları tespit edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Dört farklı boyutta yer alan genlerin birbirleri ile ilişkisi

Değişkenler kendi içerisinde boyutlandı ve varyans yüzdesi yüksekten düşüğe doğru hiyerarşik bir şekilde sıralandı (Tablo 4.8).

Özgünlük değeri 1'e yaklaştıkça, boyutlardaki değişkenlerin birbiriyle ilişkisi de artar. Bu nedenle, boyutların etki yüzdelerine bakıldığında ise en yüksek ilişkinin %21,3'lük bir oranla birinci boyuta ait olduğu saptandı (Tablo 4.8). Elde edilen boyutlar, özdeğer ve varyans yüzdeleri Tablo 4.8'de verildi.

Tablo 4.8: Genlerin birbirleriyle farklı boyutlardaki etki oranı

Boyut	Özdeğer	Varyans yüzdeleri (%)
1	3,19	21,3
2	2,97	19,8
3	2,97	19,8
4	2,21	14,7

4.2. CUSHING HASTALARINA AİT KLİNİK PARAMETRELER

Yaş, cinsiyet, kilo, ameliyat öncesi (pre-op) kortizol ve ACTH değerleri, 1 mg ve 8 mg Deksametazon (Dx) baskılama testi, idrarda kortizol düzeyi, ameliyat sonrası (post-op) 24. saat ve 48. saatteki serum kortizol seviyeleri, adenom tipi, invazif özelliği, patolojisi ve remisyon özellikleri hastaların klinik ve patolojik parametrelerini kapsamaktadır.

Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik parametreleri Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9: Hastalara ait klinik parametreler

Sıra No	Yaş	Cinsiyet	Kilo	Pre-op Kortizol	Pre-op ACTH	Pre-op 1 mg Dx	Pre-op 8 mg Dx	Pre-op İdrarda Kortizol	Post-op 24 saat Kortizol	Post-op 48 saat Kortizol	Adenom Tipi	İnvazyon	Patoloji			Remisyon
													ACTH	P53	Ki67	
CH1	50	E		25,01	8,66	5,3	2,8	898	3,69	2,36	mikroadenom	invazyon var	+	+	-	+
CH2	39	K		30,8					23,9	16,1	makroadenom	invazyon yok	+	+	-	+
CH3	29	K	55	50,91	55,4	65,26	15		74,72	25,7	mikroadenom	invazyon yok	+			+
CH4	29	K	93	8,39	15,7	2,3	2,27	300	28,19	1,71	mikroadenom	invazyon yok	+	+	+	+
CH5	31	K	72	15,2	55,9				3,30	1,2	mikroadenom	invazyon var	+	+	-	takipsiz
CH6	55	K	80	47,4	185	13,72	6,79	458	10,34	2,7	mikroadenom	invazyon var	+			+
CH7	35	K	77	15,4	39,3	4,1	1,7	196	45,9	1,5	mikroadenom	invazyon yok	+	+	-	+
CH8	30	K	120	16	11	2,8	3,68	73	94		mikroadenom	invazyon yok	+	+		+
CH9	40	K	86	26,9					23,82	2,71	mikroadenom	invazyon yok	+			-
CH10	21	E	70	22,8	56,5	19,5	5,1	65,5	15,5		mikroadenom	invazyon yok	+	+	+	+
CH11	63	K	80	30	72	19,39				0,93	mikroadenom	invazyon yok	+	+	-	+
CH12	20	K	70	34,77	58,19	15,4	21,5	204	1,73	2,69	mikroadenom	invazyon yok	+	+	+	+
CH13	51	E	100	47	112	769,69	346,52	360	37,5	25,5	makroadenom	invazyon var	+	+	+	-
CH14	41	E	100	19,29	47,21	2,1		299	16,1	10,02	makroadenom	invazyon var	+	+	+	+
CH15	34	K	96	13,82	57.8	9,46	0,75	79	16,83	3,32	mikroadenom		+	+	+	+
CH16	18	K	125	24,3	50,4	11,7	3	550	9,6	4,7	mikroadenom	invazyon yok	+	-	-	+
CH17	36	K	80	24,33	55,6	10,76	5,76	810	2,54	0,7	mikroadenom	invazyon yok	+	-	-	+
CH18	33	K	120	23,31	111	17,6	2,6	933	0,4	0,3	mikroadenom	invazyon yok	+	+	+	+
CH19	33	K	70	17,3	58,7	13,4	3,36		0,6	0,01	mikroadenom	invazyon yok	+			+
CH20	31	K	80	11,9	15,2	15,2	1,2	430	1,3	0,3	mikroadenom	invazyon yok	+	+	+	+
CH21	38	K	68	31	32	13	3		28		makroadenom	invazyon yok	+	+	+	+
CH22	55	E	83	80	41,7	3,69	4,4	26	14,44	31	mikroadenom	invazyon var	+		-	takipsiz
CH23	42	E	94	24,77	79,55	19,08			0,63	0,99	mikroadenom		+	+	+	+
CH24	26	K	86	22,82	32	25,81	4	490	4	1,55	makroadenom	invazyon var	+	+	+	+
CH25	29	E	70	2,8	31,4	22,2	2,4	30	8,5	20	mikroadenom	invazyon yok	+	+	-	+
CH26	18	K	73	8,81	51,9	1,96	8,44	58	38	25	makroadenom	invazyon yok	+			+
CH27	22	K	80	38,4	202	28,6	2,8	>1000			mikroadenom		+	+	+	+
CH28	56	K	96	14,88	7,08		1,47	357	0,8	0,27	mikroadenom	invazyon var	+	+	+	+
CH29	32	K	75	13,61	123	2,65			2,42	1,26	mikroadenom	invazyon yok	+	+		+
CH30	55	K	108	17,91	60,29	4,96	3,25	23,29	33,94	1,66	makroadenom	invazyon var	+	+	+	+
CH31	64	E	74	16,8	42,6	18,3	22,7			1,1	mikroadenom	invazyon yok	+	+	+	+
CH32	38	K	94	15	45,2	10	4	117,42	5,46		makroadenom	invazyon yok	+	+	+	takipsiz

4.2.1. Genlerin İfade Düzeylerinin Klinik Parametreler ile İlişkisi

Çalışmaya dahil edilen 32 hastaya ait gen ifadesi sonuçlarının klinik parametreler ile karşılaştırılması *Temel Bileşen Analizi* (*Principle Component Analysis*) yöntemi uygulanarak yapıldı.

Gen ifade sonuçlarının ilk grubunda hastalığın şiddetini gösteren pre-op kortizol, ACTH, idrarda kortizol, 1 mg Dx değerleri ile karşılaştırıldı ve bu etkileşimde 5 farklı boyutun yer aldığı tespit edildi (Tablo 4.10). Daha sonra ikinci grupta adenom tipi ve invazyon durumu gibi önemli klinik parametrelerin gen ifadeleri üzerinde etkisi karşılaştırılarak (Tablo 4.12) hastalığın gidişatı hakkında sonuçlar alındı.

Klinik parametreler olan değişkenler kendi içerisinde boyutlandı ve varyans yüzdesi yüksekten düşüğe doğru hiyerarşik bir şekilde sıralandı (sırasıyla, Tablo 4.11, Tablo 4.13).

Tablo 4.10: Temel Bileşen Analizine göre genlerin hastalığın şiddeti ile ilişkisini gösteren boyutlar

	Boyutlar				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
IL-6	0,890				
RIPK1	0,837			0,353	
HDAC2	0,791	0,328			
USP2	0,699	0,345	0,345	0,353	
STAM2		0,810			
NR4A1		0,729			
CABLES1	0,312	0,581	0,520		
WEE1		0,576		0,345	
EGFR		0,543	0,307	0,474	
NEUROD1			0,803		
VPS28		0,340	0,685	0,311	
SİKLİN D1			0,631		
İdrarda Kortizol			**-0,616**		0,337
p16		0,438	0,517	0,374	0,373
Preop Kortizol	**-0,319**			**-0,740**	
BRG1		0,376	0,315	0,695	
USP8				0,641	
ACTH					0,874
1 Mg Dx					0,846

İlk gruptaki birinci boyutta *IL-6, RIPK1, HDAC2* ve *USP2* genlerinin birbirine yakın ilişkili olduğu gözlenirken, bu boyutta pre-op kortizol değerleri ile genler arasında negatif (ters) yönde bir ilişkiye rastlanmıştır. İkinci boyutta, *STAM2, NR4A1, CABLES1, WEE1* ve *EGFR* genlerinin birbirine yakın ilişkili olduğu gözlenirken, yine bu boyutta da herhangi bir klinik parametre ile genler arasında pozitif veya negatif yönde bir ilişkiye rastlanmamıştır. Üçüncü boyutta *NEUROD1, VPS28, SİKLİN D1* ve *p16*'nın hem birbirleriyle ilişkisi hem de idrarda kortizol seviyesi ile negatif yönde ilişkili olduğu saptandı. Dördüncü boyutta, *BRG1* ve *USP8*'in birbirleriyle yakın ilişkili oluğu, ancak pre-op kortizol değeri ile negatif yönde ilişki gösterdiği tespit edildi. Beşinci boyutta ise *p16*'nın pre-op idrarda kortizol, ACTH ve pre-op 1 mg Dx seviyeleri ile pozitif (doğrusal) yönde ilişkili olduğu (Tablo 4.10).

Özgünlük değeri 1'e yaklaştıkça, boyutlardaki değişkenlerin birbiriyle ilişkisi de o kadar artmaktadır. Boyutların etki yüzdelerine bakıldığında ise en yüksek ilişkinin %17,4'lük bir oranla birinci boyuta ait olduğu saptandı (Tablo 4.11). Elde edilen boyutlar, özdeğer ve varyans yüzdeleri Tablo 4.11'de verildi.

Tablo 4.11: Genler ve hastalığın şiddeti üzerine boyutların etki oranı

Boyut	Özdeğer	Varyans yüzdeleri (%)
1	3,31	17,4
2	3,18	16,7
3	2,94	15,5
4	2,46	13,0
5	2,09	11,0

İkinci grupta, gen ifade sonuçlarının adenom tipi ve invazyon durumu gibi hastalığın temel klinik parametreleri ile karşılaştırılması tamamlandı bu etkileşimde 5 farklı boyutun yer aldığı tespit edildi (Tablo 4.12).

Tablo 4.12: Temel Bileşen Analizine göre genlerin adenom tipi ve invazyon durumu ile ilişkisini gösteren boyutlar

	Boyutlar				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
RIPK1	0,881	0,315			
IL-6	0,854				
HDAC2	0,815				
USP2	0,736		0,427		
USP8		0,819			
EGFR		0,716	0,328		
BRG1	0,322	0,641			
WEE1	0,315	0,636			
NEUROD1			0,874		
VPS28			0,804		
CABLES1	0,349	0,382	0,633	0,348	
p16		0,488	0,565		
SİKLİN D1			0,532	0,300	**-0,502**
STAM2				0,754	
NR4A1		0,408		0,709	
Adenom tipi				**-0,618**	0,618
İnvazyon					0,811

Birinci boyutta yer alan *RIPK1*, *IL-6*, *HDAC2* ve *USP2* ve ikinci boyutta yer alan *USP8*, *EGFR*, *BRG1* ve *WEE1* genlerinin herhangi bir klinik parametre ile ilişkisine rastlanmamıştır. Üçüncü boyutta, *NEUROD1*, *VPS28*, *CABLES1*, *p16* ve *SİKLİN D1* genlerinin birbirine yakın ilişkili olduğu gözlenirken, bu boyutta herhangi bir klinik parametre ile genler arasında pozitif veya negatif yönde bir ilişkiye rastlanmamıştır. Dördüncü boyutta, *STAM2* ve *NR4A1*'in

adenom tipi ile negatif yönde ilişkili olduğu tespit edildi. Beşinci boyutta ise *SİKLİN D1*'in adenom tipi ve invazyon durumu ile ilgili negatif yönde ilişki gösterdiği saptandı (Tablo 4.12).

Özgünlük değeri 1'e yaklaştıkça, boyutlardaki değişkenlerin birbiriyle ilişkisi de o kadar artmaktadır. Boyutların etki yüzdelerine bakıldığında ise en yüksek ilişkinin %19,33'lik bir oranla birinci boyuta ait olduğu saptandı (Tablo 4.13). Elde edilen boyutlar, özdeğer ve varyans yüzdeleri Tablo 4.13'te verildi.

Tablo 4.13: Genler ve adenom tipi ve invazyon durumu ile ilişkisi üzerine boyutların etki oranı

Boyut	Özdeğer	Varyans yüzdeleri (%)
1	3,48	19,33
2	3,12	17,31
3	3,09	17,18
4	2,17	12,04
5	1,52	8,47

4.3. METİLLENMEYE ÖZGÜ POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ (MS-PZR) İLE GEN İFADESİNİ ETKİLEYEN EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN BELİRLENMESİ

Parafine gömülü hasta ve kontrol grubu doku kesitlerinden elde edilen DNA'ların 260 nm / 280 nm dalga boylarındaki OD değerlerinin 1,8-2,0 arasında olduğu, yoğunluklarının ise 1,2-133,3 ng/µl olduğu tespit edildi (Tablo 4.14). Parafine gömülü arşiv dokularının farklı senelere ait olması, dokuların boyutundaki farklılıklar ve kesitlerden elde edilen doku miktarları, her bir hasta ve kontrol örneğinin yoğunluklarının farklı düzeylerde çıkmasına sebep olmuştur.

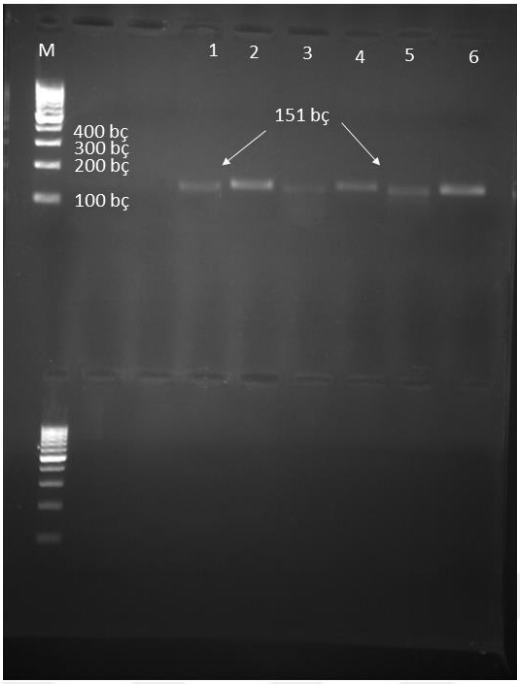
Tablo 4.14: Hasta ve kontrol grubu örneklerinden elde edilen DNA'ların yoğunluk ve saflık tayini

HASTA GRUBU	DNA		KONTROL GRUBU	DNA	
	Yoğunluk	Saflık		Yoğunluk	Saflık
CH1	12,2	2,02	**K1**	3,4	1,89
CH2	1,2	1,85	**K2**	21,1	1,84
CH3	39,8	1,96	**K3**	22,2	1,96
CH4	92,9	1,83	**K4**	85,9	1,82
CH5	22,5	1,89	**K5**	11,3	1,93
CH6	8,6	1,87	**K6**	6,4	1,95
CH7	5,0	1,91	**K7**	18,2	1,99
CH8	2,2	1,88	**K8**	120.2	1,88
CH9	12,9	1,81	**K9**	30,9	1,84
CH10	8,8	1,95	**K10**	26,3	1,86
CH11	5,2	1,99	**K11**	24,1	1,87

CH12	55,3	1,91	**K12**	9,9	2,02
CH13	13,9	1,86	**K13**	185,7	1,82
CH14	38,6	1,81	**K14**	10,6	1,85
CH15	3,7	1,96	**K15**	40,2	1,89
CH16	3,5	1,93			
CH17	33,9	1,92			
CH18	11,1	1,92			
CH19	16,1	1,94			
CH20	3,5	1,87			
CH21	8,9	1,82			
CH22	3,8	1,79			
CH23	8,8	1,88			
CH24	12,4	1,82			
CH25	19,5	1,88			
CH26	3,0	1,86			
CH27	39,4	1,83			
CH28	34,0	1,85			
CH29	6,5	1,94			
CH30	133,3	1,86			
CH31	3,3	1,78			
CH32	55,5	1,90			

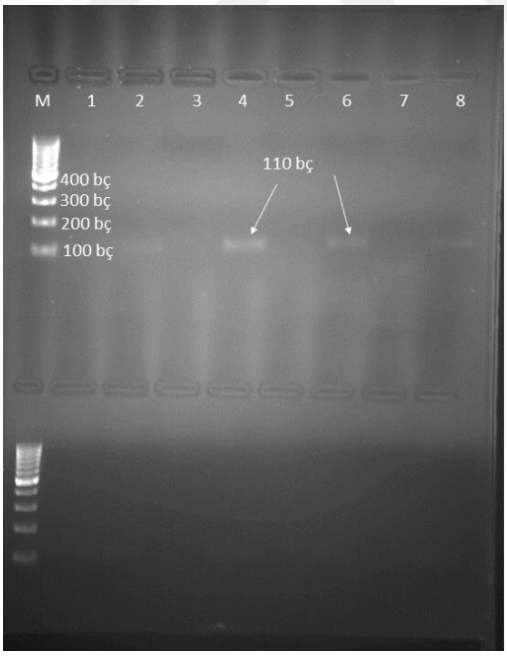
4.3.1. *p16* ve *USP8* Genlerinin Metillenme Analizi

Hücre döngüsünde anormalliklere yol açan ve hipofiz adenomlarının oluşumunda rol oynayan *p16* ile hipofiz adenom etyopatogenezinde proteinleri deubikutinleyerek etkin bir rol oynayan *USP8* genindeki ifade değişimlerinin metillenmeye bağlı olabileceği düşünüldü. Bu nedenle, hasta ve kontrol gruplarının parafine gömülü doku kesitlerinden elde edilen DNA örnekleri, *p16* (151 bç) ve *USP8* (110 bç) genlerinin promotör bölgesindeki metillenme durumunu incelemek amacı ile bisülfit modifikasyonundan sonra metillenmeye özgü PZR yöntemi kullanılarak çoğaltıldı. Bu amaçla hem metillenmiş bölgeye özgü hem de metillenmemiş bölgeye özgü tasarlanmış primerler kullanıldı. Amplikonlar %2'lik agaroz jel elektroforezi üzerinde yürütülüp UV ışık altında incelendi (Şekil 4.3, Şekil 4.4). *p16* ve *USP8* genlerinin promotör bölgesi üzerindeki metillenme durumu hasta ve kontrol gruplarında incelendi (Tablo 4.15), ardından jel üzerinde bant görüntüsü olan tümör ve kontrol örneklerinin metillenme yüzde oranları saptandı (Tablo 4.16).



Şekil 4.3: *p16* (151 bp) geninin promotör bölgesinin metillenmesinin incelenmesi

M: 100 bç'lik marker, 1ve 2 no'lu kuyulardaki örnekler CS1'e, 3 ve 4 no'lu kuyulardaki örnekler CS2'ye, 5 ve 6 no'lu kuyulardaki örnekler ise CS4'e aittir. 1, 3, 5 no'lu kuyulardaki bantlar metillenmiş bölgeye özgü olarak çoğaltılmış bantları; 2, 4, ve 6 no'lu kuyulardaki bantlar ise metillenmemiş bölgeye özgü çoğaltılmış bantları göstermektedir. Her üç örnekte de kısmi metillenme görülmektedir.



Şekil 4.4: *USP8* (110 bp) geninin promotör bölgesinin metillenmesinin incelenmesi

M: 100 bç'lik marker, 1ve 2 no'lu kuyulardaki örnekler CS1'e, 3 ve 4 no'lu kuyulardaki örnekler hasta CS2'ye, 5 ve 6 no'lu kuyulardaki örnekler ise hasta CS4'e, 7 ve 8 no'lu kuyulardaki örnekler CS5'e aittir. 1, 3, 5, 7 no'lu kuyular metillenmiş bölgelere özgü tasarlanmış primerler ile çalışılan, 2, 4, 6 ve 8 no'lu kuyular ise metillenmemiş bölgelere özgü tasarlanmış primerler ile çalışılan örneklerdir. 4 hastanın hiçbirinde metillenmiş bölgeye özgü primerler ile çoğalma saptanmamıştır. Ancak metillenmemiş bölgelere özgü primer (2, 4, 6, 8 no'lu kuyular) ile incelendiğinde çoğalma saptanmıştır. Bu durumda örneklerin hiçbirinde metillenme tespit edilmemiştir.

Tablo 4.15: *p16* ve *USP8*'in hasta ve kontrol gruplarındaki metillenme durumu

	p16		***USP8***			***p16***		***USP8***	
	m (+)	**m (-)**	**m (+)**	**m (-)**		**m (+)**	**m (-)**	**m (+)**	**m (-)**
CH1	+	+	-	+	**K1**	-	+	-	+
CH2	+	+	-	+	**K2**	-	+	-	+
CH3					**K3**	-	+	-	+
CH4	+	+	-	+	**K4**	-	+	-	+
CH5	+	+	-	+	**K5**	-	+	-	+
CH6	-	+	-	+	**K6**	-	+	-	+
CH7	-	+	-	+	**K7**	-	+	-	+
CH8	-	+	-	+	**K8**	-	+	-	+
CH9	-	+	-	+	**K9**	-	+	-	+
CH10	-	+	-	+	**K10**	-	+	-	+
CH11	+	+	-	+	**K11**	-	+	-	+
CH12	-	+	-	+	**K12**	-	+	-	+
CH13					**K13**	-	+	-	+
CH14	-	+	-	+	**K14**	-	+	-	+
CH15	-	+	-	+	**K15**	-	+	-	+
CH16									
CH17	+	+	-	+					
CH18	-	+	-	+					
CH19	-	+	-	+					
CH20	+	+	-	+					
CH21	+	+	-	+					
CH22	-	+	-	+					
CH23	+	+	-	+					
CH24	+	+	-	+					
CH25	+	+	-	+					
CH26	-	+	-	+					
CH27	-	+	-	+					
CH28	+	+	-	+					
CH29	-	+	-	+					
CH30	+	+	-	+					
CH31	-	+	-	+					
CH32	+	+	-	+					

Yapılan incelemelerin sonucunda, 32 hasta dokusunun 14'ünde (%44) *p16* geninde kısmi metillenme olduğu, 15'inde (%47) ise metillenme olmadığı görüldü (Tablo 4.16). 32 hastanın hiçbirinde *USP8* metillenmesi izlenmedi. Ayrıca hem *p16* hem de *USP8* için kontrol grubunda herhangi bir metillenme durumu tespit edilmedi (Tablo 4.15, Tablo 4.16).

Tablo 4.16: *p16* ve *USP8*'in metillenme oranları

	p16	***USP8***
Metillenmiş	–	–
Kısmi Metillenmiş	14 (%44)	–
Metillenmemiş	15 (%47)	29 (%91)

4.3.2. *p16* Metillenme Düzeyinin Klinik Parametreler ile İlişkisi

Çalışmaya dahil edilen 32 hastanın tümör ve normal doku örneklerinde metillenme düzeyi çalışılan *p16* geninin; cinsiyet, yaş, kilo, pre-op kortizol, ACTH değeri, 1 mg Dx ve 8 mg Dx baskılama testi, idrarda kortizol, post-op 24 ve 48 saatlik kortizol değerleri, adenom tipi, ve invazyon durumu gibi klinik ve de ACTH seviyeleri, p53 mutasyon durumu, Ki-67 antikor değerleri gibi patolojik parametreler ile karşılaştırıldı (Tablo 4.17).

Tablo 4.17: Tümör ve normal doku örneklerinde *p16* metillenme düzeyinin klinik parametreler ile ilişkisi

Klinik Parametreler		***p16* metillenme yüzdesi**		
		Kısmi metile	**metillenme yok**	***p**
Yaş	**<18**	0	0	1
	>18	14 (%48,3)	14 (%48,3)	
Cinsiyet	**Kadın**	11 (%37,9)	11 (%37,9)	1
	Erkek	3 (%10,3)	4 (%13,8)	
Kilo	**<70**	2 (%6,9)	3 (%10,3)	0,546
	>70	12 (%41,4)	12 (%41,3)	
Pre-op Kortizol	**<18**	7 (%24,1)	7 (%24,1)	1
	>18	7 (%24,1)	8 (%27,6)	
Pre-op ACTH	**<18**	4 (%13,8)	1 (%3,4)	0,287
	>18	9 (%31)	13 (%44,8)	
Pre-op 1 mg Dx	**>1.8**	11 (%37,9)	14 (%48,3)	0,33
	bilinmiyor	3 (%10,3)	1 (%3,4)	
Pre-op 8 mg Dx	**<5**	9 (%31)	7 (%24,1)	0,057
	>5	0	5 (%17,2)	
Pre-op İdrarda Kortizol	**<50**	2 (%6,9)	1 (%3,4)	0,427
	>50	6 (%20,7)	10 (%34,5)	
Post-op 24 saat Kortizol	**<2,5**	3 (%10,3)	4 (%13,8)	0,781
	>2,5	10 (%34,5)	9 (%31)	
Post-op 48 saat Kortizol	**<2,5**	9 (%31)	6 (%20,7)	0,277
	>2,5	2 (%6,9)	6 (%20,7)	
Adenom Tipi	**mikroadenom**	9 (%31)	13 (%44,8)	0,215
	makroadenom	5 (%17,2)	2 (%6,9)	
İnvazyon	**var**	2 (%6,9)	2 (%6,9)	0,988
	yok	8 (%27,6)	9 (%31)	
Patoloji	**p53 (+)**	13 (%44,8)	10 (%34,5)	***0,041***
	p53 (-)	1 (%3,4)	0	
	Ki67 (+)	8 (%27,6)	7 (%24,1)	***0,005***
	Ki67 (-)	6 (%20,7)	1 (%3,4)	

Bu istatistiksel değerlendirme sonucunda, kısmi metillenme oranında p53 ve Ki-67 patolojik belirteçlerinin pozitifliğinin anlamlı olduğu tespit edildi (sırasıyla, p=0,041, p=0,001).

Diğer parametrelerle yapılan karşılaştırma sonucunda ise anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

32 hastanın tümör doku örneklerinden elde edilen *p16* metillenme düzeylerinin klinik parametreler ile karşılaştırılması Temel Bileşen Analizi (Principle Component Analysis) yöntemi uygulanarak yapıldı. *p16* metillenme düzeyinin pre-op kortizol, ACTH, 1 mg Dx ve 8 mg Dx baskılama testi, idrarda kortizol, pos-top 24 ve 48 saatlik kortizol, adenom tipi, invazyon durumu ve patolojik özelliği gibi klinik parametrelerle olan ilişkisi saptandı. Bu etkileşimde 2 farklı boyutun yer aldığı tespit edildi (Tablo 4.18).

Tablo 4.18: Temel Bileşen Analizine göre tümör dokularındaki *p16* metillenme düzeylerinin klinik parametreler ile ilişkisini gösteren boyutlar

	Boyutlar	
	1	**2**
Pre-op 1 mg Dx	0,837	
Pre-op ACTH	0,745	
Pre-op 8 mg Dx	0,687	
Pre-op İdrarda Kortizol	0,555	
Post-op Kortizol 48 saat		
Pre-op Kortizol		
Adenom Tipi		0,806
Post-op 24 saat		0,606
p16 metillenme	-0,326	0,566
İnvazyon		0,435

Birinci boyutta *p16* metillenme durumu ile hastalığın şiddetini gösteren pre-op belirteçler arasında yer alan ACTH, 1 mg Dx baskılama testi, 8 mg Dx baskılama testi, idrarda kortizol seviyelerinebakıldığında zıt (negatif) yönde ilişki olduğu saptandı. İkinci boyutta ise *p16* metillenme durumu ile post-op 24 saatlik kortizol, adenom tipi ve invazyon durumu arasındaki ilişkinin pozitif yönde olduğu tespit edildi.

Özgünlük değeri 1'e yaklaştıkça, boyutlardaki değişkenlerin birbiriyle ilişkisi de o kadar artmaktadır. Boyutların etki yüzdelerine bakıldığında ise en yüksek ilişkinin %20,02'lik bir oranla birinci boyuta ait olduğu saptandı (Tablo 4.19). Elde edilen boyutlar, özdeğer ve varyans yüzdeleri Tablo 4.19'da verildi.

Tablo 4.19: Tümör dokularında *p16* metillenme durumunun klinik parametreler ile ilişkisi üzerine boyutların etki oranı

Boyut	**Özdeğer**	**Varyansların yüzdeleri (%)**
1	2,42	20,2
2	2,16	18,0

5. TARTIŞMA

Tüm hipofiz tümörlerinin yaklaşık %10-15'ini oluşturan ACTH salgılayan hipofiz adenomları, yüksek kortizol seviyesi sonucu ortaya çıkan Cushing hastalığına neden olmaktadır. Bugüne kadar ACTH salgılayan hipofiz adenomlarının gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmalar ve hastalığın patogenezinde etkili olan faktörler tam olarak açıklanamamıştır.

Genlerde meydana gelen mutasyonların ve çeşitli epigenetik değişikliklerin hastalığın patogenezinde önemli rolleri olabileceği düşünülmektedir. Yapılan son çalışmalarda, DNA metillenmesi, histon modifikasyonları, nükleozomların yeniden şekillenmesi ve kodlama yapmayan RNA'ların da dahil olduğu epigenetik düzenlemelerin rol oynadığı gösterilmiştir (Pease ve diğ., 2013; Fukuoka ve Takahashi, 2014; Ma ve diğ., 2015). Daha önce yapılan çalışmalarda, *AIP* geni ve *MEN1* mutasyonlarının sporadik hipofiz adenomlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Daly ve diğ., 2006; Lecoq ve diğ., 2015). Son yıllarda, ACTH salgılayan hipofiz adenomlarının gelişmesinde etkili olabileceği düşünülen birtakım genler tespit edilmiştir (Albani ve diğ., 2018). Bu genler arasında *USP8, EGFR* ve *CABLES1* yer almaktadır (Ghorayeb ve diğ., 2015; Cassarino ve diğ., 2017; Albani ve diğ., 2018). *USP8* ve *CABLES1*'in Cushing hastalığının gelişim mekanizmaları ve bu genlerin hastalığın gelişimi ile ilişkili farklı genlerle olası etkileşimleri üzerine daha önce yapılmış az sayıda çalışma vardır (Ma ve diğ., 2015; Perez-Rivas ve diğ., 2015; Theodoropoulou ve diğ., 2015; Hayashi ve diğ., 2016; Roussel-Gervais ve diğ., 2016; Faucz ve diğ., 2017; Hernandez-Ramirez ve diğ., 2017).

Bu çalışmada, protein-protein ilişkilerini inceleyen *STRING* biyoinformatik veri tabanında (https://string-db.org/) yapılan araştırma ile USP8 ve CABLES1 proteinleri ile olası ilişkili proteinler belirlendi, adenom oluşumuna katılması öngörülen ve daha önce çalışılmamış olan olası genler ile çalışma kurgulandı. Hasta ve normal dokularda deubikutinlenme enzimlerinden *USP8, USP2, VPS28* ve *STAM2* genleri, senesens ve hücre döngüsüne katılan genlerden *CABLES1*, *BRG1, EGFR, WEE1, p16, SİKLİN D1* ve *HDAC2*, doku hasarı, inflamasyon ve hücre ölümünde rol oynayan bir serin/treonin protein kinaz olan *RIPK1* geni, transkripsiyon faktörü olan *NR4A1* ve *NEUROD1* genlerinin ifade düzeyleriyle birlikte *USP8* ve *p16*'nın epigenetik değişimleri ile Cushing hastalığı arasındaki ilişkiler araştırıldı.

Protein ubikutinlenmesi ve deubikutinlenmesi hedef proteinlerin ve protein-protein etkileşimlerinin kaderini kontrol eden tersine çevrilebilir süreçlerdir. Normal koşullarda, proteinler ubikutinlenerek proteazomlarda yıkılmak üzere hedeflenirler. Proteinlerin deubikutinlernmesi durumunda ise hatalı proteinler veya yıkılması gereken proteinler yıkılmayarak hücre içinde birikmeye başlayabilir. Bu da çeşitli hastalıklara yol açabilir. İnsan genomunda ~100 lokus tarafından kodlanan deubikutinlenme enzimleri (DUB'lar), sisteinler ya da metalloproteazlardır (Celebi ve diğ., 2020). DUB'lar; ubikutin spesifik proteazlar (USP'ler), ubikutin C-terminal hidrolazlar, yumurtalık tümörü proteazları, Machado-Joseph hastalığı proteazları ve JAB1/MPN/Mov34 metalloproteazları olacak şekilde beş alt aileye ayrılabilir. DUB'lar içerisinde çeşitli hastalıklarda ortaya çıkan en önemli enzimler USP8 ve USP2'dir (Park ve diğ., 2020).

USP8, çeşitli proteinlerin yıkılmasını önleyebilen deubikutinleştirici bir enzimdir. 14-3-3 proteini ile fosforillenerek bütün işlevini kaybedebilmektedir. USP8'in aktivasyon gösterdiği en önemli reseptör EGFR'dir. *COSMIC* veri tabanı (https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic), yaklaşık 8.500 kanser genomunda bulunan 85 adet *USP8* mutasyonunun bulunduğunu göstermektedir. Mutasyonlar, 14-3-3 proteinlerinin bağlanmasını bozar ve böylece USP8'in proteolitik yıkılımını arttırır. Ortaya çıkan USP8'in 40-kDa C-terminali parçası, yüksek deubikutinlenme aktivitesine sahip olup, bu durum, hücresel substratı olan EGFR'nin plazma membranında önemli ölçüde birikmesine yol açar. *USP8*'in mutasyona uğraması durumunda, *EGFR* aşırı miktarda ifade edilir ve bu da MAPK sinyal yolu ile Hedgehog sinyal yolunun aşırı şekilde etkinleşmesine neden olur. *p27*, *HDAC2*, *BRG1* gibi düzenleyici genlerin ifadesi engellenir. Yüksek EGFR seviyeleri, transkripsiyon faktörü olan *NR4A1* üzerinden, önce ACTH öncüsü olan *POMC* gen transkripsiyonunu uyarır ve ardından plazma ACTH seviyelerini arttırır (Xiong ve Ge, 2016). ACTH'ın fazla salınması sonucunda Cushing hastalığı veya fonksiyonel olmayan hipofiz adenomları ortaya çıkar (Lim ve Korbonits, 2018; Tatsi ve Stratakis, 2019). *NR4A1*'in meme, akciğer, pankreas, yumurtalık, kolon, endometriyal, servikal ve gastrik kanserler, rabdomiyosarkomlar ve melanomlar dahil olmak üzere çoklu tümör tiplerine sahip hastalarda aşırı derecede ifade edildiğine dair kapsamlı kanıtlar bulunmaktadır (Lee ve diğ., 2010; Lee ve diğ., 2014; Lacey ve diğ., 2017; Sun ve diğ., 2019). Çoğu çalışma *NR4A1*'in kanserli hücre hatlarında pro-onkogenik olduğunu, hücrenin çoğalması, hayatta kalması ve göçü/invazyonunda rol oynadığını göstermektedir (Ke ve diğ., 2004; Beard ve diğ., 2015; Karki ve diğ., 2020).

Bu çalışmada, *EGFR* ifadesinde 32 hastanın 17'sinde (%53) bir artış gözlenirken, 15'inde (%44) azalma görülmüştür. *EGFR* ifadesi artan 17 hasta incelendiğinde, 12 hastada (%71) *NR4A1* ifadesinde de artış meydana geldiği saptanmıştır. 32 hastanın tamamında *NR4A1* geninin ifadesine bakıldığında, 16 hastanın (%50) gen ifadesinde artma, 14'ünde (%48) gen ifadesinde azalma olduğu saptanmıştır. Normal dokuya göre tümör dokularındaki *NR4A1* geni ifade düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar, *EGFR* ifadesindeki artış ile *NR4A1* ifadesindeki artış arasında bir ilişki olabileceğini, POMC'nin sürekli uyarılarak aşırı miktarda ACTH salınımına sebebiyet verebileceğini düşündürmektedir.

Mutant *USP8*'in yukarı yönde düzenlenmesi ve nükleer lokalizasyonu (Dufner ve Knobeloch, 2019), henüz tanımlanmamış mekanizmalar aracılığıyla patogenezden de sorumlu olabilir. Mutant USP8'in nükleer lokalizasyonu göz önüne alındığında, USP8'in tümör oluşumu ve POMC transkripsiyonu üzerinde doğrudan bir etkisinin olup olmadığı henüz bilinmemektedir (Dufner ve Knobeloch, 2019). Bununla birlikte, USP8'in 14-3-3 bağlanma motifindeki mutasyonlar nadiren de olsa diğer tümörlerde de bulunduğundan, Cushing hastalığının patogenezinden EGFR dışındaki kortikotrop spesifik USP8 substratlarının sorumlu olma olasılığını da düşündürmektedir (Ma ve diğ., 2015; Perez-Rivas ve diğ., 2015; Xiong ve Ge, 2016). Tüm ekzom dizileme yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, hipofiz adenomlu hastaların %65'inde *USP8* mutasyonu olduğu bulunmuştur. Somatik *USP8* mutasyonlarının Cushing hastalığında sıklıkla görüldüğü ve ACTH'nin aşırı üretimine neden olduğu gösterilmiştir (Perez-Rivas ve diğ., 2015). Mutant USP8'in hiperaktivite kazanarak EGFR'nin plazma membranına dönüşünü hızlandırmasıyla, bunun da adenom oluşumuyla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Xiong ve Ge, 2016). Bir başka çalışmada Cushing hastalarında mutasyonların tümünün heterozigot olduğu tespit edilmiş ve hepsi *USP8* geninin 14. eksonunda 718-723 amino asitleri kodlayan bölge arasında bulunmuştur (Theodoropoulou ve diğ., 2015; Hayashi ve diğ., 2016; Faucz ve diğ., 2017). Bu çalışmada, USP8 mutasyonlarına bakılmamış sadece gen ifadesi araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre, 17 hastada (%53) *USP8* ifadesinde azalma gözlenmiş, 15 hastada ise (%47) *USP8* ifadesinde artma görülmüştür. Ancak istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık göstermemiştir. *USP8* ifadesi artan 15 hastanın 12'inde (%80) *EGFR* ifadesinde artış görülmüştür. Bu sonuçlar Temel Bileşen Analizine göre değerlendirildiğinde, *USP8* ve *EGFR* gen ifadesi değişimlerinin aynı etki alanında oldukları, *USP8* gen ifadesindeki artışın Cushing hastalığında EGFR aracılı ACTH üretiminin arttırılmasında rol oynadığını göstermektedir. USP8-EGFR ilişkisini daha ileri seviyelerde

araştırılması için western blot ve immünpresipitasyon yöntemlerinin kullanılması konuya açıklık getirebilir.

İnsanlarda ortaya çıkan hipofiz adenomlarının yaklaşık %80'i en az bir hücre döngüsü düzenleyicisinde meydana gelen genetik değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Jordan ve diğ., 2000). Siklinler ve/veya sikline bağımlı kinazlar gibi hücre döngüsü düzenleyicilerinin ifadesindeki değişiklikler hipofiz tümörogenezinde etkilidir. Özellikle, *CDK4* ve *CDK6* ile birlikte *SİKLİN D1*, G1 fazı sırasında hücre döngüsünün S fazına geçişinden sorumlu olup, onkogenezi başlatmaktadır (Jordan ve diğ., 2000). Jordan ve diğ., *SİKLİN D1*'in ifadesindeki artışın, normal hipofiz dokusuna kıyasla fonksiyonel olmayan ve agresif hipofiz tümörlerinde daha sık görüldüğünü bildirirken (Jordan ve diğ., 2000), Tani ve diğ., *p16* ifadesindeki artışın *SİKLİN D1* inhibisyonu ile mikroadenom boyutundaki kortikotrop adenomlarının oluşmasında etkili olduğunu bildirmişlerdir. *p16* ifadesini klinik parametrelerle kıyasladıklarında serum kortizol düzeyi ile anlamlı doğrusal bir ilişki gösterdiğini saptamışlardır (Tani ve diğ., 2010). *p16* veya *p27* ifadesinde azalma veya *SİKLİN D1*'in aşırı ifadesine bağlı olarak hücre döngüsü düzenlemesinde meydana gelen anormalliklerin tümör oluşumunda önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Byeon ve diğ., 1998; Russo ve diğ., 2011; Li ve diğ., 2011; Serra ve Chetty, 2018). Siklin D'lerin ifadesi hücre dışı büyüme faktörlerinin etkisiyle kontrol edilir. Mitojenler ortadan kaldırıldığında Siklin D'lerin birikimi önlenir ve Siklin D'ler hızla bozulur, böylece hücre döngüsü ilerlemesi G1 fazındaki kısıtlama noktasında durdurulur. Özellikle *SİKLİN D1*'in aşırı ifadesi, özofagus karsinomları, küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri ve meme kanserleri gibi birçok insan kanserinde sıklıkla bulunmuştur (Bates ve Peters, 1995). Hücrelerdeki Siklin D'lerin yüksek ifadesi, pRb'nin CDK4 aracılı fosforilasyonunun artmasına ve böylece hücre döngüsü ilerlemesinin teşvik edilmesine yol açar. Hücrelerin çoğunda P16/CDK4/siklin D üçlü kompleksi yerine CDK4-P16 ve CDK4-siklin D ikili kompleksleri bulunduğundan, siklin D'lerin aşırı ifadesi CDK4-P16 kompleksini azaltabilmektedir (Li ve diğ., 2000). Kanser türlerinde, birtakım onkogenlerin aktivasyonu veya ilgili tümör baskılayıcıların ifadelerindeki baskılanmalar, *p16*'nın ifadesinde değişikliklere neden olmaktadır. *SİKLİN D1*'in aşırı ifadesi, *p16*'yı işlevsel olarak etkisiz hale getirerek tümör gelişiminde etkili bir rol oynar.

Bu çalışmada, 32 hastanın sonuçlarına bakıldığında, *SİKLİN D1* ifadesinin 23 hastada (%72) arttığı, 9'unda (%28) azaldığı görülürken, *p16* gen ifadesinin ise hastaların 19'unda (%59) azaldığı, 12'sinde (%38) arttığı saptandı. Normal dokuya göre tümör dokularındaki *SİKLİN D1* geni ifadesindeki artış istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı olduğu tespit

edilirken, *p16* ifadesindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Temel Bileşen Analizine göre, *SİKLİN D1*; *NEUROD1, VPS28* ve *CABLES1* ile aynı boyutta yakın ilişki gösterirken, *p16* ise *USP8, EGFR, BRG1* ve *WEE1* ile de korelasyon göstermiştir. *SİKLİN D1* ifadesi artan 23 hastanın 12'sinde (%52) *p16* ifadesinde azalma gözlendi. Daha önce yapılan çalışmalardaki gibi (Byeon ve diğ., 1998; Russo ve diğ., 2011; Li ve diğ., 2011; Serra ve Chetty, 2018), bu çalışmada da *SİKLİN D1* ifadesinde artışın ve *p16* ifadesinde azalmanın bu hasta grubunda Cushing hastalığı gelişimine katılmış olduğu desteklenmektedir.

BRG1, gelişim ve homeostazda, morfogenezde, kök hücre farklılaşmasında, hücre sağ kalımında, sinyal yollarının düzenlenmesinde, proliferasyon, tümörogenez ve hücre yaşlanmasında etkili olup, IFN-α, IFN-γ, IL-6 gibi sitokinlerin promotör bölgelerini hedefleyerek, IFN sinyalleşmesinin düzenlenmesinde etkilidir. IL-6 ise tirozin fosforillenmesi ve JAK'ların aktivasyonunu tetikler ve apoptozu baskılayarak tümörogeneze katkıda bulunur (Marquez-Vilendrer ve diğ., 2016). Diğer tarftan memeli SWI/SNF2 kompleksinin ATPaz alt birimlerinden biri olan *BRG1*, tümör baskılayıcı olarak da kabul edilir (Wu ve diğ., 2017). *BRG1* fonksiyon kaybının, kortikotropinomalarda p27Kip1 kaybı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Roussel-Gervais ve diğ., 2010). *HDAC2*, histonların N terminal bölgesinde bulunan lizin kalıntılarından asetil gruplarını çıkararak gen ifadesini düzenler. *HDAC2*'nin varlığının POMC geni de dahil olmak üzere farklı genlerin transrepresyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir (Bilodeau ve diğ., 2006). Cushing hastalarına ait hipofiz adenomlarının yaklaşık %50'sinde *BRG1* ve *HDAC2*'nin ifadesinde azalma olduğu gösterilmiş, bu proteinlerin ifadelerindeki değişimlerin kortikotrop adenomaların oluşumunda ve glukokortikoid negatif geri bildiriminde etkili olduğu tespit edilmiştir (Bilodeau ve diğ., 2006). Bu çalışmada 32 hastanın 16'sında (%50) *BRG1* ifadesinin azaldığı görülürken, 15'inde (%47) artış saptanmıştır. *HDAC2* ifadesi 16 hastada (%50) artarken, 14 hastada ise (%44) azalmıştır. Kişisel gen ifadesi tablolarına bakıldığında özellikle *EGFR*'nin aşırı ifade edildiği 17 hastanın 5'inde (%29) *BRG1* ve *HDAC2* ifadelerinde azalma olduğu gözlenmiştir. Ancak *BRG1* ve *HDAC2* ifadelerindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir. Her ne kadar *HDAC2* ifadesindeki değişimler istatistiksel olarak sınırda gözükse de hasta sayısının daha fazla olması halinde *HDAC2* ifadesinin Cushing hastalığı ile ilişkisinin daha net gösterilebileceği düşünülmüştür.

Ayrıca hücre döngüsünde G2-M geçişinin negatif düzenleyicisi olan WEE1, özellikle Siklin B1 ile bağlanmış CDK1'i fosforilleyip inaktive eder. S ve G2 fazlarında aktivitesi artar ve hiperfosforillendiğinde M fazında azalır. *WEE1* ifadesindeki artış veya azalış hücre döngüsünün kontrolünü bozarak anormal hücre proliferasyonuna sebep olabilmektedir

(Yoshida ve diğ., 2004). Yapılan bir çalışmada, G2 kontrol noktası düzenleyicisi olan *WEE1*'in AZD1775 (Adavosertib) ile baskılanması sonucunda, duyarlı hücrelere kıyasla dirençli hücrelerde, hücre çoğalmasını önemli ölçüde azalttığı ve G2/M döngüsünü durdurduğu, apoptozu arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, WEE1'in standart tedaviye dirençli ER+ meme kanserinde umut verici bir antikanser terapötik ajan olabileceği fikri öne sürülmüştür (Fallah ve diğ., 2021). Yapılan literatür taramalarında, *WEE1* ile ACTH salgılayan adenomlar arasında ilişki gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada *WEE1* gen ifadesinin, 32 hastanın 25'inde (%78) arttığı, 7'sinde (%22) ise azaldığı saptanmış ve Cushing hastalarında *WEE1* ifadesi önemli derecede anlamlı bulunmuştur. Temel Bileşen Analizine göre, *WEE1* gen ifadesinin *EGFR*, *BRG1* ve *p16* genlerinin ifade düzeyleri ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. *EGFR* ifadesi artan 17 hastanın 16'sında (%94) da *WEE1* ifadesinde yüksek oranda artış saptanmıştır. Bu sonuçlar, bu çalışma grubundaki hastalarda *EGFR* ifadesindeki artış ile özellikle hücre döngüsünde yer alan *WEE1* ifadesi arasında bir ilişki olabileceğini ve ACTH salgılayan adenom oluşumuna katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

CABLES1 proteini başlangıçta, CDK3'ün substratı olarak tanımlanmıştır (Matsuoka ve diğ., 2000; Yamochi ve diğ., 2001). Fare ve zebra balığı modelleriyle yapılan çalışmalarda (Zukerberg ve diğ., 2000; Groeneweg ve diğ., 2011; Mizuno ve diğ., 2014) embriyogenez sırasında nöral gelişimde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. CABLES1, hücre döngüsünün G1 evresinin sonlarında, çoğalan hücrelerin çekirdeğinde yüksek oranda ifade edilmektedir (Matsuoka ve diğ., 2000; Wu ve diğ., 2001; Yamochi ve diğ., 2001). CABLES1, CDK3'ün haricinde CDK2, 14-3-3, AKT, CDK5 ve ABL dahil olmak üzere diğer protein kinazlar için bir substrattır (Zukerberg ve diğ., 2000; Wu ve diğ., 2001; Shi ve diğ., 2015b). Bu proteinin bir diğer önemli fonksiyonu, *CDKN1A* (*P21*), *CDK5R1* (*P35*) ve *TP63* gibi hücre döngüsünün düzenleyicilerini sabitlemek ve proteinlerin parçalanmasını önlemektir (Zukerberg ve diğ., 2000; Wang ve diğ., 2010b; Groeneweg ve diğ., 2011; Shi ve diğ., 2015a). CABLES1 ayrıca *TP53* ve *TP73* ile de etkileşerek apoptozu tetiklemektedir (Tsuji ve diğ., 2002). Glukokortikoidlerin kortikotrop hücreleri üzerinde uyguladığı fizyolojik negatif geribildirim, çoğunlukla kortikotropinomalarda bozulmakta ve bu tür tümörlerin yaklaşık yarısında CABLES1 protein ifadesi kaybolmaktadır (Roussel-Gervais ve diğ., 2010; Roussel-Gervais ve diğ., 2016). CABLES1'in tümör baskılayıcı aktivitesi 14-3-3 veya AKT-aracılı fosforillenme ile baskılanmaktadır (Shi ve diğ., 2015b). CABLES1, kortikotropinomalarda CDK/siklin bağımlı hücre döngüsü düzenlemesinin bozulmasına ve EGFR yolağının etkinleşmesine neden

olarak, bu iki önemli moleküler mekanizma arasında bir bağlantı sağlayabilmektedir (Fukuoka ve diğ., 2011). *EGFR*'nin ana etkileyicilerinden biri olan RAC-alfa serin/treonin protein kinaz (AKT1), CABLES1'i fosforilleyerek etkisiz hale getirebilmekte ve bu şekilde CABLES1'in CDK/siklin kompleksleri üzerindeki düzenleyici etkisini nötralize edebilmektedir (Fukuoka ve diğ., 2011, Shi ve diğ., 2015b).

Kortikotropik adenomlarda, USP8 enziminin EGFR'da olduğu gibi CABLES1 üzerinde de deubikutinleştirici bir etki gösterdiği ileri sürülmüştür (Reincke ve diğ., 2015). CABLES1, hücre döngüsü baskılayıcılarını p21/Cip1 ve p27/Kip1 sabitlediğinden, CABLES1 eksikliğinin kortikotropinomaların gelişimine katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür (Roussel-Gervais ve diğ., 2016). Hernandez-Ramirez ve diğ., 181 adet Cushing hastası arasından dört tanesinde işlev kaybı olan heterozigot *CABLES1* mutasyonu saptamıştır. Her ne kadar çok az hastada mutasyon varlığı tespit edilse de tanımlanan dört hastanın klinik özellikleri (örn, yaş ve tümör boyutu) göz önüne alındığında, pediatrik hastalarda meydana gelen *CABLES1* mutasyonlarının kortikotrop adenom oluşumunda daha etkili olabileceği düşünülmüştür (Hernandez-Ramirez ve diğ., 2017; Locantore ve diğ., 2022). Bu çalışmada *CABLES1* gen ifadesi çalışılmıştır. 32 hastanın 16'sında (%50) *CABLES1* geninin ifadesinde azalma, diğer yarısında (%50) ise artma olduğu görülmüştür. Normal dokuya göre tümör dokularındaki *CABLES1* geninin ifade düzeyindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve Cushing hastalığı ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Temel Bileşen Analizine bakıldığında, *CABLES1*'in *NEUROD1, VPS28, SİKLİN D1* ve *p16* genleri ile aynı boyutta yer aldığı, özellikle *CABLES1* gen ifadesi azalan 16 hastanın 15'inde (%94) *p16* ifadesinde de azalma olduğu gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarla paralellik gösteren bu sonuçlar *CABLES1*'in hücre döngüsünün baskılanmasını engelleyebileceğini ve böylece kortikotrop adenom oluşumuna katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

USP ailesinin ikinci üyesi olan *USP2,* ilk olarak 1997 yılında tavuk kasında UBP41 olarak tanımlanmıştır (Baek ve diğ., 1997). *USP2* geni alternatif kırpılma yoluyla 7 farklı varyant oluşturur, ancak bunlardan 5 tanesi protein kodlar (Stevenson ve diğ., 2007). Bazı USP2 varyantlarının tümörogenez, sirkadyen ritmin düzenlemesi ve inflamasyon dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylar için spesifik olarak çok önemli roller üstlendikleri bildirilmiştir (Sacco ve diğ., 2010; Wing, 2013; Bonacci ve Emanuele, 2020). Bugüne kadar, prostat kanseri, hepatoma, mesane karsinomu ve glioma dahil olmak üzere çeşitli malign tümörlerde yüksek oranda *USP2* ifadesi saptanmıştır (Granner ve diğ., 2004; Priolo ve diğ., 2006; Calvisi ve diğ., 2011; Tao ve diğ., 2013; Jeong ve diğ., 2015; Boustani ve diğ., 2016).

Ayrıca, en agresif meme kanseri türü olan üçlü negatif meme kanseri dokuları da yüksek düzeyde *USP2* ifadesine sahiptir (Qu ve diğ., 2015). Bu çalışmada, 32 hastanın 15'inde (%47) *USP2* ifadesi azalırken, 15'inde (%47) artmıştır. Ancak tümör ve normal doku örneklerinde *USP2* gen ifadeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuş ve hastalık ile yakın ilişki saptanmıştır. Temel Bileşen Analizine göre, *USP2* gen ifadesi, *IL-6*, *RIPK1* ve *HDAC2* gen ifadeleriyle korelasyon göstermiştir. *USP2* ifadesi azalan 15 hastanın 13'ünde (%87) *IL-6* ifadesinde, 14'ünde (%93) *RIPK1* ifadesinde ve 12'sinde (%80) de *HDAC2* ifadesinde azalma tespit edildi.

Deubikutinleştirici bir enzim olarak görev yapan *USP2*'nin, IL-6, RIPK1 ve TNF-α ilişkili NF-kB sinyalleşmesi için gerekli olan ubikutine spesifik bir proteaz olarak da çalışır (Kitamura ve Hashimoto, 2021). USP2, serin/treonin protein kinaz 1 (RIP1)'i de içeren TNF-α uyarılı sinyal kompleksini stabilize ederek NF-kB'nin aktivasyonuna yol açar ve proinflamatuar genlerin indüklenmesine neden olur. Ayrıca USP2'nin NF-kB aktivitesini çeşitli mekanizmalarla değiştirdiği gösterilmiştir (Metzig ve diğ., 2011). Bu çalışmada, *RIPK1* ifadesinin 19 hastada (%59) azaldığı, 12 hastada ise (%38) arttığı saptanmış, ancak istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık tespit edilmemiştir. *USP2* ifadesi azalan 15 hastanın 14'ünde (%93) *RIPK1* ifadesinde de azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar, daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarını destekler nitelik taşımaktadır. İfadesi azalan *USP2*'ye bağlı olarak *RIPK1* ifadesinde meydana gelen azalma hücre ölümünü engellerken adenom oluşumunu uyarmaktadır. Daha önce USP2 ve Cushing hastalığı arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada USP2 ifadeleri açısından hasta sayıları arasında bir fark yok gibi görülse de gerek kontrol grubuyla olan istatistiksel olarak saptanan anlamlı fark, gerekse inflamasyon belirteçleriyle olan yakın ilişkisi, USP2'nin farklı yolaklarla ve etkileşimlerle aktive olabilen Cushing hastalığında önemli bir hedef gen/protein olabileceğini göstermektedir. Hasta sayısı arttırılarak yapılacak daha ileri çalışmalar ile USP2'nin ACTH salgılayan hipofiz adenomlarının oluşumuna katkısı incelenebilir.

IL-6, immün ve inflamatuar yanıtları, tümör hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen önemli bir sinyal proteinidir. İmmünmodülatör bir sitokin olan IL-6'nın tümör proliferasyonu, anjiyogenez ve ilaç direncine yol açan farklı sinyal yollarını başlattığı bildirilmiştir (Chen ve diğ., 2017). Önceki çalışmalar, IL-6'nın p70S6K'yı yukarı doğru düzenleyerek PI3-K/Akt/mTOR ve MAPK/ERK sinyal yolaklarını aktive ettiği, böylelikle baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomunun invazyon ve metastazını teşvik edebildiğini göstermektedir (Wu ve diğ., 2016). Ayrıca Shen ve diğ., fonksiyonel olmayan hipofiz

adenomlarında *IL-6* ifadesinin yüksek olduğunu göstermiştir (Shen ve diğ., 2021). Yuanyang ve diğ., daha önce 62 hipofiz adenomu vakasını (30 invaziv ve 32 invaziv olmayan adenomlar) incelemişler, invaziv adenomlardaki *IL-6* ifadesinin invaziv olmayanlardakine göre daha yüksek olduğunu ve IL-6'nın anjiyogenezi teşvik ederek tümör invazyonuna neden olabileceğini göstermişlerdir (Yuanyang ve diğ., 2014). Doku hasarı, inflamasyon ve hücre ölümünde (nekroptoz) rol oynayan bir protein olan RIPK1'in artmış ifadesinin, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Wang ve diğ., 2013) ve farklı tiplerdeki meme kanseri (Karami-Tehrani ve diğ., 2016) gelişiminde etkili olduğu gözlenmiştir. Melanom hücrelerinde RIPK1'in susturulmasının hücre çoğalmasını baskıladığı saptanmış ve NF-κB yolağını aktive ederek onkogenik etki gösterdiği bildirilmiştir (Liu ve diğ., 2015). Bu çalışmada, *IL-6* ifadesinin hastaların 16'sında (%50) azaldığı, diğer 16'sında ise (%50) arttığı görülürken, 19 hastada (%59) *RIPK1* ifadesinin azaldığı, 12 hastada (%38) ise arttığı saptandı. Normal dokulara kıyasla tümör dokularında görülen ifade değişimlerinde herhangi bir anlamlılık tespit edilmedi. Ancak, Temel Bileşen Analizine göre *IL-6* ifadesi ile *RIPK1* ifadesi arasında korelasyon olduğu saptandı. *IL-6* ifadesi artan 16 hastanın 12'sinde (%75) *RIPK1* ifadesinde artış gözlendi. Bununla birlikte, *USP2* ifadesi azalan 15 hastanın 14'ünde (%93) *RIPK1* ifadesinde de azalma saptandı. *HDAC2*, *IL-6* ve *RIPK1* ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlılık bulunmasa da Temel Bileşen Analizine göre *USP2*, *HDAC2*, *IL-6* ve *RIPK1* genlerinin ACTH salgılayan hipofiz adenomu oluşumunda inflamasyon süreciyle ilişkili bir mekanizmada ortak hareket ettikleri düşünüldü.

Hücre döngüsü kontrolünün bozulması, kanser hücrelerinin ortak bir özelliğidir ve USP2'nin hücre döngüsü düzenlemesindeki rolleri hakkında çalışmalar mevcuttur. *SİKLİN D1*'in aşırı ifadesi çeşitli kanserli hücre türlerinde sıklıkla gözlenmektedir (Navarro ve diğ., 2020; Qie ve Diehl, 2020). Shan ve diğ., 76 adet DUB arasından USP2'yi spesifik bir Siklin D1 deubikutinlenme enzimi olarak tanımlamıştır (Shan ve diğ., 2009). USP2, Siklin D1 ile doğrudan etkileşime girmekte ve Siklin D1'in bozunmasını azaltmaktadır (Shan ve diğ., 2009). Siklin D1 tümörogenez için bir belirleyici olduğundan, USP2 inhibitörlerinin anti-tümör ilaçlar olarak araştırılmasında bir indeks olarak kullanılmıştır (Nepal ve diğ., 2015). Bu çalışmada, *USP2* ifadesi artan 15 hastanın 13'ünde (%87) *SİKLİN D1* ifadesinde artış görülmüştür. *USP2* ifadesi azalan hastalarda inflamasyonda görev alan genlerin ifadesinde azalma görülürken, diğer taraftan *USP2* ifadesi artan hastalarda ise *SİKLİN D1* ifadesinde artış gözlenmiştir. Temel Bileşen Analizine göre *USP2*; *NEUROD1*, *VPS28*, *SİKLİN D1*, *CABLES1* ve *p16* ile aynı boyutta yer almaktadır. Bu sonuçlar, *USP2*'nin hiperaktivasyonuna bağlı olarak *SİKLİN D1*'i

deubikutinleştirdiğini ve *SİKLİN D1*'in yıkımını engelleyerek ifadesinde artışa sebebiyet vereceğini düşündürmektedir. Bulgular, yüksek *EGFR* ifadesi görülen hastalarda yüksek *SİKLİN D1* ifadesi görülse de *USP2* ifadesindeki artışın da *SİKLİN D1* üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermiştir. Ayrıca, yüksek *SİKLİN D1* ifadesi *p16*'nın işlevini kontrol eden *CABLES1*'in de ifadesinde azalmaya neden olarak, hücre döngüsünün kontrolsüz bir şekilde ilerlemesinde etki göstermiş olabilir. Bu sonuçlar dahilinde USP8-EGFR deubikutinlenme yolağı dışında USP2'nin de farklı bir mekanizma ile Cushing adenom gelişiminde rol alabileceğini düşündürmektedir.

Hücre yüzeyi transmembran reseptörlerinin aracılık ettiği yanıtları düzenlemek amacıyla, reseptörlerin endozomlara alınarak sinyalleşmenin azalmasının sağlandığı mekanizmalar devreye girer (Gorden ve diğ., 1978). Bu mekanizmada "taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksi" (*endosomal compleces required for transport*-ESCRT) olarak bilinen bir dizi protein kompleksi kullanılır (Katzmann ve diğ., 2001). ESCRT kompleksi vasıtasıyla ubikutinlenmiş proteinler vezikül içine alınırlar. ESCRT kompleksinde birbiri ile koordineli olarak çalışan birçok protein alt grubu vardır. ESCRT-0 ubikutinlenmiş proteinleri tanır ve bunları STAM1/STAM2 aracılığıyla endozomal membrana toplar. ESCRT mekanizmasının substratları içerisinde en önemlisi EGFR'dır. ESCRT kompleksi, reseptörün ubikutinlenmesi ve endozoma yönlendirilmesinde önemli bir denge unsurudur. Bu denge içerisinde özellikle DUB'lar, hücresel substratı olan EGFR'nin deubikutinlenmesini sağlayarak yıkılmasını önler ve plazma membranına geri dönmesini sağlar (Katzmann ve diğ., 2001; Babst ve diğ., 2002a; Babst ve diğ., 2002b).

Vezikül aracılı taşıma ve klatrin aracılı endositozda görevli olan STAM2, multiveziküler cisimler (MVB'ler) aracılığıyla reseptör tirozin kinazların aşağı yönlü düzenlenmesinde yer alan ESCRT-0 kompleksinin bir alt birimidir. Kaymaz ve diğ., *STAM2* ifadesinin tümör baskılayıcı olarak görev yapan miR-2278 tarafından baskılandığını ve bu sayede *STAM2*'nin apoptozu uyararak lösemik hücre çoğalmasını inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Kaymaz ve diğ., 2015). Yapılan başka bir çalışmada, gastrik kanserli dokularda *STAM2* ifadesinin engellenmesinin JAK/STAT sinyal yolağını etkileyerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu ve metastaz potansiyelini önemli ölçüde kısıtlayabildiği sonucuna varılmıştır (Yang ve diğ., 2021). Bu çalışmada 32 hastanın 23'ünde (%72) *STAM2* ifadesinde azalma, 9'unda (%28) ise artış görüldü. Ancak herhangi bir istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır. *STAM2* ifadesi azalan 23 hastanın 10'unda (%43) *EGFR* ifadesinde artış

gözlenmiştir. Bu sonuçlar, *EGFR*'nin endozomal membrana yönlendirilmesinde tek başına *STAM2*'nin etkili olamadığını göstermektedir.

Proteinlerin veziküllere taşınması ve sınıflandırılmasında görev yapan ESCRT-I kompleksinin bir protein alt birimini kodlayan gen olan *VPS28,* ubikutin bağlayan bir protein kodlar (Cornet ve diğ., 2006). *VPS28*, hücresel membranlar, sitokinez, otofaji ve membran onarımını destekleyen birçok hücresel süreçte kritik öneme sahiptir (Henne ve diğ., 2011). Bu çalışmada, 32 hastanın 17'sinde (%53) *VPS28* ifadesinde azalış, 14'ünde (%44) artış gözlenmiştir. Ancak istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık bulunmamaktadır. Cushing hastalığı ile ilişkisi saptanmamıştır.

NEUROD1 (Neuronal Differentiation 1) bir transkripsiyon faktörüdür. NEUROD1 proteini, adenohipofizde proopiomelanokortini ACTH'ye dönüştüren kortikotrop hücrelerinin çekirdeğinde tespit edilmiştir (Poulin ve diğ., 1997). *NEUROD1*, özellikle merkezi sinir sistemi hücrelerinin farklılaşmasında, morfogenezinde ve normal işleyişinde de önemli bir rol oynamaktadır (Liu ve diğ., 2000). Mitrofanova ve diğ., kortikotrop ve gonadotrop adenomlarda yüksek seviyelerde *NEUROD1* ifadesini tespit etmiş, *NEUROD1*'in hipofiz adenomu gelişiminde transkripsiyon faktörü olarak önemli bir role sahip olduğunu bildirilmişlerdir (Mitrofanova ve diğ., 2019). ACTH ve GH salgılayan plurihormonal adenomlarda *NEUROD1* ve Pit-1 mRNA'sının önemli ölçüde ifade olmaktadır (Takiguchi ve diğ., 2017). Bu çalışmada, normal dokuya göre tümör dokularındaki *NEUROD1* geni ifade düzeyindeki azalma istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulunmuştur. *NEUROD1* geninin ifadesi 32 hastanın 16'sında (%50) azalırken, 13'ünde (%41) artmıştır. Temel Bileşen Analizine göre, *p16*, *VPS28*, *SİKLİN D1* ve *CABLES1* ifadeleri ile yakın ilişki göstermektedir. Hipofiz adenomlarında *NEUROD1* ifadesiyle ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (Takiguchi ve diğ., 2017; Mitrofanova ve diğ., 2019). *NEUROD1* geni, üzerinde taşıdığı E-box (*Enhancer box)* bölgeleri sayesinde birçok farklı proteinin bağlanabileceği ve gen ifadesini kontrol edebileceği, üzerinde bulunan –CANNTG- nükleotid dizisi nedeniyle c-Myc, TWIST2 ve TCF43 de dahil olmak üzere birçok farklı transkripsiyon faktörünün hedefi konumundadır. Bu dizi sayesinde, farklı transkripsiyon faktörlerinin etkisi altında hücre farklılaşmasını ve gelişimini kontrol edebilme potansiyeli bulunmaktadır. *NEUROD1* geninin ifadesindeki azalış, bahsi geçen transkripsiyon faktörleri aracılığı ile apoptozu azaltmış olabilir. Bu çalışmada, *NEUROD1* gen ifadesindeki azalmada olası miRNA'ların veya post-translasyonel modifikasyonların rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma *NEUROD1* geninin Cushing hastalığının etyopagenezinde önemli rol oynayabileceğini ileri süren çalışmaları desteklemektedir.

Çalışmanın başlangıcında biyoinformatik analizler ile birbiriyle ilişkisi öngörülen aday proteinler saptanmış ve buna göre bir gen paneli oluşturulmuştu. Çalışmanın sonucunda, ilk kez bir arada çalışılan genlerin ifadeleri ile Cushing hastalığının etyopatogenezinde etkin olan genler saptanmıştır. Bu çalışma ile kullanılan Temel Bileşen Analizi yöntemiyle özellikle Cushing hastalığının etyopatogenezinde rol alan gen kümeleri tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda ilk kez *USP2, CABLES1, p16* ve *WEE1* genlerinin Cushing hastalığında etkili genler oldukları ve farklı genlerle kümeler oluşturdukları tespit edildi.

Çalışmaya dahil edilen 32 hastanın tümör ve normal doku örneklerinde ifade düzeyi çalışılan genlerin; cinsiyet, yaş, kilo, pre-op kortizol, ACTH değeri, idrarda kortizol, post-op 24 ve 48 saatlik kortizol değerleri, adenom tipi ve invazyon durumu klinik parametreler ile karşılaştırılmasında yine *Temel Bileşen Analizi (Principle Component Analysis)* yöntemi uygulandı.

İlk grupta, hastalığın şiddetini gösteren pre-op kortizol, pre-op ACTH, pre-op idrarda kortizol ve pre-op 1 mg Dx değerleri ile gen ifade sonuçları karşılaştırıldı. Bu etkileşim 5 farklı boyutta incelendi. Birinci boyutta yer alan *IL-6, RIPK1, HDAC2* ve *USP2* genleri ile ikinci boyutta yer alan *STAM2, NR4A1, CABLES1, WEE1* ve *EGFR* genlerinin hastalığın şiddetini gösteren klinik parametrelerle ilişkisinin olmadığı görüldü. Üçüncü boyuttaki *NEUROD1, VPS28, SİKLİN D1* ve *p16*'nın ifadelerinin idrarda kortizol seviyesi ile negatif yönde ilişkili olduğu; dördüncü boyuttaki *BRG1* ve *USP8*'in ifadelerinin ise pre-op kortizol değeri ile negatif yönde ilişki gösterdiği gözlendi. Kortizol ve NEUROD1'in ilişkisini balıklarda gösteren iki çalışma (Best ve diğ., 2017; Sadoul ve diğ., 2018) olmasına rağmen, insanlarda bu yönde çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ilk kez NEUROD1 ve kortizol ilişkisi gösterilmiştir. Hücre döngüsünde tümör baskılayıcı olarak görev yapan p16'nın, kortizol üreten adenomlarda hücrede senesensi arttırdığı bilinmektedir. Hem p16 hem de p21 proteinleri retinoblastoma proteinini (pRb) indüklemekte, bu da CDK2 veya CDK4/6'nın ifadesini arttırıp hücre döngüsünü G1/S fazında tutarak hücreyi senesense götürmektedir. Ancak p16'da meydana gelebilecek bir mutasyon nedeniyle bu mekanizma bozulmakta ve hücre kanserleşmektedir. Bu çalışmada, *p16* geninin ifadesinin artışı ile kortizol seviyesi arasında ters yönde ilişki saptandı. Artmış *p16* gen ifadesi hücrede senesensi arttırarak kortizol üretimini baskılıyor olabilir (Rayess ve diğ., 2012; Gao ve diğ., 2021). Siklin D1 de hücre döngüsünün ilerlemesinde görev yapan bir protein olduğundan, benzer bir önerme Siklin D1 için de kurulabilir.

İkinci grupta ise gen ifade sonuçları adenom tipi ve invazyon durumu gibi hastalığın temel klinik parametreleri ile karşılaştırıldığında, 5 farklı boyutta etkileşim saptandı. Birinci

boyutta yer alan *RIPK1, IL-6, HDAC2* ve *USP2*, ikinci boyutta yer alan *USP8, EGFR, BRG1* ve *WEE1* ve üçüncü boyutta yer alan *NEUROD1, VPS28, CABLES1, p16* ve *SİKLİN D1* genlerinin herhangi bir klinik parametre ile ilişkisi yoktu. Dördüncü boyutta, *STAM2* ve *NR4A1*'in adenom tipi ile negatif yönde ilişkili olduğu tespit edildi. Bu genlerin ve ürünleri olan proteinlerin birbirleri ile olası ilişkileri immünpresipitasyon tarzı çalışmalarla araştırılması konuya daha fazla açıklık getirebilir.

Hipofiz adenomları sporadik, herediter veya ailesel sendromlar şeklinde ortaya çıkabilir. Tümör oluşumunda onkogenler, tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsü genleri, miRNA'lar ve epigenetik değişiklikler rol oynamaktadır. DNA'nın yapısında doğrudan meydana gelen değişiklikler (delesyon, mutasyon, insersiyon vb.) ve epigenetik düzenlemenin bozulması, DNA metillenmesi-asetillenmesi, histon modifikasyonu, nükleozomların yeniden biçimlenmesi ve RNA aracılı hedeflemedeki bozukluklar, hücresel döngünün işleyişini bozarak tümör oluşumuna yol açmaktadır. Hücre döngüsü düzenlemesindeki anormallikler, hipofiz adenomlarının oluşumunda önemli bir role sahiptir. p16 veya p27 gibi CDK baskılayıcılarının kaybı veya Siklin D gibi CDK'leın aşırı ifade edilmesi tümör gelişiminde rol oynamaktadır. İnsan hipofiz adenomlarının %80'inde en az bir hücre döngüsü düzenleyicisinde değişiklik olduğu tahmin edilmektedir.

Bu çalışmada, hasta ve kontrol gruplarının parafine gömülü doku kesitlerinden elde edilen DNA örnekleri, *p16* ve *USP8* genlerinin promotör bölgesindeki metillenme durumunu incelemek amacı ile bisülfit modifikasyonundan sonra metillenmeye özgü PZR yöntemi kullanılarak çoğaltıldı. Yapılan incelemelerin sonucunda, 32 hasta dokusunun 14'ünde (%44) *p16* geninde kısmi metillenme gözlenirken, 15'inde (%47) ise metillenme olmadığı görüldü. Bu durumda kısmi metillenme ile *p16* geninin çalışması engellenmiş ve ifadesinde azalma gözlemlenmiş olabilir. Hipofiz adenomlarında *p16* geni neredeyse sadece metillenme yoluyla baskılanır. Baskılayıcı mutasyonlar (heterozigotluğun kaybı, *loss of heterozygosity*-LOH) veya homozigot delesyonlar *p16*'nın fonksiyon kaybının sadece %0-15'ini oluşturur (Seeman ve diğ., 2001; Farrel ve Clayton, 2003). Sporadik hipofiz adenomlarının %34-90'ında *p16* geninin CpG adalarının metillenmesi saptanmıştır (Yoshimoto ve diğ., 1997; Ruebel ve diğ., 2001; Ogino ve diğ., 2005). Simpson ve diğ.'nin Cushing hastalarında *p16* metillenmesini MS-PCR yöntemini kullanarak inceledikleri bir çalışmada, adenomların %54,8'inde (17/31), kortikotrop hiperplazilerin ise %66,7 (4/6)'sinde metillenme saptanmış, *p16* ifadesinin azaldığı ve *p16* geninin CpG adacıklarının histolojik bulgulardan bağımsız bir şekilde metillendiği gösterilmiştir (Simpson, 2004). Bu çalışmanın sonuçları daha önceki çalışmalara paralel olup,

p16'nın Cushing hastalığında önemli bir role sahip olduğunu ve Cushing hastalığı etyopatogenezinde *p16* metillenme durumunun bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Cushing hastalığının etyopatogenezinin araştırılmasında 2015 yılından itibaren yapılan moleküler çalışmalarda USP8 geninde saptanan mutasyonların hastalığa spesifik olduğu düşünülmüş, bu nedenle USP8'in kortikotrop adenomu oluşumunda bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür (Perez-Rivas ve diğ., 2015; Theodoropoulou ve diğ., 2015; Hayashi ve diğ., 2016; Faucz ve diğ., 2017; Albani ve ark., 2018). Bu öngörüden yola çıkılarak USP8 metillenmesinin ilk defa araştırıldığı bu çalışmada, 32 hastanın hiçbirinde *USP8* metillenmesi saptanmadı. Gen ifadelerinin metillenme durumlarıyla ilişkisi üzerine istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık görülmedi. *p16* geninin kısmi metillenmesi ve *USP8* geninde ise hiç metillenme olmaması, gen ifadelerinin düzenlenmesinde farklı mekanizmalar ile ilişkili olabilir. Gen ifadesinmin düzenlenmesinde rol alan miRNA'ların hedeflerini belirlemede/öngörmede kullanılan mirdb sitesine göre, *p16*'yı hedefleyen 44, *USP8*'i hedefleyen 140 farklı miRNA bulunmaktadır. Metillenme profili için miRNA'ların çalışılması konuya açıklık getirebilir. Bir diğer olasılık ise, genin üzerinde transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı ve gen ifadesini kontrol eden promotör bölge üzerinde bir mutasyon olasılığıdır. Bu mutasyona bağlı olarak, genin ifadesi azalmış olabilir. Ayrıca, genlerin düzenleyici bölgeleri üzerindeki çeşitli genetik değişiklikler (insersiyon, delesyon, vb.) başta transkripsiyon faktörleri olmak üzere farklı efektör proteinlerin bağlanmasını engellemiş, transkripsiyonu engelleyerek genlerin ifadesini azaltmış olabilir (Kamanu ve diğ., 2012).

Çalışmaya dahil edilen 32 hastanın tümör ve normal doku örneklerinde metillenme düzeyi çalışılan *p16* geninin; cinsiyet, yaş, kilo, pre-op kortizol, pre-op ACTH, pre-op idrarda kortizol, pre-op 1 mg Dx baskılama testi, post-op 24 ve 48 saatlik kortizol değerleri, adenom tipi ve invazyon durumu gibi klinik parametreler ve ACTH seviyeleri, p53 mutasyon durumu, Ki-67 antikor değerleri gibi patolojik parametreler ile karşılaştırılması sonucunda, kısmi metillenmenin p53 ve Ki-67 pozitifliği ile anlamlı şekilde korelasyon gösterdiği tespit edildi. Diğer klinik parametrelerle yapılan karşılaştırma sonucunda ise anlamlı bir fark bulunamadı. Bu sonuçlar *p16* kısmi metillenmesinin, p16 proteinin p53 ve Ki-67 gibi proliferasyonda iş gören proteinleri etkileyerek hücre çoğalmasını tetikleyebileceğini göstermiştir. *p16* metillenmesi ile tümör hacmi, invazivlik, nüks, hasta yaşı veya malignite arasında ilişkiler tartışmalıdır (Yoshimoto ve diğ., 1997; Jaffrain-Rea ve diğ., 1999; Seeman ve diğ., 2001; Ogino ve diğ., 2005). Her ne kadar birkaç çalışmada hasta yaşı ile metillenme durumu arasında anlamlı

bir ilişki olduğu bildirilse de hasta yaşı ve cinsiyeti gibi klinik özelliklerin metillenme durumu ile daha az ilişki gösterdiği saptanmıştır (So ve diğ., 2006).

Tümör doku örneklerindeki *p16* metillenme düzeylerinin klinik parametreler ile karşılaştırılması Temel Bileşen Analizi uygulanarak yapıldı. *p16* metillenme düzeyinin pre-op kortizol, pre-op ACTH, pre-op 1 mg Dx ve 8 mg Dx baskılama testi, pre-op idrarda kortizol, post-op 24 ve 48 saatlik kortizol, adenom tipi ve invazyon durumu gibi klinik parametrelerle olan ilişkisi saptandı. Bu etkileşimde 2 farklı boyutun yer aldığı tespit edildi. Birinci boyutta hastalığın şiddetini gösteren pre-op belirteçler arasında yer alan ACTH, 1 mg Dx baskılama testi, 8 mg Dx baskılama testi, idrarda kortizol seviyeleri ile *p16* metillenme durumu arasında negatif yönde ilişkili olduğu tespit edildi. İkinci boyutta ise *p16* metillenme durumu ile postop 1 mg Dx, 8 mg Dx testleri, adenom tipi ve invazyon durumu arasındaki ilişkinin pozitif yönde olduğu saptandı. *p16*'nın mutasyonu halinde hücreler kontrolsüz şekilde çoğalmaya başladığından, hücrelerin invazyonu, farklı bir hücre tipine dönüşme hızı ve imkânı artmış olabilir. Ancak bu çalışmada *p16*'nın mutasyon durumu incelenmediğinden, bu soruya yanıt verilememektedir. *p16*'nın hücre döngüsünün ilerlemesindeki ve birçok kanser türündeki etkin rolü göz önüne alındığında, bu önemli proteinin Cushing hastalığındaki rolünün daha fazla araştırılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile Cushing hastalığında etkin olduğu düşünülen 15 farklı genin ifadesi ve 2 farklı genin metillenme profili incelendi. Buna göre *CABLES1*, *NR4A1*, *SİKLİN D1*, *USP2*, *NEUROD1* ve *WEE1*'in Cushing hastalığının etyopatogenezinde etkili oldukları saptandı.

p16'nın Cushing hastalığında önemli bir role sahip olabileceği, Cushing hastalığı etyopatogenezinde *p16* metillenme durumunun bir belirteç olarak kullanılabileceği gösterildi.

USP8-EGFR deubikutinlenme yolağı dışında USP2'nin de rol oynayabileceği farklı bir mekanizmanın olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak, Cushing hastalığında daha önceden etkinliği gösterilmiş olan genler haricinde, bu genler ile ilişkili olabilecek yeni genler ve gen kümeleri gösterildi. Cushing hastalığı gibi birçok farklı parametrenin etkisi ve kontrolü altında olan karmaşık bir hastalıkta genetik ve epigenetik faktörlerin incelenmesi, hastalığın gelişme riskini ve seyrini önceden tahmin edebilme ve tedaviye erken başlama seçeneklerini sunmaktadır. Birçok kanser türünde ve metabolik hastalıkta olduğu gibi, Cushing hastalığında da etkin gen ve reseptörler hedeflenerek ilaç ve tedavi yöntemleri geliştirmek mümkün olabilecektir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında daha geniş kapsamlı epigenetik panel çalışması yapılabilir. Gen ifadesinin değişmesine neden olan miRNA mekanizmaları daha geniş kapsamlı olarak araştırılabilir. Hücre kültürü deneyleri ile yine siRNA gibi gen susturma teknikleri kullanılarak hipofiz adenomlarında gen/protein ilişkileri saptanabilir. Kromatin immünpresipitasyon (ChIP) deneyleri ile de DNA/protein ilişkileri araştırılabilir. Yeni nesil dizileme teknikleri kullanılarak hedef genlerdeki mutasyonlar ve bunun fenotipe olan etkileri araştırılabilir. Ayrıca omik çalışmaları yapılarak (ekzom analizi ile tüm eksonlardaki mutasyonlar, transkriptom analizi ile tüm transkriptler, metabolom analizi ile tüm metabolitler) çok daha geniş kapsamlı olarak araştırılabilir.

KAYNAKLAR

Aflorei, E.D., Korbonits, M., 2014, Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas, *Journal of Neuro-Oncology*, 117:379–94.

Albani, A., Theodoropoulou, M., Reincke, M., 2018, Genetics of Cushing's disease, *Clinical Endocrinology*, 88:3–12.

Allende-Vega, N., Sparks, A., Lane, D.P., Saville, M.K., 2010, MdmX is a substrate for the deubiquitinating enzyme USP2a, *Oncogene*, 29(3):432–41.

Amar, A.P., Weiss, M.H., 2003, Pituitary anatomy and physiology, *Neurosurgery Clinics of North America*, 14(1):11-23.

Asa, S.L., Casar-Borota, O., Chanson, P., Delgrange, E., Earls, P., Ezzat, S., Grossman, A., Ikeda, H., Inoshita, N., Karavitaki, N., Korbonits, M., Laws, E.R. Jr., Lopes, M.B., Maartens, N., McCutcheon, I.E., Mete, O., Nishioka, H., Raverot, G., Roncaroli, F., Saeger, W., Syro, L.V., Vasiljevic, A., Villa, C., Wierinckx, A., Trouillas, J., 2017, From pituitary adenoma to pituitary neuroendocrine tumor (PitNET): an International Pituitary Pathology Club proposal, *Endocrine-Related Cancer*, 24:C5–8.

Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Sabal, E.J., Meerloo, T., Emr, S.D., 2002, Escrt-III, *Developmental Cell*, 3:271–282.

Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W.B., Wendland, B., Emr, S.D., 2002, Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body, *Developmental Cell*, 3:283–289.

Backert, S., Gelos, M., Kobalz, U., Hanski, M.L., Bohm, C., Mann, B., Lovin, N., Gratchev, A., Mansmann, U., Moyer, M.P., Riecken, E.O., Hanski, C., 1999, Differential gene expression in colon carcinoma cells and tissues detected with a cDNA array, *International Journal of Cancer*, 82:868 – 874.

Baek, S.H., Choi, K.S., Yoo, Y.J., Cho, J.M., Baker, R.T., Tanaka, K., Chung, C.H., 1997, Molecular cloning of a novel ubiquitin-specific protease, UBP41, with isopeptidase activity in chick skeletal muscle, *Journal of Biological Chemistry*, 272, 25560–25565.

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*, 18:1827–39.

Banskota, S., Adamson, D.C., 2021, Pituitary Adenomas: From Diagnosis to Therapeutics, *Biomedicines*, 30;9(5):494.

Barkhoudarian, G., Kelly, D.F., 2017, *The Pituitary Gland: Anatomy, Physiology, and its Function as the Master Gland*, Cushing's Disease, In: Laws, E.D. (ed.), Chapter 1, Academic Press, A division of Harcourt Brace & Company, San Diego, USA, 978-0-12-804340-0, 1-41.

Bates, S., Peters, G., 1995, Cyclin D1 as a cellular proto-oncogene, *Seminars in Cancer Biology*, 6:73–82.

Baylin, S.B., Jones, P.A., 2011, A decade of exploring the cancer epigenome -biological and translational implications, *Nature Reviews Cancer*, 11:726–34.

Beard, J.A., Tenga, A., Chen, T., 2015, The interplay of NR4A receptors and the oncogene-tumor suppressor networks in cancer, *Cell Signal*, 27, 257–266.

Beckers, A., Aaltonen, L.A., Daly, A.F., Karhu, A., 2013, Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene, *Endocrine Reviews*, 34(2):239-77.

Bertagna, X., Guignat, L., Groussin, L., Bertherat, J, 2009, Cushing's disease, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 23:607–623.

Best, C., Kurrasch, D.M., Vijayan, M.M., 2017, Maternal cortisol stimulates neurogenesis and affects larval behaviour in zebrafish, *Science Reports*, 18;7:40905.

Bhattacharya, S., Ghosh, M.K., 2014, Cell death and deubiquitinases: perspectives in cancer, *BioMed Research International*, 2014:435197.

Bi, W.L., Horowitz, P., Greenwald, N.F., Abedalthagafi, M., Agarwalla, P.K., Gibson, W.J., Mei, Y., Schumacher, S.E., Ben-David, U., Chevalier, A., Carter, S., Tiao, G., Brastianos, P.K., Ligon, A.H., Ducar, M., MacConaill, L., Laws, E.R. Jr., Santagata, S., Beroukhim, R., Dunn, I.F., 2017, Landscape of genomic alterations in pituitary adenomas, *Clinical Cancer Research*, 23:1841–51.

Bilodeau, S., Vallette-Kasic, S., Gauthier, Y., Figarella-Branger, D., Brue, T., Berthelet, F., Lacroix, A., Batista, D., Stratakis, C., Hanson, J, Meij, B., Drouin, J., 2006, Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease, *Genes and Development*, 20 2871–2886.

Bird, A., 2002, DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes & Development*, 16:6–21.

Bonacci, T., Emanuele, M.J., 2020, Dissenting degradation: Deubiquitinases in cell cycle and cancer, *Seminars in Cancer Biology*, 1–14.

Boustani, M.R., Khoshnood, R.J., Nikpasand, F., Taleshi, Z., Ahmadi, K., Yahaghi, E., Goudarzi, P.K., 2016, Overexpression of ubiquitinspecific protease 2a (USP2a) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in human gliomas, *Journal of the Neurological Sciences*, 363, 249–252.

Bowden, S.A., Connolly, A.M., Kinnett, K., Zeitler, P.S., 2019, Management of Adrenal Insufficiency Risk After Long-term Systemic Glucocorticoid Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy: Clinical Practice Recommendations, *Journal of Neuromuscular Diseases*, 6(1):31-41.

Briassoulis, G., Damjanovic, S., Xekouki, P., Lefebvre, H., Stratakis, C.A., 2011, The glucocorticoid receptor and its expression in the anterior pituitary and the adrenal cortex: a source of variation in hypothalamic-pituitary-adrenal axis function; implications for pituitary and adrenal tumors, *Endocrine Practice*, 17(6):941-8.

Byeon, I.J., Li, J., Ericson, K., Selby, T.L., Tevelev, A., Kim, H.J., O'Maille, P., Tsai, M-D, 1998, Tumor suppressor p16INK4A: determination of solution structure and analyses of its interaction with cyclin-dependent kinase 4, *Molecular Cell*, 1:421–431.

Caimari, F., Korbonits, M., 2016, Novel Genetic Causes of Pituitary Adenomas, *Clinical Cancer Research*, 15;22(20):5030-5042.

Calvisi, D.F., Wang, C., Ho, C., Ladu, S., Lee, S.A., Mattu, S., Destefanis, G., Delogu, S., Zimmermann, A., Ericsson, J., Brozzetti, S., Staniscia, T., Chen, X., Dombrowski, F., Evert, M., 2011, Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma, *Gastroenterology*, 140, 1071–1083.e5.

Cassarino, M.F., Sesta, A., Pagliardini, L., Losa, M., Lasio, G., Cavagnini, F., Pecori Giraldi, F., 2017, Proopiomelanocortin, glucocorticoid, and CRH receptor expression in human ACTH-secreting pituitary adenomas, *Endocrine*, 55(3):853-860.

Castinetti, F., Morange, I., Conte-Devolx, B., Brue, T., 2012, Cushing's disease, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7:41.

Celebi, G., Kesim, H., Ozer, E., Kutlu, O., 2020, The effect of dysfunctional ubiquitin enzymes in the pathogenesis of most common diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 6335.

Chan, S.H., Chiang, J., Ngeow, J., 2021, CDKN2A germline alterations and the relevance of genotype-phenotype associations in cancer predisposition, *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 25;19(1):21.

Chang, M., Yang, C., Bao, X., Wang, R., 2020, Genetic and Epigenetic Causes of Pituitary Adenomas, *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 11:596554.

Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., Varshavsky, A., 1989, A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein, *Science*, 243:1576–83.

Chen, L.M., Liu, P.Y., Chen, Y.A, Tseng, H.Y., Shen, P.C., Hwang, P.A., Hsu, H.L., 2017, Oligo-Fucoidan prevents IL-6 and CCL2 production and cooperates with p53 to suppress ATM signaling and tumor progression, *Scientific Reports*, 7(01):11864–11869.

Chin, S.O., 2020, Epidemiology of Functioning Pituitary Adenomas, *Endocrinology and Metabolism (Seoul)*, 35(2):237-242.

Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E.M., Campsteijn, C., Stenmark, H., 2017, Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery, *Trends in Biochemical Science*, 42 (1), 42–56.

Coopmans, E.C., Korbonits, M., 2022, Molecular genetic testing in the management of pituitary disease, *Clinical Endocrinology (Oxf)*, 97(4):424-435.

Cornet, M., Gaillardin, C., Richard, M.L., 2006, Deletions of the Endocytic Components VPS28 and VPS32 in Candida Albicans lead to Echinocandin and Azole Hypersensitivity, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (10), 3492–3495.

Daly, A.F., Jaffrain-Rea, M.L., Ciccarelli, A., Valdes-Socin, H., Rohmer, V., Tamburrano, G., Borson-Chazot, C., Estour, B., Ciccarelli, E., Brue, T., Ferolla, P., Emy, P., Colao, A., De Menis, E., Lecomte, P., Penfornis, F., Delemer, B., Bertherat, J., Wémeau, J.L., De Herder, W., Archambeaud, F., Stevenaert, A., Calender, A., Murat, A., Cavagnini, F., Beckers, A., 2006, Clinical characterization of familial isolated pituitary adenomas, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91: 3316-3323.

Daniel, E., Newell-Price, J., 2006, Recent advances in understanding Cushing disease: resistance to glucocorticoid negative feedback and somatic USP8 mutations, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(9):3316-23.

Dong, W., Li, J., Liu, Q., Liu, C., Li, C., Song, G., Zhu, H., Gao, H., Zhang, Y., 2018, P21(Waf1/Cip1) and p27(Kip1) are correlated with the development and invasion of prolactinoma, *Journal of Neuro-Oncology*, 136(3):485-94.

Dufner, A., Knobeloch, K.P., 2019, Ubiquitin-specific protease 8 (USP8/UBPy): a prototypic multidomain deubiquitinating enzyme with pleiotropic functions, *Biochemical Society Transactions*, 20;47(6):1867-1879.

Dworakowska, D., Korbonits, M., Aylwin, S., McGregor, A., Grossman, A.B., 2011, The pathology of pituitary adenomas from a clinical perspective, *Frontiers in Bioscience (Schol Ed)*, 1;3(1):105-16.

Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., Hrabeta, J., 2017, Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs, *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1414.

El Sayed, S.A., Fahmy, M.W., Schwartz, J., Physiology, Pituitary Gland. 2022 May 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Endo, K., Takeshita, T., Kasai, H., Sasaki, Y., Tanaka, N., Asao, H., Kikuchi, K., Yamada, M., Chenb, M., O'Shea, J.J., Sugamura, K., 2000, STAM2, a new member of the STAM family, binding to the Janus kinases, *FEBS Letters*, 477: 55–61.

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*, 1;101(3):613-9.

Fallah, Y., Demas, D.M., Jin, L., He, W., Shajahan-Haq, A.N., 2021, Targeting WEE1 Inhibits Growth of Breast Cancer Cells That Are Resistant to Endocrine Therapy and CDK4/6 Inhibitors, *Frontiers in Oncology*, 1;11:681530.

Farrell, W.E., Clayton, R.N., 2003, Epigenetic change in pituitary tumorigenesis, *Endocrine-Related Cancer*, 10: 323-330.

Faucz, F.R., Tirosh, A., Tatsi, C., Berthon, A., Hernández-Ramírez, L.C., Settas, N., Angelousi, A., Correa, R., Papadakis, G.Z., Chittiboina, P., Quezado, M., Pankratz, N., Lane, J., Dimopoulos, A., Mills, J.L., Lodish, M., Stratakis, C.A., 2017, Somatic USP8 gene mutations are a common cause of pediatric Cushing disease, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 102:2836-2843.

Ferretti, E., Di Stefano, D., Zazzeroni, F., Gallo, R., Fratticci, A., Carfagnini, R., Angiulli, S., Santoro, A., Minniti, G., Tamburrano, G., Alesse, E., Cantore, G., Gulino, A., Jaffrain-Rea, M.L., 2003, Human pituitary tumours express the bHLH transcription factors NeuroD1 and ASH1, *Journal of Endocrinological Investigation*, 26:957–965.

Ferrau, F., Korbonits, M., 2015, Metabolic comorbidities in Cushing's syndrome, *European Journal of Endocrinology*, 173, M133–M157.

Fukuoka, H., Cooper, O., Ben-Shlomo, A., Mamelak, A., Ren, S.G., Bruyette, D., Melmed, S., 2011, EGFR as a therapeutic target for human, canine, and mouse ACTH-secreting pituitary adenomas, *Journal of Clinical Investigation*, 121:4712-4721.

Fukuoka, H., Takahashi, Y., 2014, The Role of Genetic and Epigenetic Changes in Pituitary Tumorigenesis, *Neurologia Medico-Chirurgica*, 54, 943–957.

Gao, X., Li, F., Liu, B., Wang, Y., Wang, Y., Zhou, H., 2021, Cellular Senescence in Adrenocortical Biology and Its Disorders, *Cells*, 9;10(12):3474.

Ghorayeb, N.E., Bourdeau, I., Lacroix, A., 2015, Multiple aberrant hormone receptors in Cushing's syndrome, *European Journal of Endocrinology*, 173, M45–M60.

Gibbison, B., Angelini, G.D., Lightman, S.L, 2013, Dynamic output and control of the hypothalamic-pituitaryadrenal axis in critical illness and major surgery, *British Journal of Anaesthesia*, 111:347–360.

Gittleman, H., Ostrom, Q.T., Farah, P.D., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Kruchko, C., Singer, J., Kshettry, V.R., Laws, E.R., Sloan, A.E., Selman, W.R., Barnholtz-Sloan, J.S., 2014, Descriptive epidemiology of pituitary tumors in the United States, 2004-2009, *Journal of Neurosurgery*, 121:527–35.

Gorden, P., Carpentier, J.L., Cohen, S., Orci, L., 1978, Epidermal growth factor: morphological demonstration of binding, internalization, and lysosomal association in human fibroblasts, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75:5025–5029.

Green, J.L., Okerberg, E.S., Sejd, J., Palafox, M., Monserrat, L., Alemayehu, S., Wu, J., Sykes, M., Aban, A., Serra, V., Nomanbhoy, T., 2019, Direct CDKN2 modulation of CDK4 alters target engagement of CDK4 inhibitor drugs, *Molecular Cancer Therapeutics*, 18: 771-779.

Groeneweg, J.W., White, Y.A., Kokel, D., Peterson, R.T., Zukerberg, L.R., Berin, I., Rueda, B.R., Wood, A.W., 2011, Cables1 is required for embryonic neural development: molecular, cellular, and behavioral evidence from the zebrafish, *Molecular Reproduction and Development*, 78 22–32.

Gunderman, R.B., Seymour, Z.A., Harvey, W., 2010, Cushing, *American Journal of Roentgenology*, 194:296–298.

https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic v97, released 29 November 2022, [Ziyaret tarihi: 17 Kasım 2022].

https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bNBbXuJiNNK6&input_page_show_search=on, [Ziyaret tarihi: 01 Kasım 2022].

Hanahan, D., Weinberg, R.A., Hallmarks of cancer: the next generation, 2011, *Cell*, 144:646–74.

Hauser, B.M., Lau, A., Gupta, S., Bi, W.L., Dunn, I.F., 2019, The Epigenomics of Pituitary Adenoma, *Frontiers in Endocrinology*, 14;10:290.

Hayashi, K., Inoshita, N., Kawaguchi, K., Ibrahim Ardisasmita, A., Suzuk, H., Fukuhara, N., Okada, M., Nishioka, H., Takeuchi, Y., Komada, M., Takeshita, A., Yamada, S., 2016, The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease, *European Journal of Endocrinology*, 174:213-226.

Henne, W.M., Buchkovich, N.J., Emr, S.D., 2011, The ESCRT Pathway, *Developmental Cell*, 21 (1), 77–91.

Hernández-Ramírez, L., Gam, R., Valdés, N., Lodish, M.B., Pankratz, N., Balsalobre, A., Gauthier, Y., Faucz, F.R., Trivellin, G., Chittiboina, P., Lane, J., Kay, D.M., Dimopoulos, A., Gaillard, S., Neou, M., Bertherat, J., Assié, G., Villa, C., Mills, J.L., Drouin, J., Stratakis, C.A., 2017, Loss-of-function mutations in the CABLES1 gene are a novel cause of Cushing's disease, *Endocrine-Related Cancer*, 24, 379–392.

Herpel, E., Rieker, R.J., Dienemann, H., Muley, T., Meister, M., Hartmann, A., Warth, A., Agaimy, A., 2017, SMARCA4 and SMARCA2 deficiency in non-small cell lung cancer: immunohistochemical survey of 316 consecutive specimens, *Annals of Diagnostic Pathology*, 26:47–51.

Hiller-Sturmhöfel, S., Bartke, A., 1998, The endocrine system: an overview, *Alcohol Health and Research World*, 22(3):153-64.

Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., et al., 1986, Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin, *Nature*, 324:73.

Hossain, M.G., Iwata, T., Mizusawa, N., Qian, Z.R., Shima, S.W., Okutsu, T., Yamada, S., Sano, T., Yoshimoto, K., 2009, Expression of p18(INK4C) is down-regulated in human pituitary adenomas, *Endocrine Pathology*, 20:114–21.

Huang, J.R., Tan, G.M., Li, Y., Shi, Z., 2017, The Emerging Role of Cables1 in Cancer and Other Diseases, *Molecular Pharmacology*, 92(3):240-5.

Jaffrain-Rea, M.L., Ferretti, E., Toniato, E., Cannita, K., Santoro, A., Di Stefano, D., Ricevuto, E., Maroder, M., Tamburrano, G., Cantore, G., Gulino, A., Martinotti, S., 1999, p16 (INK4a, MTS-1) gene polymorphism and methylation status in human pituitary tumours, *Clinical Endocrinology (Oxf)*, 51: 317-325.

Jeong, P., Ha, Y.S., Yun, S.J., Yoon, H.Y., Freeman, M.R., Kim, J., Kim, W.J., 2015, Assess the expression of ubiquitin specific protease USP2a for bladder cancer diagnosis, *BMC Urology*, 15, 1–6.

Jones, S.A., Jenkins, B.J., 2018, Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer, *Nature Reviews Immunology*, 18:773.

Jordan, S., Lidhar, K., Korbonits, M., Lowe, D.G., Grossman, A.B., 2000, Cyclin D and cyclin E expression in normal and adenomatous pituitary, *European Journal of Endocrinology*, 143(1): R1-6.

Kadoch, C., Crabtree, G.R., 2015, Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer: mechanistic insights gained from human genomics, *Science Advances*, 1:e1500447.

Kamanu, F.K., Medvedeva, Y.A., Schaefer, U., Jankovic, B.R., Archer, J.A., Bajic, V.B., 2012, Mutations and binding sites of human transcription factors, *Frontiers in Genetics*, 1;3:100.

Kapuralin, K., Curlin, M., Mitrecic, D., Kosi, N., Schwarzer, C., Glavan, G., Gajovic, S., 2015, STAM2, a member of the endosome-associated complex ESCRT-0 is highly expressed in neurons, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 67:104–115.

Karami-Tehrani, F., Malek, A.R., Shahsavari, Z., Atri, M., 2016, Evaluation of RIP1K and RIP3K expressions in the malignant and benign breast tumors, *Tumour Biology*, 37(7):8849–56.

Karki, K., Li, X., Jin, U.H., Mohankumar, K., Zarei, M., Michelhaugh, S.K., Mittal, S., Tjalkens, R., Safe, S., 2020, Nuclear receptor 4A2 (NR4A2) is a druggable target for glioblastomas, *Journal of Neurooncology*, 146, 25–39.

Katzmann, D.J., Babst, M., Emr, S.D., 2001, Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I, *Cell*, 106:145–155.

Kaymaz, B.T., Gunel, N.S., Ceyhan, M., Çetintas, V.B., Özel, B., Yandım, M.K., Kıpçak, S., Aktan, Ç., Gökbulut, A.A., Baran, Y., Can, B.K., 2015, Revealing genome-wide mRNA and microRNA expression patterns in leukemic cells highlighted "hsa-miR-2278" as a tumor suppressor for regain of chemotherapeutic imatinib response due to targeting STAT5A, *Tumor Biology*, 36: 7915–7927.

Ke, N., Claassen, G., Yu, D.H., Albers, A., Fan, W., Tan, P., Grifman, M., Hu, X., Defife, K., Nguy, V., Meyhack, B., Brachat, A., Wong-Staal, F., Li, Q.X., 2004, Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis, *Cancer Research*, 64, 8208–8212.

Kitamura, H., Hashimoto, M., 2021, USP2-Related Cellular Signaling and Consequent Pathophysiological Outcomes, *International Journal of Molecular Sciences*, 26;22(3):1209.

Knosp, E., Steiner, E., Kitz, K., Matula, C., 1993, Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings, *Neurosurgery*, 33(4):610-7.

Kovalovsky, D., Refojo, D., Liberman, A.C., Holsboer, F., Pereda, M.P., Coso, O.A., Stalla, G.K., Holsboer, F., Arzt, E., 2002, Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways, *Molecular Endocrinology*, 16: 1638-1651.

Lacey, A., Rodrigues-Hoffman, A., Safe, S., 2017, PAX3-FOXO1A Expression in Rhabdomyosarcoma Is Driven by the Targetable Nuclear Receptor NR4A1, *Cancer Research*, 77, 732– 741.

Lake, M.G., Krook, L.S., Cruz, S.V., 2013, Pituitary adenomas: an overview, *American Family Physician*, 1;88(5):319-27.

Lamacz, M., Tonon, M.C., Louiset, E., Cazin, L., Vaudry, H., 1991, The intermediate lobe of thepituitary, model of neuroendocrine communication, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 99: 205–219.

Lawrence, M., Daujat, S., Schneider, R., 2016, Lateral thinking: How histone modifications regulate gene expression, *Trend in Genetics*, 32, 42–56.

Lecoq, A.L., Kamenický, P., Guiochon-Mantel, A., Chanson, P., 2015, Genetic mutations in sporadic pituitary adenomas–what to screen for?, *Nature Reviews Endocrinology*, 11:43–54.

Lee, S.O., Jin, U.H., Kang, J.H., Kim, S.B., Guthrie, A.S., Sreevalsan, S., Lee, J.S., Safe, S., 2014, The orphan nuclear receptor NR4A1 (Nur77) regulates oxidative and endoplasmic reticulum stress in pancreatic cancer cells, *Molecular cancer research: MCR*, 12, 527–538.

Lee, S.O., Abdelrahim, M., Yoon, K., Chintharlapalli, S., Papineni, S., Kim, K., Wang, H., Safe, S., 2010, Inactivation of the orphan nuclear receptor TR3/Nur77 inhibits pancreatic cancer cell and tumor growth, *Cancer Research*, 70, 6824–6836.

Lee, J.E., Hollenberg, S.M., Snider, L., Turner, D.L., Lipnick, N., Weintraub, H., 1995, Conversion of Xenopus ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helixloop-helix protein, *Science*, 268:836–844.

Lemmon, M.A., Schlessinger, J., 2010, Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases, *Cell*, 141, 1117–1134.

Lane, A., Segura-Cabrera, A., Komurov, K., 2014, A comparative survey of functional footprints of EGFR pathway mutations in human cancers, *Oncogene*, 33, 5078–5089.

Li, J., McQuade, T., Siemer, A.B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y-S., Damko, E., Moquin, D., Walz, T., McDermott, A., Chan, F.K., Wu, H., 2012, The RIP1/RIP3 Necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis, *Cell*, 150(2):339–50.

Li, J., Poi, M.J., Tsai, M.D., 2011, Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer, *Biochemistry*, 28;50(25):5566-82.

Li, J., Byeon, I.J., Poi, M.J., Ericson, K., Selby, T., O'Maille, P., Qin, D., Tsai, M.D., 2000, *Structure function relationship of the INK4 family of tumor suppressors*, DNA Alterations in Cancer: Genetic and Epigenetic Changes, In: Ehrlich, M. (ed.), Eaton Publishing, Massachusetts, 71-83.

Lidhar, K., Korbonits, M., Jordan, S., Khalimova, Z., Kaltsas, G., Lu, X., Clayton, R.N., Jenkins, P.J., Monson, J.P., Besser, G.M., Lowe, D.G., Grossman, A.B., 1999, Low expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84:3823–30.

Lim, C.T., Korbonits, M., 2018, Update on the clinicopathology of pituitary adenomas, *Endocrine Practice*, 24(5):473-88.

Linkermann, A., Green, D.R., 2014, Necroptosis, *The New England Journal of Medicine*, 370(5):455–65.

Liu, X., Dai, C., Feng, M., Li, M., Chen, G., Wang, R., 2021, Diagnosis and treatment of refractory pituitary adenomas: a narrative review, *Gland Surgery*, 10(4):1499-1507.

Liu, X., Wang, R., Li, M., Chen, G., 2021, Pituitary adenoma or pituitary neuroendocrine tumor: a narrative review of controversy and perspective, *Translational Cancer Research*, 10(4):1916-1920.

Liu, X.Y., Lai, F., Yan, X.G., Jiang, C.C., Guo, S.T., Wang, C.Y., Croft, A., Tseng, H.Y., Wilmott, J.S., Scolyer, R.A., Jin, L., Zhang, X.D., 2015, RIP1 kinase is an oncogenic driver in melanoma, *Cancer Research*, 75(8):1736.

Liu, M., Pereira, F.A., Price, S.D., Chu, M.J., Shope, C., Himes, D., Eatock, R.A., Brownell, W.E., Lysakowski, A., Tsai, M.J., 2000, Essential role of BETA2/NeuroD1 in development of the vestibular and auditory systems, *Genes & Development*, 14:2839–2854.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25(4):402-8.

Locantore, P., Paragliola, R.M., Cera, G., Novizio, R., Maggio, E., Ramunno, V., Corsello, A., Corsello, S.M., 2022, Genetic Basis of ACTH-Secreting Adenomas, *International Journal of Molecular Sciences*, 19;23(12):6824.

Lodish, M., 2015, Cushing's syndrome in childhood: update on genetics, treatment, and outcomes, *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 22(1): 48–54.

Lonser, R.R., Nieman, L., Oldfield, E.H., 2017, Cushing's disease: pathobiology, diagnosis, and management, *Journal of Neurosurgery*, 126:404–417.

Ma, Z-Y., Song, Z-J., Chen, J-H., Wang, Y.F., Li, S.Q., Zhou, L.F., Mao, Y., Li, Y.M., Hu, R.G., Zhang, Z.Y., Ye, H.Y., Shen, M., Shou, X.F., Li, Z.Q., Peng, H., Wang, Q.Z., Zhou, D.Z., Qin, X.L., Ji, J., Zheng, J., Chen, H., Wang, Y., Geng, D.Y., Tang, W.J., Fu, C.W., Shi, Z.F., Zhang, Y.C., Ye, Z., He, W.Q., Zhang, Q.L., Tang, Q.S., Xie, R., Shen, J.W., Wen, Z.J., Zhou, J., Wang, T., Huang, S., Qiu, H.J., Qiao, N.D., Zhang, Y., Pan, L., Bao, W.M., Liu, Y.C., Huang, C.X., Shi, Y.Y., Zhao, Y., 2015, Recurrent gain-of- function USP8 mutations in Cushing's disease, *Cell Research*, 25:306-317.

Marquez-Vilendrer, S.B., Rai, S.K., Gramling, S.J.B., Lu, L., Reisman, D.N., 2016, BRG1 and BRM loss selectively impacts RB and P53, respectively: BRG1 and BRM have differential functions in vivo, *Oncoscience*, Vol. 3(11-12).

Matsuoka, M., Matsuura, Y., Semba, K., Nishimoto, I., 2000, Molecular cloning of a cyclin-like protein associated with cyclin-dependent kinase 3 (cdk 3) in vivo, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273 442–447.

Mehta, G.U., Lonser, R.R., 2017, Management of hormone-secreting pituitary adenomas, *Neuro-Oncology*, 1;19(6):762-773.

Melmed, S., 2011, Pathogenesis of pituitary tumors, *Nature Reviews Endocrinology*, 7:257–66.

Melmed, S., 2002, *The Pituitary*, Academic Press, A division of Harcourt Brace & Company, San Diego, USA, ISBN: 978-0123809278.

Metzig, M., Nickles, D., Falschlehner, C., Lehmann-Koch, J., Straub, B.K., Roth, W., Boutros, M., 2011, An RNAi screen identifies USP2 as a factor required for TNF-α induced NF-κB signaling, *International Journal of Cancer*, 129, 607–618.

Miao, H., Liu, Y., Lu, L., Gong, F., Wang, L., Duan, L., Yao, Y., Wang, R., Chen, S., Mao, X., Zhang, D., Heaney, A.P., Zhu, H., 2021, Efect of 3 NR3C1 mutations in the pathogenesis of pituitary ACTH adenoma, *Endocrinology*, 162(11):bqab167.

Mitrofanova, L.B., Vorobeva, O.M., Gorshkov, A.N., 2019, Analysis of pituitary adenoma expression patterns suggests a potential role for the NeuroD1 transcription factor in neuroendocrine tumor-targeting therapies, *Oncotarget*, 8;10(3):289-312.

Mizuno, S., Tra, D.T., Mizobuchi, A., Iseki, H., Mizuno-Iijima, S., Kim, J.D., Ishida, J., Matsuda, Y., Kunita, S., Fukamizu, A., Sugiyama, F., Yagami, K., 2014, Truncated Cables1 causes agenesis of the corpus callosum in mice, *Laboratory Investigation*, 94 321–330.

Mizuno, E., Kitamura, N., Komada, M., 2007, 14-3-3-dependent inhibition of the deubiquitinating activity of UBPY and its cancellation in the M phase, *Experimental Cell Research*, 1;313(16):3624-34.

Murakami, M., Kamimura, D., Hirano, T., 2019, Pleiotropy and specificity: insights from the interleukin 6 family of cytokines, *Immunity*, 50:812.

Murphy, E.P., Dobson, A.D., Keller, C., Conneely, O.M., 1996, Differential regulation of transcription by the NURR1/NUR77 subfamily of nuclear transcription factors, *Gene Expression*, 5, 169–179.

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D.Y., Nakayama, K., 1996, Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors, *Cell*, 85:707–20.

Navarro, A., Beà, S., Jares, P., Campo, E., 2020, Molecular Pathogenesis of Mantle Cell Lymphoma, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 34, 795–807.

Needham, S.R., Roberts, S.K., Arkhipov, A., Mysore, V.P., Tynan, C.J., Zanetti-Domingues, L.C., Kim, E.T., Losasso, V., Korovesis, D., Hirsch, M., Rolfe, D.J., Clarke, D.T., Winn, M.D., Lajevardipour, A., Clayton, A.H., Pike, L.J., Perani, M., Parker, P.J., Shan, Y., Shaw, D.E., Martin-Fernandez, M.L., 2016, EGFR oligomerization organizes kinase-active dimers into competent signalling platforms, *Nature Communications*, 7, 13307.

Neou, M., Villa, C., Armignacco, R., Jouinot, A., Rafn-Sanson, M.L., Septier, A., Letourneur, F., Diry, S., Diedisheim, M., Izac, B., Gaspar, C., Perlemoine, K., Verjus, V., Bernier, M., Boulin, A., Emile, J.F., Bertagna, X., Jafrezic, F., Laloe, D., Baussart, B., Bertherat, J., Gaillard, S., Assié, G., 2020, Pangenomic classifcation of pituitary neuroendocrine tumors, *Cancer Cell*, 37(1):123-134.e5.

Nepal, S., Shrestha, A., Park, P.H., 2015, Ubiquitin specific protease 2 acts as a key modulator for the regulation of cell cycle by adiponectin and leptin in cancer cells, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 5;412:44-55.

Newell-Price, J., 2009, Diagnosis/differential diagnosis of Cushing's syndrome: a review of best practice, *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism*, 23(suppl 1): S5–S14.

Nguyen, L.K., Kolch, W., Kholodenko, B.N., 2013, When ubiquitination meets phosphorylation: A systems biology perspective of EGFR/MAPK signalling, *Cell Communication and Signaling*, CCS, 11, 52.

Nicholson, B., Marblestone, J.G., Butt, T.R., Mattern, M.R., 2007, Deubiquitinating enzymes as novel anticancer targets, *Future Oncology*, 3(2):191-9.

Nieman, L.K., 2018, Recent Updates on the Diagnosis and Management of Cushing's Syndrome, *Endocrinology and Metabolism (Seoul)*, 33(2): 139–146.

Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K., Bernards, R., 2005, A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes, *Cell*, 2;123(5):773-86.

Nishioka, H., Yamada, S., 2019, Cushing's Disease, *Journal of Clinical Medicine*, 12;8(11):1951.

Niyazoglu, M., Sayitoglu, M., Firtina, S., Hatipoglu, E., Gazioglu, N., Kadioglu, P., 2014, Familial acromegaly due to aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) gene mutation in a Turkish cohort, *Pituitary*, 17(3):220-6.

Ogino, A., Yoshino, A., Katayama, Y., Watanabe, T., Ota, T., Komine, C., Yokoyama, T., Fukushima, T., 2005, The p15(INK4b)/p16(INK4a)/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 64: 398-403.

Ortiz, A.B., Garcia, D., Vicente, Y., Palka, M., Bellas, C., Martin, P., 2017, Prognostic signifcance of cyclin D1 protein expression and gene amplifcation in invasive breast carcinoma, *PLoS ONE*, 12(11): e0188068.

Osamura, R.Y., Kajiya, H., Takei, M., Egashira, N., Tobita, M., Takekoshi, S., Teramoto, A., 2008, Pathology of the human pituitary adenomas, *Histochemistry and Cell Biology*, 130(3):495-507.

Park, J., Cho, J., Song, E.J., 2020, Ubiquitin–proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment, *Archives of Pharmacal Research*, 43(11):1144-1161.

Park, S., Hatanpaa, K.J., Xie, Y., Mickey, B.E., Madden, C.J., Raisanen, J.M., Ramnarain, D.B., Xiao, G., Saha, D., Boothman, D.A., Zhao, D., Bachoo, R.M., Pieper, R.O., Habib, AA., 2009, The receptor interacting protein 1 inhibits p53 induction through NF-κB activation and confers a worse prognosis in glioblastoma, *Cancer Research*, 69(7):2809–16.

Pataskar, A., Jung, J., Smialowski, P., Noack, F., Calegari, F., Straub, T., Tiwari, V.K., 2016, NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program, *EMBO Journal*, 35:24–45.

Pease, M., Ling, C., Mack, W.J., Wang, K., Zada, G., 2013, The role of epigenetic modification in tumorigenesis and progression of pituitary adenomas: a systematic review of the literature, *PLoS One*, 18;8(12):e82619.

Perez-Castro, C., Renner, U., Haedo, M.R., Stalla, G.K., Arzt, E., 2012, Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology, *Physiological Reviews*, 92(1):1-38.

Perez-Rivas, L.G., Theodoropoulou, M., Ferraù, F., Nusser, C., Kawaguchi, K., Stratakis, C.A., Faucz, F.R., Wildemberg, L.E., Assié, G., Beschorner, R., Dimopoulou, C., Buchfelder, M., Popovic, V., Berr, C.M., Tóth, M., Ardisasmita, A.I., Honegger, J., Bertherat, J., Gadelha, M.R., Beuschlein, F., Stalla, G., Komada, M., Korbonits, M., Reincke, M., 2015, The Gene of the Ubiquitin-Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100: E997–E1004.

Pines, G., Köstler, W.J., Yarden, Y., 2010, Oncogenic mutant forms of EGFR: Lessons in signal transduction and targets for cancer therapy, *FEBS Letters*, 584, 2699–2706.

Poulin, G., Turgeon, B., Drouin, J., 1997, NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene, *Molecular Cell Biology*, 17:6673–6682.

Priolo, C., Tang, D., Brahamandan, M., Benassi, B., Sicinska, E., Ogino, S., Farsetti, A., Porrello, A., Finn, S., Zimmermann, J., Febbo, P., Loda, M., 2006, The isopeptidase USP2a protects human prostate cancer from apoptosis, *Cancer Research*, 66, 8625–8632.

Qian, Z.R., Sano, T., Yoshimoto, K., Yamada, S., Ishizuka, A., Mizusawa, N., Horiguchi, H., Hirokawa, M., Asa, S.L., 2005, Inactivation of RASSF1A tumor suppressor gene by aberrant promoter hypermethylation in human pituitary adenomas, *Laboratory Investigation*, 85:464–73.

Qie, S., Diehl, J.A., 2020, Cyclin D degradation by E3 ligases in cancer progression and treatment, *Seminars in Cancer Biology*, 67(Pt 2):159-170.

Qu, Q., Mao, Y., Xiao, G., Fei, X., Wang, J., Zhang, Y., Liu, J., Cheng, G., Chen, X., Wang, J., Shen, K.., 2015, USP2 promotes cell migration and invasion in triple negative breast cancer cell lines, *Tumor Biology*, 36, 5415–5423.

R Core Team, 2021, *R: A Language and environment for statistical computing*, (Version 4.0), https://cran.r-project.org, [Ziyaret tarihi: 10 Haziran 2022].

Raff, H., Carroll, T., 2015, Cushing's syndrome: from physiological principles to diagnosis and clinical care, *The Journal of Physiology*, 1;593(3):493-506.

Rawindraraj, A.D., Basit, H., Jialal, I., 2022, *Physiology, Anterior Pituitary*, In: StatPearls [Internet], Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.

Rayess, H., Wang, M.B., Srivatsan, E.S., 2012, Cellular senescence and tumor suppressor gene p16, *International Journal of Cancer*, 15;130(8):1715-25.

Reincke, M., Sbiera, S., Hayakawa, A., Theodoropoulou, M., Osswald, A., Beuschlein, F., Meitinger, T., Mizuno-Yamasaki, E., Kawaguchi, K., Saeki, Y., Tanaka, K., Wieland, T., Graf, E., Saeger, W., Ronchi, C.L., Allolio, B., Buchfelder, M., Strom, T.M., Fassnacht, M., Komada, M., 2015, Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease, *Nature Genetics*, 47:31–8.

Revelle, W., 2019, *psych: Procedures for Psychological, Psychometric, and Personality Research*, https://cran.r-project.org/package=psych, [Ziyaret tarihi. 10 Haziran 2022].

Rosso, L., Mienville, J.M., 2009, Pituicyte modulation of neurohormone output, *Glia*, 57: 235–243.

Roussel-Gervais, A., Couture, C., Langlais, D., Takayasu, S., Balsalobre, A., Rueda, R., Zukerberg, L.R., Figarella-Branger, D., Brue, T., Drouin, J., 2016, The Cables1 Gene in Glucocorticoid Regulation of Pituitary Corticotrope Growth and Cushing Disease, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101:513–522.

Roussel-Gervais, A., Bilodeau, S., Vallette, S., Berthelet, F., Lacroix, A., Figarella-Branger, D., Brue, T., Drouin, J., 2010, Cooperation between cyclin E and p27(Kip1) in pituitary tumorigenesis, *Molecular Endocrinology*, 24: 1835-1845.

Ruebel, K.H., Jin, L., Zhang, S., Scheithauer, B.W., Lloyd, R.V., 2001, Inactivation of the p16 gene in human pituitary nonfunctioning tumors by hypermethylation is more common in null cell adenomas, *Endocrine Pathology*, 12: 281-289.

Russo, A.A., Tong, L., Lee, J.O., Jeffrey, P.D., Pavletich, N.P., 1998, Structural basis for inhibition of the cyclindependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a, *Nature*, 395:237–243.

Sacco, J.J., Coulson, J.M., Clague, M.J., Urbé, S., 2010, Emerging roles of deubiquitinases in cancer-associated pathways, *IUBMB Life*, 62, 140–157.

Sadoul, B., Alfonso, S., Bessa, E., Bouchareb, A., Blondeau-Bidet, E., Clair, P., Chatain, B., Bégout, M.L., Geffroy, B., 2018, Enhanced brain expression of genes related to cell proliferation and neural differentiation is associated with cortisol receptor expression in fishes, *General and Comparative Endocrinology*, 1;267:76-81.

Seemann, N., Kuhn, D., Wrocklage, C., Keyvani, K., Hackl, W., Buchfelder, M., Fahlbusch, R., Paulus, W., 2001, CDKN2A/p16 inactivation is related to pituitary adenoma type and size, *The Journal of Pathology*, 193: 491-497.

Serra, S., Chetty, R., 2018, p16, *Journal of Clinical Pathology*, 71(10):853-858.

Shan, J., Zhao, W., Gu, W., 2009, Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation, *Molecular Cell*, 36(3):469–76.

Sharma, S.T., Nieman, L.K., Feelders, R.A., 2015, Cushing's syndrome: epidemiology and developments in disease management, *Clinical Epidemiology*, 7:281-93.

Shen, X., Liu, Q., Xu, J., Wang, Y., 2021, Correlation between the Expression of Interleukin-6, STAT3, E-Cadherin and N-Cadherin Protein and Invasiveness in Nonfunctional Pituitary Adenomas, *Journal of Neurological Surgery Part B: Skull Base*, 82(Suppl 3):e59-e69.

Sherr CJ., 1994, G1 phase progression: cycling on cue, *Cell*, 79(4):551–5.

Shi, Z., Li, Z., Li, Z.J., Cheng, K., Du, Y., Fu, H., Khuri, F.R., 2015a, Cables1 controls p21/Cip1 protein stability by antagonizing proteasome subunit alpha type 3, *Oncogene*, 34 2538–2545.

Shi, Z., Park, H.R., Du, Y., Li, Z., Cheng, K., Sun, S.Y., Li, Z., Fu, H., Khuri, F.R., 2015b, Cables1 complex couples survival signaling to the cell death machinery, *Cancer Research*, 75 147–158.

Simpson, D.J., McNicol, A.M., Murray, D.C., Bahar, A., Turner, H.E., Wass, J.A., Esiri, M.M., Clayton, R.N., Farrell, W.E., 2004, Molecular pathology shows p16 methylation in nonadenomatous pituitaries from patients with Cushing's disease, *Clinical Cancer Research*, 1;10(5):1780-8.

Simpson, D.J., Clayton, R.N., Farrell, W.E., 2002, Preferential loss of Death Associated Protein kinase expression in invasive pituitary tumours is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion, *Oncogene*, 21:1217–24.

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*, 60:1211–6.

Smith, S.M., Vale, W.W., 2006, The role of the hypothalamic- pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress, *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8:383–395.

So, K., Tamura, G., Honda, T., Homma, N., Waki, T., Togawa, N., Nishizuka, S., Motoyama, T., 2006, Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in nonneoplastic gastric epithelia, *Cancer Science*, 97: 1155-1158.

Srirangam Nadhamuni, V., Korbonits, M., 2020, Novel Insights into Pituitary Tumorigenesis: Genetic and Epigenetic Mechanisms, *Endocrine Reviews*, 1;41(6):821–46.

Stevenson, L.F., Sparks, A., Allende-Vega, N., Xirodimas, D.P., Lane, D.P., Saville, M.K., 2007, The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2, *EMBO Journal*, 26(4):976–86.

Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000, The language of covalent histone modifications, *Nature*, 403:41–5.

Sun, L., Zhou, R., Dong, J., Liu, S., Jiao, Y., Wang, L., Hu, S., He, P., Liu, X., Zhao, X., Jiang, G., Zhao, Y., 2019, Lnc-NA inhibits proliferation and metastasis in endometrioid endometrial carcinoma through regulation of NR4A1, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23, 4699–4710.

Szklarczyk, D., Gable, A.L., Nastou, K.C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N.T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C., 2021, The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets, *Nucleic Acids Research*, 8;49(D1):D605-D612. 00.

Takiguchi, T., Koide, H., Nagano, H., Nakayama, A., Fujimoto, M., Tamura, A., Komai, E., Shiga, A., Kono, T., Higuchi, S., Sakuma, I., Hashimoto, N., Suzuki, S., Miyabayashi, Y., Ishiwatari, N., Horiguchi, K., Nakatani, Y., Yokote, K., Tanaka, T., 2017, Multihormonal pituitary adenoma concomitant with Pit-1 and Tpit lineage cells causing acromegaly associated with subclinical Cushing’s disease: a case report, *BMC Endocrine Disorders*, 17:54.

Tani, Y., Sugiyama, T., Izumiyama, H., Yoshimoto, T., Yamada, S., Hirata, Y., 2011, Differential gene expression profiles of POMCrelated enzymes, transcription factors and receptors between non-pituitary and pituitary ACTH-secreting tumors, *Endocrine Journal*, 58:297–303.

Tani, Y., Inoshita, N., Sugiyama, T., Kato, M., Yamada, S., Shichiri, M., Hirata, Y., 2010, Upregulation of CDKN2A and suppression of cyclin D1 gene expressions in ACTH-secreting pituitary adenomas, *European Journal of Endocrinology*, 163(4), 523-529.

Tanno, H., Komada, M., 2013, The ubiquitin code and its decoding machinery in the endocytic pathway, *Journal of Biochemistry*, 153(6):497-504.

Tao, B.B., He, H., Shi, X.H., Wang, C.L., Li, W.Q., Li, B., Dong, Y., Hu, G.H., Hou, L.J., Luo, C., Chen, J.X., Chen, H.R., Yu, Y.H., Sun, Q.F., Lu, Y.C., 2013, Up-regulation of USP2a and FASN in gliomas correlates strongly with glioma grade, *Journal of Clinical Neuroscience*, 20, 717–720.

Tatsi, C., Stratakis, C.A., 2019, The Genetics of Pituitary Adenomas, *Journal of Clinical Medicine*, 21;9(1):30.

The jamovi Project, 2021, *jamovi*, (Version 2.2), https://www.jamovi.org, [Ziyaret tarihi: 10 Haziran 2022].

Theodoropoulou, M., Reincke, M., Fassnacht, M., Komada, M., 2015, Decoding the genetic basis of Cushing's disease: USP8 in the spotlight, *European Journal of Endocrinology*, 173, M73–M83.

Tian, H., Chen, F., Wang, Y., Liu, Y., Ma, G., Zhao, Y., Ma, Y., Tian, T., Ma, R., Yu, Y., Wang, D., 2022, Nur77 prevents osteoporosis by inhibiting the nf-kappab signalling pathway and osteoclast differentiation, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(8):2163–76.

Trouillas, J., Jaffrain-Rea, M.L., Vasiljevic, A., Raverot, G., Roncaroli, F., Villa, C., 2020, How to Classify the Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNET)s in 2020, *Cancers (Basel)*, 22;12(2):514.

Tsuji, K., Mizumoto, K., Yamochi, T., Nishimoto, I., Matsuoka, M., 2002, Differential effect of ik3-1/cables on p53- and p73-induced cell death, *Journal of Biological Chemistry*, 277 2951–2957.

Xiong, Q., Ge, W., 2016, Gene mutations in Cushing's disease, *Biomedical Reports*, 5: 277-282.

van der Pas, R., de Herder, W.W., Hofland, L.J., Feelders, R.A., 2012, New developments in the medical treatment of Cushing's syndrome, *Endocrine-Related Cancer*, 9;19(6):R205-23.

Vandeva, S., Jaffrain-Rea, M.L., Daly, A.F., Tichomirowa, M., Zacharieva, S., Beckers, A., 2010, The genetics of pituitary adenomas, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 24(3):461-76.

Varlamov, E.V., McCartney, S., Fleseriu, M., 2019, Functioning Pituitary Adenomas - Current Treatment Options and Emerging Medical Therapies, *European Journal of Endocrinology*, 15(1):30-40.

Vietri, M., Radulovic, M., Stenmark, H., 2020, The many Functions of ESCRTs, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21 (1), 25–42.

Wang, Q., Chen, W., Xu, X., Li, B., He, W., Padilla, MT., Jang, J.H., Nyunoya, T., Amin, S., Wang, X., Lin, Y., 2013, RIP1 potentiates BPDEinduced transformation in human bronchial epithelial cells through catalase-mediated suppression of excessive reactive oxygen species, *Carcinogenesis*, 34(9):2119.

Wang, N., Guo, L., Rueda, B.R., Tilly, J.L., 2010b, Cables1 protects p63 from proteasomal degradation to ensure deletion of cells after genotoxic stress, *EMBO Reports*, 11 633–639.

Wing, S.S, 2013, Deubiquitinases in skeletal muscle atrophy, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45, 2130–2135.

Wu, C.L., Kirley, S.D., Xiao, H., Chuang, Y., Chung, D.C., Zukerberg, L.R., 2001, Cables enhances cdk2 tyrosine 15 phosphorylation by Wee1, inhibits cell growth, and is lost in many human colon and squamous cancers, *Cancer Research*, 61 7325–7332.

Wu, D., Cheng, J., Sun, G., Wu, S., Li, M., Gao, Z., Zhai, S., Li, P., Su, D., Wang, X., 2016, p70S6K promotes IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma, *Oncotarget*, 7(24):36539–36550.

Wu, Q., Lian, J.B., Stein, J.L., Stein, G.S., Nickerson, J.A., Imbalzano, A.N., 2017, The BRG1 ATPase of human SWI/SNF chromatin remodeling enzymes as a driver of cancer, *Epigenomics*, 9(6):919-931.

Yamochi, T., Semba, K., Tsuji, K., Mizumoto, K., Sato, H., Matsuura, Y., Nishimoto, I., Matsuoka, M., 2001, ik3-1/Cables is a substrate for cyclin-dependent kinase 3 (cdk 3), *European Journal of Biochemistry*, 268, 6076–6082.

Yang, Y., Zhang, Q., Liang, J., Yang, M., Wang, Z., Tang, D., Wang, D., 2021, STAM2 knockdown inhibits proliferation, migration, and invasion by affecting the JAK2/STAT3 signaling pathway in gastric cancer, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, 21;53(6):697-706.

Yoshida, A., Kobayashi, E., Kubo, T., Kodaira, M., Motoi, T., Motoi, N., Yonemori, K., Ohe, Y., Watanabe, S.I., Kawai, A., Kohno, T., Kishimoto, H., Ichikawa, H., Hiraoka, N., 2017, Clinicopathological and molecular characterization of SMARCA4-deficient thoracic sarcomas with comparison to potentially related entities, *Modern Pathology*, 30(6):797–809.

Yoshida, T., Tanaka, S., Mogi, A., Shitara, Y., Kuwano, H., 2004, The clinical significance of Cyclin B1 and Wee1 expression in non-small-cell lung cancer, *Annals of Oncology*, 15(2):252-6.

Yoshimoto, K., Tanaka, C., Yamada, S., Kimura, T., Iwahana, H., Sano, T., Itakura, M., 1997, Infrequent mutations of p16INK4A and p15INK4B genes in human pituitary adenomas, *European Journal of Endocrinology*, 136: 74-80.

Yoshino, A., Katayama, Y., Ogino, A., Watanabe, T., Yachi, K., Ohta, T., Komine, C., Yokoyama, T., Fukushima, T., 2007, Promoter hypermethylation profile of cell cycle regulator genes in pituitary adenomas, *Journal of Neuro-Oncology*, 83:153–62.

Yuanyang, L., Jiabin, Z., Kai, W., et al., 2014, Expression of IL-6 and its relationship to microvessel density and invasiveness of pituitary adenomas, *Chinese Journal of Minimally Invasive Neurosurgery*, 19(09):424–426.

Zhang, X., Sun, H., Danila, D.C., Johnson, S.R., Zhou, Y., Swearingen, B., Klibanski, A., 2002, Loss of expression of GADD45 gamma, a growth inhibitory gene, in human pituitary adenomas: implications for tumorigenesis, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87:1262–7.

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, *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 90:2179–86.

Zhu, X., Lee, K., Asa, S.L., Ezzat, S., 2007, Epigenetic silencing through DNA and histone methylation of fibroblast growth factor receptor 2 in neoplastic pituitary cells, *The American Journal of Pathology*, 170:1618–28.

Zukerberg, L.R., Patrick, G.N., Nikolic, M., Humbert, S., Wu, C.L., Lanier, L.M., Gertler, F.B., Vidal, M., Van Etten, R.A., Tsai, L.H., 2000, Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth, *Neuron*, 26 633–646.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



ACTH SALGILAYAN HİPOFİZ ADENOMLARINDA GENETİK VE EPİGENETİK MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%10	%8	%1	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

EŞLEŞEN KAYNAK

1 acikbilim.yok.gov.tr — %4
İnternet Kaynağı

%4
★ acikbilim.yok.gov.tr
İnternet Kaynağı

Alıntıları çıkart Kapat
Bibliyografyayı Çıkart üzerinde
Eşleşmeleri çıkar Kapat

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

☒ **Etik Kurul izni gerekmektedir.**

☐ **Etik Kurul izni gerekmemektedir.**

Nirva Sera KAYACAN
(İmza)

KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

☐ **Kurum izni gerekmektedir.**

☒ **Kurum izni gerekmemektedir.**

Nirva Sera KAYACAN
(İmza)