



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**miR-124'ün GROWTH HORMON-INSULIN LIKE
GROWTH FACTOR-1(GH-IGF-1) YOLAĞI ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Neslihan KILIÇ KARADUMAN

KAYSERİ – 2019



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**miR-124'ün GROWTH HORMON-INSULIN LIKE
GROWTH FACTOR-1(GH-IGF-1) YOLAĞI ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Neslihan KILIÇ KARADUMAN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

**Bu tez, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TTU-2018-8330 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

KAYSERİ – 2019

TEŞEKKÜR

Tıpta Uzmanlık eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim değerli hocalarım özellikle tez danışmanım Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL, Prof. Dr. Munis DÜNDAR ve Prof. Dr. Çetin SAATÇİ'ye,

Tez çalışmam ve laboratuvar çalışmalarımdaki destekleri için Doç. Dr. Serpil TAHERİ, Uzm. Bio. Kezban Korkmaz BAYRAM ve Moleküler Biyolog Zeynep YILMAZ'a,

Ayrıca tez sürecindeki yardımlarından dolayı Dr.Öğr.Üyesi Muhammet Ensar DOĞAN'a, Dr. Hilal AKALIN'a ve hemşiremiz canım ablam Selma ÜSTÜNEL'e,

Berber çalışma fırsatı bulduğum sevgili çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Meltem, Uzm. Dr. Nefise, Dr. Ulviyya, Dr. Saide Betül, Dr. Özlem ve Dr. Kübra'ya,

Beni bu kariyer yolunda yönlendiren kıymetli öğretmenlerime,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca desteğini benden esirgemeyen, iyi insan olmanın önemini aşıl原因an, bugünüme gelmemde en büyük emeğe sahip olan canım ANNEM ve BABAM'a ve çok sevdiğim KARDEŞİM'e,

Tüm bu süreçlerdeki desteği ve sabrı için sevgili eşim Uzm. Dr. Muhsin KARADUMAN'a, bu tempoda en çok ihmal ettiğim, neşe kaynağım, bitanecik balkızıma sonsuz teşekkür ederim.

Neslihan KILIÇ KARADUMAN

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| TEŞEKKÜR | i |
| İÇİNDEKİLER | ii |
| KISALTMALAR | v |
| TABLolar LİSTESİ | vii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | viii |
| ÖZET | x |
| ABSTRACT | xii |
| | |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| | |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. EPİGENETİK | 4 |
| 2.1.1. EPİGENETİK MEKANİZMALAR | 5 |
| 2.1.1.1. DNA Metilasyonu | 7 |
| 2.1.1.2. Histon Değişimleri | 7 |
| 2.1.1.3. miRNA'lar | 7 |
| 2.2. MiR-124-3p | 10 |
| 2.3. GH-IGF-1 YOLAĞI | 11 |
| 2.4. AŞIRI BÜYÜME DURUMLARI | 16 |
| 2.4.1. GİGANTİZM VE AKROMEGALİ | 19 |
| 2.4.1.1. Gigantizmin Etyopatogenezi | 21 |
| 2.4.1.2. Klinik Bulgular | 27 |
| 2.4.1.3. Tanı | 27 |
| 2.4.1.4. Tedavi | 28 |
| 2.4.2. Trizomi X (47, XXX kadın) | 28 |
| 2.4.3. Klinefelter Sendromu (47, XXY) | 29 |
| 2.4.4. 47, XYY Erkek | 29 |
| 2.4.5. Frajil X Sendromu | 29 |
| 2.4.6. Kromozom 22q13.3 Delesyon Sendromu | 30 |
| 2.4.7. Aşırı Beslenme (Obezite) | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.8. IGF-I Reseptörünün Trizomisi | 30 |
| 2.4.9. Bozulmuş FGFR3 - CATSHL Sendromu..... | 31 |
| 2.4.10. Lipodistrofi..... | 31 |
| 2.4.11. Prepubertal Seks Hormonu Fazlalığı | 32 |
| 2.4.12. Cinsiyet Hormonu Eksikliği veya Direnci | 32 |
| 2.4.13. Aromataz Eksikliği - Östrojen Direnci | 32 |
| 2.4.14. Ailesel Glukokortikoid Eksikliği..... | 32 |
| 2.4.15. Marfan Sendromu tip 1 ve tip 2 (MFS1, MFS2)..... | 33 |
| 2.4.16. Beals Sendromu (Doğumsal Kontraktürel Araknodaktili)..... | 33 |
| 2.4.17. Homosistinüri tip 1 | 33 |
| 2.4.18. Beckwith-Wiedemann Sendromu | 34 |
| 2.4.19. Simpson-Golabi-Behmel Sendromu, tip 1 ve 2 | 34 |
| 2.4.20. Sotos Sendromu..... | 34 |
| 2.4.21. Weaver Sendromu..... | 35 |
| 2.4.22. Nevo Sendromu | 35 |
| 2.5. GENLER | 35 |
| 2.5.1. <i>GHI</i> (Growth hormone 1)..... | 35 |
| 2.5.2. <i>IGF1</i> (Insulin Like Growth Factor 1)..... | 36 |
| 2.5.3. <i>GHRH</i> (Growth Hormone Releasing Hormone)..... | 37 |
| 2.5.4. <i>IGFBP5</i> (Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5)..... | 38 |
| 2.5.5. <i>GHR</i> (Growth Hormone Receptor) | 39 |
| 2.5.6. <i>IGF1R</i> (Insulin Like Growth Factor 1 Receptor)..... | 39 |
| 2.5.7. <i>IGFBP1</i> (Insulin Like Growth Factor Binding Protein 1)..... | 41 |
| 2.5.8. <i>GHRL</i> (Ghrelin And Obestatin Prepropeptide)..... | 42 |
| 3. YÖNTEM ve FARELER | 45 |
| 3.1. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI..... | 45 |
| 3.2. FARELER ve YAŞAM KOŞULLARI | 46 |
| 3.3. YÖNTEM | 47 |
| 3.3.1. Mikroenjeksiyon Yöntemi | 47 |
| 3.3.2. Kilo Takibi..... | 49 |
| 3.3.3. Hipotalamus ve Hipofiz Dokularından RNA İzolasyonu | 49 |

| | |
|--|------------|
| 3.3.4. Kan Dokusundan RNA İzolasyonu | 50 |
| 3.3.5. cDNA Eldesi..... | 51 |
| 3.3.6. Gen Ekspresyonu..... | 52 |
| 3.3.7. ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemi ile GH ve IGF-1 Düzeylerinin Ölçülmesi..... | 53 |
| 3.3.8. İstatiksel Analizler | 54 |
| 4. BULGULAR..... | 55 |
| 4.1. Farelerde Fenotipik Bulgular..... | 55 |
| 4.2. Kilo Takibi Bulguları | 55 |
| 4.3. mRNA Ekspresyon Analizi Bulguları | 67 |
| 4.3.1. <i>GH</i> | 67 |
| 4.3.2. <i>IGF1</i> | 70 |
| 4.3.3. <i>GHRH</i> | 72 |
| 4.3.4. <i>IGFBP5</i> | 75 |
| 4.3.5. <i>GHR</i> | 77 |
| 4.3.6. <i>IGF1R</i> | 80 |
| 4.3.7. <i>IGFBP1</i> | 82 |
| 4.3.8. <i>GHRL</i> | 85 |
| 4.4. ELISA ile GH ve IGF-1 Protein Konsantrasyon Bulguları..... | 87 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 94 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 105 |

KISALTMALAR

| | |
|---------------|---|
| ALS | : asit labil subunit |
| CBS | : sistasyonin beta sentaz |
| CCA | : konjenital kontraktürel araknodaktili |
| cDNA | : komplementer DNA |
| Cyp19 | : sitokrom p450,19,aromataz |
| dk. | : dakika |
| DNA | : deoksiribonükleik asit |
| ELISA | : Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay |
| FBN1 | : fibrilin 1 geni |
| FBN2 | : fibrilin 2 geni |
| FGFR-3 | : fibroblast growth faktör reseptör 3 |
| GCY | : ekstra Y spesifik kontrol geni |
| GH | : büyüme Hormonu (Growth hormon) |
| GHR | : büyüme hormon reseptörü |
| GHRH | : büyüme hormonu salgılatıcı hormon |
| GHRL | : ghrelin |
| GPC3 | : glipikan 3 |
| IGF-1 | : insülin benzeri büyüme faktörü 1 |
| IGFBP | : IGF bağlayıcı protein |
| JAK | : janus kinaz |
| LOH | : heterozigosite kaybı |
| MAPK | : mitogen-activated protein kinase |
| MEN1 | : multiple endokrin neoplazi tip 1 |
| ml | : mililitre |
| mRNA | : mesajcı ribonükleik asit |
| NF1 | : nörofibramatozis tip 1 |

| | |
|----------------------|--|
| NFW | : nuclease-free water |
| NSD1 | : nuclear receptor binding su(var), enhancer-of-zeste and trithorax domain protein 1 |
| PBS | : phosphate buffered saline |
| PCR | : polymerase chain reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) |
| PTTG | : pituiter tümör transforming geni |
| qPCR | : kantitatif PCR |
| Real-Time PCR | : gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu |
| RNA | : ribonükleik asit |
| SAM | : S-adenosil metiyonin |
| SHOX | : short stature homeobox containing gene |
| sn. | : saniye |
| SOCS | : suppressor of cytokine signaling |
| STAT | : signal transducer and activator of transcription |
| TGFBR2 | : transforming growth factor-beta receptor 2 |

TABLULAR LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1. miR-124-5p ve miR124-3p'nin dizisi. | 11 |
| Tablo 2. Aşırı büyümenin moleküler temeli ve etyopatogenezi..... | 18 |
| Tablo 3. Growth hormon fazlalığının etiyojisi | 21 |
| Tablo 4. Gigantizm ve akromegali ile ilişkili genetik sendromlar..... | 22 |
| Tablo 5. Dokulardan RNA izole edilen örnekler için karışım miktarları..... | 51 |
| Tablo 6. cDNA sentezi için PCR programı | 51 |
| Tablo 7. Gen ekspresyon çalışması için gerekli malzemeler ve miktarları..... | 52 |
| Tablo 8. Ekspresyonu araştırılan genlere ait bilgiler | 53 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | | |
|-----------|--|----|
| Şekil 1. | Üç ana epigenetik modifikasyon mekanizması..... | 6 |
| Şekil 2. | MikroRNA biyogenezi ve etki mekanizması..... | 10 |
| Şekil 3. | GH / IGF-1 aksı..... | 13 |
| Şekil 4. | İnsan kas ve yağ dokusunda bugüne kadar araştırılan GH sinyal proteinlerinin şematik ve basitleştirilmiş gösterimi | 16 |
| Şekil 5. | Büyüme fazlalığı olan hastalarda klinik yaklaşım | 17 |
| Şekil 6. | Gigantizm ve akromegali ile ilişkili genetik mutasyonlar | 23 |
| Şekil 7. | Embriyoların farklı günlerde alınmış fotoğrafları..... | 55 |
| Şekil 8. | Günlere göre kontrol ve miR-124* erkek ve dişiler arasındaki ağırlık kıyaslaması..... | 56 |
| Şekil 9. | Günlere göre kontrol ve miR-124* erkekler arası ağırlık kıyaslaması..... | 57 |
| Şekil 10. | Günlere göre Kontrol ve miR-124* dişiler arası ağırlık kıyaslaması..... | 57 |
| Şekil 11. | Tüm farelerin haftalara göre tartıları..... | 58 |
| Şekil 12. | Fareler 12 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması..... | 59 |
| Şekil 13. | Fareler 16 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması..... | 60 |
| Şekil 14. | Fareler 20 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması..... | 61 |
| Şekil 15. | Fareler 24 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması..... | 62 |
| Şekil 16. | Fareler 28 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması..... | 64 |
| Şekil 17. | Fareler 31 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması..... | 65 |
| Şekil 18. | Fareler 36 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması..... | 66 |
| Şekil 19. | Hipotalamus, hipofiz ve kanda <i>GH</i> geni ekspresyon kıyaslanması | 69 |
| Şekil 20. | Hipotalamus, hipofiz ve kanda <i>IGF1</i> geni ekspresyon kıyaslanması | 72 |
| Şekil 21. | Hipotalamus, hipofiz ve kanda <i>GHRH</i> geni ekspresyon kıyaslanması | 74 |
| Şekil 22. | Hipotalamus, hipofiz ve kanda <i>IGFBP5</i> geni ekspresyon kıyaslanması..... | 77 |
| Şekil 23. | Hipotalamus, hipofiz ve kanda <i>GHR</i> geni ekspresyon kıyaslanması..... | 79 |
| Şekil 24. | Hipotalamus, hipofiz ve kanda <i>IGFIR</i> geni ekspresyon kıyaslanması | 82 |
| Şekil 25. | Hipotalamus, hipofiz ve kanda <i>IGFBP1</i> geni ekspresyon kıyaslanması..... | 84 |
| Şekil 26. | Hipotalamus, hipofiz ve kanda <i>GHRL</i> geni ekspresyon kıyaslanması..... | 86 |
| Şekil 27. | Kontrol ve F0 miR-124* dişiler arasındaki GH düzeylerinin karşılaştırması | 87 |

| | |
|--|----|
| Şekil 28. Kontrol ve F0 miR-124* erkekler arasındaki GH düzeylerinin karşılaştırması | 88 |
| Şekil 29. Kontrol ve F1 miR-124* dişiler arasındaki GH düzeylerinin karşılaştırması | 88 |
| Şekil 30. Kontrol ve F1 miR-124* erkekler arasındaki GH düzeylerinin karşılaştırması | 89 |
| Şekil 31. Kontrol ve F0 miR-124* dişiler arasındaki IGF-1 düzeylerinin karşılaştırması | 89 |
| Şekil 32. Kontrol ve F0 miR-124* erkekler arasındaki IGF-1 düzeylerinin karşılaştırması | 90 |
| Şekil 33. Kontrol ve F1 miR-124* dişiler arasındaki IGF-1 düzeylerinin karşılaştırması | 90 |
| Şekil 34. Kontrol ve F1 miR-124* erkekler arasındaki IGF-1 düzeylerinin karşılaştırması | 91 |
| Şekil 35. Tüm gruplardaki GH düzeylerinin karşılaştırılması..... | 92 |
| Şekil 36. Tüm gruplardaki IGF-1 düzeylerinin karşılaştırılması..... | 93 |

miR-124'ün GH/IGF-1 YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Genel popülasyonda büyüme, genetik ve epigenetik faktörler arasındaki karmaşık bir etkileşimle belirlenir. miR-124, yetişkin beyninde özel olarak ifade edilen en iyi karakterize edilmiş ve en bol bulunan miRNA'lardan biri olup, bazı genlerin ifadesini doğrudan etkileyebilen epigenetik bir faktördür.

Bu çalışmada miR-124'ün anabolik bir sistem olan GH-IGF-1 aksı üzerine etkisi araştırıldı. İlk olarak Balb/c ırkı fare embriyolarına miR-124-3p mikroyenjeksiyonu yapıldı. Mikroyenjeksiyon sonrası doğan (paramutant/miR-124*) 5 erkek, 1 dişi fare (F0) çalışma grubu olarak kullanıldı. Kontrol grubu olarak da 4 erkek, 4 dişi 8 fare kullanıldı. Kilo takibi yapılan bu farelerden, miR-124* lar kendi aralarında kontrol fareler de kendi aralarında çiftleştirilerek F1 nesli elde edilmiştir. 3 erkek 2 dişi olmak üzere 5 tane F1 miR-124* fare ve 4 erkek 10 dişi olmak üzere 14 tane kontrol fare kullanılmıştır. F1 nesli için de kilo takipleri yapılmıştır. Ağırlık ve vücut büyüklüğü açısından farelerin çok farklı oldukları tespit edilmiştir. Daha sonra bu farelere ait hipotalamus, hipofiz ve kan örneklerinde GH-IGF-1 yolağında görevli olan *GH*, *IGF1*, *GHRH*, *IGFBP5*, *GHR*, *IGF1R*, *IGFBP1*, *GHRL* genlerinin ekspresyonları Real Time PCR ile, *GH* ve *IGF-1* genlerinin ekspresyonları ayrıca ELISA metodu ile de tespit edilmiştir.

F0 miR-124*erkekler ve F1 miR-124*erkeklerin, kontrol erkeklerle kıyasla ağırlık artışları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). F0 miR-124*erkeklerin, F1 miR-124*erkeklerle kıyasla daha ağır oldukları da istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p<0,05$). IGFBP1 in hipotalamustaki ekspresyon bulgularında F1 paramutant erkeklerin F0 paramutant erkeklerle kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon artışı görülmüştür ($p<0,05$). F0 paramutant erkek grubundaki GH düzeyleri kontrolleriyle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0,05$). F0 paramutant dişinin de kontrollerine göre artmış GH düzeyi izlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da her iki cinsiyette de $F0>F1>$ kontrol şeklindeki GH düzeyleri ve bununla korele GH kan ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. IGFBP5 geni için istatistiksel olarak ispatlanmasa da tüm dokularda F0 ve F1 paramutant erkeklerde kontrollerine göre belirgin ekspresyon artışı izlenmiştir. *IGF1R* kan

ekspresyon bulgularında F1 paramutant erkeğin kontrol erkek ve F1 paramutant dişilere göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bariz artmış ekspresyonu saptanmıştır. Dişilerde de birer örnek olmalarına rağmen her iki jenerasyonda da kontrollerine göre artmış bir ekspresyon gözlenmiştir.

Sonuç olarak miR-124 enjeksiyonu farelerde kilo artışı ve iri fenotipe neden olmaktadır. Bu etkinin bir sonraki kuşakta azalarak ta olsa devam ettiği belirlenmiştir. Bu küçülmenin *IGFBP1* ekspresyonundaki artış nedeni ile olabileceği kanısındayız. Diğer taraftan *GH* ekspresyonundaki artış ile kilo artışı arasında pozitif bir korelasyon olduğu diğer bir bulgumuzdur. *IGFBP5* ve *IGF1R* genlerinin ise büyümeye katkı sağladıklarını düşündürecek sayısal olarak ekspresyon bulgularımız olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlandırılmamıştır. Bu durumun temel nedeninin de örnek sayısındaki yetersizlik olduğunu düşünmekteyiz. Bu mekanizmanın net olarak aydınlatılabilmesi ve bu çalışmanın desteklenmesi için daha fazla örnek sayısıyla benzer çalışmalar yapılmalıdır.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MIR-124 ON THE GH / IGF-1 ROAD

ABSTRACT

Growth in the general population is determined by a complex interaction between genetic and epigenetic factors. miR-124 is an epigenetic factor that can now influence the expression of genes, whether one of the best expressed and most abundant miRNAs is specifically expressed in the adult brain

In this study, miR-124-3p microinjection was performed on Balb / c breed mouse embryos to investigate the effect of miR-124 on an anabolic system GH-IGF-1 axis. 5 male, 1 female mice (F0) born after microinjection (paramutant / miR-124 *) were used as study group. As a control group, 4 males and 4 females, 8 mice were used. These mice were then weight-tracked, miR-124 * s were mated among themselves and control mice were mated among each other to obtain F1 generation. 5 F1 miR-124 * mice (3 male and 2 female) and 14 control mice (4 male and 10 female) were used in our study. Weight tracing was performed for F1 generation. Mice were found to be very different in weight and body size. The expressions of *GH*, *IGF1*, *GHRH*, *IGFBP5*, *GHR*, *IGF1R*, *IGFBP1*, *GHRL* genes which were involved in the GH-IGF-1 pathway in the hypothalamus, pituitary and blood samples of these mice were also analyzed by Real Time PCR. Expression of *GH* and *IGF-1* gene has also been determined with ELISA method.

Weight increases of F0 miR-124 * males and F1 miR-124 * males were found statistically significant compared to control males ($p < 0.05$). F0 miR-124 * males were statistically more heavy than F1 miR-124 * males ($p < 0.05$). In the expression findings of *IGFBP1* in the hypothalamus, a statistically significant increase was observed in F1 paramutant males compared to F0 paramutant males ($p < 0.05$). GH levels in the F0 paramutant male group were significantly increased compared to controls ($p < 0, 05$). Increased GH levels were also observed in F0 paramutant female compared to controls. Although not statistically significant, GH levels of F0 > F1 > control and correlated with *GH* blood expression levels were determined in both sexes. Although there was no statistical evidence for *IGFBP5* gene, F0 and F1 paramutant in all tissues showed significant increase in expression compared to controls. In the *IGF1R* blood expression

findings, an increased expression of F1 paramutant male compared to control male and F1 paramutant females was found, although not statistically significant. Although they were also one example in females, increased expression was observed in both generations.

As a result, miR-124 injection causes weight gain and large phenotype in mice. This effect is reduced in the next generation, but is nevertheless determined to continue. We think that this decrease may be due to the increase in *IGFBP1* expression. On the other hand our other findings that there is a positive correlation between weight gain and an increase in the expression of *GH*. Although the *IGFBP5* and *IGF1R* genes are thought to contribute to growth, we have numerical expression findings, but they were not statistically significant. We think that the main reason of this situation is the inadequacy in the number of samples. Similar studies should be carried out with more number of samples in order to clarify this mechanism and support this study.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epigenetik, DNA dizisinde değişiklik olmadığı halde kalıtsal fenotipte oluşan değişiklikleri ifade eden bir terimdir [1]. Bugün en çok kullanılan ve de kabul gören tanımı ise şöyledir: Epigenetik; DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ekspresyonundaki farklılıkları inceleyen bilim dalıdır [2], [3]. Epigenetik mekanizmalar, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel ve/veya translasyonel ve post-translasyonel modifikasyonlarla gen aktivitesini etkileyebilirler [4]. Post-transkripsiyonel mekanizmalarda etkili olan faktörlerden biri olan mikro RNA'lar (miRNA), küçük, kodlayıcı olmayan RNAlardır [5]. DNA'dan transkribe olup, translasyona uğramazlar ve proteine kodlanan diğer genlerin ifadesini düzenlerler [6]. Nöral kök hücre çoğalması ve farklılaşması dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte işlev görürler [7].

miR-124, yetişkin beyninde özel olarak ifade edilen en iyi karakterize edilmiş ve en bol bulunan miRNA'lardan biridir. [8] Her ne kadar miR-124 ailesi omurgalıların yetişkin beyninde yüksek oranda ifade edilse de, nörojenezdeki rolü tam olarak bilinmemektedir [9]. Mikro RNA'lar kullanılarak yapılan mikroenjeksiyon deneylerinde, yapılan mikroenjeksiyonun bir şekilde metabolizmayı etkileyebildiği ve mikro RNA'nın ebeveyndeki etkileri yeni nesile taşıyabileceğine dair önemli veriler elde edilmiştir [10]. Mino ve arkadaşları yaklaşık 21-22 nükleotidlik küçük bir RNA molekülü olan miR-124'ün mikroenjeksiyonu sonucunda hem prenatal hem de postnatal dönemde daha iri fenotipe sahip farelerin oluştuğunu gözlemlemişlerdir [11]. Bu çalışmadan yola çıkarak biz de miR-124 mikroenjeksiyonunun iri fenotip oluşturma mekanizmasını

aydınlatabilmek amacıyla anabolik bir aks olan Growth hormone-Insulin like growth factor 1 (GH/IGF-1) aksı üzerindeki etkisini incelemeyi planladık.

GH / IGF-1, birkaç üye içeren anabolik bir akstır. Bu üyeler başlıca GH salgılayan hormon (GHRH), büyüme hormonu (GH), GH reseptörü (GHR), Insulin Like Growth Factor 1 (IGF-1) ve IGF-1 reseptörü (IGF-1R)dür. GH reseptünün aşağı akış mediyatörleri olan STAT5, JAK2 ve SOCS1-3 de sıklıkla bu aksa dahil edilir. Ayrıca IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP'ler) ve dolaşımda IGF-1'i taşıyan, yarı ömrünü uzatan ve biyoyararlanımını düzenleyen asit labil subunit (ALS)de bu yolakta görevlidir [12]. GH, çeşitli gen dizilerini uyararak merkezi bir metabolik role sahiptir [13]. Direk etkisi ve IGF-1 üzerinden olan etkileriyle büyümeyi düzenler. GH hemen hemen tüm hücrelerde bulunan reseptörü aracılığıyla davranır ve kas kütlelerini, yağ lipolizini, doğrusal ve radyal kemik büyümesini ve kemik mineralizasyonunu artırır [12]. GH / IGF-1'in anabolik bir aks olması sebebiyle, GH / IGF-1 fazlalığının büyümenin artmasına yol açması beklenmektedir.

Genel popülasyonda büyüme, genetik ve epigenetik faktörler arasındaki karmaşık bir etkileşimle belirlenir. Gigantizm, epifizyal büyüme plakları açıkken aşırı miktarda büyüme hormonu (GH) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) salınımı ile karakterize bir sendromdur [14]. Bu durum, tanımlanabilir ve klinik olarak tedavi edilebilir bir nedeni olduğundan, nadir fakat çok önemli bir hastalık grubudur [15]. Gigantizm, aşırı fiziksel boyut ve boy ile karakterize bir durumu ifade eder. Bu büyüme, epifiz büyüme plakları açıkken, bebeklik, çocukluk veya ergenlik döneminde ortaya çıkmaktadır. Büyüme hormonu fazlalığını belirtmek için kullanılmasına rağmen, gigantizm terimi aslında hormonal olmayan aşırı büyüme durumları için de kullanılır [16]. Aşırı büyümenin olası nedenleri arasında GH fazlalığına bağlı gigantizm ve akromegali dışında kromozomal, hormonal, sendromik, ya da obezite gibi çok çeşitli durumlar sayılabilir. Tüm aşırı büyüme durumları oldukça nadir olup, karmaşık bir patofizyolojik kökene ve bazı ortak klinik belirtilere sahiptir [17].

Bu çalışmada miR-124'ün GH-IGF-1 aksı üzerine etkisini araştırılmıştır. Fare embriyolarına miR-124 mikroenjeksiyonu yapıldıktan sonra F0 ve F1 soyları elde edilmiştir. Daha sonra da bu farelere ait hipotalamus, hipofiz ve kan dokuları elde

edilerek bu dokular üzerinde GH-IGF-1 yolağında görevli olan genlerden olan *GH*, *IGF1*, *GHRH*, *IGFBP5*, *GHR*, *IGF1R*, *IGFBP1*, *GHRL* genlerinin ekspresyonları Real Time PCR ile ,ayrıca GH ve IGF1 genlerinin serum seviyeleri ELISA metodu ile çalışılmıştır. Bu çalışmada jenerasyon takipleri sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda miR-124 mikroenjeksiyonu yapılan farelerde(paramutant/miR-124*) miR-124'ün GH-IGF-1 aksı üzerine etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. EPİGENETİK

Eski Yunancada “epi” ön eki, “üstünde”, “üzerinde”, “ötesinde” anlamına gelmektedir. Günümüzde epigenetik “genler üstü genetik” anlamında kullanılmaktadır [18].

Epigenetik sözcüğü 1942’de, bilimsel anlamıyla ilk kez, Conrad Waddington tarafından kullanılmıştır. Waddington’a göre epigenetik; gelişim esnasında genotipin fenotipi nasıl oluşturduğunu inceleyen bilim dalıdır [19]. Bugün en çok kullanılan ve de kabul gören tanımı ise şöyledir: Epigenetik; genotipik değişikliklerden kaynaklanmayan gen ekspresyonundaki farklılıkları inceleyen bilim dalıdır [2], [3]. Bu farklılıklar hücreyi ya da organizmayı doğrudan etkilemektedir ancak, DNA dizisinde hiçbir değişiklik gerçekleşmemektedir [20]. Bir organizmanın tüm somatik hücrelerinde aynı DNA dizisi var olmasına rağmen genin ifadesi farklı hücre türleri arasında büyük farklılıklar göstermektedir. DNA dizilimindeki değişimlerle açıklanamayan genin fonksiyonundaki mitotik ve/veya mayotik kalıtsal değişiklikler epigenetiğin tanımını oluşturmaktadır. [21]. Epigenetik mekanizmalar, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel ve/veya translasyonel ve post-translasyonel modifikasyonlarla gen aktivitesini etkileyebilirler [4].

Epigenetiğin moleküler temeli karmaşıktır ve belli genlerin aktivasyonunun ne zaman ve nasıl olacağını belirler. Bu süreç içerisinde erişkinlerde hücre yenilenmesi, gen

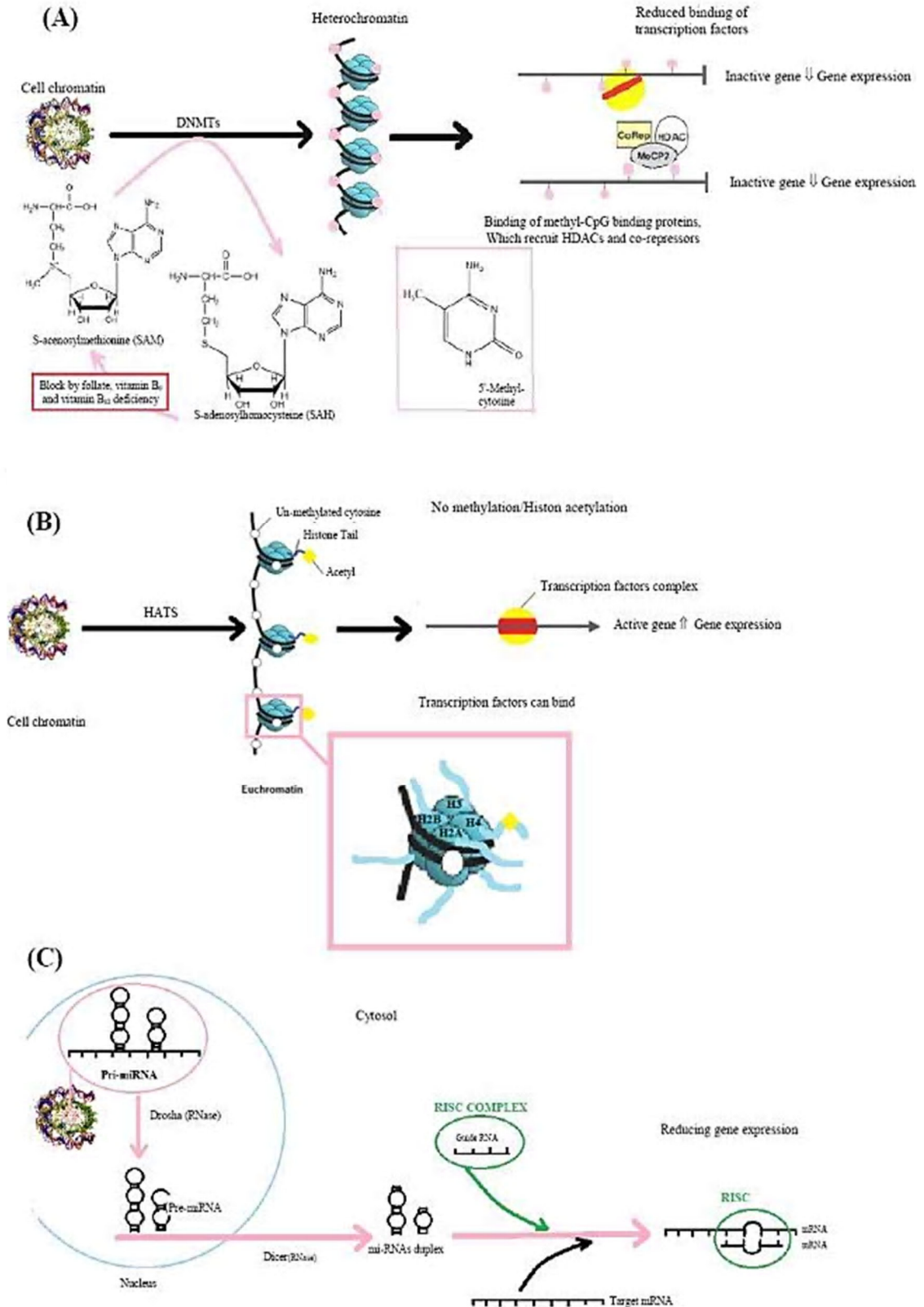
imprintingi, X kromozom inaktivasyonu gibi olaylar gerçekleşmektedir [22], [23]. Diğer taraftan sürecin bozulması kanser, otoimmün ve nörolojik hastalıklar gibi problemlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır [24], [25], [26].

Potansiyel olarak geniş bir sonuç yelpazesine sahip olan bu tür epigenetik mekanizmalar, hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenebilmektedir. Embriyonel dönemden başlayan ve yaşamın her evresinde devam eden epigenetik değişimler, geri döndürülebilir ve sonraki nesillere aktarılabilir özelliktedir [27]. Bazı epigenetik işaretlerin geri dönüşümlü olması gerçeği birçok araştırmacıyı epigenetik tedaviye odaklanmaya teşvik etmiştir [28].

'Epigenetik' terimi, genomik damgalama ve paramutasyon gibi birçok fenomeni kapsamaktadır [1]. İlk olarak bitkilerde tanımlanan ve bir genin bir allelinde meydana gelen genetik değişikliğin normal alleli kalıtsal olarak etkilemesi olarak tanımlanan 'Paramutasyon' yani susturma işlemi bitkilerde bildirilenden farklı olarak, farelerde lokus transkripsiyonunun epigenetik artışı olarak tanımlanmıştır [11], [29]. Burada dikkat çeken durum ise paramutant allel ve ilişkili fenotipin, sonraki nesillere aktarılabilmesidir ki bu durum epigenetik kalıtım olarak adlandırılmaktadır [4].

2.1.1. EPIGENETİK MEKANİZMALAR

Epigenetik değişiklikler, çok hücreli bir organizmada, her hücre tipinin mevcudiyeti için gerekli olan spesifik genleri eksprese etmesine ve bilgilerin yeni hücrelere aktarılmasına izin verir. Epigenetik modifikasyonlar sıklıkla bir organizmanın ömrü boyunca olur; ayrıca, germ hücrelerinde meydana gelirse, bu değişiklikler yeni nesillere aktarılabilir [30]. Paramutasyon, imprinting, gen susturma, kanserojen işlemler, teratojenik etkiler, X kromozom inaktivasyonu, yeniden programlama, maternal özellikler, histon modifikasyonlarının düzenlenmesi ve klonlamanın epigenetik işlemleri içerdiği bilinmektedir. Epigenetik kontrol başlıca; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA lar ile olmaktadır. Üç ana epigenetik modifikasyon mekanizması şekil:1 de gösterilmiştir [4].



Şekil 1. Üç ana epigenetik modifikasyon mekanizması [4]
(A-metilasyon, B-histon modifikasyonu, C-mikroRNA)

2.1.1.1. DNA Metilasyonu

DNA düzeyindeki modifikasyonların en bilinen ve en işlevsel olanı DNA metilasyonudur [31]. Omurgalılarda tipik olarak CpG bölgelerine DNA metiltransferaz enzimi ile bir metil grubunun bağlanması neticesinde gerçekleşir. Metil grubu DNA'nın sitozin bazının pirimidin halkasının 5 numaralı karbonuna eklenir. Metil vericisi olarak S-Adenozil Metiyonin (SAM) görev yapar. Erişkin somatik dokularda DNA metilasyonu tipik olarak CG dinükleotit dizilerinde meydana gelir. CpG dışı metilasyon embriyonik kök hücrelerde hâkimdir. Metilasyon genlerin inaktive olmasına neden olarak ekspresyonu engelleyen bir mekanizmadır [23], [31].

2.1.1.2. Histon Değişimleri

Histon modifikasyonları, kromatin ile ilişkili proteinler ile de etkileşerek, genin transkripsiyon aşamasının düzenlenmesini sağlayan faktörlerdir. Kromatin yapı ve fonksiyonunu değiştirerek genin ifadesini değiştirirler. Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, s-nitrosilasyon, ubiquitinasyon ve de sumolasyon histon modifikasyonları grubunda yer alan mekanizmalardır. Bu mekanizmalar sonucunda kromatinin yapısını transkripsiyonel olarak aktif (ökromatin) ya da inaktif (heterokromatin) olarak değiştirmektedirler [32].

2.1.1.3. miRNA'lar

MikroRNA'lar (miRNA'lar), mRNA'ların stabilitesini ve translasyonunu etkileyerek çok hücreli organizmalarda gen ekspresyonu sonrası transkripsiyonel düzenlemede işlev gören, yaklaşık 21-22 nükleotidlik, kısa, kodlayıcı olmayan RNAlardır. Nöral kök hücre çoğalması ve farklılaşması dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte işlev görürler [5], [7]. MiRNA'ların translasyon sürecinin başlangıç adımını bastırdıkları ve bununla mRNA degradasyonunu tetiklediği düşünülmektedir [33], [34]. miRNA'lar bir ya da daha fazla mRNA'nın genelde 3'UTR bölgesine komplementer olarak genin ifadesini baskırlarlar [10].

Bir miRNA yüzlerce farklı mRNA hedeflerine sahip olabilir ve belirli bir hedef çoklu miRNA'lar tarafından düzenlenebilir [35], [36]. MiRNA'nın disregülasyonunun, hücre

farklılaşması, proliferasyon, apoptoz, göç ve metastaz gibi çeşitli biyolojik fonksiyonları düzenleyerek, birçok hastalıkla bağlantılı olduğu gösterilmiştir [37]. Son zamanlarda, artan çalışmalar, miRNA'ların nöral kök hücre kendini yenileme, gelişme, çoğalma ve farklılaşma durumlarına farklı kök hücre düzenleyicilerin kontrolü ile dahil edilmesine dikkat çekmiştir [38], [39], [40]. Tümörögenizde gen ağlarının ana düzenleyicileri olarak önemli bir rol oynarlar. Bu nedenle, ekspresyon profilleri birçok insan kanserinde prognoz ve tedavi sonuçları ile ilişkilidir [41]. miRNA'lar, çok sayıda hedef genin koordineli bir şekilde baskılanma kapasiteleri nedeniyle tümör metastazını düzenlemeye çok uygundur, böylece invazyon -metastaz kademesinin çoklu aşamalarında müdahalelerini sağlarlar [42].

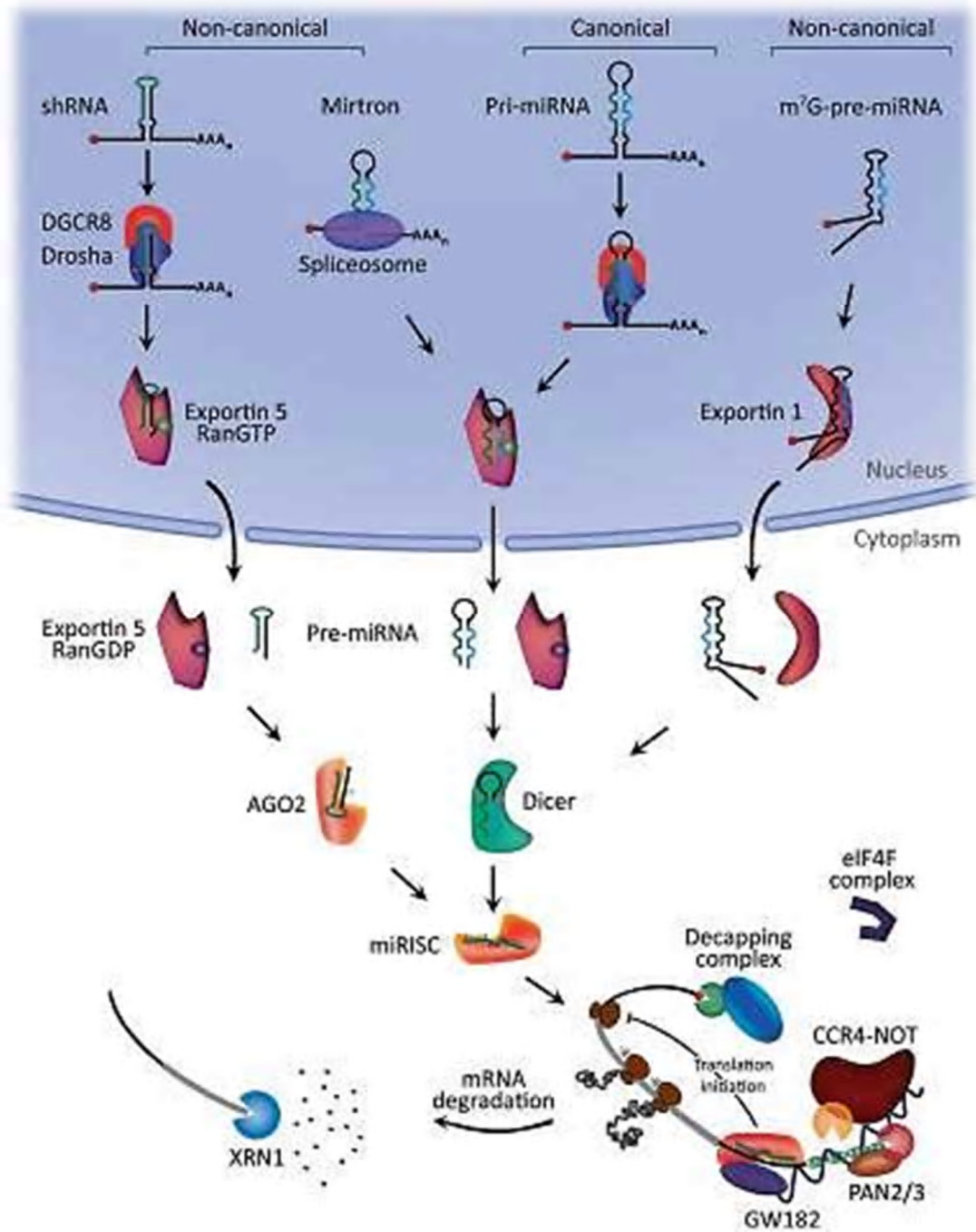
Hali hazırda tanımlanmış tüm miRNA'ların yaklaşık yarısı intrageniktir ve çoğunlukla intronlardan ve nispeten az sayıda protein kodlayan gen ekzonundan işlenirken, diğerleri intergeniktir, bir konakçı geninden bağımsız olarak kopyalanır ve kendi promotörleri tarafından düzenlenir [43] [44]

miRNA, çekirdekte transkribe olur ve olgunlaşmadan önce birkaç değişikliğe uğrar [45]. miRNAlar oluşum süreçlerinde, DNA'dan RNA polimeraz II / III aracılığı ile transkribe olurlar [45]. Çoğu miRNA, DNA dizilerinden primer miRNA'lara (pri-miRNA'lara) kopyalanır ve öncül miRNA'lara (pre-miRNA'lar) ve olgun miRNA'lara işlenir. Çoğu durumda, miRNA'lar ekspresyonu baskılamak için hedef mRNA'ların 3' UTR'si ile etkileşime girer [46]. Bununla birlikte, miRNA'ların 5' UTR, kodlama dizisi ve gen promotörleri dahil diğer bölgelerle etkileşimi de rapor edilmiştir [47].

miRNA biyogenezindeki ilk adım miRNA'ların RNA polimeraz II tarafından DNA'dan primer miRNA'ya (pri-miRNA) transkribe olmasıdır. Drosha benzeri endonükleazlar ve Drosha mikroişlemci kompleksi (DGCR8) ve /veya splayozomal bileşenler tarafından, prekürsör-miRNA (pre-miRNA) üretmek için pri-miRNA parçalanır [48]. Pre-miRNA, bir reseptör olan Exportin-5 ve RanGTP'ye bağlı bir şekilde çekirdekten sitoplazmaya salınır [49], [50]. Sitoplazmada Dicer benzeri endonükleazlar miRNA duplesi oluşturmak için pre-miRNA'yı iki ipliğe ayırır. Bu iki iplikten yalnızca biri(öncü iplik ya da kılavuz iplik) miRNA'dır. Diğer ipliğe ise yolcu iplik denir. Olgun miRNA hedef mrna'nın translasyonunu bloke edebilir. Son olarak, olgun miRNA duplesinin

iplikçikleri, miRNA ile indüklenen bir susturma kompleksi (miRISC) oluşturmak için RISC kompleksi içindeki proteinlerden biri olan Argonate(AGO) protein ailesine yüklenir [51]. Argonat proteinleri miRNA ların kılavuzluğunda transkriptleri hedef alıp destabilize ve/veya translasyonel baskılamaya aracılık ederler [52]. miRNA'lar bazı genleri regüle ederek RNA'nın susturulmasıyla ilgili kendi mekanizmaları da dahil olmak üzere negatif geri bildirim kendinden kontrollü bir şekilde düzenler [46], [53].

MikroRNA'ların olgunlaşma sürecinde bu standart yoldan başka standart dışı yollar da vardır. Standart dışı yollarda, shRNA(short hairpin RNA) başlangıçta mikroşlemci kompleksi tarafından bölünür ve Exportin5 / RanGTP yoluyla sitoplazmaya verilir. AGO2'ye bağımlı fakat Dicer'den bağımsız, bölünme yoluyla daha da işlenirler. (m7G)-pre-miRNA sitoplazmik olgunlaşmalarını tamamlamak için Dicer'a bağlıdır, ancak nükleositoplazmik mekiklerinde farklılıklar gösterir. (m7G)-pre-miRNA Exportin1 ile sitoplazmaya taşınmaktadır. Tüm yollar sonuçta işlevsel bir miRISC kompleksine yol açar. Çoğu durumda, miRISC, muhtemelen eIF4F kompleksine müdahale ederek, translasyon inhibisyonunu indüklemek için mRNA'ları hedef alır. Daha sonra Argonaute'ye bağlı GW182 familyası proteinleri, PAN2 / 3(poli (A) - deadenilaz) ve CCR4-NOT devreye girer. PAN2 / 3 deadenilasyonu başlatırken CCR4-NOT kompleksi işlemi tamamlar ve hedef mRNA üzerindeki m7G kapağını uzaklaştırır. Daha sonra ekzoribonükleaz XRN1 üzerinden mrna degradasyonu olur. Hayder ve ark. [54](şekil 2).



Şekil 2. MikroRNA biyogenezini ve etki mekanizması [54].

2.2. MiR-124-3p

miR-124 ilk önce faredeki klonlama çalışmaları ile tanımlanmıştır [55]. Ekspresyonu daha sonra insan embriyonik kök hücrelerinde doğrulanmıştır [56]. miR-124 ailesi metazoada yüksek oranda korunmuştur ve genellikle sinir sisteminde zenginleştirilmiştir [57].

İnsan ve farede, bu miRNA, üç ayrı gen tarafından kodlanır. Farede miR-124 genleri olan miR-124-1 (MI0000176), miR -124-2 (MI0000717) ve miR -124-3 (MI0000150) sırasıyla 14, 3 ve 2 numaralı kromozomlar üzerinde bulunur [58]. Birbiriyle yakından ilişkili olan insan homologları mevcuttur. (MI0000443, MI0000444 ve MI0000445).

miR-124, yetişkin beyinde özel olarak ifade edilen en iyi karakterize edilmiş ve en bol bulunan miRNA'lardan biridir [8]. Her ne kadar miR-124 ailesi omurgalıların yetişkin beyinde yüksek oranda ifade edilse de, yetişkin nörojenezindeki rolü tam olarak bilinmemektedir [9]. miR-124'ün, hem doğum öncesi hem de doğum sonrası nöronal farklılaşmada aşırı eksprese edildiği keşfedildi [59]. Bununla birlikte, miR-124'ün nöronal kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşması ile ilişkili moleküler mekanizmaları hala bilinmemektedir [60].

Tablo 1. miR-124-5p ve miR124-3p'nin dizisi.

| miRNA Adı | Sekansı | MIMAT Kodu |
|----------------|----------------------|--------------|
| mmu-miR-124-3p | UAAGGCACGCGGUGAAUGCC | MIMAT0000134 |

2.3. GH-IGF-1 YOLAĞI

GH / IGF-1, birkaç üye içeren anabolik bir akstır. Bu üyeler başlıca GH salgılayan hormon (GHRH), büyüme hormonu (GH), GH reseptörü (GHR), Insulin Like Growth Factor 1 (IGF-1) ve IGF-1 reseptörü (IGF-1R)dür. GH reseptünün aşağı akış mediyatörleri olan STAT5, JAK2 ve SOCS1-3 de sıklıkla bu aksa dahil edilir. Ayrıca IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP'ler) ve dolaşımda IGF-1'i taşıyan, yarı ömrünü uzatan ve biyoyararlanımını düzenleyen asit labil subunit (ALS)de bu yolakta görevlidir [12].

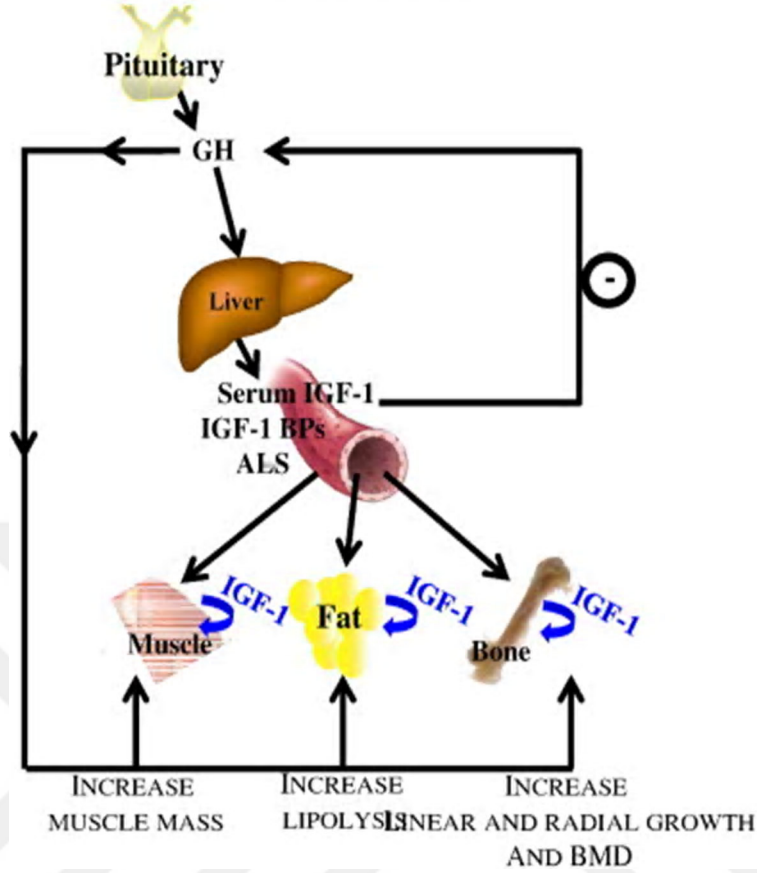
Ön hipofizden GH sekresyonu GH salgılayan hormon (GHRH), somatostatin (GH sekresyon inhibe edici hormon) ve GH sekretagoinler denilen diğer hipotalamik peptidler tarafından düzenlenir [61], [62]. Bunlardan biri de Ghrelin dir. [63]GH'nin hipofizden salgılanması ve sentezi GHRH tarafından desteklenirken, GH salgılanmasının engellenmesi büyük ölçüde somatostatin tarafından gerçekleştirilir [64]. İnsanlarda, GH, ön hipofiz tarafından pulsatil bir şekilde salgılanır. Bu salınım uyku, egzersiz ve serbest yağ asitleri gibi bir dizi fizyolojik uyarıcı ile düzenlenmektedir.

GH'nin hipofizden salgılanma şekli, gece patlamaları ile metabolizmada sirkadiyen salınımlara yol açar [13]. GH, hipofiz bezinden, yavaş dalga uykusu başlangıcında büyük bir dalgalanma ile ve yemeklerden birkaç saat sonra daha az göze çarpan salgı dönemleri ile epizodik olarak salgılanır [65]. Açlık ve belirli fiziksel stres koşulları sırasında, GH salınımı artarken, glukoz ve lipid gibi yakıt fazlalığı, sağlıklı bir insanda GH salınımı engeller [65]. GH salgılanması pubertede maksimumdur ve bu dolaşımdaki yüksek IGF-I seviyeleriyle birlikte [66]. Yetişkinlik, GH sekresyonunda ve dolaşımdaki IGF-I seviyelerinde kademeli bir düşüş ile ilişkilidir [67]. Ayrıca, GH salgılama düzenlerindeki cinsel dimorfizm iyi tanımlanmıştır, burada erkekler pulsatil sekresyona sahiptir, ancak dişiler daha sürekli bir sekresyon sergiler [68].

Büyüme hormonu (GH) ön hipofizin somatotrof hücreleri tarafından yapılan ve salgılanan, 191 amino asitli bir polipeptid hormondur. GH'nin primer fonksiyonu lineer büyümeyi sağlamaktır [69]. Etkilerini insulin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) aracılığı ile gerçekleştirir. GH, amino asit alımını uyararak ve direkt olarak mRNA transkripsiyonunu ve translasyonunu hızlandırarak protein yapımını artırır. Enerji kaynağı olarak yağ kullanımını artırarak protein yıkımını azaltır. GH yağ dokusundan serbest yağ asitlerinin serbestleşmesini ve asetil koenzim A'ya dönüşümünü artırır. Bundan da enerji sağlanır. Protein koruyucu etkisi büyümeyi ve gelişmeyi sağlayan önemli bir mekanizmadır. Karbonhidrat metabolizması üzerine hiperglisemik ve diyabetojenik etkisi vardır. Hücrelere glukoz alımını azaltır [69].

Hipofizden salgılanan GH, karaciğerde IGF-1 geninin primer düzenleyicisidir ve serum IGF-1'in ~%75'ine katkıda bulunur. Kas kütlelerini, yağ lipolizini, lineer ve radyal kemik büyümesini ve kemik mineralizasyonunu artıran GH hemen hemen tüm hücrelerde bulunan reseptörü ile etki eder. IGF-1 serumda IGFBP ler ve ALS ile bağlı halde bulunur. Bu kompleks ile yarı ömrü düzenlenir ve aynı zamanda ilgili dokulara iletimi yapılarak kas kütleleri ve kemik mineral içeriğinin artışı ve lipoliz artışı olur. Serum IGF-1 ayrıca hipofizden GH sekresyonunun negatif regülatörü olarak da görev yapar. IGF-1, tüm dokular tarafından üretilir ve otokrin / parakrin tarzda davranır [12](şekil 3).

The GH/IGF-1 axis



Şekil 3. GH / IGF-1 aksı [12]

Karaciğer, dolaşımdaki IGF-1 havuzuna ~%75 katkıda bulunurken, yağ ve kas gibi diğer dokular ~%25'ine katkıda bulunurlar. Dolaşımda IGF-1, serum ve dokulardaki IGF-1 yarı ömrünü uzatan ve biyoyararlanımını belirleyen IGFBP'lere ve ALS'e bağlanır. IGF-1 serumda en fazla bulunan IGFBP olan IGFBP-3, IGFBP-5 ve ALS ile ~ 16 saat yarı ömürleri olan üçlü kompleksler oluşturur. IGFBP'lerin ve IGF-1'in ikili kompleksleri ~ 90 dakika yarı ömre sahipken, serumdaki serbest IGF-1'in yarı ömrü sadece ~ 10 dakikadır. Serumdaki IGF-1 endokrin bir şekilde etki eder ve GH salgılanmasını önlemek için hipofiz seviyesinde negatif geri besleme sağlar. Hemen hemen tüm dokular tarafından üretilen IGF-1, aynı zamanda farklı yerel üretim bölgelerinde otokrin / parakrin tarzda da etki etmektedir. IGF-1, tirozin kinaz reseptörüne, yani IGF-1R'ne bağlanır. Reseptörüne bağlandıktan sonra IGF-1, reseptör otofosforilasyonunu ve insülin reseptör substrat (IRS) ailesi ve adaptör hücresi proliferasyonunu, farklılaşmasını ve organ fonksiyonunu aktifleştirmek için proto-

onkogen tirozin kinaz Src gibi adaptör proteinlerinin alımını aktive eder. GH in karaciğer üzerindeki ve ayrıca kas, yağ, kıkırdak ve kemik gibi diğer organlar üzerindeki etkilerine, hemen hemen tüm dokularda bulunan ve sitokin benzeri bir reseptör olan GHR aracılık eder. GH'ın GHR'ne bağlanması üzerine, reseptörün hücre içi bölgesinde bir konformasyonel değişiklik meydana gelir [70], [71]. Sonrasında JAK2 proteinlerinin fosforilasyonu ve sinyalin gen transkripsiyonunu aktive eden STAT5 proteinlerine transdüksiyonu gerçekleşir. Bu sinyalleme kaskadının bastırılması, reseptörün proteozomal bozulması, JAK2 proteinlerinin fosforilasyonu ve SOCS proteinleri tarafından proteozomal bozulmasına teşviki ile gerçekleşir [72], [73].

Dolaşan IGF-I ağırlıklı olarak GH tarafından uyarılır ve karaciğerde yeterli besin alımı ve yüksek portal insülin seviyeleri varlığında üretilir [74] ve IGF-I, GH'ın anabolik etkilerini teşvik etmek için kritik öneme sahiptir [75]. Dolaşımdaki IGF-I konsantrasyonları açlık sırasında azalır ve GH salgılaması çoğalırken, IGF-I infüzyonu GH salgılanmasını baskılar [76]. Bu gözlemler, GH'nin IGF-I'den bağımsız etkilerinin esas olarak açlık veya uzun süreli egzersiz gibi nispi yakıt azlığı durumları sırasında yapıldığını ve buna bağlı olarak bu durumların GH'nin doğrudan eylemleri için önemli alanlar olarak görüldüğünü göstermektedir [77]. GH'nin akut ve kronik metabolik etkileri vardır. Akut eylemler, kanda lipolizin uyarılmasını ve artan serbest yağ asidi seviyelerini içerir. Sistemik ve portal insülin seviyelerinde yeterli besin temini ve daha sonra yükselmelerin varlığında tekrarlayan GH darbeleri gibi daha uzun süreli GH maruziyeti hepatik IGF-I üretimine neden olur [74]. GH'nin IGF-I üretimi ve etkisi üzerindeki uyarıcı etkisi, pozitif bir enerji dengesine ve insülinin yükselmesine neden olan daha kronik bir süreçtir.

Karaciğer, dolaşımdaki IGF-1'in ana kaynağı olduğu için, GH'ın etkisi için ana hedef organdır [78], [79]. GH'nin büyüme ve metabolizma üzerindeki IGF'ye bağımlı ve IGF'ye bağımsız etkilerini ayırt etmek zordur, çünkü iki hormon normal fizyolojide iç içedir [80]. Özellikle, asit kararsız alt birim, transkripsiyonel seviyede GH tarafından uyarılır [81] ve Igfals geninin susturulması karaciğere özgü IGF-I eksikliği olan fare modelinde serum IGF-1 ve uzun kemik uzunluğunu azaltır [79]. Büyümenin yanı sıra, GH karaciğer metabolizması üzerinde önemli etkiye sahiptir [82]. GH, hem glikojenoliz hem de glukoneogenez yoluyla hepatik glukoz üretimini artırarak, hipoglisemi

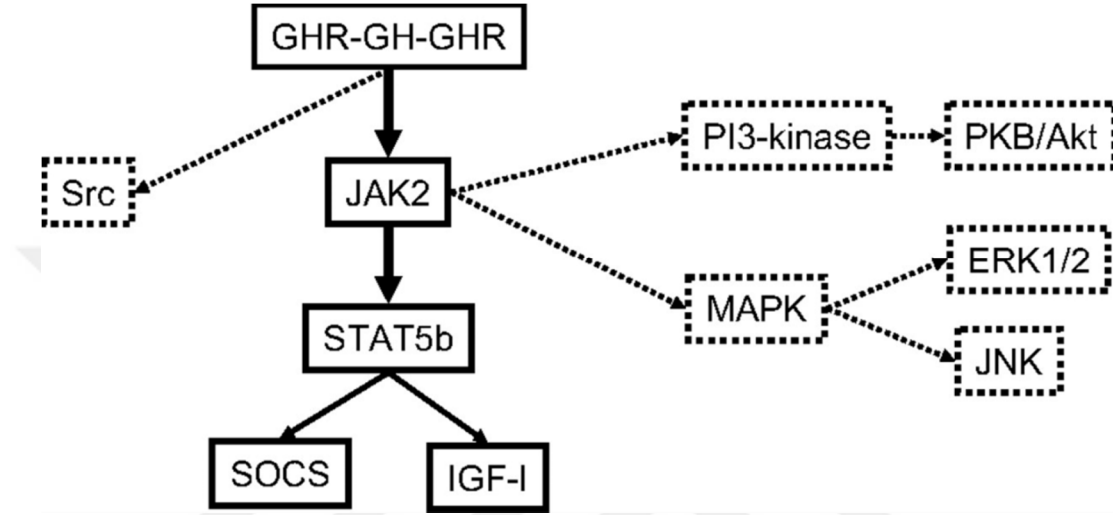
ortamındaki glikoz seviyelerini arttırmak için düzenleyici bir hormon görevi görmektedir. Bu ikisinden hangisinin hepatik glukoz üretimi üzerindeki baskın etkisi gösterdiği açık değildir [83].

Kronik olarak yüksek GH seviyelerine sahip hayvanlara özgü olduğu görülen anatomik ve biyokimyasal değişiklikler, böbrek ve karaciğer büyümesini, glomerüloskleroza, cilt anormalliklerini ve insülin ve kolesterol yükselmelerini içermektedir [84].

Dolaşımda, GH'nin çeşitli moleküler formları mevcuttur. Bunların çoğu GH reseptörünün hücre dışı alanına karşılık gelen taşıyıcı proteinlere bağlıdır. Serbest GH'nin plazmada toplam immünoaktivitenin yaklaşık %20'sini oluşturduğu tahmin edilmektedir [85]. GHR'ler kas, yağ, karaciğer, kalp, böbrek, beyin ve pankreas dahil birçok dokuda tanımlanmıştır [86]. Reseptörle ilişkili Janus kinazın (JAK 2) aktivasyonu, GH sinyalini başlatmanın kritik adımı olarak kabul edilir [87]. GH bağlanmasından sonra, GHR dimerinin hücre içi alanları, her biri bir JAK2 molekülünü bağlayan iki hücre içi alanı bir araya getirdiği düşünülen dönüşüme uğrar. Bu da, her JAK2 molekülünün kinaz alanındaki tirozin kalıntılarının çapraz fosforilasyonunu ve ardından GHR'nin tirozin fosforilasyonunu indükler. GHR ve JAK2 üzerindeki fosforlanmış kalıntılar, STAT1, -3, -5a ve -5b, MAPK yolu ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3-kinaz) yolu dahil olmak üzere farklı sinyal molekülleri için yerleştirme alanları oluşturur [87]. Aktive edilmiş GHR-JAK2 kompleksine bağlı STAT'lar daha sonra JAK2 tarafından tek bir tirozin üzerinde fosforile edilir, daha sonra DNA'ya bağlandıkları ve hedef genler için transkripsiyon faktörleri olarak işlev gördükleri çekirdeğe dimerize olurlar ve yer değiştirirler. [88] JAK2 ile ilişkili GH sinyallemesinin aşağı regülasyonu veya zayıflatılması, sekiz üyesi bulunan sitokin tarafından indüklenebilen baskılayıcıları (SOCS) ailesinin etkilerine aracılık eder [89]. SOCS proteinleri, GHR veya JAK2 üzerindeki fosfotirozin kalıntılarına bağlanır ve JAK2 aktivitesini inhibe ederek ve GHR'ye bağlanma için STAT ile rekabet ederek veya GHR kompleksinin proteazomal bozulmasını indükleyerek GH sinyalini bastırır [77](şekil 4).

JAK2 / STAT5b sinyal yolu, insan modellerinde GH tarafından aktive edilir ve GH'nin çocukluk çağında lineer büyüme üzerindeki etkileri konusunda kritik öneme sahiptir.

GH'nin insan fibroblastlarında in vitro olarak MAPK yolunu aktive edebileceğine dair kanıtlar da vardır. Bununla birlikte, GH'nin insanlardaki insülin antagonistik etkilerini destekleyen sinyal mekanizmaları henüz açıklanmamıştır. İnsanlarda bulunan veriler, GH'nin bazal veya insülinle uyarılmış PI-kinaz aktivitesi üzerinde önemli etkilerini gösterememiştir.

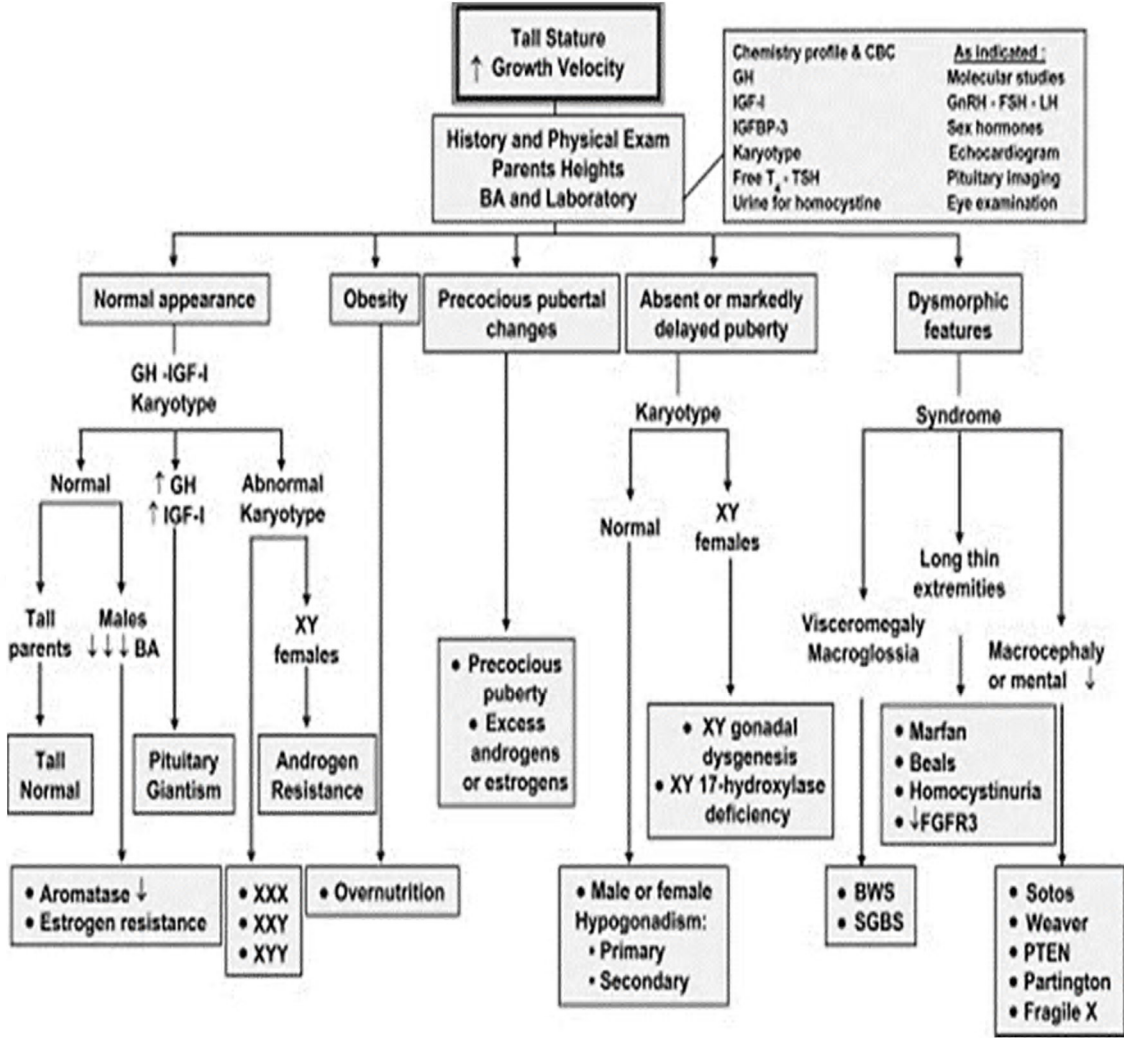


Şekil 4. İnsan kas ve yağ dokusunda bugüne kadar araştırılan GH sinyal proteinlerinin şematik ve basitleştirilmiş gösterimi [77]. (Kesintisiz çizgiler ve kutular, GH tarafından etkinleştirildiği gösterilen yolları belirtir; Taranmış çizgiler ve kutular, GH tarafından aktivasyonun belgelenmediği sinyal proteinlerini temsil eder.)

2.4. AŞIRI BÜYÜME DURUMLARI

Son yıllarda, aşırı büyümeye olan ilgi artmış, yeni bozukluklar tanımlanmış ve bir takım sorumlu genler ve genotip-fenotip korelasyonları tanımlanmıştır. Aşırı büyümenin tanınması; tıbbi tedavi, genetik danışma ve olası tümör gelişimi için önemlidir [90]. Tüm aşırı büyüme durumları oldukça nadirdir ve ortak bir karmaşık patofizyolojik kökene ve klinik belirtilere sahiptir [17].

Bir dizi aşırı büyüme bozukluğunun klinik belirtileri üst üste gelebilir, tanı zor olabilir ve DNA çalışmaları ile onaylanması gerekebilir. Büyüme fazlalığı olan bir hastanın tanısal değerlendirmesinde yardımcı olacak bir algoritma, Şekil 5'de gösterilmektedir.



Şekil 5. Büyüme fazlalığı olan hastalarda klinik yaklaşım[90]

Boy, insan toplulukları arasında temel bir değişkendir. Çocukların büyüme oranları ve yetişkinlikte ulaşılan son yükseklik, kalıtsal birçok özellik ile etkileşime giren çevresel faktörlere tabidir [91], [92]. Cinsiyet ve ebeveyn boyu, bir bireyin boyuna çok önemli katkıda bulunur. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, geniş insan popülasyonlarında boy tayini üzerinde kombine bir etkiye sahip olan çeşitli genleri ve yolları (IGFBP4, SHOX2 gibi) vurgulamıştır [93], [94]. Tablo 2 'de aşırı büyümeden sorumlu faktörler listelenmiştir.

Tablo 2. Aşırı büyümenin moleküler temeli ve etyopatogenezi [90], [17].

| Aşırı GH sekresyonu (gigantizm/akromegali) | | |
|---|---|---------|
| 1.Sporadik | | |
| a) Hipotalamik/hipofizer GH fazlalığı | -Konjenital GHRH fazlalığı -Hipofizer hiperplazi -Hipofizer somatotrof / mamosomatotrof adenom -Hipotalamik gangliostoma/nörostoma | |
| b) Ektopik GH fazlalığı | -GHRH veya GH salgılayan bronşiyal karsinoid veya pankreatik neoplazi -Ektopik hipofiz adenomu | |
| 2.Ailesel/sendromik | | |
| a) Nörofibramatozis 1 | -Somatostatinerjik yollara tümör infiltrasyonu | |
| b) McCune-Albright sendromu | -Gs alfa mutasyonu | |
| c) Multipl endokrin neoplazi tip 1 ve tip 4 | -Menin ve <i>CDKN1</i> gen mutasyonu | |
| d) Carney kompleksi | -2p16 da anormallik -17q22-24 <i>PRKARIA</i> mutasyonu | |
| e) 3PA (pituitar adenom asosiyasyonu) | -süksinat dehidrogenaz defektleri | |
| f) FIPA (familyal izole pituitar adenomları) | -11q13.3 te <i>AIP</i> geninde mutasyon -2p12.6 da anormallik | |
| g) X-LAG (X linked akromegali sendromu) | -Xq26.3 duplikasyonu | |
| Aşırı büyüme genleri | | |
| a) Klinefelter (47, XXY) | Ekstra büyüme geni <i>SHOX</i> | |
| b) Trisomy X (47, XXX) | Ekstra büyüme geni <i>SHOX</i> | |
| c) 47, XYY | Ekstra Y spesifik büyüme kontrol geni(<i>GCY</i>) | |
| Ekstra büyüme faktörleri | | |
| 1. IGF-II | | |
| a) Beckwith-Wiedemann | <i>IGF2</i> overekspresyonu | 11p15.5 |
| b) H19-susması | <i>IGF2</i> overekspresyonu | 11p15.5 |
| c)Simpson-Golabi-Behmel, tip1 | Glipikan-3 - <i>GPC3</i> geni eksikliği | Xq26 |
| d)Simpson-Golabi-Behmel, tip2 | <i>CXORF5</i> gen mutasyonu | Xp22 |
| 2. IGF-I-Insulin | | |
| a) Obezite | Hiperinsülinizm—serbest IGF-I | |
| b) Lipodistrofi | Hiperinsülinizm | |
| c)Diyabetik anne bebeği | Hiperinsülinizm | |
| d)Neonatal hiperglisemili gigant bebekler | Hiperinsülinizm | |

Tablo 2'nin devamı...

| Büyüme faktörleri – reseptörler | | |
|--|--|------------------|
| a) IGF-1R'nin Trisomisi | Ekstra IGF-IR | 15q duplikasyonu |
| b) CATSHL sendromu | <i>FGFR3</i> 'ün aktif olmayan mutasyonu | 4p16.3 |
| Büyüme durduracak faktörlerin eksikliği | | |
| a) Aromataz eksikliği | Östrojen eksikliği - Mutasyonlar - <i>Cyp19</i> geni | 15q21.1 |
| b) Östrojen reseptör eksikliği | Östrojen eksikliği - Mutasyonlar – <i>östrojen reseptör α</i> geni | 6q25.1 |
| c) Hipogonadizm | Östrojen eksikliği(sekonder) | |
| Kemiklerin uzamasını önleyici faktörlerin eksikliği | | |
| a) Marfan I (MFS1) | Defektif fibrillin geni (<i>FBN1</i>) | 15q21.1 |
| b) Marfan II (MFS2) | <i>TGFBR2</i> mutasyonları | 3p24.1 |
| c) Fibrillinopatiler | Fibrillin gen mutasyonu (<i>FBN1</i>) | 15q21.1 |
| d) Beals (CCA) | <i>FBN2</i> mutasyonu | 5q23-31 |
| e) Homosistinüri tip 1 | <i>CBS</i> gen mutasyonu | 21q23 |
| Hücre döngüsü, büyüme ve tümör baskılanmasının düzenlenmesinde rol oynayan gen değişiklikleri | | |
| a) PTEN hamartom sendromu | <i>PTEN</i> gene mutasyonları | 10q23 |
| b) Bannayan-Riley-Ruvalcaba | <i>PTEN</i> gene mutasyonları | 10q23 |
| c) Cowden hastalığı | <i>PTEN</i> gene mutasyonları | 10q23 |
| d) Lhermitte-Duclos hastalığı | <i>PTEN</i> gene mutasyonları | 10q23 |
| e) Sotos sendromu | <i>NSD1</i> gen mutasyonları | 5q35 |

2.4.1. GİGANTİZM VE AKROMEGALİ

Gigantizm, epifizyal büyüme plakları açıkken aşırı miktarda büyüme hormonu (GH) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) salınımı ile karakterize bir sendromdur. Akromegali ise bu durumun erişkin dönemde, epifizyal büyüme plakları kapandıktan sonra olması durumudur [14]. Aşırı GH üretimi, santral olarak hipofiz adenomu,

hipotalamik tümörlerden(gangliositomlar); periferik olarak pankreas, bronşiyal, karsinoid tümörler tarafından, ya da GHRH'ın ektopik salgılanmasından kaynaklanabilir [95].

Gigantizm, pediatrik bir hastada aşırı büyümeyi belirten spesifik olmayan bir terimdir. Bu nadiren hipofizer gigantizm olarak adlandırılan aşırı büyüme hormonu (GH) üretiminden veya aşırı büyüme ile ilgili bir sendromdan kaynaklanabilir. Hipofizer gigantizm doğuştan veya kazanılmış olabilir. Aynı şekilde, sporadik bir durum olarak veya GH'nin aşırı salgılanmasının potansiyel bir özellik olduğu iyi tanımlanmış bir sendrom bağlamında da ortaya çıkabilir. GH fazlalığının meydana geldiği durumlar arasında Nörofibromatozis Tip 1, McCune-Albright sendromu, Multipl Endokrin Neoplazi Tip 1, Carney Kompleksi, İzole Familial Somatotropinomlar ve X'e Bağlı Akrogigantizm bulunur [17](tablo 4),(şekil 6).

Ayrıca acromegaloidizm denen, çocukları ve yetişkinleri etkileyen nadir heterojen bir bozukluk grubu vardır. Bu durum aşırı GH veya IGF-I üretimi olmadan ve hipofiz adenomu veya hiperplazisi olmadan yüksek boy, aşırı büyüme ve akromegali özellikleri ile karakterize edilir. Klinik bulgular, hipofizer gigantizm ve akromegali hastalarındaki aşırı GH salgılanmasına benzer. Belirtiler, çocuklarda uzun boy ve hızlı büyümenin yanı sıra, akrall genişleme, akromegalik yüz görünümü, baş ağrısı, yorgunluk, hiperhidroz, eklem ağrıları ve hipertansiyonu vakaların% 50'sinden daha fazlasını içerir. GH fazlalığı olmayan ve akromegaloidizmi olan bu hasta grubunun heterojenliğini gösteren çok sayıda hasta tanımlanmıştır [96], [97].

Gigantizm, açık epifizyal büyüme plaklarının aşırı lineer büyümeye izin verdiği durumlarda çocuklukta ortaya çıkan GH fazlalığı anlamına gelir, oysa akromegali erişkinlikte meydana gelen aynı olayı gösterir. [98] Bu iki durum arasındaki diğer bir ayrım, bu bozuklukların genel görülme sıklıkları ile ilgilidir. Akromegali nadir görülen bir durum olup, prevalansı 100.000 kişi başına 2.8 ila 13.7 vaka ve yıllık insidans oranları 0.2 ila 1.1 vaka / 100.000 kişi arasında değişmektedir [99]. Çocukluk ve ergenlik döneminde GH fazlalığı son derece nadirdir, gigantizmin insidansı yaklaşık 8 milyonda birdir ve şimdiye kadar bildirilen toplam vaka sayısı yüzölçümüyle ifade edilecek kadar azdır [100]. Akromegali, yaşamın beşinci on yılında sporadik olarak

ortaya çıkar ve kadınlarda erkeklerden biraz daha sık görülür [101], [102], [103]. Buna karşılık, hipofizer gigantizm ağırlıklı olarak erkekleri etkilemektedir.(%78) [104]. Bu belirgin farkın sebebi bilinmemektedir [15].

2.4.1.1. Gigantizmin Etyopatogenezi

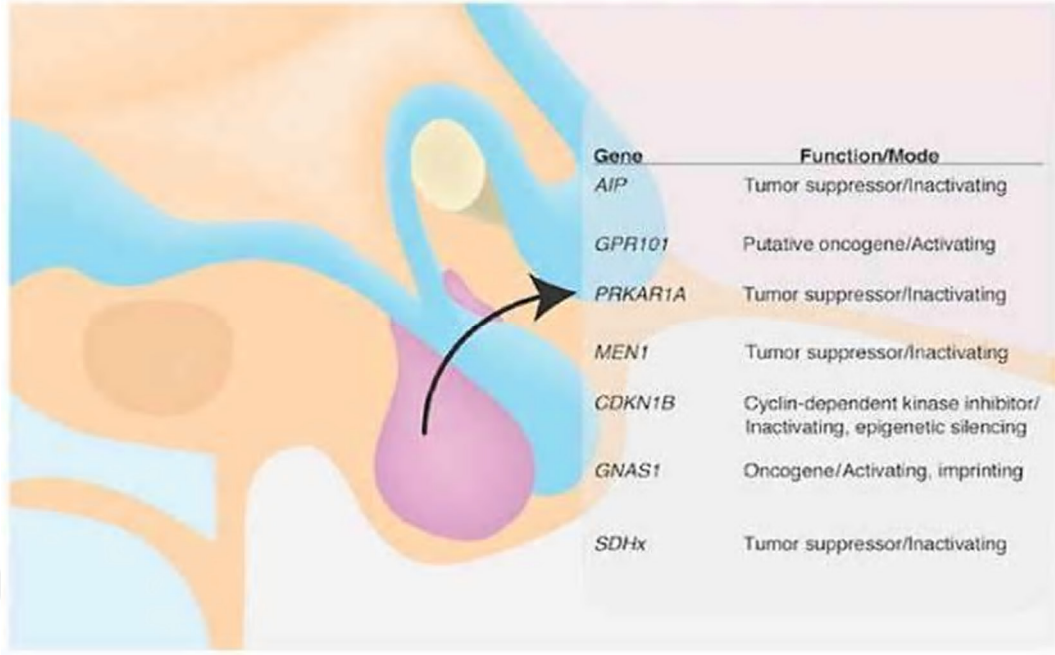
Gigantizme neden olan GH fazlalığının etyolojisi tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Growth hormon fazlalığının etiyolojisi [17]

| Sporadic | | Syndromic/Familial | |
|--|---|---|---|
| Disorder | Source of GH | Disorder | Source or Genetic Mutation |
| Hypothalamic/Pituitary GH excess | Congenital GHRH excess(postulated) | Neurofibromatosis-1 | Tumor infiltration into somatostatinergic pathways(postulated) |
| | Pituitary somatotroph or mammosomatotroph adenoma | McCune-Albright syndrome | Activating mutation of <i>Gsa</i> |
| | Pituitary hyperplasia | Multiple endocrine neoplasia Type-1 and Multiple endocrine neoplasia Type-4 | Defect in tumor suppression from mutations in <i>menin</i> and <i>CDKN1</i> genes |
| | Hypothalamic gangliocytoma/neurocytoma | Carney complex | • Abnormality at 2p16 • Mutations in <i>PRKARIA</i> at 17q22-24 |
| | | 3PA association | Succinate dehydrogenase defects |
| Ectopic GH excess | • GHRH or GH production by bronchial, carcinoid or pancreatic neoplasm Ectopic pituitary adenoma | • Familial somatotrophinomas • X-LAG syndrome | • Mutation in acylhydrocarbon receptor gene at 11q13.3 • Abnormality at 2p12-6 • Xq26.3 • duplications |
| GH-growth hormone, GHRH-growth hormone-releasing hormone, PRKARIA-protein kinase Aregulatory subunit 1 | | | |

Tablo 4. Gigantizm ve akromegali ile ilişkili genetik sendromlar [105]

| Syndrome | Gene | Chromosome | Function | Inheritance |
|--|---|---|-------------------|---|
| Familial isolated pituitary adenoma (FIPA) | <i>AIP</i> | 11q13.3 | Tumor suppressor | Autosomal dominant or sporadic |
| X-linked acrogigantism (X-LAG) | <i>GPR101</i> | Xq26.3 | Putative oncogene | X-linked dominant or sporadic |
| Carney complex (CNC) | <i>PRKARIA</i> | 17q24.2 | Tumor suppressor | Autosomal dominant |
| Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) | <i>MEN1</i> | 11q13.1 | Tumor suppressor | Autosomal dominant or sporadic |
| Multiple endocrine neoplasia type 4 (MEN4) | <i>CDKN1B</i> | 12p13.1 | Tumor suppressor | Autosomal dominant |
| McCune-Albright Syndrome (MAS) | <i>GNAS1</i> | 20q13.32 | Oncogene | Sporadic |
| Paraganglioma, pheochromocytoma, and pituitary adenoma association (3PA) | <i>SDHA</i> <i>SDHB</i> <i>SDHC</i> <i>SDHD*</i> | 5p15.33 1p36.13 1q23.3 11q23.1 | Tumor suppressor | Autosomal dominant or sporadic * <i>SDHD</i> with genomic imprinting |



Şekil 6. Gigantizm ve akromegali ile ilişkili genetik mutasyonlar [105]

2.4.1.1.1. Büyüme hormonu fazlalığının sporadik formları

2.4.1.1.1.a. Hipotalamik-Hipofizer Büyüme Hormonu fazlalığı:

Hastaların çoğunluğunda, hipofiz adenomlarının mevcut olduğu akromegalik erişkinlerin aksine, çocukluk çağı hipersekresyonunun altında yatan çeşitli farklı histopatolojik mekanizmalar önerilmiş veya gözlenmiştir [106]. Bunlar, çocukluk çağındaki GH fazlalığının, hipofiz morfolojisi ve işlevi açısından farklı özelliklere sahip, ayrı bir varlığı temsil ettiği kavramı ile ilgilidir. Bu görüşü destekleyen konjenital gigantizmin ortaya çıkmasında yaygın hipofizer hiperplazi raporları olmuştur, burada konjenital GHRH fazlalığı teşvik edici neden olarak ileri sürülmüştür [107]. GH hipersekresyonunda yüksek GHRH'nin rolü, insan GHRH'sini aşırı eksprese eden transgenik farelerde hipofiz hiperplazisi ve adenomlarının, artan somatik büyümenin ve yüksek plazma GH seviyelerinin bulunmasıyla gösterilmiştir [108]. Ek olarak, erken çocukluk dönemindeki gigantizmin hemen hemen tüm vakalarında, kombine prolaktin ve GH aşırı salgı bulgusu, ayrı bir patolojik sürecin olabileceğini düşündürmektedir. Bu çift hormonal salgı, yetişkinlikte nadir görülen fakat fetal yaşamda baskın olan mammosomatotrofların varlığına bağlanmıştır [109]. Buna karşılık, prolaktin seviyeleri genellikle ergenlik döneminde ortaya çıkan GH salgılayan hipofizer adenomlarda

normaldir ve yetişkin GH hipersekresyonunun spektrumu içinde olduğu düşünülebilir. İlginç bir şekilde, hipofiz somatotroflarının GHRH'ın ektopik aşırı üretimi etkisi altında bihormonal mammosomatotroflara reversibl bir dönüşümü gözlenmiştir, hipotalamik GHRH fazlalığının erken başlangıçlı gigantizmin ortaya çıkmasında önemli bir rol oynayabileceği kavramına ek destek vermiştir [110]. Sporadik gigantizm etiyojisi sıklıkla bilinmemekle birlikte, hipofiz gigantizmi olan çocuklarda ve ergenlerde sendromik ve ailesel GH hipersekresyonuyla ilişkili genlerde bazı germline ve somatik mutasyonlar bildirilmiştir [110], [111].

Santral sinir sistemi patolojisine bağlı sporadik GH fazlalığının diğer bir nedeni de hipotalamik gangliositoma veya nörositomun ortaya çıkmasıdır. Ganglion hücrelerinden oluşan bu nadir tümörlerin, GHRH ürettiği ve hipofiz büyüme hormonu salgılayan adenomlara yakın olduğu görülmüştür [112], [113], [114]. Bazı hastalarda hipotalamik tümörün rezeksiyonunu takiben serum büyüme hormonu seviyelerinin normalleşmesi, bu vakalarda gigantizm veya akromegali gelişiminde anormal GHRH salgılanması için merkezi bir rolü desteklemiştir [115].

2.4.1.1.1.b.Ektopik Büyüme Hormonu fazlalığı:

Ektopik GH hipersekresyonu, tüm vakaların %1'inden daha azını temsil ettiği düşünülen, yetişkinlerde nadir fakat önemli bir akromegali nedenidir [116], [117]. Bu durumda, GHRH veya nadiren GH'nin paraneoplastik bir incelemesi ortaya çıkar, nöroendokrin tümörler en yaygın kaynaktır [118], [119]. Buna sebep olduğu bilinen spesifik lezyonlar bronşiyal karsinoid ve pankreas neoplazmalarını içerir [120], [121]. Ayrıca sphenoid sinüs veya klivus içinde bulunan ve boş bir sella ile birlikte bulunan ektopik bir hipofiz adenomu şeklinde ektopik GH fazlalığı da bildirilmiştir [122], [123].

2.4.1.1.2.Büyüme hormonu fazlalığının sendromik ve ailesel formları:

2.4.1.1.2.a.Nörofibramatozis tip 1:

Nörofibramatozis tip 1, *NF1* geninin, hücre farklılaşması ve çoğalmasının düzenlenmesinde rol oynayan bir protein olan nörofibromini kodlayan 17q11.2 kromozomu üzerindeki mutasyonlardan kaynaklanır. Nörofibromin, bazı hücre

tiplerinde mikrotübüllerle ilişkilidir ve diğer hücre tiplerinde, birçok hücre içi sinyal yolunda kritik bir molekül olan ve hem büyümeyi teşvik eden hem de büyümeyi durduran sinyalleri ileten proto-onkogen RAS'ın negatif bir regülatörü olarak işlev görür [124]. Bazı hastalar (% 2 ila% 4) aşırı derecede uzundurlar ve fazla büyümesi olan hastalarda nörofibromatozis olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır. Bazı durumlarda gigantizm, optik sinir glioma veya hipotalamik tümörden aşırı GH salgılanmasının sonucu olabilir. Aşırı GH üretimi, hipotalamik nöronlar üzerine tümör yerleşimi yoluyla GH salgılanmasının somatostatinerjik inhibisyonunun kaybı yoluyla olabilir [90].

2.4.1.1.2.b.McCune-Albright sendromu (MAS)

MAS, GH fazlalığının ilave endokrinopatiler ve diğer anormallikler ile birlikte ortaya çıkabileceği karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Klasik formdaki MAS'da, puberte prekoks, cafe-au-lait lekeleri ve kemiğin fibröz displazisi görülür. Bununla birlikte, MAS'lı bireylerin, aşırı büyüme hormonu salgılanmasından kaynaklanan gigantizm veya akromegali dahil olmak üzere bir dizi endokrin problemi geliştirme eğiliminde oldukları bilinmektedir [125].

Hücre içi sinyallemede yer alan heterotrimerik G-protein kompleksinin uyarıcı alt birimi olan Gs alfa'nın aktive edici mutasyonlarının, MAS'ın hemen hemen tüm klinik belirtilerine temel oluşturduğu gösterilmiştir [126]. Klasik MAS'ta GH fazlalığının görülme sıklığının genellikle% 15-21 olduğu ve erkeklerde daha yaygın olabileceği bildirilmiştir [127]. MAS'taki büyüme hormonu fazlalığına tipik olarak kafa tabanı fibröz displazisi eşlik eder ve artmış kraniyofasiyal morbidite ve makrosefali ile ilişkilendirilmiştir [128].

2.4.1.1.2.c.Multipıl Endokrin Neoplazi Tip I (MEN-1):

MEN-1, otozomal dominant kalıtım gösteren ve çoklu endokrin bez tutulumu ile karakterize birçok ailesel kanser sendromundan biridir. Spesifik tümör kombinasyonları açısından önemli klinik heterojenite olmasına rağmen, MEN-1'in en sık görülen belirtileri paratiroid, pankreas ve hipofiz adenomlarıdır [129]. Daha önce kromozomal lokus 11q13 de haritalanmış olan *MEN-1* geninin, menini kodladığı gösterilmiştir [130]. Menin geni içindeki birçok farklı moleküler genetik anormallik MEN-1 li ailelerde

tanımlanmıştır [131]. Somatik biallelik *MEN-1* mutasyonlarının, somatotrof tümörleri içeren sporadik hipofiz adenomlarının en az %15'inde mevcut olduğu gösterilmiştir [132]. MEN-1 olduğu bilinen bireylerde ön hipofiz adenomlarının %10-60 oranında bildirilmiş prevalansa sahip olduğu ve sporadik vakaların %25'inde hastalığın ilk klinik belirtisini temsil ettiği düşünülmektedir [133].

2.4.1.1.2.d. Multipl Endokrin Neoplazi-Tip IV (MEN-4):

MEN-4, varsayılan tümör baskılayıcı p27Kip1'i kodlayan *CDKN1B* genindeki germ hattı mutasyonlarının neden olduğu yakın zamanda tanınan bir durumdur [134]. Etkilenen hastalar tipik olarak *CDKN1B*'deki mutasyonlar için heterozigottur ve MEN-1'de görülene benzer bir fenotip sergilerler [135].

2.4.1.1.2.e. Carney Complex (CNC):

İlk olarak 1985 'de tarif edilen CNC, kardinal özelliklerin çoklu endokrin tümörleri, cilt lezyonlarını, kardiyak miksomları ve sinir kılıfı tümörlerini içerdiği nadir bir otozomal dominant hastalıktır. CNC'nin klinik sunumu, tanı yaşı gibi oldukça heterojendir. GH fazlalığının gelişimi nadir görülür, genellikle yaşamın 3. ve 4. yıllarında görülür ve hastaların sadece %10'unda bulunur [136].

2.4.1.1.2.f. 3PA Asosiasyonu:

Paraganglioma, feokromositoma ve hipofiz adenomunun birlikteliği 3PA asosiasyonu olarak adlandırılır ve çeşitli süksinat dehidrojenaz alt birimlerindeki germ hattı mutasyonlarına bağlı olduğu gösterilmiştir [137]. Büyüme hormonu fazlalığı tipik olarak yaşamın 3. ve 4. dekatında görülür [138].

2.4.1.1.2.g. Ailesel Somatotropinomlar:

“Ailesel İzole Hipofiz Adenomları” (FIPA) olarak adlandırılan bu fenomende GH fazlalığı, yaşamın oldukça erken yaşlarında ortaya çıkma eğilimindedir [139]. 11q13.3'te *AIP*(aril hidrokarbon reseptörü ile etkileşime giren protein) geni vakaların çoğundan sorumlu tutulmaktadır [140], [141], [142].

2.4.1.1.2.h.X'e Bağlı Akrogigantizm:

Xq26.3 mikroduplikasyonu barındıran hastalar, ortalama 12 aylık başlangıç yaşı ile dikkat çekici bir şekilde erken gigantizm ile karakterize belirgin bir fenotip sergiler. GH'nin aşırı salgılanmasına ek olarak, dolaşımdaki yüksek GHRH ve prolaktin de kaydedilmiştir [143].

2.4.1.2. Gigantizmde Klinik Bulgular

Tahmin edilebileceği gibi, doğrusal büyüme ivmesi aşırı GH üretiminin temel özelliğidir. Bununla birlikte, çok sayıda vaka raporuna dayanarak, gigantizmlü küçük çocuklarda gözlenen aşırı lineer büyümenin makrosefali ve / veya obezite ile birlikte olabileceği ve hatta bundan önce gelebileceği söylenebilir [109], [144]. Sıkça karşılaşılan ek klinik özellikler arasında frontal bossing, geniş burun köprüsü, prognatizm, aşırı terleme, iştah artışı, kaba yüz özellikleri ve ellerin ve ayakların genişlemesi bulunur [17].

2.4.1.3. Gigantizmde Tanı

GH fazlalığının teşhis edilmesinde altın standart, oral glikoz yüklemesinin ardından serum GH'nin uygun bir seviyeye bastırılmamasına dayanır. Teşhis, GH'nin aşırı salgılanmasının yanı sıra sella genişlemesi ile birlikte bir hipofiz adenomu veya hipofiz hiperplazisinin varlığının gösterilmesine dayanır [145], [146]. Aşırı GH salgılamasının teşhisi için yapılan kesin test, serum GH'nin oral glikoz yükünden sonra (75 veya 100 g) 1 ng / mL'nin altına düşmemesidir. Normal kilolu bireyler serum GH konsantrasyonunu 1 ng / mL'nin altına düşürür [90]. Bazen, 24 saatlik entegre GH değerlendirmesi, OGTT'ye şüpheli bir yanıtın görüldüğü durumlarda yardımcı olabilir [147]. Bireysel duruma bağlı olarak, ektopik GHRH salgısı olasılığını araştırmak için periferik GHRH ölçümü de belirtilebilir. GH fazlalığının biyokimyasal kanıtı gösterildiğinde, MRI taraması bir sonraki adımdır [17].

Serum IGF-I konsantrasyonu duyarlı bir tarama testidir ve normalin yaklaşık 4-10 kat üstüne çıkar [90]. Normal ergenleri değerlendirirken potansiyel bir karışıklık ortaya çıkabilir, çünkü ergenlik döneminde normale göre anlamlı derecede yüksek IGF-I

seviyeleri ortaya çıkar [148]. Ayrıca, normal çocuklarda oral glukoz yüküne büyüme hormonu tepkisi cinsiyete ve pubertal evreye özgü olarak bulunmuştur, en yüksek GH piki, Tanner 2-3 evresindeki kız çocuklarında görülür [149]. Bu nedenle, GH fazlalığı için hem tarama hem de kesin testler klinik şüphe bağlamında yapılmalı ve IGF-1 düzeyleri yaşa ve pubertal evre tarafından ayarlanan normal aralıklara göre yorumlanmalıdır [17].

2.4.1.4. Gigantizmde Tedavi

Yetişkinlerde olduğu gibi, GH hipersekresyonu olan çocuk ve ergenlerin tedavisi için mevcut üç ayrı yöntem cerrahi, radyasyon ve medikal tedavidir. Bireysel tedavi stratejisinden bağımsız olarak, tedavinin hedefleri aynı kalır, yani GH ve IGF-1 seviyelerinin normal sınırlara getirilmesidir [150]. Transsfenoidal cerrahi, tercih edilen bir tedavi yöntemidir. Eğer GH sekresyonu ameliyatla normalleştirilmezse, seçenekler arasında hipofiz radyasyonu ve octreotid (uzun etkili somatostatin analogu) veya bromokriptin veya her ikisi ile yapılan medikal tedavi yer alır. Ameliyat öncesi octreotid, adenomun boyutunu azaltmak için faydalı olabilir [151]. Yeni bir terapi şekli, GH reseptörü için doğal GH ile rekabet eden bir GH reseptörü antagonisti olan pegvisomant'ın kullanılmasıdır [145].

DİĞER AŞIRI BÜYÜME DURUMLARI

2.4.2. Trizomi X (47, XXX kadın)

Trizomi X hastaları uzun olma eğilimindedir. Hastaların çoğunda normal bir fenotip vardır, bazı hastalarda minimal dismorfik özelliklere rastlanabilir(klinodaktili, sindaktili gibi) [90].

Uzun boylu olma eğiliminin nedeni muhtemelen ekstra X kromozomudur. Birçok gözlem tek X (45, X) ve Xp'nin delesyonunun, özellikle de Xp'nin terminal delesyonunun kısa boylanmaya yol açtığını ve ek X kromozomlarının bu kaybı telafi edebileceğini açıkça göstermiştir. Rao ve arkadaşları, X ve Y insan seks kromozomlarının psödootozomal bölgesinde (PAR1), *SHOX* (kısa boy homeobox içeren gen için) olarak adlandırdıkları bir geni izole ettiler [152]. Kanıtlar, *SHOX* yokluğunda

Xp ucunun delesyonunun, kısa boy ve kısa sürede aktif hale gelmesi ve aktif olmayan X kromozomlarının, aktif büyüme genlerinin (*SHOX*) inaktivasyondan kaçmasıyla sonuçlanabileceğini, Klinefelter sendromu ve trizomi X'deki gibi uzun boylu olmaya neden olabileceğini göstermektedir [153].

2.4.3. Klinefelter Sendromu (47, XXY)

Bu sendrom; jinekomasti, boy uzunluğu, kusurlu virilizasyon, küçük testisler, küçük penis, mental retardasyon eğilimi ve gonadotropinlerin idrarla atılımının artması ile karakterize bir durumdur. Uzun boy genellikle ergenlikten önce vardır. Bu durum, bu özelliğin androjen eksikliği ile ilişkili olmadığını ve trisomi X'deki gibi ekstra X kromozomu (ekstra *SHOX*) ile ilişkili olabileceğini gösterir [90].

2.4.4. 47, XYY Erkek

47, XYY erkeklerde yüksek boylanmanın, ilave Y kromozomu üzerindeki ekstra büyüme genleri olan *SHOX* veya *GCY* (Growth control in the Y) genleriyle ilişkili olduğunu gösterilmiştir [154].

2.4.5. Frajil X Sendromu

Frajil X sendromu, en yaygın kalıtsal zihinsel gerilik şeklidir. DNA segmentinde, Xq27.3'teki X kromozomunun spesifik DNA fragmanının boyutunu artıran, frajil X zihinsel geciktirme geni 1'de (*FMR1*) trinükleotit tekrarlarının ([CGG]) artışı görülmektedir. Fragil X sendromu, CGG artışı olmadan *FMR1* geninin delesyonları ve nokta mutasyonları olan hastalarda da ortaya çıkabilir [155], [156]. Genç frajil X pozitif kızlarda, en yaygın ve en önemli iki bulgu, doğumdan itibaren görülen aşırı büyüme, şiddetli dikkat problemleri, aşırı çekingencilik ve endişe dahil davranışsal özelliklerdir. Erkeklerde en tipik özellikler zihinsel gerilik, uzun boy, büyük kulaklar ve makroorşidizmdir; hastaların yaklaşık yarısı normalin yüzde 90'ının üzerinde kulak uzunluğuna sahiptir. Aşırı büyümenin nedeni bilinmemektedir [90].

2.4.6. Kromozom 22q13.3 Delesyon Sendromu

Terminal 22q13.3 delesyon sendromu, neonatal hipotoni, gelişimsel gecikme, normalden hızlı büyüme, ciddi şekilde konuşma geriliği, otistik davranış ve minör dismorfik özellikler ile karakterizedir (omim#606232).22q13 terminal delesyonu olan hastalar genel olarak aşırı büyümeye meyilliyken, ring 22 olan hastalar sıklıkla büyüme yetersizliği göstermiştir. Büyümenin nedeni bilinmemektedir [90].

2.4.7. Aşırı Beslenme (Obezite)

Obezite ile ilişkili yüksek boy ve artmış büyüme hızlarına muhtemelen insülin ve IGF-I aracılık eder. Obez çocuklar, normal kilolu bireylere kıyasla, baskılanmış GH salgılanmasına rağmen, değişken fakat genellikle normal ila yüksek plazma IGF-I konsantrasyonuna sahiptir. Hiperinsülinemi, obezitede tutarlı bir bulgudur ve insülin, IGF tip 1 reseptörünü aktive ederek uzama hızının artmasına neden olabilir. Ek olarak insülin, IGFBP-1'in ana düzenleyicisidir. Hiperinsülinemi IGFBP-1'i azaltır ve bunun sonucunda serbest IGF-I'de bir artış olur. Orta ve şiddetli obezite ve kontrol grubundaki hastaların çalışmaları, erkek ve kadınlarda insülin artışı, IGFBP-1'deki azalma ve serbest IGF-I'deki artışı göstermiştir [157], [158]. Bu nedenle, obez çocukların artan büyüme hızları büyük olasılıkla hiperinsülinemi ve artmış serbest IGF-I'in sonucudur.

2.4.8. IGF-I Reseptörünün Trizomisi

IGF-I reseptörünün trizomisi birkaç çocukta bildirilmiştir ve sıklıkla uzun boy ve zeka geriliği ile ilişkilidir. 2002 yılında, Faivre ve arkadaşları aşırı büyümüş ve kromozom 15 in uzun kolunun terminal duplikasyonu ile başvuran iki bağımsız aileden dört çocuğu bildirmişlerdir [159]. Her iki durumda da, ebeveynlerin kromozom analizi 15q26.1-qter içeren dengeli bir translokasyon göstermiştir. Moleküler ve sitogenetik çalışmalar, *IGF1R* geninin üç kopyasını gösterdi; bu, bu hastalarda gözlenen aşırı büyümenin, 15q terminal delesyonu olan hastalarda görülen ciddi büyüme geriliği aksine, *IGF1R* geninin bir dozaj etkisiyle nedensel olarak ilişkili olabileceğini ortaya koydu. Bu hastalar spesifik bir fenotipe sahiptir. Doğumda makrozomi, aşırı büyüme, makrosefali,

bazılarında kraniyosinostoz ve hafif gelişimsel gecikme majör klinik özelliklerdir [160], [161], [162].

IGF1R'nin üç kopyası olan bir hastadan alınan deri fibroblastları ve *IGF1R*'nin sadece bir kopyasına sahip bir denekten alınan hücrelerin, kontrollere kıyasla daha yavaş büyüme gösterdiğini gösterdi. *IGF1R* geninin üç kopyası olan çocuk uzundu. Bu bulgular ve yukarıda belirtilen raporlar, *IGF1R* gen kopya sayısının insanlarda fonksiyonel ve klinik öneme sahip olduğu ve aşırı büyümeden sorumlu olduğu kavramı ile tutarlıdır [162].

2.4.9. Bozulmuş FGFR3 - CATSHL Sendromu

Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3 (*FGFR3*), beş ayrı membranı kapsayan tirozin kinazdan biridir ve endokondral kemik büyümesinin negatif bir regülatörüdür. *FGFR3* mutasyonları; akondroplazi, hipokondroplazi, tanatoforik displazi gibi iskelet displazileri ile ilişkilidir. Anormal *FGFR3* sinyalleri, endokondral kemik gelişimini inhibe etmenin yanı sıra teşvik ederek de birtakım anomalilerine neden olabilir. Son zamanlarda, Toydemir ve arkadaşları, *FGFR3*'ü inaktive eden, kamptodaktili (%90), uzun boy (%100), skolyoz ve işitme kaybı (%85) (CATSHL sendromu) ile karakterize bir sendroma neden olan yeni bir mutasyon bildirmiştir. Bu durumun baskın bir negatif mekanizma ile *FGFR3* fonksiyonunun kaybına neden olduğu ileri sürülmüştür [163].

2.4.10. Lipodistrofi

Lipodistrofi, adipoz doku depolarının genel veya kısmi yokluğu, insülin direnci, hiperinsulinemi, hiperlipidemi ve ketotik olmayan diabetes mellitus ile karakterize nadir bir hastalık grubunu içerir. Transgenik farelerde ve insanlarda yapılan son gözlemler, insülin direncinin, hiperinsulinemi ve diyabetin, yağ eksikliğinden ve bunun sonucunda leptin ve adiponektin, peptidlerin (adipositokinler) eksikliğinin, insülin duyarlılığını ve enerji dengesini etkileyebileceğini göstermiştir. Leptin, gıda alımını, enerji tüketimini ve nöroendokrin fonksiyonunu düzenlemede önemli bir rol oynar. Konjenital otozomal resesif jeneralize lipodistrofisi olan hastalarda gigantizm; artan büyüme hızı; akromegaloid özellikler; büyük eller, ayaklar ve kulaklar; belirgin mandibula ve ileri

kemik olgunlaşması mevcuttur. Doğuştan veya doğum sonrası makrozomik olabilirler. Hipertrofi, kas hipertrofisinden, polikistik over sendromundan ve artan lineer büyümeden sorumlu olabilir [90].

2.4.11. Prepubertal Seks Hormonu Fazlalığı

Etyolojiden bağımsız olarak androjen veya östrojenlerin prepubertal salgılanmasındaki artış salgılanmasındaki artış, lineer büyümeyi ve iskelet gelişimini hızlandırır ve cinsel gelişmeyi tetikler [90].

2.4.12. Cinsiyet Hormonu Eksikliği veya Direnci

Erkeklerde testosteronun ve kadınlarda östrojenin kalıcı eksikliği, uzun bacaklar ve düşük üst alt segment oranlarına, gecikmiş iskelet olgunlaşması, uzun büyüme periyodu, uzun boy ve önükoid oranlarına neden olur. Bu, elbette, GH eksikliği, Turner sendromu veya doğrusal büyümeyi etkileyen başka herhangi bir bozukluğun bulunmaması koşuluyla geçerlidir [90].

2.4.13. Aromataz Eksikliği - Östrojen Direnci

Son zamanlarda, aromataz eksikliğinin bir sonucu olarak östrojen eksikliği olan, *CYP19* genindeki mutasyonlar veya östrojen direncinin bir sonucu olarak östrojen reseptör geninin alfa (*ERα*) mutasyonunun bir sonucu olarak az sayıda erkek ve kadın hasta tanımlanmıştır [164], [165], [166].

Östrojen veya östrojen etkisinin olmaması nedeniyle, epifizlerin kapanması belirgin bir şekilde geciktirilir, büyüme süresi uzar ve hastalar aşırı uzun boylu hale gelir [165].

2.4.14. Ailesel Glukokortikoid Eksikliği

Ailesel glukokortikoid eksikliği, ACTH'ye cevap vermeyen nadir görülen otozomal resesif bir hastalıktır. Uzun boy ve ileri kemik yaşı sık rastlanan bulgulardır. Bu durum, dolaşımdaki yüksek ACTH seviyelerinin varlığında glukokortikoid eksikliği ile karakterize edilir [167]. Hastalar genellikle bebeklik döneminde veya erken çocukluk

döneminde hiperpigmentasyon, normal serum elektrolitleri, hipoglisemik dönemler, kusma, gelişememe veya / ve olağandışı şekilde enfeksiyon veya strese cevap vermeleriyle tanınırlar. Semptomların başlangıç yaşı ve hastalığın klinik şiddeti değişiklik gösterir. Bu hastalarda aşırı GH salgılanmasına dair kanıt yoktur ve IGF-I ve IGFBP-1'in serum seviyeleri normaldir. Kemik yaşı ilerlemiştir. Uzun boylu olmalarının nedeni açıkça bilinmemektedir. Kortizolün büyümeyi inhibe edici etkisinin olmamasından veya adrenal androjenlerin bulunmamasından ve kıkırdak büyüme plakası üzerindeki etkilerinden dolayı olabileceği düşünülmektedir [90].

2.4.15. Marfan Sendromu tip 1 ve tip 2 (MFS1, MFS2)

Marfan sendromu, 10.000 kişiden 2 ila 3'ünü etkilediği tahmin edilen; iskelet, kardiyovasküler ve oküler sistemleri ve ayrıca lumbosakral spinal kanalın dural ektazisini etkileyen kalıtsal bir bağ dokusu bozukluğudur. İskeletle ilgili klinik bulgular, uzun boylu, uzun kollar ve bacaklar (dolikostenomyeli), araknodaktili, pektus excavatum veya karinatum ve dar damağı içerir. Hastaların% 60 ila% 100'ünde skolyoz / kifoz mevcuttur. Marfan sendromunda (MFS tip 1) temel kusur, fibrilin genindeki bozukluktur. Sorumlu gen ise *FBN1* genidir. Ayrıca 2004'te *TGFBR2* genindeki mutasyonlar MFS'li hastalarda (MFS tip 2) tanımlanmış ve vakaların% 10'undan sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür [168].

2.4.16. Beals Sendromu (Doğumsal Kontraktürel Araknodaktili)

Beals sendromunun iskelet özellikleri, uzun ince bacaklar ve araknodaktili olması sebebiyle Marfan sendromuna benzer. Bu, kromozom 5q23-31 de fibrillin genindeki (*FBN2*) bir mutasyonun neden olduğu otozomal dominant kalıtılan bir hastalıktır [169].

2.4.17. Homosistinüri tip 1

Homosistinüri, sistatyonin beta-sentaz enzimi eksikliğinden dolayı metiyoninin metabolizmasının etkilendiği kalıtsal bir bozukluktur [170]. Klinik bulgular, bazı farklılıklar olmakla beraber Marfan sendromuna benzerdir [171].

2.4.18. Beckwith-Wiedemann Sendromu

Bu sendromda en karakteristik özellikleri olan doğum öncesi ve doğum sonrası aşırı büyüme durumu vardır. Bunun yanı sıra makroglossi omfalosel veya göbek defektleri olabilecek diğer bulgularıdır. Büyüme hızı genellikle 4-6 yaşına kadar yüzde 90'ın üzerinde ve daha sonra normaldir. BWS, 11p15 kromozomal bölgesinde, büyüme ve hücre döngüsü kontrolünde yer alan, imprinted genlerin ekspresyonundaki değişikliklerden kaynaklanan, karmaşık ve heterojen bir genetik hastalıktır [172].

IGF-II, fetal büyüme için önemli bir büyüme faktörüdür. Farelerde yapılan transgenik deneyler, fonksiyonel paternal IGF-II alelinin kaybının, %40 oranında doğum öncesi büyüme geriliği ile sonuçlandığını göstermiştir [173]. IGF-II 'nin aşırı ekspresyonu, BWS semptomlarının çoğuna yol açabilir [174], [175]. Beckwith-Wiedemann'daki aşırı büyüme özellikle IGF-II bakımından zengin organlarda görülür. IGF-IR, hem somatik büyüme hem de hücre proliferasyonunun ana düzenleyicileri olan IGF-I ve IGF-II tarafından aktive edilir. IGF-II'nin aşırı ekspresyonu, doğum öncesi ve doğum sonrası aşırı büyümeye neden olur. Ek olarak, IGF-II baskısı sporadik Wilms tümörlerinde kaybolur, bu da IGF-II aşırı ekspresyonunun aşırı büyümeden ve tümörlerin gelişmesinden sorumlu olduğunu düşündürür [176].

2.4.19. Simpson-Golabi-Behmel Sendromu, tip 1 ve 2

Bu sendrom, doğum öncesi ve doğum sonrası aşırı büyüme, sıradışı yüz görünümü (geçmişte bulldog sendromu olarak tanımlanmıştır), makrosefali ve parmak anomalileri ile karakterize X'e bağlı resesif bir hastalıktır [177]. Bu sendrom, *GPC3* geninin farklı mutasyonları veya mikrodelesyonlarından kaynaklanır [178]. Membrana bağlı bir protein olan GPC-3, IGF-II ile etkileşime girer ve IGF-II'nin modülasyonunda önemli olabileceği embriyonik mezodermal dokularda seçici olarak eksprese edilir.

2.4.20. Sotos Sendromu

Bu sendromda başlıca tanısal özellikler; ayırt edici bir yüz konfigürasyonu, makrosefali, aşırı büyüme ve öğrenme güçlüğüdür [179].

Otozomal dominant kalıtılan bu sendromda vakaların çoğu sporadiktir (%85). 2002 yılında Kurotaki ve arkadaşları, sporadik vakaların %75'inde 5q35 kromozomunda bulunan *NSDI* delesyonlarını veya nokta mutasyonlarını tanımlamıştır. [180] Sotos sendromunda *NSDI* delesyon ya da nokta mutasyonlarının aşırı büyümeye neden olduğu bulgusu, *NSDI*'in büyümeyi destekleyen genlerin koruyucusu olarak hareket ettiğini gösterir.

2.4.21. Weaver Sendromu

Weaver sendromu, doğum öncesi ya da doğum sonrası aşırı büyüme olağandışı yüz görünümü, ilerlemiş iskelet olgunlaşması ve kamptodaktili ile karakterizedir [181].

Aşırı büyüme doğumda bulunur veya bebeklik döneminde başlar. Özelliklerin çoğu Sotos sendromuna benzer.[182] *EZH2* geni ile ilişkili aşırı büyümeye sahip kişilerde tanımlamıştır [183].

2.4.22. Nevo Sendromu

Nevo sendromu artmış doğum uzunluğu, kifoz, kas hipotonisi ve eklem gevşekliği ile karakterize otozomal resesif nadir bir hastalıktır. Sadece birkaç vaka bildirilmiştir [184].

2.5. GENLER

2.5.1. Growth hormone 1 (*GHI*)

İnsan GH, hipofiz bezinden salgılanan 191 amino asidli, 22-kDa luk bir polipeptiddir [185]. Bu gen tarafından kodlanan protein, büyüme kontrolünde önemli bir rol oynayan somatotropin / prolaktin hormon ailesinin bir üyesidir. Somatotropin ailesi, temsilcileri büyüme hormonu olarak da bilinen somatotropin olan, beş genden oluşan bir protein ailesidir [186]. Diğer dört gen ile birlikte *GHI* geni, kromozom 17 üzerindeki büyüme hormonu lokusunda bulunur (17q22-24'te). Beş gen, oldukça yüksek derecede bir dizi benzerliği taşır [187]. *GHI* hipofizde eksprese edilirken, diğer dört gen plasental dokuda eksprese edilir [188]. Fare *GH* geni ise 11.kromozomda bulunmaktadır [189].

GH kodlayan genetik lokus, insan kromozomu 17q24.2'de bulunur. 46.83 kilobaz içerir ve *GH* ile ilişkili 5 gen içerir [187]. Bu kümedeki genlerin gen çoğalmasıyla ortaya çıktığı düşünülmektedir. İki tanesi 2 farklı *GH* varyantını kodlar ve *GHI* (veya *GH-N*) ve *GH2* (veya *GH-V*) olarak adlandırılır. Diğer ikisi, plasental laktojen (*PL*) olarak da bilinen ve koryonik somatomammotropini (*CS*) kodlar ve *CS1* (veya *CSA*) ve *CS2* (veya *CSB*) olarak adlandırılır. Olgun protein ürünleri aynıdır, yani *CS*. Kümedeki beşinci gen, *CSL* adında düşük seviyelerde eksprese edilen ve verimli bir şekilde çevrilemeyen bir *CS* benzeri protein kodlar. Bu genin / psödojenin fonksiyonu - ya da olmayan - fonksiyonu yıllardır tartışılmaktadır, ancak belirsizliğini korumaktadır. Kümedeki 5 genin her biri 5 ekzon ve 4 introndan oluşur. *GHI* ise geni, hipofiz somatotrop hücrelerinde ifade edilirken; *GH2*, *CS1* ve *CS2* plasentada eksprese edilir.

GH geninin proteini olan somatotropin (Growth hormon), büyüme kontrolünde önemli bir rol oynar. Vücut büyümesini teşvik etmedeki ana rolü, karaciğer ve diğer dokuları *IGF-1* salgılaması için uyarmaktır. *GH* hemen hemen tüm hücrelerde bulunan reseptörü aracılığıyla davranır. Myoblastların farklılaşmasını ve çoğalmasını uyarır. Aynı zamanda kas ve diğer dokularda amino asit alımını ve protein sentezini uyarır. Yağ lipolizini, doğrusal ve radyal kemik büyümesini ve kemik mineralizasyonunu artırır [12].

2.5.2. Insulin Like Growth Factor 1 (*IGF1*)

Fare *IGF1* geni, 10.kromozom üzerinde bulunan 12 ekzonlu bir gendir. İnsandaki *IGF1* geni ise 12.kromozomun uzun kolunda 12q23-23 bölgesinde bulunur [190], [191].

Bu gen tarafından kodlanan protein, fonksiyon ve yapı olarak insüline benzer ve büyüme ve gelişmeye aracılık eden protein ailesinin bir üyesidir. Plazmadan izole edilen insülin benzeri büyüme faktörleri, yapısal ve işlevsel olarak insülin ile ilişkilidir, ancak daha yüksek bir büyüme destekleyici aktiviteye sahiptir. Osteoblastlarda glukoz taşınımı ve glikojen sentezinin fizyolojik bir düzenleyicisi olabilir. Osteoblastik hücrelerde glukoz taşınmasını uyarır ve sadece glikojen ve DNA sentezi için değil, aynı zamanda glukoz alımını arttırmada da insülininden çok daha düşük konsantrasyonlarda etkilidir. Sinaps olgunlaşmasında rol oynayabilir [192], [193].

İnsülin Benzeri Büyüme faktörleri (IGF) genellikle lokal olarak etki gösteren ve spesifik hücrelerde büyümeyi uyaran, primer aminoasid dizilimleri birbirlerine ve insan proinsüline benzeyen küçük peptidlerdir. Yapısal ve fonksiyonel olarak growth faktörler ailesi içerisinde yer alır. Kısmen büyüme hormonuna bağımlı ve GH'nın anabolik ve mitojenik etkilerinden birçoğuna aracılık eden bir peptid grubudur. IGF-1, growth hormonun büyümeyi hızlandırmada major mediatörü olarak görev alan ve 7647 dalton ağırlığında 70 amino asitten oluşan küçük bir peptittir [194]. Postnatal yaşam boyunca dolaşımda anlamlı seviyelerde bulunur ve insüline benzer dozlarda glukoregülatuar ve mitojenik özellik gösterir. IGF-2 de yapısal olarak IGF-1'e benzer fakat başka bir gen tarafından kodlanmıştır. IGF-1, GH'nun kontrolü altında karaciğerde sentez edilir ve kana sekrete edilir. IGF-1 kemik gibi periferel dokularda da otokrin/parakrin sentezlenir. IGF-1 ve -2'nin birbirinden ayrı reseptörleri vardır. İnsülin ve IGF-1 reseptörleri yaklaşık olarak %38 oranında benzerlik gösterir. IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP) altı yüksek afiniteli protein ailesinin bir üyesidir. IGF-1 ve -2 için afinitesi, IGF-1 reseptörlerinden daha fazladır. IGFBP'lerin başlıca fonksiyonu hedef dokulara IGF taşınmasıdır. IGFBP-3 plazmada en fazla bulunanıdır ve IGF-1 için afinitesi en yüksek olanıdır. Genellikle doymuş durumdadır [195].

IGF'ler, bugüne kadar incelenen tüm omurgalılarda büyüme ve gelişme için kritik öneme sahiptir [196]. Örneğin, IGF-I veya IGF-II nakavt farelerin doğum ağırlığı, kontrollerinin yaklaşık %60'ı kadardır. Hem IGF-I hem de IGF-II'de boş mutasyonlara sahip fareler, doğumda kontrollerinin %30'una sahip bir vücut ağırlığına sahiptir ve bundan kısa bir süre sonra ölürlere [197], [198]. Farelerde IGF-I'in aşırı ekspresyonu vücut ağırlığını %30 arttırır [199]. Baskılama kaybından kaynaklanan IGF-II aşırı ekspresyonu sıklıkla somatik aşırı büyüme ile ilişkilidir [200], [201].

Memelilerde, lineer büyüme IGF sistemi tarafından, fetal periyotta IGF-I ve IGF-II ile düzenlenir ve IGF-I, doğum sonrası dönemde somatotropik eksen içine dahil edilir [202].

2.5.3. Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH)

Fare GHRH geni 2.kromozom üzerinde lokalize olmuştur. Bu gen, glukagon protein ailesinin bir üyesini kodlar. Kodlanmış preproprotein, hipotalamusta üretilir ve hipofiz

bezinden büyüme hormonu salınımını uyarmaya yarayan somatoliberin (GHRH) olarak bilinen olgun faktörü oluşturmak için ayrılır. Somatoliberin için varyant reseptörleri, çeşitli tümör türlerinde bulunmuştur ve bu reseptörlerin antagonistleri, tümörlerin büyümesini inhibe edebilir. Bu gendeki kusurlar cücelik nedenidir, kodlanmış proteinin aşırı salgılanması ise bir devlik nedenidir (genecards).

2.5.4. Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5 (IGFBP5)

Sıçan ve farenin *IGFBP5* genleri yaklaşık 17 kb lık, dört ekzon ve üç intron içeren ve 1.kromozom üzerinde lokalize olan bir gendir [203]. İnsan *IGFBP5* geni ise, toplam 33 kb'lık bir gen büyüklüğü ile, kemirgen kardeşinden biraz daha büyüktür [204]. *IGFBP5* geninin uzunluğu 33 kb'dır ve insanlarda kromozom 2'nin üzerinde bulunur. Dört ekzon içeren bu gen, insanlarda çeşitli dokularda eksprese edilen yaklaşık 29 kDa çözünür bir proteini kodlar. *IGFBP5* geni, *IGFBP2* geni ile aynı kromozomda bulunur [205].

İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-5 (IGFBP-5), IGFBP ailesinin bir üyesidir [206]. IGFBP-5, kemik, yumurtalık, meme bezi ve böbrek fizyolojisi gibi çeşitli biyolojik işlemlerde önemli bir rol oynamaktadır [207]. IGFBP-5'in işlevi temel olarak hücre büyümesi üzerinedir; protein hücre çoğalmasını baskılamakta veya indüklemektedir [208], [209], [210], [211]. Ek olarak, trombospondin-1 [212], osteopontin [212], vitronektin [213] ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 [214] dahil çeşitli hücre dışı matris proteinleri ile etkileşime girer. Son birkaç yılda, IGFBP-5'in hücre sağkalımı üzerindeki etkisinin, spesifik çözünür veya hücre ile ilişkili ligandlarla etkileşimlere dayandığı görülmüştür [206], [215].

IGFBP-5, IGFBP'lerden en çok korunandır ve birkaç anahtar hücre soyunun, örneğin miyoblastların ve sinir hücrelerinin gelişimi sırasında odak düzenleyici bir faktör olarak vurgulanmıştır. Farelerde, *IGFBP5* embriyoda, erken gelişmeden, temel olarak somitlerin miyotomal bileşeninde ve gelişmekte olan merkezi sinir sisteminde eksprese edilir. Doğum sonrası, serum IGFBP-5, IGFBP-3 ile ortak olarak, IGF-I veya IGF-II ve asit kararsız alt ünite ile üçlü bir kompleks oluşturur. Agresif pediatrik kanser, rabdomiyosarkomda *Igfbp5* yukarı regüle edilir prostat kanserinin androjen

bağımsızlığına ilerlemesinde ve düz kas türevli uterin leiomyomda, neoplazide bir işlevi olduğunu gösterir [216].

2.5.5. Growth Hormone Receptor (GHR)

Bu gen, büyüme hormonu için bir transmembran reseptörü olan bir proteini kodlar [217], [218]. Büyüme hormonu reseptörü (GHR), 30'dan fazla reseptör içeren sınıf I sitokin reseptörü ailesinin bir üyesidir [219]. Büyüme hormonunun reseptöre bağlanması, büyümeye yol açan hücre içi ve hücreler arası bir sinyal iletim yolunun aktivasyonuna yol açar [220]. GHR'ler kas, yağ, karaciğer, kalp, böbrek, beyin ve pankreas dahil birçok dokuda tanımlanmıştır[86]Bu gendeki mutasyonlar, kısa boy ile karakterize bir hastalık olan büyüme hormonu duyarsızlığı sendromu olarak da bilinen Laron sendromuyla ilişkilendirilmiştir [221].

2.5.6. Insulin Like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R)

Bu reseptör insülin benzeri büyüme faktörünü yüksek afinite ile bağlar. Tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. İnsülin benzeri büyüme faktörü I reseptörü, dönüşüm olaylarında kritik bir rol oynar. Öncülün bölünmesi, alfa ve beta alt birimlerini üretir. Hücre sağkalımını artırarak anti-apoptotik bir ajan olarak işlev gördüğü çoğu malign dokularda aşırı eksprese edilir. Farelerde bu gen 7.kromozomda bulunur (GENECARDS).

Hücresele seviyede, IGF'ler hücre çoğalması, farklılaşma, göç ve hayatta kalma dahil olmak üzere çeşitli hücresele tepkileri indükler. IGF'ler bu biyolojik eylemleri temel olarak tip I IGF reseptörünün (IGF-IR) bağlanması ve aktivasyonu yoluyla gerçekleştirir. IGF-IR, iki α alt üniteye ve disülfid bağlarıyla bağlanmış iki β alt üniteye sahiptir. α alt birimi, bir sistein bakımından zengin ligand bağlanma bölgesi içerir. Alt birim, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. IGF-IR, insülin reseptörü(IR) ile yüksek dizi ve yapısal benzerlik sergiler [222]. IGF-IR'nin ligand bağlanması, otofosforilasyonunu indükler. Etkinleştirilen IGF-IR, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) -Akt kaskadı ve Raf-Mek-Erk1/2 kaskadı, [223], [224], dahil çoklu hücre içi sinyal transdüksiyon kaskadlarını aktive eder.

İki alfa alt birimi ve iki beta alt birimi, IGF-1 reseptörünü oluşturur. Hem alfa hem de β alt birimleri, tek bir mRNA öncülünden sentezlenir [225].

IGF-1, en az iki hücre yüzeyi reseptörüne bağlanır: IGF1 Reseptörü (IGFR) ve insülin reseptörü. IGF-1 reseptörü IGF-1'i insüline bağlanandan önemli ölçüde daha yüksek afinitede bağlar [226].

IGF1R'nin sadece bir işlevsel kopyasını taşıyan fareler normaldir, ancak vücut kütlelerinde ~%15 azalma gösterir. Aynı şekilde *IGF1R*'nin köpeklerde de vücut boyutunu düzenlediği gösterilmiştir. Bu genin mutasyona uğramış bir versiyonu bir dizi küçük köpek ırkında bulunur [227].

IGF1R meme, prostat ve akciğer kanserleri dahil birçok kanserde gösterilmiştir [228], [229]. Bazı durumlarda, anti-apoptotik özellikleri kanserli hücrelerin kemoterapötik ilaçların veya radyoterapinin sitotoksik özelliklerine direnç göstermesini sağlar.

Primer ve metastatik prostat kanseri hasta tümörlerinin çoğunda ekspresse edilir [230]. Kanıtlar, prostat kanseri hücreleri androjen bağımsızlığına ilerlerken hayatta kalmak ve büyümek için IGF-IR sinyalleme gerektirildiğini öne sürmektedir [231], [232].

IGF-IIR geninin nakavt edilmesi veya baskılanmış IGF-IIR'nin kaybı fetal büyüme ve perinatal ölümcüllüğe neden olur [233].

İnsülin benzeri büyüme faktörü-I reseptörü (IGF-IR), hücre çoğalmasının ve uzunlamasına kemik büyümesinin önemli bir aracısıdır [234]. IGF-I'in IGF-IR'e bağlanması, IGF-IR'nin tirozin kinaz aktivitesinin transmembran aktivasyonuna neden olur. İnsanda, IGF-I reseptörü geni, kromozom 15'in (15q26.3) uzun kolunun distalinde bulunur [235]. İntrauterin büyüme geriliği ve postnatal büyüme açığı olan hastalarda Kromozom 15q'nin monoalelik kaybı, IGF-I reseptörü geninin mutasyonları ve bir kopyasının kaybı bulunmuştur [236]. Farelerde *IGF1R* gen nakavt deneyleri, her iki alelin null mutasyonunu taşıyan farelerin şiddetli ve bir allel null mutasyon olanlarda orta düzeyde embriyonik ve postnatal büyüme yetmezliği sergilediklerini göstermiştir [237]. Fetal büyüme, substrat ve oksijen kaynağına, plasental ve fetal dokularının vaskülarizasyonuna ve hücre proliferasyonunun kompleks bir endokrin modülasyonuna,

doku genişlemesine, apoptozun inhibisyonuna ve doku remodellemesine bağlıdır. IGF-I ve IGF-II'nin her ikisinin de, insan fetalizasyonunun önemli düzenleyicileri olduğu ortaya kondu [238], [239]. Fetal karaciğer tarafından üretilen IGF-I'in, plasenta substrat alımının önemli bir uyarıcısı olduğu gösterilmiştir. IGF-I fetal plasental katabolizmasını inhibe eder ve plasental laktat üretimini azaltır. Fare *IGF-II* geninin hedeflenen bozulması, fetal büyümenin %40 oranında azalmasına yol açar. *IGF-I* geninin bozulması hem doğum öncesi hem doğum sonrası büyüme yetmezliğine yol açar [237]. Son zamanlarda, intrauterin gelişme geriliği ve doğum sonrası büyüme eksikliği olan hastalarda, kromozom 15q'nin monoalelik kaybı ve uzun kolunun distalinin delesyonu nedeniyle IGF-I reseptör geninin bir kopyasının kaybı tespit edilmiştir [240], [241]. Kromozom 15'in distal kolundan materyal kaybı olan hastalar, intrauterin gelişme geriliği, postnatal büyüme eksikliği ve ayrıca bazen kraniyofasiyal ve iskelet anormallikleri ve hafif-orta zeka geriliği gösterirler [242], [243].

2.5.7. Insulin Like Growth Factor Binding Protein 1 (*IGFBP1*)

İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler (IGFBP'ler), IGF'lere yüksek afinite ile bağlanan altı proteinden (IGFBP-1 ila 6) oluşan bir süper ailedir [244]. IGFBP'ler yalnızca IGF eylemine dahil değildir, aynı zamanda hücre büyümesinin inhibisyonu veya aktivasyonu ve apoptozun indüksiyonu dahil IGF'den bağımsız fonksiyonları düzenliyor gibi görünmektedir [245]. IGFBP'ler asit kararsız alt üniteler (ALS) ve ayrıca serumdaki insülin benzeri büyüme faktörleriyle (IGF'ler) etkileşime girer [246]. IGF'ler salgılandığında ve serbestçe dolaştığında, kararsız ve kolayca bozulurlar. Fonksiyonel stabiliteyi elde etmek için kanda etkin dolaşım için IGFBP'leri bağlamaları gerekir. Son zamanlarda, IGFBP'ler kanser, metabolik hastalık ve nöronal hastalık gibi patofizyolojik hastalıklarda potansiyel oyuncular olarak çoklu fonksiyonlar ortaya koymuşlardır [247].

IGFBP-1, hücresel tepkiler üzerindeki IGF-1 aktivitesini etkileyebilir ve bağımsız olarak hücre sinyalleşmesinde IGF-1 etkisini aktive eder [248], [249]. IGFBP-1, sadece IGF aktivitesinin önemli bir belirleyicisi olmakla kalmaz, aynı zamanda periferik dokularda glikoz alımını artırır ve karaciğerde glikoz çıkışını azaltır. Ayrıca, lipid metabolizmasında rol oynar [250].

İnsan *IGFBP1*, kromozom 7'nin kısa kolunda bulunur ve 5.31 kb bir gen tarafından kodlanır. IGFBP-1, yaklaşık 25 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir ve IGF-1 veya 2 ile bir heterodimer kompleksi olarak plazmada dolaşır [251]. Fare *IGFBP1* geni ise 11.kromozomda lokalize olmuştur [252].

2.5.8. Ghrelin And Obestatin Prepropeptide (*GHRL*)

Bu gen, ghrelin ve obestatin verecek şekilde bölünmüş ghrelin-obestatin preproteini kodlar [253]. Farelerde *GHRL* geni 6. Kromozom üzerinde yer almaktadır.

Ghrelin aynı zamanda lenomorelin olarak da bilinen "açlık hormonu", merkezi sinir sistemindeki bir nöropeptid olarak işlev gören ve gastrointestinal sistemdeki ghrelinerjik hücrelerin ürettiği bir peptid hormonudur [254], [255], [256]. Ghrelin güçlü bir iştah uyarıcıdır. İştahı düzenlemenin yanı sıra enerji homeostazını düzenlemede de önemli bir rol oynar [257]. Mide boşaldığında, ghrelin salgılanır. Mide gerildiği zaman, sekresyon durur. Hem açlığı arttırmak hem de gastrik asit sekresyonunu ve gastrointestinal hareketliliği artırmak için vücudu yiyecek alımına hazırlamak için hipotalamik beyin hücrelerine etki eder [258].

Ghrelin hücreleri esas olarak mide ve duodenumda bulunur [259]; ayrıca jejunumda, akciğerlerde, pankreas adacıklarında [260], gonadlarda, adrenal kortekste, plasentada ve böbreklerde de bulunur. Son zamanlarda, ghrelinin beyinde yerel olarak üretildiği gösterilmiştir [261].

Ghrelin, ATP üretimine, yağ deposuna, glikojen depolamaya ve kısa süreli ısı kaybına giden enerjinin oranını ayarlayarak, karmaşık enerji homeostazisi sürecini düzenlemeye katılan bir katılımcıdır. Bu işlemlerin net sonucu vücut ağırlığına yansır ve metabolik sinyallere ve ihtiyaçlara göre sürekli izleme ve ayarlama altındadır. Herhangi bir anda, herhangi bir zamanda, denge veya dengesizlik olabilir. Gastrik beyin iletişimi, enerji homeostazının önemli bir parçasıdır ve ghrelin, nesfatin ve endokannabinoid gastrik sistemler arasındaki etkileşime aracılık eden gastrik hücre içi mTOR / S6K1 yolu, ve hem afferent hem de efferent vagal sinyalleri dahil olmak üzere çeşitli iletişim yolları mümkündür [262].

Ghrelin ve sentetik ghrelin mimetikleri (büyüme hormonu sekretagogları), orexigenic nöropeptid Y (NPY) ve agouti ile ilişkili protein (AgRP) nöronlarını içeren [263] arkuat çekirdek içerisindeki reseptörleri tetikleyen [264, 265] reseptörleri vücut ağırlığını ve yağ kütlesini artırır [266-268].

Ghrelin, enerji homeostazındaki işlevine ek olarak, ventral tegmental alana ve doğal ödüllerin hedonik ve güçlendirici yönlerini ileten bir devre olan mezolimbik yoldaki kolinerjik-dopaminerjik ödül bağlantısını da aktive eder [256, 269].

Ghrelin, iştah açmak ve beslenme davranışları ile ilişkilendirilmiştir. Dolaşan ghrelin seviyeleri yemekten önce en yüksek ve hemen sonra en düşüktür [270, 271]. Çalışmalar, ghrelin seviyelerinin ağırlıkla negatif olarak ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu veriler, ghrelinin vücudun enerji depoları ile beyni arasında bir mesajlaşma, adipozite sinyali olarak işlev gördüğünü göstermektedir [258].

Ghrelin bağırsak hücre proliferasyonunu teşvik eder ve enflamatuar durumlar ve oksidatif stres sırasında apoptozu inhibe eder [272]. Aynı zamanda pro-enflamatuar mekanizmaları baskılar ve anti-enflamatuar mekanizmaları artırır, böylece kolit, iskemi reperfüzyon hasarı ve sepsis dahil olmak üzere çeşitli gastrointestinal enflamatuar durumlarda terapötik kullanım imkanı yaratır [273].

Ghrelin gastrointestinal ve pankreas malignitesinin oluşumunu destekler [274-276].

Ghrelin, pankreas adacıklarındaki beta hücrelerinden glukozla uyarılan insülin sekresyonunu inhibe eder. Ghrelin, dolaylı olarak, ghrelin reseptörünü seçici olarak eksprese eden pankreas delta hücrelerinden somatostatinin aracılık ettiği lokal negatif geri beslemeyi teşvik ederek yapar [277].

Tüm ghrelin sistemi glukoregulator bir etkiye sahiptir [278].

Ghrelin fetal akciğer tarafından erken üretilir ve akciğer büyümesini destekler [279].

Kordon kanı aktif ve total ghrelin düzeyleri, ghrelin düzeyleri ile doğum ağırlığı arasında bir ilişki olduğunu gösterir [280].

Obez bireylerin plazmasındaki Ghrelin seviyeleri, ağırlığı daha az olan bireyelerinkinden daha düşüktür [281], ghrelinin, yüksek ghrelin düzeylerinin artmış gıdalarla korele olduğu Prader-Willi sendromu ile indüklenen obezite durumları haricinde, obeziteye katkıda bulunmadığını göstermektedir [282, 283].

Yukarıda açıklanan nedenlerden dolayı miR-124'ün muhtemel hedefi olan ve büyüme-gelişmeden sorumlu *GH*, *IGF1*, *GHRH*, *IGFBP5*, *GHR*, *IGF1R*, *IGFBP1*, *GHRL* genleri bu çalışmada kullanılmıştır.



3. YÖNTEM ve FARELER

3.1. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

Kullanılan Cihaz ve Aletler

1. LightCycler 480 II (Roche)
2. Santrifüj Cihazı Mikro 22 (Hettich Zentrifugen)
3. Termal Cyclus PCR Cihazı (SensoQuest)
4. Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Sigma)
5. Vorteks Cihazı (Heidolph)
6. Isıtıcı Blok TH2 (HLC Biotech)
7. Mikropipet (Gilson Eppendorf)
8. T-Shaker (Euroclone)
9. Distile Su Cihazı (Diret-Q. UV Millipore)
10. Etüv CO₂ (Nüve)
11. Binoküler Mikroskop (Leica)
12. Sterio Mikroskop (Leica)
13. Laminar Hava Kabini (TelStar)
14. Mikrotom (Leica RM 2155)
15. +4°C Buzdolabı (Siemens)
16. -20°C Dondurucu (Beko)
17. -80°C Dondurucu (Binder)

18. Otoklav (Aıp)
19. Eppendorf Thermomixer (Comfort)
20. Hassas Terazı (G Adam Equipment)
21. Centrifuge (Beckman Coulter Allegra)
22. Biotech Biospec-Nano (Shimadzu)
23. Su Banyosu (Nüve)
24. Thermal Cyclers (Bio-Rad)
25. Çeker Ocak (Hedlab)
26. Jel Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad)
27. Plate Santrifüj (Peqlab)
28. Mikropipetler

3.2. FARELER ve YAŞAM KOŞULLARI

Çalışmamızda Balb/c ırkı fareler kullanılmıştır. Bu fareler, Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezinde en uygun koşullarda barındırılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız farelerimize, minimum kafes alanı: 180cm² ve minimum kafes yüksekliği: 12cm² şartlarında olacak biçimde ve doğumlarından itibaren bütün ihtiyaçları karşılanacak şekilde barınma olanağı sağlanmıştır. Farelerin hayatta kalmaları için en uygun yaşam şartları olan 20-24C° yaşam alan sıcaklığı ve %45-70 nisbi nem miktarı sağlanmıştır.

miR-124-3p mikroenjeksiyonu sonucu 5 erkek, 1 dişi olmak üzere 6 tane F0 miR-124* fare doğdu. Kontrol grubu olarak da 4 erkek, 4 dişi olmak üzere 8 tane F0 fare kullanılmıştır. Sonrasında kilo takibi yapılan bu fareler, miR-124* lar kendi aralarında kontrol fareler de kendi aralarında çiftleştirilerek F1 nesli elde edilmiştir. 3 erkek 2 dişi olmak üzere 5 tane F1 miR-124* fare ve 4 erkek 10 dişi olmak üzere 14 tane F1 kontrol fare çalışmamızda kullanılmıştır. F1 nesli için de kilo takipleri yapılmıştır. Hem F0 hem de F1 farelerin hipotalamus, hipofiz ve kan dokuları elde edilip RNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından *GH*, *IGF1*, *GHRH*, *IGFBP5*, *GHR*, *IGF1R*, *IGFBP1*, *GHRL* genlerinin mRNA ekspresyonları Real Time PCR ile tespit edilmiştir. Ayrıca bu farelerin serum örneklerinde de ELISA yöntemi ile GH ve IGF-1 protein düzeyleri ölçülmüştür.

3.3. YÖNTEM

3.3.1. Mikroenjeksiyon Yöntemi

Bu çalışma için iki grup fareye ihtiyaç vardır. İlk grubu embriyo topladığımız sağlıklı erkek ile çiftleşen sağlıklı dişiler oluştururken, ikinci grubu vazektomize erkek (Vaz deferens kanalları cerrahi operasyon ile kesilmiş fareler) ile çiftleşen sağlıklı dişiler (taşıyıcı anne) oluşturur. Bir gün önce çiftleşmeye atılan fare gruplarının çiftleşip çiftleşmediğini kontrol etmek için ertesi gün erkenden vajinal tıkaç takibi yapılmıştır. Sağlıklı erkek ile çiftleşen sağlıklı dişiler o gün öğleden sonra sakrifiye edilmiştir ve oviductları daha önceden 37°C’de inkübe edilen M2 medium (Sigma, Almanya) içine alınmıştır. Sterio mikroskop (Leica, Almanya) altında embriyoyu barındıran ampulla belirgin halde görülünce pensler aracılığı ile ampulla yırtılmıştır ve ağız pipeti yardımıyla embriyolar yeni M2’ye transfer edilmiştir. Pronükleusları kaynaşmadan önce fakat en belirgin olduğu evrede yakalanması için embriyolar M16 medium (Sigma, Almanya) içine ağız pipeti ile taşınıp 37°C’de % 0, 5 CO₂ ‘de (Panasonic, Japonya) inkübe edilmiştir. O sırada invert mikroskop (Nikon, Japonya) açılmıştır. Mikroenjekte edilecek olan uagcgcacgcggugaaugcc dizisine sahip sentetik mmu-miR-124-3p (MIMAT 0000134, Sigma, 1/10 oranında seyreltilmiştir ve çalışma sürecinde daima buz üzerinde tutulmuştur. Çukur lam üzerine alınan M2 medium üzerine M2 ile doyurulmuş mineral yağı (Sigma, Almanya) eklenerek lam üzerinde embriyolar için yaşam alanı oluşturulmuştur. Embriyoya zarar vermeden tutabilmek için 1, 0mm Odx 0, 58mm ID borosilikat cam kapiller (Harvard, Amerika) Micro Puller (Narishige, Japonya) kullanılarak 97,6°C’de çekilmiştir ve Micro Forge (Narishige, Japonya) kullanılarak tutucu pipete son şekli verilmiştir. Kullanıma hazır olan tutucu pipet invert mikroskop (Nikon, Japonya) altında yaşam alanı oluşturulmuş lam içine tutucu kollar yarımıyla yerleştirilmiştir. Bu ortama 15’şerli gruplar halinde embriyolar yine ağız pipeti yardımıyla taşınmıştır. Mikroenjeksiyon için en son olarak gerekli olan mikroenjeksiyon pipetini yapmak için 1, 0mm Odx 0, 78mm ID borosilikat cam kapiller (Harvard, Amerika) Micro Puller (Kopf, Amerika) istenen inceliğe uygun sıcaklıkta çekilmiştir. Hazır haldeki mikroenjeksiyon pipeti çözülmüş haldeki miRNA ya da total RNA solüsyonu içerisinde 1-2 dk. bekletildikten sonra mikroenjeksiyon pipeti ucunda

çok küçük bir damlacığın oluşması durumunda solüsyondan çıkarılıp yaşam alanı oluşturulmuş lam içine yine tutucu kollar yardımıyla yerleştirilmiştir. Joystick'ler yardımıyla aynı düzleme alınan tutucu pipet, embriyolar ve mikroenjeksiyon pipeti artık mikroenjeksiyon için hazır hale getirilmiştir. Mineral yağ yardımıyla (Sigma, Almanya) tutucu pipette oluşturulan itme-çekme gücü kullanılarak embriyo rahatça tutulmuştur ve CO₂ yardımıyla mikroenjeksiyon pipetinde oluşan itme gücüyle de miRNA ya da total RNA embriyonun erkek pronükleusuna basılmıştır. Mikroenjekte edilen solüsyonun embriyo içinde oluşturduğu şişkinliğin görünür olması sayesinde embriyoya miRNA ya da total RNA'yı verdiğimizden emin hale geldik. Mikroenjeksiyon bittikten sonra embriyolar ağız pipeti ile taşınıp 37°C'de % 0, 5 CO₂ 'de (Panasonic, Japonya) inkübe edilmiştir. Ağız pipeti yardımıyla Sterio mikroskop (Leica, Almanya) altında mikroenjeksiyon sonrası ölen embriyolar M16 (Sigma, Almanya) içinde bırakılmış ve yaşayan embriyolar M2 medium (Sigma, Almanya) içine taşınmıştır. Ağız pipetine önce bir kaç tane hava kabarcığı, sonra M2 medium (Sigma, Almanya) ile birlikte mevcut embriyoların hepsi ve en sonunda da tekrar hava kabarcıkları çekilmiştir.

Taşıyıcı anneyi anestezi altına alabilmek için 150µl %2 Rompun (Bayer, Amerika) ve 150µl Ketalar (Pfizer, Amerika) 2ml %0, 9 NaCl içinde çözülmüştür. Hazırlanan bu solüsyondan her bir fareye 300µl intraperitonel olarak enjeksiyon yapılmıştır. Anestezik madde etkisini göstermeye başlayınca farenin sırt kısmı tıraşlanmıştır. Sırt kısmından makas yardımıyla üç kat kesilen taşıyıcı annenin oviductu pens ile kesilen kısımdan dışarı çıkarılmıştır. Fare Sterio mikroskop (Leica, Almanya) altına taşınıp oviductu ile ovaryumu üzerindeki zar pensler yardımıyla yırtılmıştır. Belirgin haldeki infundibulum pens ile tutulup ağız pipeti ile embriyolar oviduct içine transfer edilmiştir. Transfer yaparken embriyolar görünmemektedir. Ancak hava kabarcıkları görülebilirler dolayısıyla hava kabarcığının oviduct içinde görünmesi embriyoların da oviduct içinde olduğu anlamına gelmektedir. Transfer sonrası farenin sırt kısmı 26mm ve 75 cm suture (Surgisorb, İngiltere) ile dikilmiştir. Taşıyıcı anne, mikroenjeksiyon bilgileri ve çiftleşme/çalışma tarihi yazılan kafese yerleştirilmiştir. İşlemden 21 gün sonra dünyaya gelen F0 nesli yavrular 21 gün anne sütü ile beslendikten sonra cinsiyetlerine göre ayrılarak yeni kafeslere alınmıştır. Cinsiyet ayrımı yapılan fareler haftalık olarak tartılıp kilo takipleri yapılmıştır.

3.3.2. Kilo Takibi

miR-124-3p mikroenjeksiyonu yapılan embriyoların taşıyıcı anneleri ortalama 21 gün sonra doğum yapmışlardır. 21 günlük olmadan yavrulara dokunmak yavruların sağlığı açısından risk taşımaktadır. Bu hayvanlarda kannibalizm görüldüğü için yavrularına yabancı koku sindiği durumda anneler yavrularını öldürmektedir. Bu yüzden yirmi bir günlük olduklarında cinsiyet ayrımı yapılan fareler, kilo takip edilmesi açısından tırnakları kesilerek numaralandırılmışlardır. F0 jenerasyonu için 37.günden başlanarak haftalık olarak 36 haftalık olana dek tartılmışlardır.F1 jenerasyonu için de 78.günden başlanarak 31 haftalık olana kadar haftalık kilo takipleri yapılmıştır.

3.3.3. Hipotalamus ve Hipofiz Dokularından RNA İzolasyonu

1. Ependorf tüplerin içine hipofiz ve hipotalamus dokusu alındı.
2. Üzerine 500µl Trizol (Roche, USA) eklendi. Ardından enjektör yardımı ile dokuların homojenizasyonu sağlandı.
3. 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 160 µl kloroform eklendi ve 15 sn kuvvetli şekilde vortekslendi.
4. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 12.000 g' de 20 dk +4°C de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan aköz faz yeni bir tüpe alındı.
5. Alınan aköz faz miktarı kadar (1:1) tüpün içerisine isopropanol eklendi ve vortekslendi. Örnekler 5dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında 12.000 g' de 10 dk +4' C de santirfüj edildi.
6. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant atıldı. Pellet üzerine yıkama işlemi için 1000 µl %75' lik etanol eklendi ve kısa bir vortex yapıldı. Sonrasında 7500 g' de 5 dk +4' C de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Pellet üzerine tekrar 1000 µl %75' lik etanol eklendi ve kısa bir vortex yapıldı. Tekrar 7500 g' de 5 dk +4' C de santrifüj edildi. Santifüj sonunda üstte olan supernatant kısım atıldı.

8. Geriye kalan dipteki pellet kısım tüpün ağzı açık bir şekilde oda sıcaklığında 10dk bekletildi. Etanolün uçması sağlandı. Sonrasında pellet üzerine 30µl Nükleaz Free Water eklendi ve resüspanse edildi.
9. Nanodrop cihazında RNA konsantrasyonu ölçüldü ve çalışılıncaya kadar örnekler - 80°C 'ye kaldırıldı.

3.3.4. Kan Dokusundan RNA İzolasyonu

Farelerden alınan kan örneklerinden RNA izolasyonu için aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

1. 500µl kan alınarak üzerine 500µl Trizol (Roche, USA) eklendi.
2. 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 200 µl kloroform eklendi ve 15 sn kuvvetli şekilde vortekslendi.
3. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 12.000 g' de 20 dk +4'C de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan aköz faz yeni bir tüpe alındı.
4. Alınan aköz faz miktarı kadar (1:1) tüpün içerisine isopropanol eklendi ve vortekslendi. Örnekler 5dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında 12.000 g' de 10 dk +4' C de santirfüj edildi.
5. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant atıldı. Pellet üzerine yıkama işlemi için 1000 µl %75' lik etanol eklendi ve kısa bir vorteks yapıldı. Sonrasında 7500 g' de 5 dk +4' C de santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. Pellet üzerine tekrar 1000 µl %75' lik etanol eklendi ve kısa bir vortex yapıldı. Tekrar 7500 g' de 5 dk +4' C de santrifüj edildi. Santifüj sonunda üstte olan supernatant kısım atıldı.
7. Geriye kalan dipteki pellet kısım tüpün ağzı açık bir şekilde oda sıcaklığında 10dk bekletildi. Etanolün uçması sağlandı. Sonrasında pellet üzerine 30µl Nükleaz Free Water eklendi ve resüspanse edildi.
8. Nanodrop cihazında RNA konsantrasyonu ölçüldü ve çalışılıncaya kadar örnekler - 80°C 'ye kaldırıldı.

3.3.5. cDNA Eldesi

Çalışmaya başlamadan önce bütün RNA örnekleri için 96 kuyucuklu plate için çalışma düzeneği oluşturuldu. cDNA sentezi için ROCHE marka EvoScript cDNA sentez Kit kullanıldı. cDNA sentezi ROCHE marka EvoScript cDNA Kit protokolüne göre yapıldı. (NOT: cDNA sentezi yapabilmek için RNA konsantrasyonları 10ng – 100ng arasında olmalıdır.)

Reaksiyon Mix'inin hazırlanması

Tablo 5. Dokulardan RNA izole edilen örnekler için karışım miktarları.

| | Her bir örnek için |
|---------------------|--------------------|
| Reaction Buffer(5X) | 4 µl |
| dH ₂ O | 10 µl |
| RNA | 5 µl |

Hazırlanan mix çok kısa süre vortekslendikten sonra, tekrar çok kısa süre santrifüj edildi. Ardından her bir kuyucuğa 15µl mix mikropipet aracılığı ile dağıtıldı. Daha sonra her bir tüpün üzerine 5'er µl RNA örneği eklendi ve 5dk buz üzerinde bekletildi. Daha sonra ürünler üzerine 2 µl Enzim mix eklendi. Ardından da PCR cihazına konuldu.

Tablo 6. cDNA sentezi için PCR programı.

| | |
|-------|-----------|
| 25 °C | 5 dakika |
| 42°C | 30 dakika |
| 85°C | 5 dakika |
| 4°C | ∞ |

PCR sonunda elimizde 20µl cDNA ürünü oluşmuştur.

3.3.6. Gen Ekspresyonu

Real Time PCR'da belirlenen genlerin mRNA ekspresyonlarını belirleyebilmek için Roche marka LightCycler® 480 Probes Master Kit (04707494001) kullanıldı.

1. cDNA örnekleri 1/5 oranında Nuclease Free Water ile seyreltilmiştir.
2. Aşağıdaki miktarlarda reaksiyon plate (Roche) üzerine dağıtılmıştır. Her bir kuyucuğa 15 µl reaksiyon mix dağıtıldı. Ardından 5 µl sulandırılmış cDNA dağıtıldı.

Tablo 7. Gen ekspresyon çalışması için gerekli malzemeler ve miktarları.

| | |
|---------------------|-------|
| 2X Probe Master Mix | 10 µl |
| Primer/Probe | 1 µl |
| Nuclease Free Water | 4 µl |
| cDNA | 5 µl |

3. LightCycler 480 II (Roche) Real-Time PCR cihazında aşağıdaki programa koyulmuştur.

95° C 10 dk
95° C 10 saniye }
60° C 30 saniye } 50 Döngü
72 ° C 1 dk
40° C 30 saniye

4. Housekeeping gen olarak beta-actin kullanılmıştır.
5. Ekspresyonu araştırılan genlere ait bilgiler aşağıdaki gibidir.

Tablo 8. Ekspresyonu araştırılan genlere ait bilgiler

| Gen Adı | NCBI link | Assay ID |
|---------------|---|----------|
| <i>Actb</i> | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11461 | 300236 |
| <i>Igf1</i> | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16000 | 313358 |
| <i>Igfbp1</i> | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16006 | 318775 |
| <i>Igf1r</i> | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16001 | 300656 |
| <i>Igfbp5</i> | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16011 | 316466 |
| <i>Ghrh</i> | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14601 | 318777 |
| <i>Ghr</i> | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14600 | 318765 |
| <i>Gh</i> | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14599 | 312620 |
| <i>Ghrl</i> | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/58991 | 318763 |

6. Elde edilen CT değerleri delta-delta CT metodu ile normalize edildi.

3.3.7. ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemi ile GH ve IGF-1 Düzeylerinin Ölçülmesi

Serum örneklerinde GH ve IGF-1'in araştırılması için ticari ELİSA kit (Sunred, Shangai) kullanılmıştır. Örnek kuyucuğuna 40 µl serum, 10 µl biyotinli antibody ve 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Blank kuyucuğuna sadece chromogen A, chromogen B ve stop solüsyonu eklendi. Standart kuyucuğuna 50 µl standart, 50 µl streptavidin- HRP eklenmiştir. Blank ve standartlar çift çalışılmıştır. Plate sealing membran ile kapatıldı. Ardından 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra distile su ile 30 kat seyreltilmiş yıkama solüsyonu kullanılarak membran 5 kez 10 dakika 37 °C'de karanlıkta bekletildi. Her bir kuyucuğa 50 µl stop solution eklendi ve reaksiyon durduruldu. Bu aşamada mavi renk hızlıca sarı renge döndü. Stop solution eklendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm'de ölçüm yapıldı.

Standartların hazırlanması

32ng/ml S5: 120 µl standart (orijinal) + 120 µl S diluents

16ng/ml S4: 120 µl S5 +120 µl S diluents

8ng/ml S3: 120 µl S4 +120 µl S diluents

4ng/ml S2: 120 µl S3 +120 µl S diluents

2ng/ml S1: 120 µl S2+ 120 µl S diluents

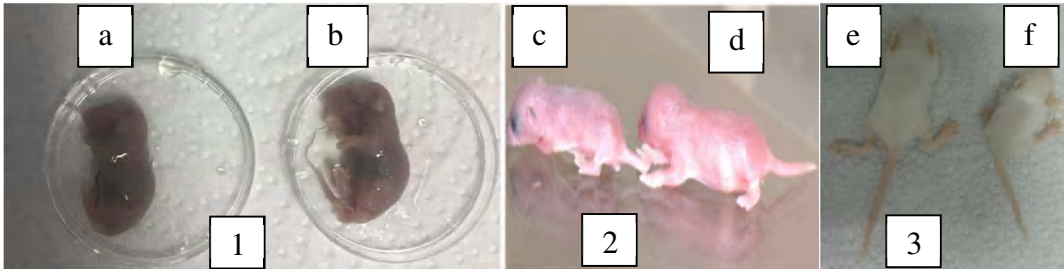
3.3.8. İstatiksel Analizler

Verilerin analizi ve grafiklerin yapımında GraphPad Prism, versiyon 7 (GraphPad Software, San Diego, Kaliforniya, ABD) yazılımı ile yapıldı. Verilerin dağılımına histogram, qq plot ve Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. İki grup arası verilerin karşılaştırılmasında bağımsız t-testi kullanıldı. 3 ve daha çok gruptan oluşan kıyaslamalarda ANOVA ve anlamlı olma durumunda ikili karşılaştırılma için Fisher's LSD ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Özet istatistik olarak veriler ortalama ±standart sapma olarak ifade edildi. $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Farelerde Fenotipik Bulgular

miR-124-3p mikroenjeksiyonu sonucunda farelerin hem prenatal hem postnatal dönemde daha iri oldukları gözlemlenmiştir (şekil 7). Birinci resimdeki embriyolar E19, 5 günlüktür; soldaki (a) kontrol embriyo iken sağdaki (b) miR-124-3p mikroenjekte edilmiş embriyodur. İkinci resimdeki doğumdan sonra 2 günlük yavru farelerdir; soldaki (c) kontrol yavru iken sağdaki (d) miR-124-3p mikroenjekte edilmiş yavrudur. Üçüncü resimdeki ise doğumdan sonra 7 günlük yavru farelerdir; soldaki (e) miR-124-3p mikroenjekte edilmiş yavru iken sağdaki (f) kontrol yavrudur (Şekil 7).

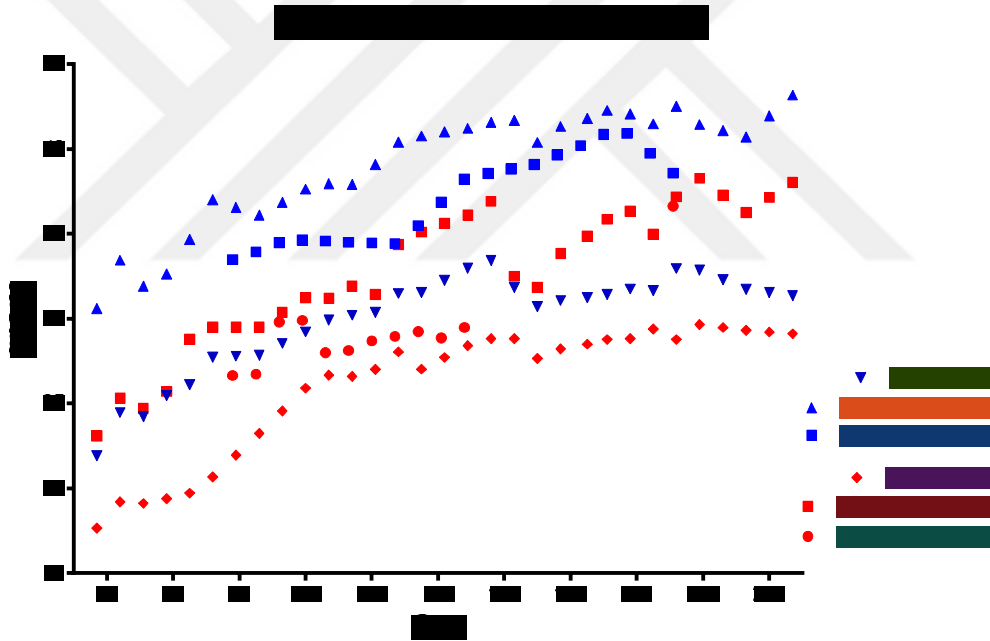


Şekil 7. Embriyoların farklı günlerde alınmış fotoğrafları.

4.2. Kilo Takibi Bulguları

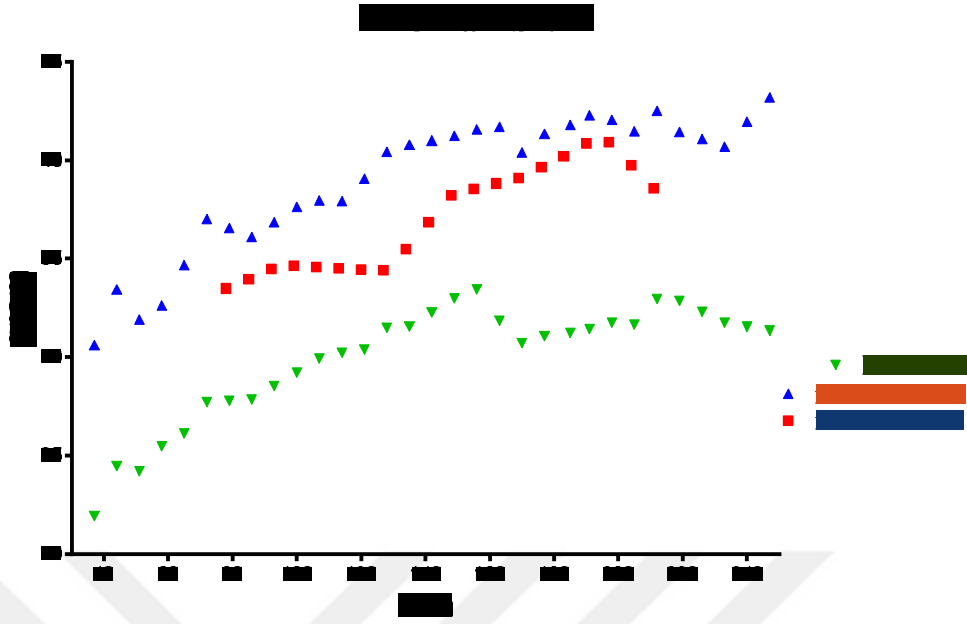
miR-124* fareler ve kontrol grubu fareler, F0 jenerasyonu için 37.günden başlanarak haftalık olarak 36 haftalık olana dek tartılmışlardır.F1 jenerasyonu için de 78.günden

başlanarak 31 haftalık olana kadar haftalık kilo takipleri yapılmıştır. Tartımlar sonucu her iki jenerasyonda da miR-124* hem dişi hem de erkek farelerin kontrol erkek ve dişilerden daha ağır oldukları Şekil 8'deki grafikte bariz olarak belirgindir. Jenerasyonlar arasında bakıldığında ise F0 miR-124* erkek fareler en ağırken; bunu sırasıyla F1 miR-124* erkek fareler, F0 miR-124* dişi fareler, kontrol erkekler, F1 miR-124* dişi ve son sırada kontrol dişiler izlemektedir. Kontrol erkekler ve F1 miR-124* dişi fareler arasında zaman zaman sıralamada değişiklik olsa da bu iki grup da kontrol dişilerden hep daha ağır olmuşlardır. Grafik incelendiğinde genel olarak kontrollere kıyasla F0 miR-124* lerdeki belirgin ağırlık artışının azalarak da olsa F1 jenerasyonunda da devam ettiği görülmektedir. Cinsiyet olarak ise hemen hemen her zaman erkeklerin dişilerden daha ağır olduğu bulgusuna rastlanmaktadır.



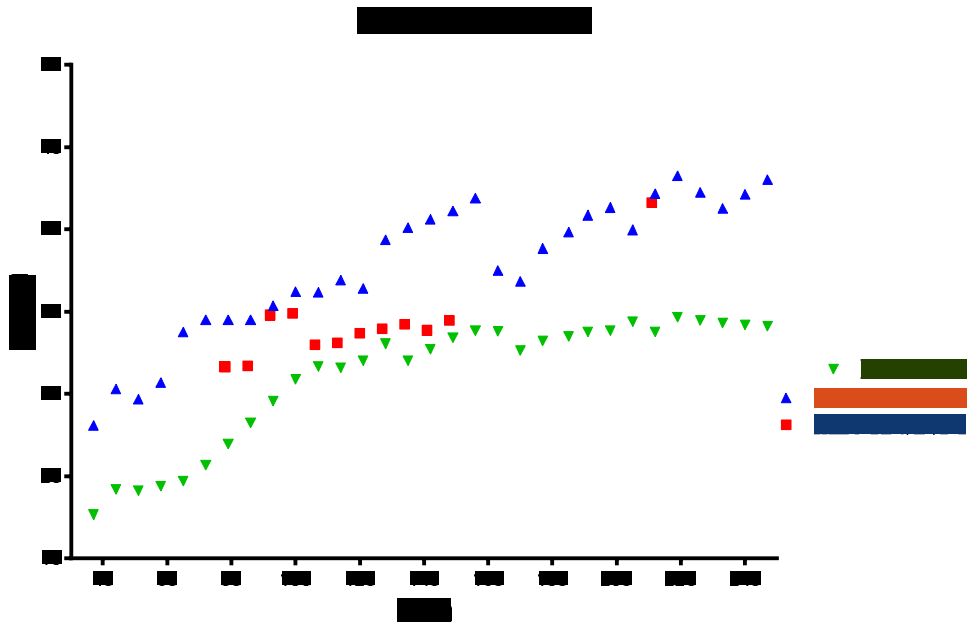
Şekil 8. Günlere göre kontrol ve miR-124* erkek ve dişiler arasındaki ağırlık kıyaslaması.

Cinsiyetlere göre grafiğe bakıldığında erkek farelerde miR-124* lar her iki jenerasyonda da kontrollerinden ağır olmakla beraber, F0 a göre F1 erkeklerde bir miktar ağırlık azalması tespit edilmiştir.

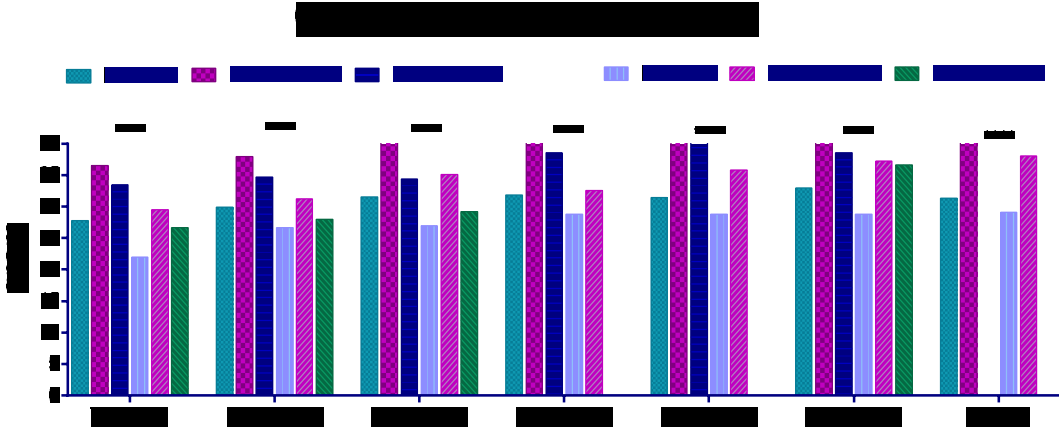


Şekil 9. Günlere göre kontrol ve miR-124* erkekler arası ağırlık kıyaslaması.

Dişilerdeki bulgular da erkeklerdekine paralel olarak miR-124* lar her iki jenerasyonda da kontrollerinden daha ağırdır. Zaman zaman F1 dişiler F0 ı yakalasalarda genel olarak F0 miR-124* dişilerin, F1 miR-124* dişilerden ağırlık olarak çok az da olsa daha ağır olduğu izlenmektedir.



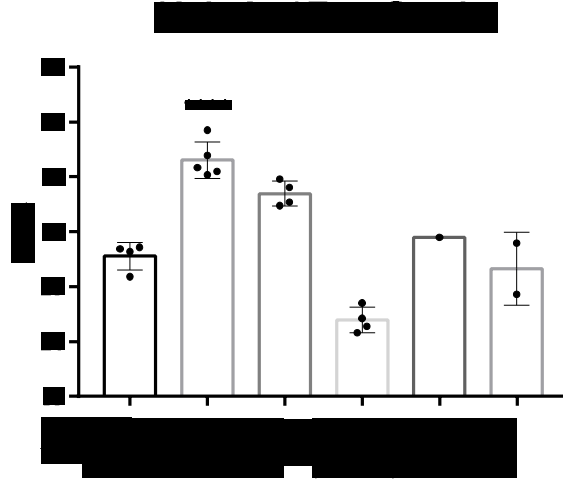
Şekil 10. Günlere göre Kontrol ve miR-124* dişiler arası ağırlık kıyaslaması.



Şekil 11. Tüm farelerin haftalara göre tartıları.

Kontrol ve miR-124* fareler doğdukları günden itibaren gözlemlendiklerinde; cinsiyet ayrımı yapılanaya kadar miR-124* farelerin kontrol grubu farelere kıyasla daha iri oldukları görülmüştür. Haftalık yapılan takiplerde de bu bulgu aynı şekilde devam etmiştir.

Şekil 11’de de gözüktüğü gibi, ilk olarak 12.haftada en ağır F0 miR-124* erkek fareler iken; bunu sırasıyla F1 miR-124* erkek fareler, F0 miR-124* dişi fareler, kontrol erkekler, F1 miR-124* dişi ve son sırada kontrol dişiler izlemektedir.16.haftada bu bulgular aynı şekilde devam etmekteyken 20.haftaya gelindiğinde F0 miR-124* dişi farelerin ağırlığındaki hızlı artış dikkati çekmektedir.20.haftada F0 miR-124* dişi fareler F1 miR-124* erkek fareler ile aralarındaki farkı kapatıp onlardan daha ağır hale gelmişlerdir.24.haftada ise bu durum tersine dönüp F1 miR-124* erkek fareler hızlı bir artış sergileyip tekrar F0 miR-124* dişi farelerden ağır hale gelmişlerdir. 28.haftaya gelindiğinde F1 miR-124* erkek farelerin ağırlığındaki artış devam ederek en ağır olan F0 miR-124* erkek fareler ile eş duruma gelmişlerdir.31. haftaya gelindiğinde F1 miR-124* erkek farelerin ağırlığında bir miktar azalma göze çarpmaktadır. Bunun dışında bu haftada dikkat çeken bir diğer bulgu ise F1 miR-124* dişilerin ağırlığındaki ciddi artıştır.Bu artışla beraber ağırlık olarak F0 miR-124* dişi farelere çok yaklaşmış olup hep gerisinde takip ettiği kontrol erkeklerden bariz bir şekilde daha ağır hale gelmişlerdir.36.haftaya gelindiğinde F1 neslinin ağırlık verileri elimizde olmayıp F0 ve kontrol grubunun bulguları önceki haftalarla aynı şekilde izlenmektedir.



Şekil 12. Fareler 12 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması.

Tablo 9. Fareler 12 haftalıkken ağırlık değerleri

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|-----------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 4 | 5 | 4 | 4 | 1 | 2 |
| Mean | 27,79 | 36,55 | 33,49 | 21,95 | 29,5 | 26,65 |
| Std. Deviation | 1,261 | 1,657 | 1,126 | 1,175 | 0 | 3,302 |
| P<0,0001 | | | | | | |

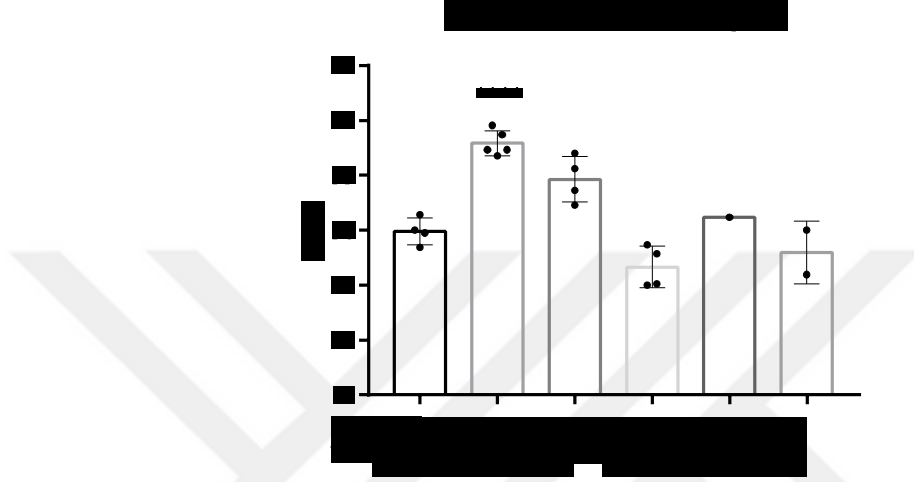
P değeri hesaplanırken,paramutant dişilerde yeterli örnek sayısı olmadığı için istatistiksel hesaplama dahil edilmemişlerdir.İstatistik, paramutant erkekler ve kontrolleri üzerinden yapılmıştır.

Fareler 12 haftalıkken yapılan kilo takibi sonuçlarına göre (şekil 12);

F0 miR-124*erkekler (ortalama 36, 55±1, 7), kontrol erkeklerle (ortalama 27, 79±1, 3) kıyaslandığında F0 miR-124* grupta ağırlık artışı istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (p<0, 0001).

F1 miR-124*erkekler (ortalama 33, 49±1, 1), kontrol erkeklerle (ortalama 27, 79±1, 3) kıyaslandığında F1 miR-124* grupta ağırlık artışı istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (p=0, 0005).

F0 miR-124*erkekler (ortalama 36, 55±1, 7), F1 miR-124*erkeklerle (ortalama 33, 49±1, 1) kıyaslandığında F0 miR-124* grupta ağırlık artışı istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (p=0,0211).



Şekil 13. Fareler 16 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması.

Tablo 10. Fareler 16 haftalıkken ağırlık değerleri

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 4 | 5 | 4 | 4 | 1 | 2 |
| Mean | 29,92 | 37,94 | 34,64 | 26,67 | 31,2 | 27,99 |
| Std. Deviation | 1,23 | 1,148 | 2,07 | 1,896 | 0 | 2,85 |
| P<0,0001 | | | | | | |

P değeri hesaplanırken,paramutant dişilerde yeterli örnek sayısı olmadığı için istatistiksel hesaplama dahil edilmemişlerdir.İstatistik, paramutant erkekler ve kontrolleri üzerinden yapılmıştır.

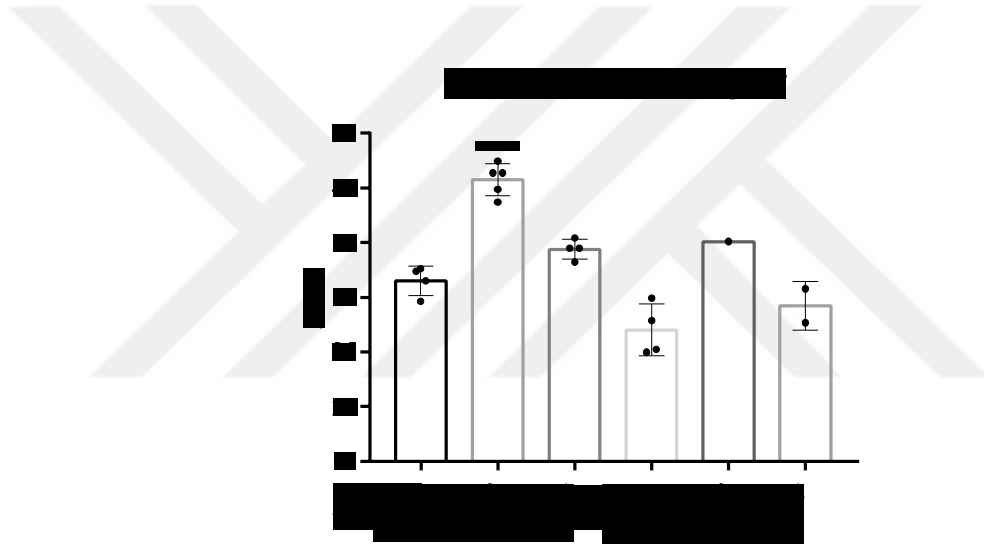
Fareler 16 haftalıkken yapılan kilo takibi sonuçlarına göre (şekil 13);

F0 miR-124*erkeklerin (ortalama 37, 94±1, 1) kontrol erkeklere (ortalama 29, 92±1, 23) kıyasla ağırlık artışları devam etmektedir (p<0, 0001).

Aynı şekilde F1 miR-124*erkekler de (ortalama 34, 64 ±2, 07) kontrol erkeklerle (ortalama 29, 92±1, 2) kıyasla ağırlık artışlarını devam ettirmektedirler (p=0, 0033).

F0 miR-124*erkeklerin (ortalama 37, 94±1, 1) F1 miR-124*erkeklerle (ortalama 34, 64 ±2, 07) kıyasla ağırlık artışları devam etmektedir (p=0,0210).

Bu haftada kontrol dişilerin ağırlığındaki hızlı artış dikkati çekmektedir. Nitekim kontrol erkeklerle ve F0 ve F1 miR-124* dişilerle arasındaki ağırlık farkı bu haftada azalmaya başlamıştır.



Şekil 14. Fareler 20 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması.

Tablo 11. Fareler 20 haftalıkken ağırlık değerleri

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|-----------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 4 | 5 | 4 | 4 | 1 | 2 |
| Mean | 31,54 | 40,77 | 34,42 | 27,02 | 35,1 | 29,24 |
| Std. Deviation | 1,357 | 1,477 | 0,8991 | 2,354 | 0 | 2,199 |
| P<0,0001 | | | | | | |

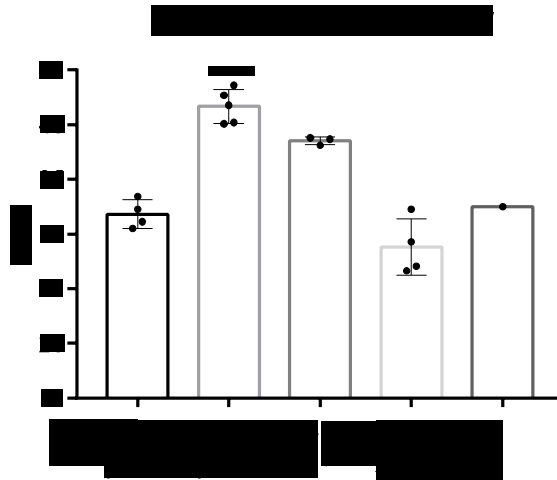
P değeri hesaplanırken,paramutant dişilerde yeterli örnek sayısı olmadığı için istatistiksel hesaplama dahil edilmemişlerdir.İstatistik, paramutant erkekler ve kontrolleri üzerinden yapılmıştır.

20. haftaya gelindiğinde; 16. haftada azalmaya başlayan kontrol erkekler ve kontrol dişiler arası fark yeniden belirmeye başlamıştır. İstatistiksel anlamlılıklar önceki haftalardaki ile aynı şekilde devam etmektedir (şekil 14).

F0 miR-124*erkeklerin (ortalama $40,77 \pm 1,5$) kontrol erkeklere (ortalama $31,54 \pm 1,3$) kıyasla ağırlık artışları devam etmektedir ($p < 0,0001$).

F1 miR-124*erkeklerin (ortalama $34,42 \pm 0,9$)) kontrol erkeklere (ortalama $31,54 \pm 1,3$) kıyasla ağırlık artışları devam etmektedir ($p = 0,0256$).

F0 miR-124*erkekler (ortalama $40,77 \pm 1,5$) F1 miR-124*erkeklerle (ortalama $34,42 \pm 0,9$) kıyaslandığında F0 gruptaki artış F1 e göre istatistiki olarak yine anlamlı tespit edilmiştir ($p < 0,0001$).



Şekil 15. Fareler 24 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması.

Tablo 12. Fareler 24 haftalıkken ağırlık değerleri

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|
| n | 4 | 5 | 4 | 4 | 1 |
| Mean | 31,84 | 41,68 | 38,54 | 28,82 | 32,5 |
| Std. Deviation | 1,294 | 1,547 | 0,3723 | 2,569 | 0 |
| P<0,0001 | | | | | |

P değeri hesaplanırken,paramutant dişilerde yeterli örnek sayısı olmadığı için istatistiksel hesaplama dahil edilmemişlerdir.İstatistik, paramutant erkekler ve kontrolleri üzerinden yapılmıştır.

24. haftaya gelindiğinde F1 miR-124* dişi çiftleşmeye alındığı için değerlendirme yapılamamıştır.

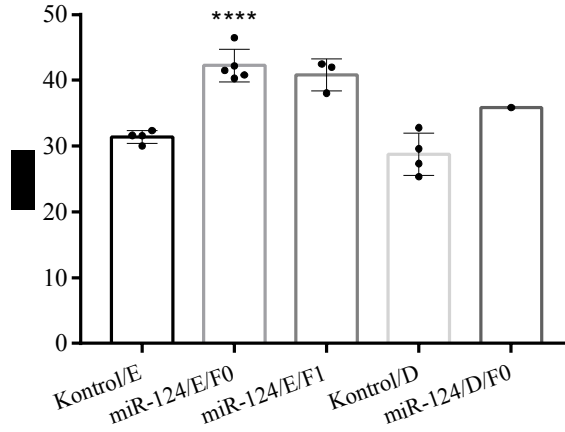
Fareler 24 haftalıkken yapılan kilo takibi sonuçlarına göre (şekil 15);

F0 miR-124*erkeklerin (ortalama 41, 68±1, 5) kontrol erkeklere (ortalama 31, 84 ±1, 3) kıyasla ağırlık artışları devam etmektedir (p<0, 0001).

F1 miR-124*erkekler (ortalama 38, 54±0, 4) kontrol erkeklerle (ortalama 31, 84 ±1, 3) kıyaslandığında F1 miR-124*erkeklerin olduğu grupta yine devam eden istatistiksel anlamlı bir artış söz konusudur (p=0, 0002).

F0 miR-124*erkeklerin (ortalama 41, 68±1, 5) F1 miR-124*erkeklere (ortalama 38, 54±0, 4) kıyasla ağırlık artışları aynı şekilde devam etmektedir ve istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,0212).

28. hafta / Tüm Gruplar



Şekil 16. Fareler 28 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması.

Tablo 13. Fareler 28 haftalıkken ağırlık değerleri

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 |
|--------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|
| n | 4 | 5 | 4 | 4 | 1 |
| Mean | 31,42 | 42,27 | 40,85 | 28,77 | 35,86 |
| Std. Deviation | 1 | 2,46 | 2,438 | 3,195 | 0 |
| P<0,0001 | | | | | |

P değeri hesaplanırken,paramutant dişilerde yeterli örnek sayısı olmadığı için istatistiksel hesaplamaya dahil edilmemişlerdir.İstatistik, paramutant erkekler ve kontrolleri üzerinden yapılmıştır.

28. haftada F1 miR-124* dişi çiftleşmeye gittiği için bu haftada da değerlendirmeye alınamamıştır.

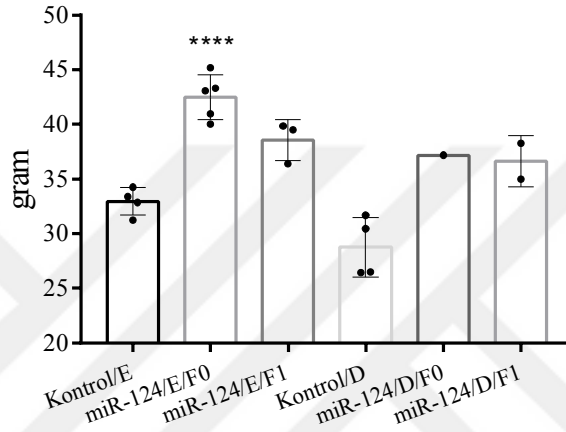
Fareler 28 haftalıkken yapılan kilo takibi sonuçlarına göre (şekil 16);

F0 miR-124*erkekler (ortalama 42, 27±2, 5) kontrol erkeklerle (ortalama 31, 42 ±1) kıyaslandığında F0 miR-124*erkeklerin olduğu grupta yine devam eden istatistiksel bir artış söz konusudur (p<0, 0001).

F1 miR-124*erkekler (ortalama 40, 85±2, 4) kontrol erkeklerle (ortalama 31, 42 ±1) kıyaslandığında F1 miR-124*erkeklerin olduğu grupta yine devam eden istatistiksel bir artış söz konusudur (p=0, 0006).

Bu haftada önceki haftalarda hep var olan F0 paramutant erkelerin F1 paramutant erkeklere olan istatistiksel anlamlı ağırlık artışı kaybolmuştur (p=0,6328 yani p>0,05).

31. hafta / Tüm Gruplar



Şekil 17. Fareler 31 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması.

Tablo 14. Fareler 31 haftalıkken ağırlık değerleri

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|-----------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 4 | 5 | 4 | 4 | 1 | 2 |
| Mean | 32,95 | 42,51 | 38,58 | 28,77 | 37,18 | 36,63 |
| Std. Deviation | 1,264 | 2,052 | 1,892 | 2,709 | 0 | 2,333 |
| P<0,0001 | | | | | | |

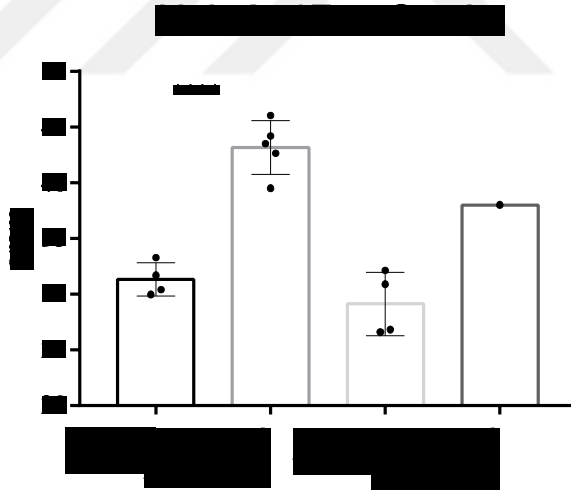
P değeri hesaplanırken,paramutant dişilerde yeterli örnek sayısı olmadığı için istatistiksel hesaplama dahil edilmemişlerdir.İstatistik, paramutant erkekler ve kontrolleri üzerinden yapılmıştır.

31.haftaya gelindiğinde önceki haftaların bulgularına paralel olarak F0 miR-124*erkeklerin ve F1 miR-124*erkeklerin kontrol erkeklere kıyasla anlamlı olan ağırlık artışları devam etmektedir (şekil 17).

F0 miR-124*erkekler (ortalama 42, 51±2, 1) kontrol erkeklerle (ortalama 32, 95±1, 3) kıyaslandığında F0 miR-124*erkeklerin olduğu grupta devam eden bir ağırlık artışı istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir ($p < 0, 0001$).

Benzer şekilde F1 miR-124*erkekler (ortalama 38, 58 ±1, 9) kontrol erkeklerle (ortalama 32, 95±1, 3) kıyaslandığında F1 miR-124*erkeklerin olduğu grupta devam eden bir ağırlık artışı istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir ($p = 0, 0066$).

28.haftada ilk kez kaybolan F0 paramutant erkeklerin F1 paramutant erkeklere kıyasla ağırlık artışı bu hafta yeniden istatistiksel olarak anlamlı artmış bulunmuştur ($p = 0,0357$).



Şekil 18. Fareler 36 haftalıkken gruplar arası ağırlığın kıyaslanması.

Tablo 15. Fareler 36 haftalıkken ağırlık değerleri

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 |
|---------------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|
| n | 4 | 5 | 4 | 1 |
| Mean | 31,34 | 43,19 | 29,11 | 38,02 |
| Std. Deviation | 1,498 | 2,414 | 2,823 | 0 |
| P<0,0001 | | | | |

P değeri hesaplanırken,paramutant dişilerde yeterli örnek sayısı olmadığı için istatistiksel hesaplama dahil edilmemişlerdir.İstatistik, sadece F0 paramutant erkek ve kontrolleri arasında yapılmıştır.

36.haftaya gelindiğinde F1 jenerasyonunun kilo takibi verileri olmadığı için yalnızca F0 ve kontrollerinin değerlendirmelerini yapacağız.

Fareler 36 haftalıkken yapılan kilo takibi sonuçlarına göre (şekil 18);

F0 miR-124*erkekler (ortalama 43, 19±2, 4) kontrol erkeklerle (ortalama 31, 34±1, 5) kıyaslandığında F0 miR-124*erkeklerin olduğu grupta devam eden bir ağırlık artışı istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir (p<0, 0001).

4.3. mRNA Ekspresyon Analizi Bulguları

4.3.1. GH

Tablo 16. GH hipotalamus ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 7 | 5 | 3 | 9 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,01991 | 0,08654 | 0,1496 | 0,00454 | 3,731 | 0,07078 |
| Maximum | 5,425 | 1,569 | 4,822 | 6,962 | 3,731 | 2,394 |
| Mean | 1,202 | 0,5589 | 2,71 | 2 | 3,731 | 1,232 |
| Std. Deviation | 1,945 | 0,5898 | 2,368 | 2,64 | 0 | 1,643 |
| P=0,2639 | | | | | | |

GH geni ekspresyon sonuçları **şekil 19**'da verilmiştir. Hipotalamustaki *GH* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=0, 55±0, 58), F1 miR-124* erkek (n=3, ortalama=2, 7±2, 4) ve kontrol erkek (n=7, ortalama 1, 2±1, 9) arasında karşılaştırma yapıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,2639).

Tablo 17. *GH* hipofiz ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|-----------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 3 | 13 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,432 | 0,7316 | 0,2659 | 0,238 | 1,601 | 0,07027 |
| Maximum | 5,693 | 1,453 | 1,394 | 2,788 | 1,601 | 0,3119 |
| Mean | 2,55 | 1,039 | 0,8641 | 0,8277 | 1,601 | 0,1911 |
| Std. Deviation | 1,907 | 0,3547 | 0,5671 | 0,7333 | 0 | 0,1708 |
| P=0,1257 | | | | | | |

Hipofizdeki *GH* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=1, ±0, 3), F1 miR-124* erkek (n=3, ortalama=0, 9±0, 6) ve kontrol erkekler (n=8, ortalama=2, 5±1, 9) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,1257).

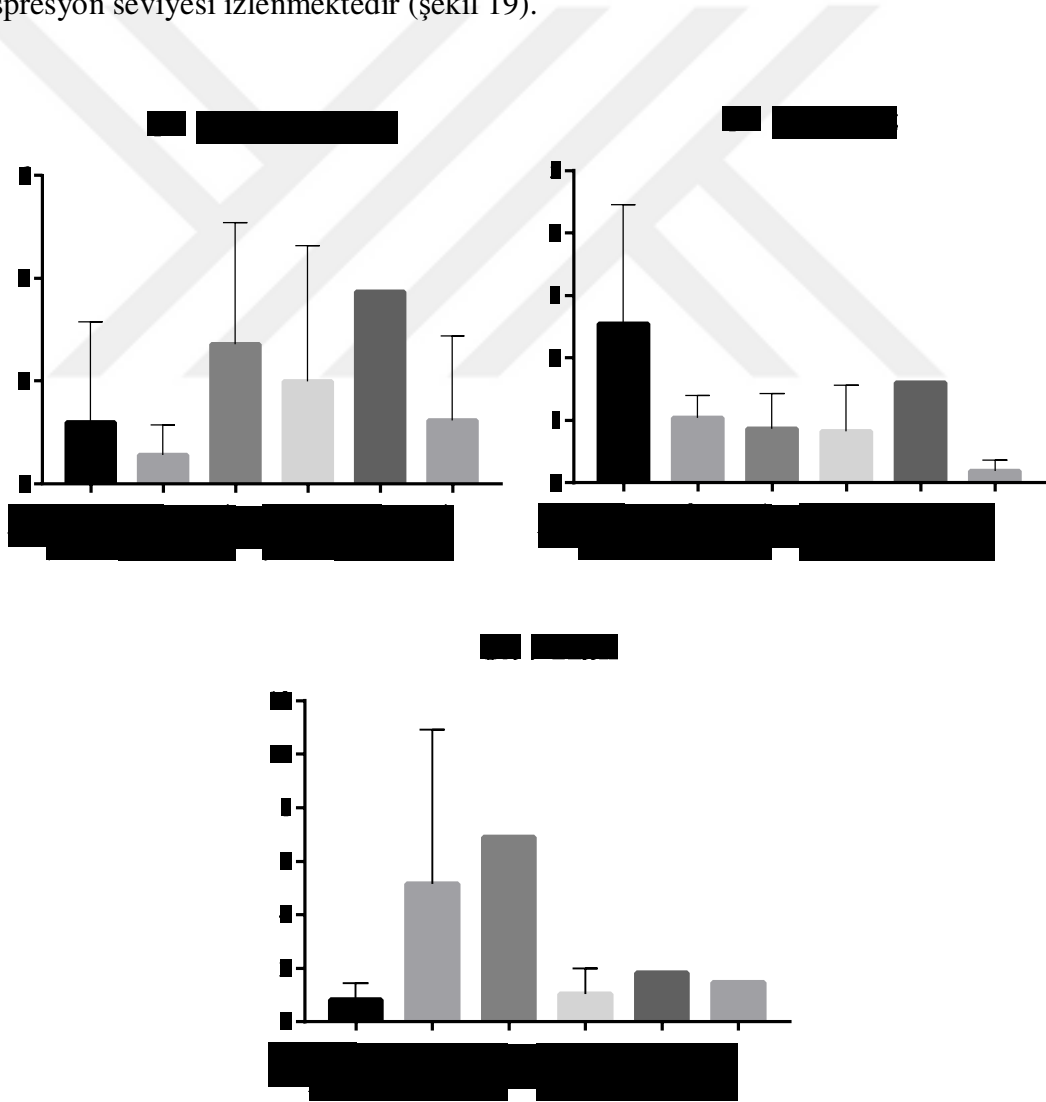
İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da hem erkek hem de dişilerde beklenildiği gibi F0 dan F1 e geçişte ekspresyonlarda bir azalma vardır(şekil 19).

Tablo 18. *GH* kan ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|-----------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 7 | 5 | 1 | 5 | 1 | 1 |
| Minimum | 0,066 | 0,2515 | 6,91 | 0,02625 | 1,826 | 1,463 |
| Maximum | 1,813 | 14,81 | 6,91 | 2,547 | 1,826 | 1,463 |
| Mean | 0,8167 | 5,146 | 6,91 | 1,035 | 1,826 | 1,463 |
| Std. Deviation | 0,6383 | 5,785 | 0 | 0,9713 | 0 | 0 |
| P=0,0731 | | | | | | |

Kandaki *GH* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=5, 1±5, 8) ve kontrol erkek (n=7, ortalama=0, 8±0, 6) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,0731).

İstatiksel olarak anlamlı saptanmasa da burada hem F0 hem F1 farelerde kontrole göre bir artış vardır.F1 paramutant erkekde örnek sayısının tek olması nedeniyle ekspresyon ortalaması yüksek gözükmemektedir.F0 paramutant erkeklere bakıldığında ekspresyonu çok yüksek olan örnekler görmekteyiz. Yani örnek sayısı F1 grubunda artsaydı, belki de F0 dan F1 e geçişte ekspresyonun bariz azalmasını görebilirdik. Dişilerde ise birer örnek olmasına rağmen F0 dan F1 e geçişte hafif bir düşüş vardır.Erkek paramutantlarda olduğu gibi dişi paramutantlarda da kontrole göre artmış bir ekspresyon seviyesi izlenmektedir (şekil 19).



Şekil 19. Hipotalamus, hipofiz ve kanda *GH* geni ekspresyon kıyaslanması

4.3.2. IGF1

Tablo 19. IGF1 hipotalamus ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 7 | 5 | 3 | 12 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,673 | 0,3581 | 0,5698 | 0,2043 | 1,013 | 0,4596 |
| Maximum | 1,801 | 1,601 | 1,013 | 2,547 | 1,013 | 1,213 |
| Mean | 1,231 | 0,8924 | 0,8405 | 1,183 | 1,013 | 0,8363 |
| Std. Deviation | 0,3944 | 0,4618 | 0,2373 | 0,7815 | 0 | 0,5327 |

P= 0,2566

IGF1 geni ekspresyon sonuçları **şekil 20**'de verilmiştir. Hipotalamustaki IGF1 ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=0, 9±0, 5), F1 miR-124* erkek (n=3, ortalama=0, 8±0, 2) ve kontrol erkek (n=7, ortalama=1, 2±0, 4) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır (P= 0,2566). Hipotalamus ekspresyonunda F0'dan F1'e her iki cinsiyette de bir azalma vardır. Fakat kontrol gruplarının ekspresyonları ilginç şekilde paramutantlardan fazla çıkmıştır (Şekil 20).

Tablo 20. IGF1 hipofiz ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 3 | 13 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,1605 | 0,3512 | 0,1869 | 0,4354 | 0,2953 | 0,2536 |
| Maximum | 1,405 | 0,7848 | 0,8412 | 4,085 | 0,2953 | 0,7581 |
| Mean | 0,6651 | 0,5814 | 0,572 | 1,598 | 0,2953 | 0,5058 |
| Std. Deviation | 0,4007 | 0,1567 | 0,3422 | 1,192 | 0 | 0,3568 |

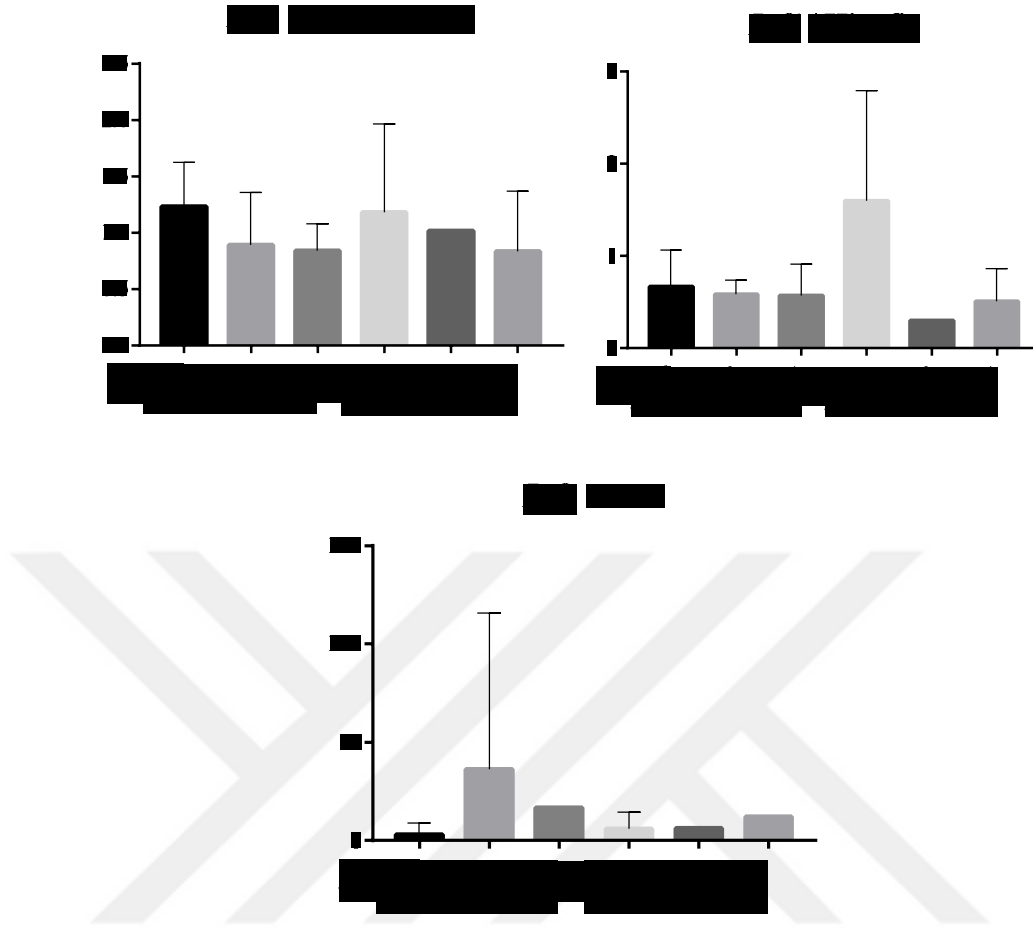
P=0,8737

Hipofizdeki IGF1 ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=0, 6±0, 2), F1 miR-124* erkek (n=3, ortalama=0, 6±0, 3) ve kontrol erkek (n=8, ortalama=0, 7±0, 4) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,8737). Hipofiz ekspresyonunda yine hipotalamustaki tabloya benzer ve ilginç şekilde kontrollerin ekspresyonları paramutantlardan yüksektir (Şekil 20).

Tablo 21. *IGF1* kan ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 1 | 6 | 1 | 1 |
| Minimum | 0,05219 | 0,1731 | 16,91 | 0,05751 | 6,277 | 12,13 |
| Maximum | 17,51 | 178,5 | 16,91 | 22,16 | 6,277 | 12,13 |
| Mean | 3,062 | 36,39 | 16,91 | 6,151 | 6,277 | 12,13 |
| Std. Deviation | 5,957 | 79,46 | 0 | 8,508 | 0 | 0 |
| P=0,2502 | | | | | | |

Kandaki *IGF1* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=36, 3±79, 4), ve kontrol erkek (n=8, ortalama=3, 5, 9) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,2502). *IGF-1* kan ekspresyon tablosuna bakıldığında (Şekil 20), dişilerde F0 ve F1 grubunda belki de tek örnek olması sebebiyle F0'dan F1'e bir azalma beklerken ilginç bir şekilde artış görüldü. Öyle ki F0 grubundaki dişi neredeyse kontrol(n=6) grubundaki dişilerle aynı ekspresyon seviyesine sahipti. Erkeklerdeki ekspresyon seviyesi ise beklentimize uygun bir şekilde F0>F1>kontrol şeklindedir. Fakat istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilememiştir.



Şekil 20. Hipotalamus, hipofiz ve kanda *IGF1* geni ekspresyon kıyaslanması

4.3.3. *GHRH*

Tablo 22. *GHRH* hipotalamus ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|-----------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 7 | 5 | 3 | 12 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,3954 | 0,6423 | 0,8244 | 0,3982 | 1,33 | 0,195 |
| Maximum | 2,951 | 1,199 | 1,486 | 3,298 | 1,33 | 1,593 |
| Mean | 1,323 | 0,89 | 1,223 | 1,086 | 1,33 | 0,8938 |
| Std. Deviation | 0,8655 | 0,2256 | 0,3509 | 0,7803 | 0 | 0,9883 |
| P=0,5238 | | | | | | |

GHRH geni ekspresyon sonuçları **şekil 21**'de verilmiştir. Hipotalamustaki *GHRH* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=; 0, 9±0, 2), F1 miR-124* erkek (n=3, ortalama=1, 2±0, 3) ve kontrol erkek (n=7, ortalama=1, 3±0, 9) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,5238). Hipotalamustaki ekspresyon grafiği incelendiğinde hem erkek hem de dişilerde kontrol>F1>F0 şeklinde bir ekspresyon sıralaması saptanmıştır (Şekil 21).

Tablo 23. *GHRH* hipofiz ekspresyon sonuçları

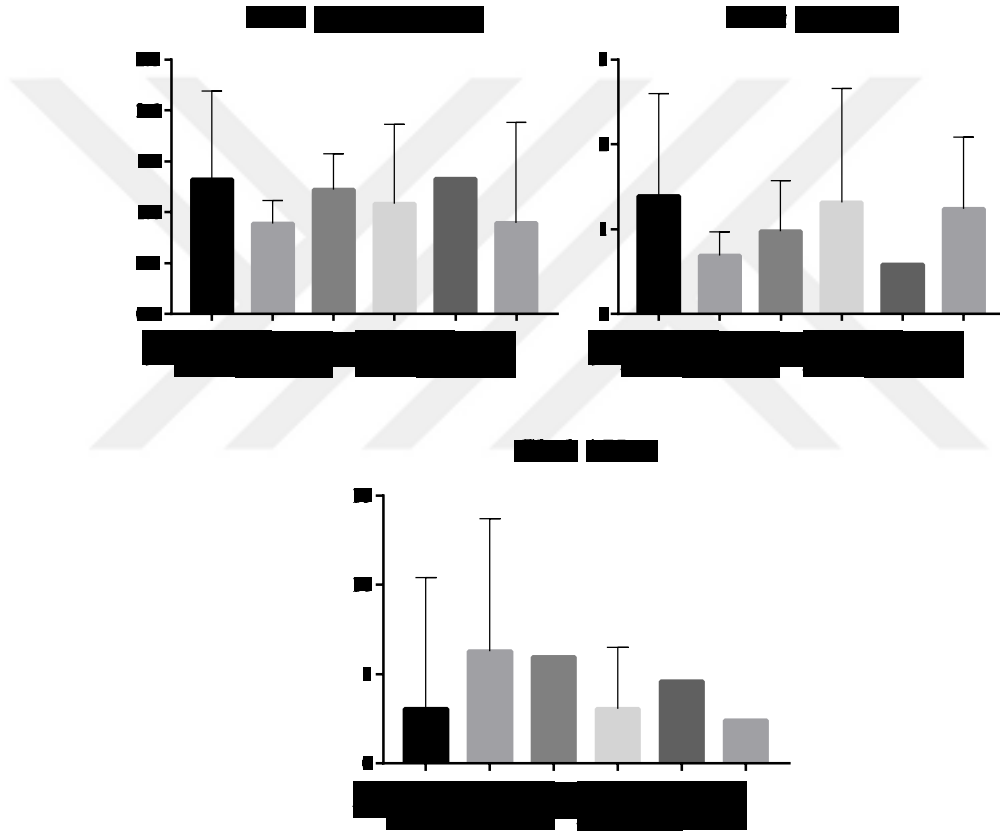
| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|-----------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 3 | 13 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,07119 | 0,207 | 0,381 | 0,2056 | 0,5855 | 0,6407 |
| Maximum | 3,939 | 0,8936 | 1,578 | 5,161 | 0,5855 | 1,837 |
| Mean | 1,389 | 0,6854 | 0,9743 | 1,318 | 0,5855 | 1,239 |
| Std. Deviation | 1,212 | 0,2815 | 0,5984 | 1,34 | 0 | 0,8462 |
| P=0,4296 | | | | | | |

Hipofizdeki *GHRH* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=0, 7±0, 3), F1 miR-124* erkek (n=3, ortalama=1, ±0, 6), ve kontrol erkek (n=8, ortalama=1, 4±1, 2) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,4296). Hipofizdeki ekspresyon grafiği incelendiğinde hem erkek hem de dişilerde kontrol>F1>F0 şeklinde bir ekspresyon sıralaması saptanmıştır (Şekil 21).

Tablo 24. *GHRH* kan ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|-----------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 1 | 6 | 1 | 1 |
| Minimum | 0,1875 | 0,1811 | 5,957 | 0,5193 | 4,61 | 2,403 |
| Maximum | 21,33 | 16,12 | 5,957 | 8,082 | 4,61 | 2,403 |
| Mean | 3,05 | 6,278 | 5,957 | 3,057 | 4,61 | 2,403 |
| Std. Deviation | 7,387 | 7,429 | 0 | 3,456 | 0 | 0 |
| P=0,4604 | | | | | | |

Kandaki *GHRH* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=6, 3 ± 7 , 4), ve kontrol erkek (n=8, ortalama= 3 ± 7 , 4) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,4604). *GHRH* kan ekspresyon grafiğine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı saptanmasa da özellikle erkeklerde F0>F1>kontrol şeklinde azalan bir eğri karşımıza çıkmaktadır. Dişilerde de tek örnek olmasına rağmen F0 dişi F1 ve kontrol dişilerden daha fazla ekspresyon göstermiştir (Şekil 21).



Şekil 21. Hipotalamus, hipofiz ve kanda *GHRH* geni ekspresyon kıyaslanması

4.3.4. IGFBP5

Tablo 25.IGFBP5 hipotalamus ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 7 | 5 | 3 | 12 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,4654 | 0,6099 | 0,839 | 0,4852 | 1,481 | 0,6721 |
| Maximum | 1,019 | 1,228 | 0,9504 | 2,688 | 1,481 | 0,9054 |
| Mean | 0,703 | 0,8489 | 0,8962 | 1,435 | 1,481 | 0,7887 |
| Std. Deviation | 0,2292 | 0,2349 | 0,0558 | 0,6647 | 0 | 0,165 |
| P=0,3486 | | | | | | |

IGFBP5 geni ekspresyon sonuçları Şekil 22’de verilmiştir. Hipotalamustaki IGFBP5 ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=0, 8±0, 2), F1 miR-124* erkek (n=3, ortalama=0, 9±0, 05) ve kontrol erkek (n=7, ortalama=0, 7±0, 2) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,3486).

Hipotalamustaki ekspresyonlara bakıldığında erkeklerde F0 ve F1 ekspresyonları hemen hemen aynı olup kontrol erkeklerden yüksektir. Dişilere bakıldığında ise F0’dan F1’e bir azalma varken, kontrol dişilerdeki yüksek ekspresyon seviyesi dikkati çekmektedir. Bu yükseklik kontrol dişilerin sayısının fazla olmasından kaynaklı olabilir. (Şekil 22)

Tablo 26.IGFBP5 hipofiz ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 3 | 13 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,6339 | 1,583 | 1,989 | 0,1758 | 0,6985 | 0,2241 |
| Maximum | 3,817 | 4,034 | 4,148 | 2,399 | 0,6985 | 0,433 |
| Mean | 1,813 | 2,867 | 3,258 | 0,9852 | 0,6985 | 0,3285 |
| Std. Deviation | 1,245 | 1,03 | 1,128 | 0,7095 | 0 | 0,1477 |
| P=0,1472 | | | | | | |

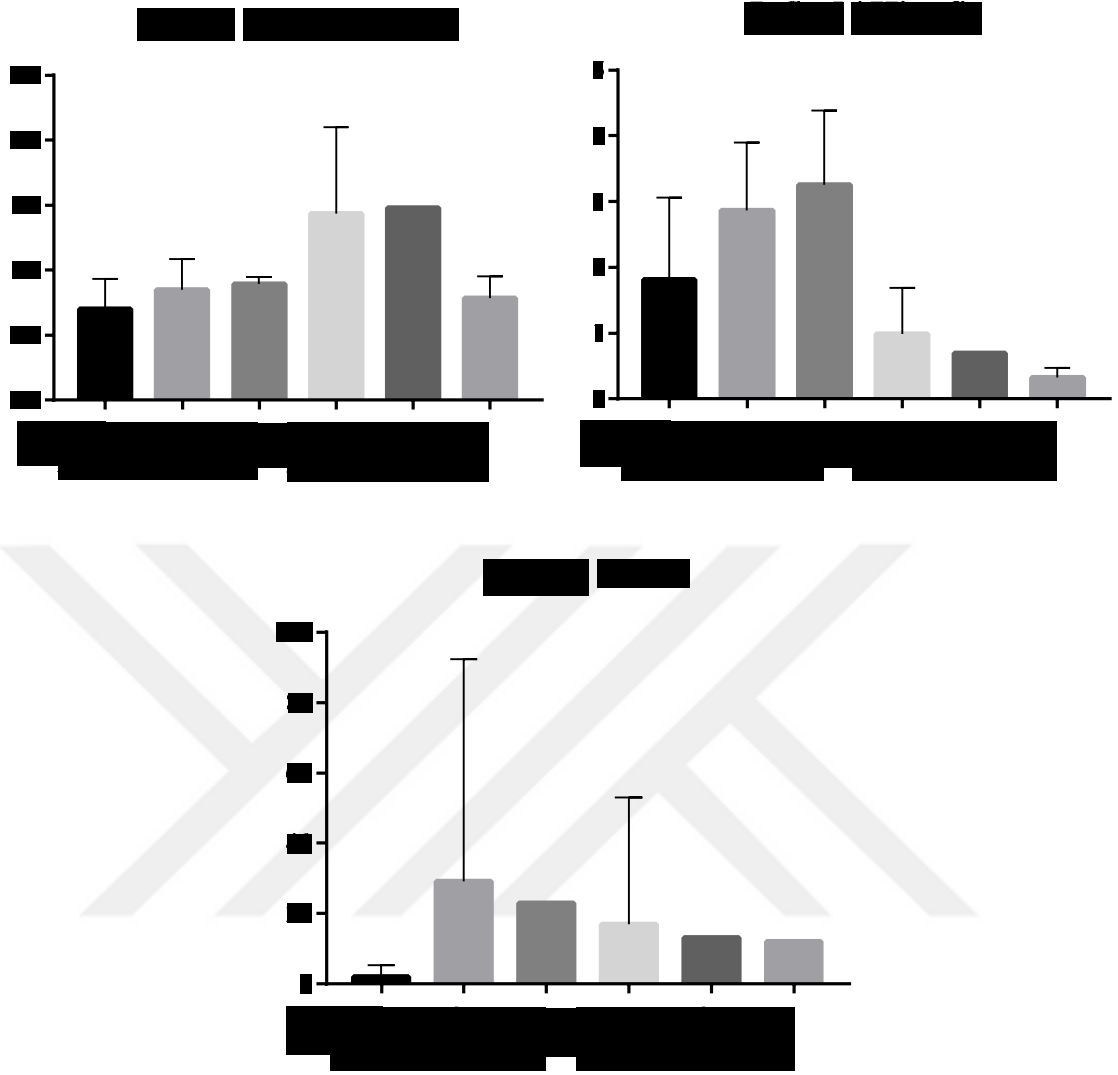
Hipofizdeki *IGFBP5* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=2, 9±1), F1 miR-124* erkek (n=3, ortalama=3, 3±1,1) ve kontrol erkek (n=8, ortalama=1, 8±1,2) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.(p=0,1472).

Hipofizdeki ekspresyonlara bakıldığında erkeklerde F0 ve F1'deki artmış ekspresyon seviyeleri dikkati çekmektedir.F1 paramutant erkeğin kontrol erkek ve F1 paramutant dişilere göre istatistiksel olarak anlamlandırılmasa da artmış ekspresyonu dikkati çekmektedir. Nitekim F1 paramutant erkekler ağırlık olarak bu gruplardan daha ağırdır. Aynı zamanda F0 paramutant erkeğin, F0 paramutant dişilere ve kontrol erkeklere kıyasla daha fazla ekspresyon gösterdiği istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da grafikte bariz olarak izlenmektedir (Şekil 22).

Tablo 27.*IGFBP5* kan ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 1 | 6 | 1 | 1 |
| Minimum | 0,04156 | 0,07439 | 22,96 | 0,1807 | 13,01 | 12,05 |
| Maximum | 9,858 | 142,2 | 22,96 | 90,59 | 13,01 | 12,05 |
| Mean | 2,017 | 29,21 | 22,96 | 16,96 | 13,01 | 12,05 |
| Std. Deviation | 3,24 | 63,15 | 0 | 36,15 | 0 | 0 |
| P=0,2373 | | | | | | |

Kandaki *IGFBP5* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=29, 2±63, 1) ve kontrol erkek (n=8, ortalama= 2±3, 2) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,2373). *IGFBP5*'in kandaki ekspresyon paterni incelendiğinde dişi paramutantlarda tek örnek olduğundan erkekler üzerinden yorumlamak daha doğru olacaktır. Erkeklerde ise F0>F1>kontrol şeklinde bir ekspresyon mevcut olup, istatistiksel olarak anlamlı saptanmasa da iri fenotiple ilgili beklentimize uygun şekilde sonuçlanmıştır (Şekil 22).



Şekil 22. Hipotalamus, hipofiz ve kanda *IGFBP5* geni ekspresyon kıyaslanması

4.3.5. *GHR*

Tablo 28. *GHR* hipotalamus ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|-------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 7 | 5 | 3 | 12 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,5249 | 0,8351 | 0,5783 | 0,2932 | 1,58 | 0,717 |
| Maximum | 3,182 | 1,125 | 1,094 | 2,99 | 1,58 | 1,214 |
| Mean | 1,289 | 0,9468 | 0,7517 | 1,13 | 1,58 | 0,9656 |
| Std. Deviation | 0,8739 | 0,1204 | 0,2967 | 0,8472 | 0 | 0,3516 |
| P=0,4357 | | | | | | |

GHR geni ekspresyon sonuçları **şekil 23**'de verilmiştir. Hipotalamustaki *GHR* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=0, 9±0, 1), F1 miR-124* erkek (n=3, ortalama=0, 7±0, 3) ve kontrol erkek (n=7, ortalama=1, 3±0, 9) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,4357). *GHR* hipotalamus ekspresyonlarında birbirine yakın ekspresyon seviyeleri gözlenmiş olup, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Tablo 29. *GHR* hipofiz ekspresyon sonuçları

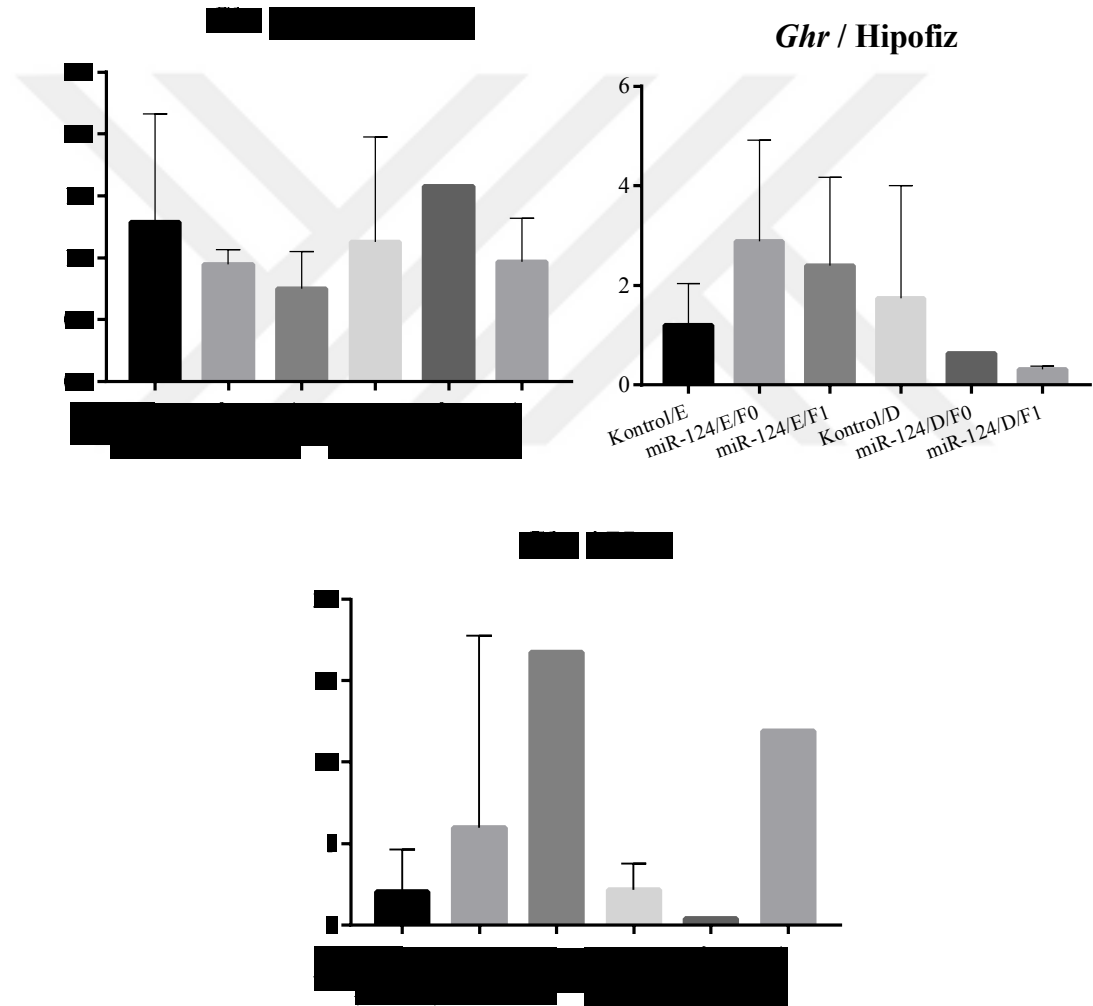
| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|-----------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 3 | 13 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,3163 | 0,9392 | 1,057 | 0,1947 | 0,6327 | 0,2851 |
| Maximum | 2,602 | 6,146 | 4,406 | 8,337 | 0,6327 | 0,3634 |
| Mean | 1,197 | 2,894 | 2,397 | 1,742 | 0,6327 | 0,3242 |
| Std. Deviation | 0,8382 | 2,021 | 1,772 | 2,26 | 0 | 0,05535 |
| P=0,1434 | | | | | | |

Hipofizdeki *GHR* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=2, 9±2), F1 miR-124* erkek (n=3, ortalama=2, 4±1, 8) ve kontrol erkek (n=8, ortalama=1, 2±0,8) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,1434). *GHR* hipofiz ekspresyonlarında erkeklerde yine istatistiksel olarak anlamlı olmayan sonuçlarda fenotipik bulgularımızla uyumlu olarak F0>F1>kontrol şeklinde bir sıralama göze çarpmaktadır.

Tablo 30. *GHR* kan ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|-----------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 1 | 6 | 1 | 1 |
| Minimum | 0,07894 | 0,1852 | 16,76 | 1,005 | 0,4166 | 11,93 |
| Maximum | 7,504 | 27 | 16,76 | 5,194 | 0,4166 | 11,93 |
| Mean | 2,053 | 5,994 | 16,76 | 2,152 | 0,4166 | 11,93 |
| Std. Deviation | 2,57 | 11,77 | 0 | 1,626 | 0 | 0 |
| P=0,3695 | | | | | | |

Kandaki *GHR* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=6±11,8) ve kontrol erkek(n=8, ortalama=2±2,6) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,3695). *GHR*'nin kandaki ekspresyonu incelendiğinde dişiler tek örnek olduğundan erkekler üzerinden yorum yapmak daha doğru olacaktır. İstatistiksel olarak anlamlı saptanmasa da F0 ve F1 den kontrole bir azalma göze çarpmaktadır. F1 tek örnek olduğu için F0 a göre yüksekliği bilgi verici değildir.



Şekil 23. Hipotalamus, hipofiz ve kanda *GHR* geni ekspresyon kıyaslanması

4.3.6. *IGF1R*

Tablo 31. *IGF1R* hipotalamus ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 7 | 5 | 3 | 12 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,5768 | 1,018 | 1,018 | 0,7004 | 0,8045 | 0,9634 |
| Maximum | 1,353 | 1,41 | 2,801 | 1,501 | 0,8045 | 1,325 |
| Mean | 1,012 | 1,131 | 1,763 | 1,065 | 0,8045 | 1,144 |
| Std. Deviation | 0,3155 | 0,1623 | 0,927 | 0,2624 | 0 | 0,2558 |
| P=0,0858 | | | | | | |

IGF1R geni ekspresyon sonuçları Şekil 24'de verilmiştir. Hipotalamustaki *IGF1R* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek (n=5, ortalama=1,1±0,2), F1 miR-124* erkek (n=3, ortalama=1,8±0,9) ve kontrol erkek (n=7, ortalama=1±0,3) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,0858).

Tablo 32. *IGF1R* hipofiz ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 3 | 13 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,333 | 1,089 | 0,8087 | 0,1835 | 0,7441 | 0,1288 |
| Maximum | 3,125 | 1,745 | 1,795 | 2,956 | 0,7441 | 0,7089 |
| Mean | 1,136 | 1,376 | 1,324 | 1,319 | 0,7441 | 0,4189 |
| Std. Deviation | 0,9685 | 0,3023 | 0,4945 | 0,8092 | 0 | 0,4102 |
| P=0,8405 | | | | | | |

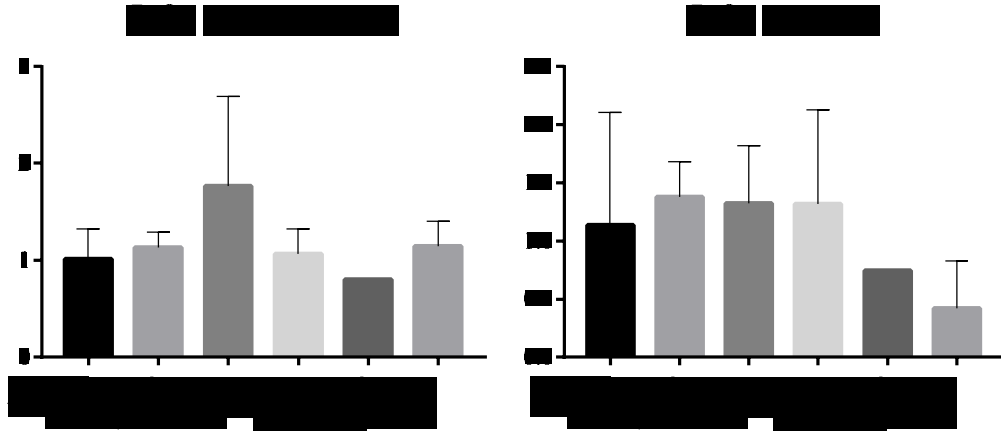
Hipofizdeki *IGF1R* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek(n=5, ortalama=1,4±0,3), F1 miR-124* erkek(n=3, ortalama=1,3±0,5) ve kontrol erkek(n=8, ortalama=1,1±0,96) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır(p=0,8405).

Tablo 33. *IGF1R* kan ekspresyon sonuçları

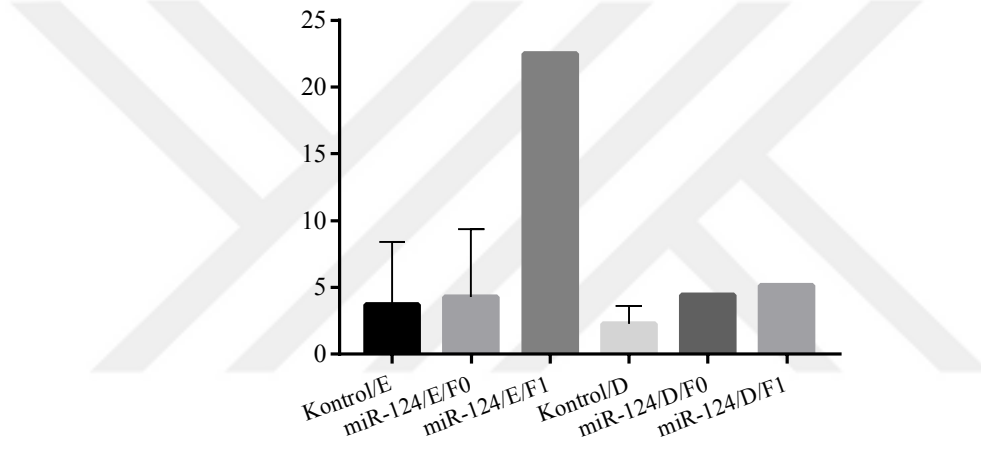
| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 1 | 6 | 1 | 1 |
| Minimum | 0,000219 | 0,7688 | 22,48 | 0,5251 | 4,41 | 5,136 |
| Maximum | 13,94 | 13,09 | 22,48 | 4,289 | 4,41 | 5,136 |
| Mean | 3,698 | 4,288 | 22,48 | 2,258 | 4,41 | 5,136 |
| Std. Deviation | 4,73 | 5,108 | 0 | 1,326 | 0 | 0 |
| P=0,8357 | | | | | | |

Kandaki *IGF1R* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek(n=5, ortalama=4, 3±5, 1) ve kontrol erkek(n=8, ortalama= 3, 7±4, 7) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,8357).

IGF1R kandaki ekspresyon seviyeleri incelendiğinde paramutant dişiler birer örnek olmasına rağmen kontrole göre daha yüksek bir ekspresyon sergilemişlerdir. Erkeklere bakıldığında ise, tek örnek olan F1 paramutant erkek ciddi şekilde artmış bir ekspresyon göstermiştir. F0 paramutant erkekte kontrole hafif bir azalma olsa da bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. F1 paramutant erkeğin kontrol erkek ve F1 paramutant dişilere göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artmış bir ekspresyonu grafikte bariz şekilde görülmektedir (şekil 24).



Igflr / Kan



Şekil 24. Hipotalamus, hipofiz ve kanda *IGF1R* geni ekspresyon kıyaslanması

4.3.7. *IGFBP1*

Tablo 34. *IGFBP1* hipotalamus ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 7 | 5 | 3 | 12 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,6556 | 0,1037 | 1,706 | 0,3394 | 1,19 | 0,9666 |
| Maximum | 2,13 | 1,57 | 2,299 | 2,516 | 1,19 | 3,787 |
| Mean | 1,276 | 0,544 | 2,086 | 1,102 | 1,19 | 2,377 |
| Std. Deviation | 0,5561 | 0,5925 | 0,3293 | 0,7197 | 0 | 1,994 |
| P=0,0066 (p<0,05) | | | | | | |

IGFBP1 geni ekspresyon sonuçları **şekil 25**'de verilmiştir. Hipotalamusdaki *IGFBP1* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek(n=5, ortalama=0, 5±0, 6), F1 miR-124* erkek(n=3, ortalama=2, 1±0, 3) ve kontrol erkek(n=7, ortalama=1, 3±0, 6) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunmuştur(p=0,0066). İkili karşılaştırma yapılırken;

F1 miR-124* erkek ve F0 miR-124* erkek(p=0,0053), arasında istatistiksel olarak anlamlı artmış ekspresyon saptanmıştır (p=0,0053).

Hipotalamustaki ekspresyon bulguları incelendiğinde F1 paramutant dişinin kontrol dişine kıyasla istatistiksel anlamlı artmış ekspresyonu görülmektedir. F0 paramutant erkeklerdeki düşük ekspresyon seviyeleri dikkati çekmektedir. Bundan kaynaklı F1 paramutant erkeklerin F0 paramutant erkeklere kıyasla istatistiksel anlamlı ekspresyon artışı görülmüştür(şekil 25).

Tablo 35. *IGFBP1* hipofiz ekspresyon sonuçları

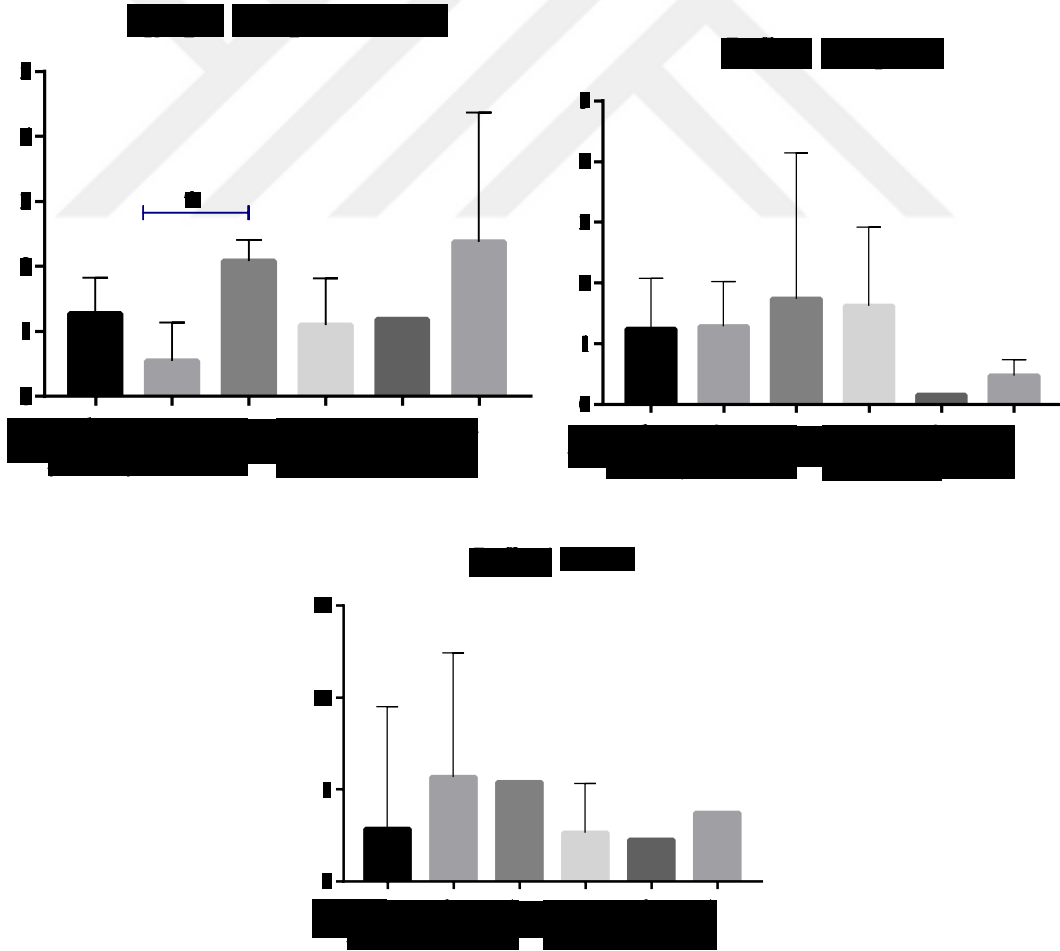
| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|-----------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 3 | 13 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,2648 | 0,3398 | 0,1469 | 0,01862 | 0,1542 | 0,2938 |
| Maximum | 2,554 | 2,089 | 4,509 | 4,035 | 0,1542 | 0,661 |
| Mean | 1,245 | 1,295 | 1,742 | 1,621 | 0,1542 | 0,4774 |
| Std. Deviation | 0,8314 | 0,7321 | 2,405 | 1,299 | 0 | 0,2597 |
| P=0,8227 | | | | | | |

Hipofizdeki *IGFBP1* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek(n=5, ortalama=1, 3±0, 7), F1 miR-124* erkek(n=3, ortalama=1, 8±2, 4) ve kontrol erkek(n=8, ortalama=1, 2±0, 8) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır (p= 0,8227).

Tablo 36. *IGFBP1* kan ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 1 | 6 | 1 | 1 |
| Minimum | 0,1521 | 0,1641 | 5,399 | 0,4706 | 2,254 | 3,739 |
| Maximum | 19,33 | 14,61 | 5,399 | 7,324 | 2,254 | 3,739 |
| Mean | 2,865 | 5,69 | 5,399 | 2,674 | 2,254 | 3,739 |
| Std. Deviation | 6,659 | 6,733 | 0 | 2,665 | 0 | 0 |
| P=0,4742 | | | | | | |

Kandaki *IGFBP1* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek(n=5, ortalama=5, 7±6, 7) ve kontrol erkek(n=8, ortalama= 2, 9±6, 7) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır(p=0,4742).



Şekil 25. Hipotalamus, hipofiz ve kanda *IGFBP1* geni ekspresyon kıyaslanması

4.3.8. GHRL

Tablo 37.GHRL hipotalamus ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 7 | 5 | 3 | 12 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,3639 | 0,5439 | 0,5952 | 0,1437 | 0,947 | 0,3846 |
| Maximum | 4,696 | 2,891 | 1,321 | 2,552 | 0,947 | 1,507 |
| Mean | 2,073 | 1,401 | 0,9841 | 0,9535 | 0,947 | 0,9457 |
| Std. Deviation | 1,315 | 0,9388 | 0,3656 | 0,753 | 0 | 0,7935 |
| P=0,3282 | | | | | | |

GHRL geni ekspresyon sonuçları Şekil 26’da verilmiştir. Hipotalamustaki GHRL ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek(n=5, ortalama=1, 4±0, 9), F1 miR-124* erkek(n=3, ortalama=1±0, 4) ve kontrol erkek(n=7, ortalama=2±1, 3) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,3282).Hipotalamustaki ekspresyon bulguları incelendiğine her iki cinsiyette de kontrol grubunun ekspresyonları F0 ve F1 paramutantlardan daha fazladır.

Tablo 38.GHRL hipofiz ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 3 | 13 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,08954 | 0,3946 | 0,5065 | 0,02467 | 0,6591 | 0,3183 |
| Maximum | 10,05 | 1,646 | 1,704 | 4,72 | 0,6591 | 0,5778 |
| Mean | 2,69 | 1,103 | 1,274 | 1,252 | 0,6591 | 0,4481 |
| Std. Deviation | 3,108 | 0,5291 | 0,6662 | 1,321 | 0 | 0,1835 |
| P=0,4416 | | | | | | |

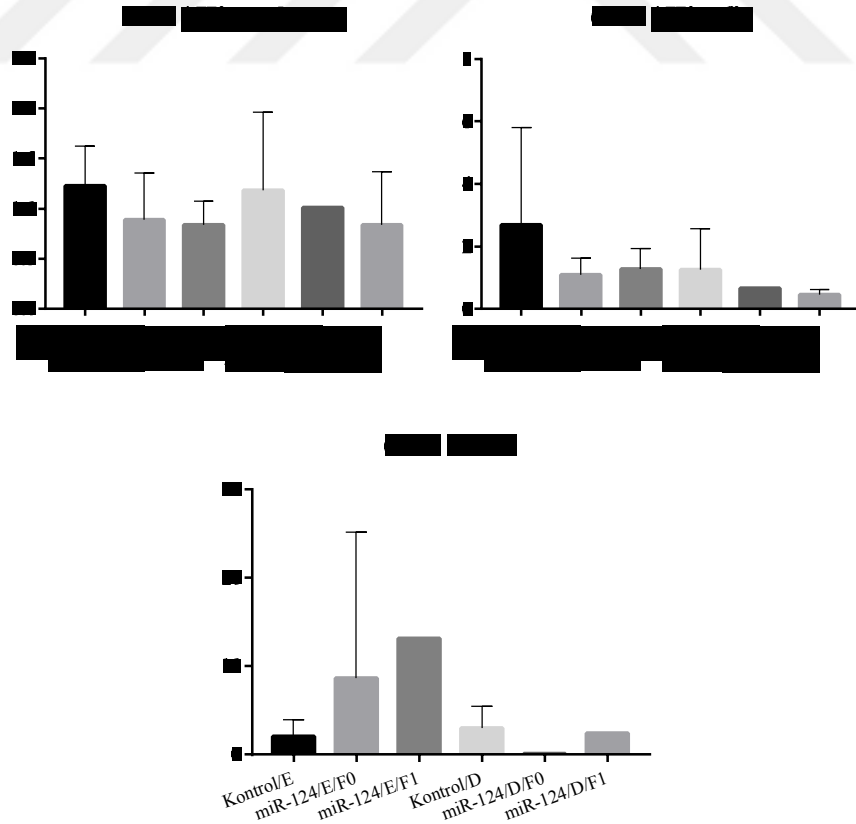
Hipofizdeki GHRL ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek(n=5, ortalama=1, 1±0, 5), F1 miR-124* erkek(n=3, ortalama=1, 3±0, 7) ve kontrol erkek(n=8, ortalama=2, 7±3, 1) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,4416). Hipofizdeki ekspresyon bulguları incelendiğine hipotalamustakine paralel

olarak her iki cinsiyette de kontrol grubunun ekspresyonları F0 ve F1 paramutantlardan daha fazladır.

Tablo 39. *GHRL* kan ekspresyon sonuçları

| | Kontrol/ E | miR- 124/E/F0 | miR- 124/E/F1 | Kontrol/ D | miR- 124/D/F0 | miR- 124/D/F1 |
|---------------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 5 | 1 | 6 | 1 | 1 |
| Minimum | 0,1334 | 0,2167 | 13,12 | 0,02864 | 0,07824 | 2,452 |
| Maximum | 5,042 | 38,11 | 13,12 | 5,479 | 0,07824 | 2,452 |
| Mean | 2,082 | 8,64 | 13,12 | 3,006 | 0,07824 | 2,452 |
| Std. Deviation | 1,864 | 16,51 | 0 | 2,459 | 0 | 0 |
| P=0,2775 | | | | | | |

Kandaki *GHRL* ekspresyon sonuçları; F0 miR-124* erkek(n=5, ortalama=8, 6±16, 5) ve kontrol erkek(n=8, ortalama=2±1, 8) arasında karşılaştırıldığında gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,2775).

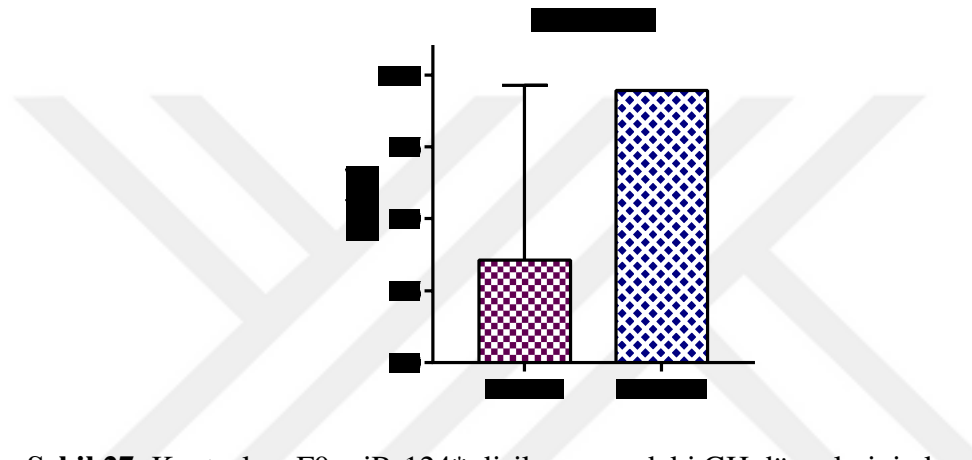


Şekil 26. Hipotalamus, hipofiz ve kanda *GHRL* geni ekspresyon kıyaslanması

4.4. ELISA ile GH ve IGF-1 Protein Konsantrasyon Bulguları

GH / F0 miR-124* D- Dişi

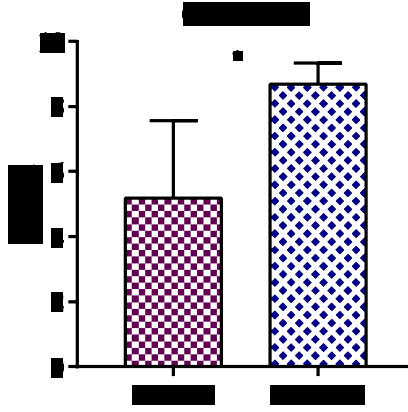
Kontrol grubu(n=4) için GH'un örnekteki konsantrasyonu $3,5 \pm 6,1$ ng/ml miR-124 grubu(n=1) için GH'un örnekteki konsantrasyonu 9,46 ng/ml olup, miR-124 grubundaki GH'un örnekteki konsantrasyonunun kontrol grubuna kıyasla arttığı görülmektedir.



Şekil 27. Kontrol ve F0 miR-124* dişiler arasındaki GH düzeylerinin karşılaştırması.

GH / F0 miR-124* E- Erkek

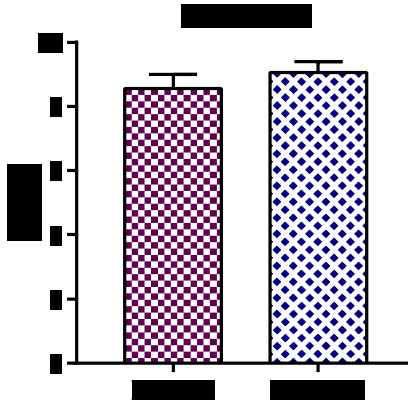
Kontrol grubu(n=4) için GH'un örnekteki konsantrasyonu $5,1 \pm 2,4$ ng/ml miR-124 grubu(n=4) için GH'un örnekteki konsantrasyonu $8,7 \pm 0,6$ ng/ml olup, gruplar kıyaslandığında, miR-124 grubu erkeklerde kontrol grubu erkeklere göre artmış bir GH düzeyi göze çarpmaktadır. $p=0,0296$ yani $p<0,05$; olduğundan gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmuştur.



Şekil 28. Kontrol ve F0 miR-124* erkekler arasındaki GH düzeylerinin karşılaştırması.

GH / F1 miR-124* D- Dişi

Kontrol grubu(n=10) için GH'un örnekteki konsantrasyonu $8,5 \pm 0,4$ ng/ml miR-124 grubu(n=2) için GH'un örnekteki konsantrasyonu $9,1 \pm 0,3$ ng/ml olup, gruplar kıyaslandığında, miR-124 grubu dişilerde kontrol gruba göre çok hafif artmış GH düzeyleri izlenmektedir. Fakat $p= 0,1605$ yani $p>0,05$; gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark bulunamamıştır.

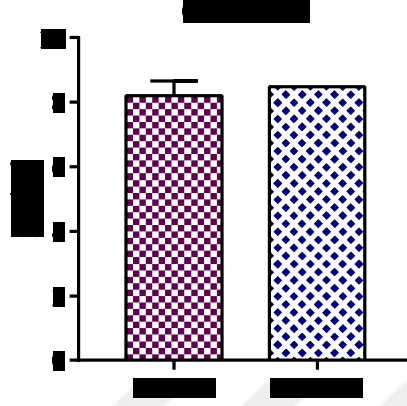


Şekil 29. Kontrol ve F1 miR-124* dişiler arasındaki GH düzeylerinin karşılaştırması.

GH / F1 miR-124* E- Erkek

Kontrol grubu(n=4) için GH'un örnekteki konsantrasyonu $8,2 \pm 0,5$ ng/ml miR-124 grubu(n=1) için GH'un örnekteki konsantrasyonu 8,5 ng/ml olup,

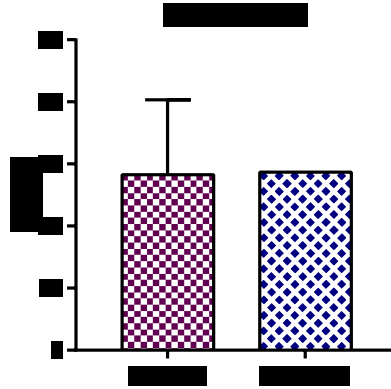
F1 miR-124* erkek ve kontrol grubunun GH düzeyleri hemen hemen aynı düzeyde bulunmuştur.



Şekil 30. Kontrol ve F1 miR-124* erkekler arasındaki GH düzeylerinin karşılaştırması.

IGF1 / F0 miR-124* D- Dişi

Kontrol grubu(n=4) için IGF-1 'in örnekteki konsantrasyonu 28,3± 12 ng/ml miR-124 grubu(n=1) için IGF-1 'in örnekteki konsantrasyonu 28,7 ng/ml olup, F0 miR-124* dişi ile kontrol grubu kıyaslandığında IGF-1 düzeyleri açısından benzer oldukları görülmektedir.

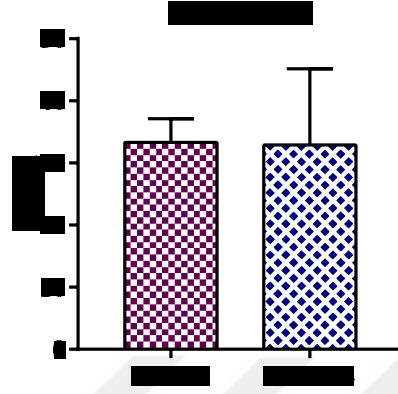


Şekil 31. Kontrol ve F0 miR-124* dişiler arasındaki IGF-1 düzeylerinin karşılaştırması.

IGF1/ F0 miR-124* E- Erkek

Kontrol grubu (n=4) için IGF-1 'in örnekteki konsantrasyonu 33,3± 3,8 ng/ml

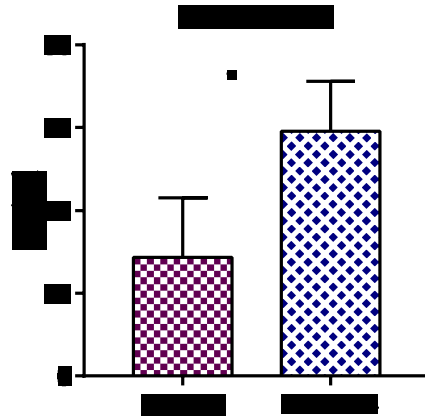
miR-124 grubu (n=4) için IGF-1 'in örnekteki konsantrasyonu $32,9 \pm 12,2$ ng/ml olup, gruplar kıyaslandığında $p= 0,9596$ yani $p>0,05$; gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark bulunamamıştır.



Şekil 32. Kontrol ve F0 miR-124* erkekler arasındaki IGF-1 düzeylerinin karşılaştırması.

IGF1 / F1 miR-124* D- Dişi

Kontrol grubu için (n=10) IGF-1'in örnekteki konsantrasyonu $28,6 \pm 14,5$ ng/ml miR-124 grubu (n=2) için IGF-1'in örnekteki konsantrasyonu $59,1 \pm 12,1$ ng/ml olup, gruplar kıyaslandığında, miR-124 grubu dişilerde kontrol grubuna kıyasla artmış bir IGF-1 düzeyi görülmektedir. $p=0,0202$ yani $p<0,05$; saptanmış olup gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmuştur.

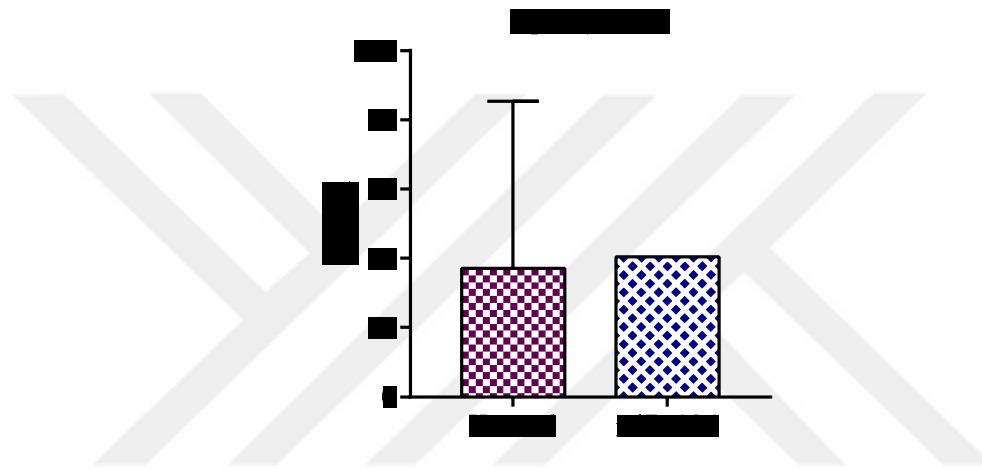


Şekil 33. Kontrol ve F1 miR-124* dişiler arasındaki IGF-1 düzeylerinin karşılaştırması.

IGF1 / F1 miR-124* E- Erkek

Kontrol grubu(n=4) için IGF-1 'in örnekteki konsantrasyonu 37, 1± 48, 3 ng/ml
miR-124 grubu(n=1) için IGF-1 'in örnekteki konsantrasyonu 40, 5 ng/ml olup,

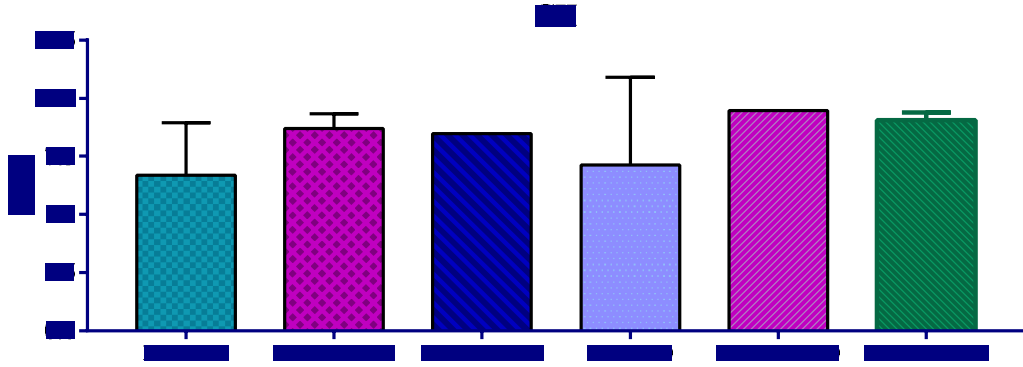
F1 miR-124* erkek ve kontrol grubu erkeklerin IGF-1 düzeyleri karşılaştırıldığında miR-124 grubu erkeklerdeki IGF-1 düzeyinin kontrole kıyasla çok az arttığı, ama bariz bir farkın olmadığı görülmektedir.



Şekil 34. Kontrol ve F1 miR-124* erkekler arasındaki IGF-1 düzeylerinin karşılaştırması.

Tablo 40. GH kan düzeyleri

| | Kontrol/ E | miR- 124/F0-E | miR- 124/F1-E | Kontrol/ D | miR- 124/F0-D | miR- 124/F1-D |
|-------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 4 | 1 | 14 | 1 | 2 |
| Minimum | 1,701 | 7,948 | 8,48 | 3,943 | 9,464 | 8,834 |
| Maximum | 8,855 | 9,517 | 8,48 | 9,249 | 9,464 | 9,305 |
| Mean | 6,688 | 8,692 | 8,48 | 7,143 | 9,464 | 9,069 |
| Std. Deviation | 2,263 | 0,6425 | 0 | 3,765 | 0 | 0,3334 |
| p= | 0,1202 | | | | | |

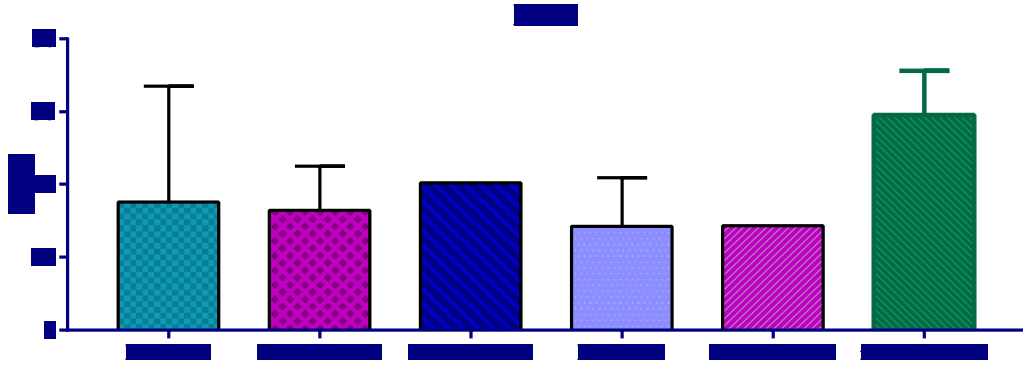


Şekil 35. Tüm gruplardaki GH düzeylerinin karşılaştırılması

GH düzeyleri; F0 miR-124* erkek (n=4, ortalama 8, 7±0, 6) ve kontrol erkek (n=8, ortalama 6, 7±2, 3) arasında kıyaslandığında gruplar arası anlamlı bir fark saptanmamıştır (p= 0,1202).Gruplar arası istatistiksel bir fark saptanmasa bile beklediğimiz üzere F0 miR-124* erkek ten F1 miR-124* erkeğe ve kontrol erkeğe gidildikçe GH düzeylerinde bir düşüş görülmektedir.Dişilerde de beklenen şekilde F0 dan F1 e ve kontrole doğru gidildikçe azalan bir grafik görmekteyiz.Ayrıca örnek sayılarına baktığımızda kontrol grubundaki örnek sayısının çok daha fazla olması sebebiyle grafikte belirgin bir artış gözlenmemiş olabilir.Şayet paramutantlardaki örnek sayısı artsa idi onlarda da daha yüksek GH ortalamaları ile karşılaşıp istatistiksel bir anlam elde edebilirdik.

Tablo 41. IGF-1 kan düzeyleri

| | Kontrol/ E | miR- 124/F0-E | miR- 124/F1-E | Kontrol/ D | miR- 124/F0-D | miR- 124/F1-D |
|-------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|
| n | 8 | 4 | 1 | 14 | 1 | 2 |
| Minimum | 0,7607 | 19,62 | 40,48 | 12,56 | 28,7 | 50,55 |
| Maximum | 107,6 | 46,37 | 40,48 | 62,89 | 28,7 | 67,62 |
| Mean | 35,2 | 32,93 | 40,48 | 28,53 | 28,7 | 59,08 |
| Std. Deviation | 31,82 | 12,18 | 0 | 13,37 | 0 | 12,07 |
| P=0,8954 | | | | | | |



Şekil 36. Tüm gruplardaki IGF-1 düzeylerinin karşılaştırılması.

IGF-1 düzeyleri; F0 miR-124* erkek (n=4, ortalama 32, 9±12, 2) ve kontrol erkek (n=8, ortalama 35, 2±31, 8) arasında kıyaslandığında gruplar arası anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,8954). Her iki cinsiyette de F1 den kontrole bir düşüş vardır. F0 gruplarına bakıldığında ise diğer tüm gruplara kıyasla en düşük IGF-1 seviyelerini görmekteyiz.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Döllenmiş fare embriyosuna 0,5. günde miR-124-3p mikroenjeksiyonu yapıldığında (paramutant/miR-124*) hem prenatal hem de postnatal dönemde belirgin şekilde fark edilen iri fenotipli fareler oluşmaktadır (Şekil 7). Bu bulgu bize yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki bir RNA parçasının fenotipik olarak gözlemlenebilen bir değişime yol açabileceğini göstermektedir. Bu sonuç, DNA dizisinde bir değişiklik olmaksızın gen ifadesindeki kalıtsal değişiklikler olarak basitçe tanımladığımız epigenetiğin aslında ne kadar güçlü bir mekanizma olduğunu açıklar niteliktedir. Bu konu ile ilgili literatürde Mino Rassoulzadegan ve ekibinin 2009 yılında yaptığı çalışma ve Özkul ve ekibinin yaptığı (yayınlanmamış) çalışma harici başka çalışma yoktur. Bahsi geçen çalışmalarda miR-124* embriyoların embriyonik dönemden başlayıp yetişkinlik dönemine kadar devam eden ve daha sonra birkaç kuşak boyunca miras kalan, aşırı bir büyüme sergiledikleri belirtilmiştir [11]. MiR-124'ün bu etkisini hangi metabolik yolak üzerinden gerçekleştirdiğine dair literatürde herhangi bir bulguya rastlamadık. Bu çalışmada muhtemel en güçlü yolak olarak kabul ettiğimiz GH-IGF-1 sistemi üzerine yöneldik.

miR-124-3p mikroenjeksiyonu ile hem prenatal hem postnatal dönemde daha iri fenotipe sahip fareler elde ettiğimiz gözlemini desteklemek için 2 ardışık jenerasyonda (F0 ve F1) yaklaşık 31-36 hafta boyunca haftalık olarak farelerin ağırlıklarını tartarak aşağıda belirttiğimiz çıkarımlara ulaştık.

Mino Rassoulzadegan ve ekibinin 2009 yılında yaptığı çalışmada miR-124 mikroenjeksiyonu sonucu doğan B6D2 ırkı 8 erkek, 12 dişi ve kontrol farelerin 50 gün boyunca kilo takibini yapmışlardır. Bu takip sonunda paramutant farelerin yaklaşık %30 daha iri olduklarını göstermişlerdir [11]. Bizim çalışmamızda ise Balb/c ırkı fare kullanılmıştır ve miR-124* fareler ile kontrollerinin 2 ardışık jenerasyonda yaklaşık 31-36 hafta boyunca haftalık olarak ağırlıkları takip edilmiştir. Bizim bulgularımızda da bu çalışmayla uyumlu olarak F0 jenerasyon paramutantlarda kontrole göre yaklaşık %28 lik, F1 jenerasyon paramutantlarda kontrole göre yaklaşık %17 lik bir ağırlık artışı saptanmıştır. F0 dan F1 e ise yaklaşık %9 luk bir ağırlık azalması olduğu bulunmuştur. Bulgularımız değerlendirildiğinde yapılan mikroenjeksiyonun etkisinin iki jenerasyonda da devam ettiği fakat effektin giderek azaldığı söylenebilir. Ayrıca bu sonuçtan hareketle birkaç nesil sonra bu etkinin git gide azalarak kaybolacağını öngörülebilir. Nitekim Grandjean ve ark. [284] miR-124* B6D2 ırkı farelerin %30 daha iri olduklarını bulduğu çalışmalarında miR-124* erkek ve dişileri sağlıklı kontrol grubu fareler ile çaprazlayarak elde ettiği nesillerde de daha iri fenotipin F2 nesline kadar devam ettiğini ancak F3 neslinde paramutantlarda ağırlığın normale döndüğünü belirtmişlerdir. Bu sonuç bizim bulgularımıza paralel ve öngörümüzü destekler niteliktedir. Biz de çalışmamızda miR-124* erkekleri miR-124* dişiler ile çiftleştirerek elde ettiğimiz F1 neslinde iri fenotipin devam ettiğini fakat F0 jenerasyonununa kıyasla F1 jenerasyonunda az da olsa bir küçülmenin olduğunu gördük. miR-124 mikroenjeksiyonu sonucu oluşan bu etkinin nesilden nesile azalarak kaybolacağını, etkinin devamlılığı için uyarının (miR-124) sürekli maruziyetinin gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Tartımlar sonucu her iki jenerasyonda da miR-124* hem dişi hem de erkek farelerin kontrol erkek ve dişilerden daha ağır oldukları Şekil 8'deki grafikte bariz olarak belirgindir. Jenerasyonlar arasında bakıldığında ise F0 miR-124* erkek fareler en ağırken; bunu sırasıyla F1 miR-124* erkek fareler, F0 miR-124* dişi fareler, kontrol erkekler, F1 miR-124* dişi ve son sırada kontrol dişiler izlemektedir. Kontrol erkekler ve F1 miR-124* dişi fareler arasında zaman zaman sıralamada değişiklik olsa da bu iki grup da kontrol dişilerden hep daha ağır olmuşlardır. Grafik incelendiğinde genel olarak kontrollere kıyasla F0 miR-124* lerdeki belirgin ağırlık artışının azalarak da olsa F1

jenerasyonunda da devam ettiği görülmektedir. Cinsiyet olarak ise hemen her zaman erkeklerin dişilerden daha ağır olduğu bulgusuna rastlanmaktadır. Bu durum erkeklerdeki Y kromozomu üzerindeki GCY (Growth control in the Y) bölgesinden kaynaklı olabilir ve her zaman erkeklerin dişilerden daha ağır olması ile açıklanabilir. Farelerin ağırlık kıyaslamalarında haftalar arası hafif dalgalanmalar olmuştur. Bu durum yem tüketim miktarlarındaki artış azalışlarla ilgili olabilir. Özkul ve ekibinin yaptığı bir önceki benzer çalışmada farelerin haftalık yem takipleri yapılmıştır. Fakat yem miktarları ile ağırlık sıralamasında birebir korelasyon gözlemlenmemiştir. Bizim çalışmamızda yem takibi yapılmamıştır. Aynı zamanda farelerin eşeyssel olgunluğa ulaştığı dönemlerde oluşan hormonal değişimlerden kaynaklı olarak da ağırlık değişimleri olmuş olabilir. Ama sonuç olarak bakıldığında ortalama genel sıralama değişmemiştir.

GH kan ekspresyon bulguları incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı saptanmasa da paramutant erkeklerde kontrole göre belirgin bir artış vardır. F1 paramutant erkeklerde örnek sayısının tek olması nedeniyle ekspresyon ortalaması yüksek gözükmektedir. F0 paramutant erkeklerde bakıldığında ekspresyonu çok yüksek olan örnekler görülmektedir. Yani örnek sayısı F1 grubunda artsaydı, belki de F0 dan F1 e geçişte ekspresyonun bariz azalmasını görebilirdik. Dişilerde ise birer örnek olmasına rağmen F0 dan F1 e geçişte hafif bir düşüş vardır. Erkek paramutantlarda olduğu gibi dişi paramutantlarda da kontrole göre artmış bir ekspresyon seviyesi izlenmektedir (şekil 19).

ELISA yöntemi ile GH düzeyleri karşılaştırıldığında; gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,1202$). Gruplar arası istatistiksel bir fark saptanmasa bile beklediğimiz üzere F0 miR-124* erkekten F1 miR-124* erkeğe ve kontrol erkeğe gidildikçe GH düzeylerinde bir düşüş görülmektedir. Dişilerde de beklenen şekilde F0 dan F1 e ve kontrole doğru gidildikçe azalan bir grafik görülmektedir (şekil 35). Ayrıca örnek sayılarına baktığımızda kontrol grubundaki örnek sayısının çok daha fazla olması sebebiyle istatistiksel bir artış gözlenmemiş olabilir. Şayet paramutantlardaki örnek sayısı artsa idi onlarda da daha yüksek GH ortalamaları ile karşılaşılabilir istatistiksel bir anlam elde edebilirdik. Örnek sayıları ve GH minimum ve maximum değerleri dikkatli incelendiğinde paramutant dişilerin örnek sayısı arttığında kontrollerden yüksek GH seviyeleri izleneceğini öngörmekteyiz. Tek tek GH düzeylerine bakıldığında özellikle F0

paramutantlar kontrolleriyle kıyaslandığında yüksek GH seviyeleri görülmektedir.F0 paramutant erkek grubundaki GH düzeyleri kontrolleriyle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 28). F0 paramutant dişinin de kontrollerine göre artmış GH düzeyi izlenmektedir (Şekil 27). Bu bulgular GH düzeylerindeki artışın iri fenotipe katkı sağlamış olabileceğini desteklemektedir.

GH kan ekspresyon bulguları ile ELISA GH protein konsantrasyonları korelidir. Beklenildiği üzere erkeklerde ve dişilerde F0>F1>kontrol şeklindedir (Şekil 19 ve şekil 35).Bu durumda ekspresyon seviyeleri beklenen sıralamaya uygundur fakat bu yolakta miR-124'ün *GHI*'i etkileyip onun ekspresyonunu artırarak farelerin iri fenotipine sebep olduğunu söyleyebilmek için yeterli ekspresyon artışı gözlenmemiştir.Bu öngörünün doğrulanması için örnek sayılarının artırılarak daha optimal şartların olduğu çalışmalarla desteklenmeye ihtiyaç vardır.

IGF-1 ELISA protein düzeylerine bakıldığında F0 grubunda en yüksek değerlerin olmasını beklerken, en düşük IGF-1 düzeylerine rastlanıldı. Kontrol erkek (n=4) ve F0 paramutant erkeklerin(n=4) örnek sayıları eşit olmasına rağmen beklenenin aksine kontrol grubunda F0 paramutantlara göre artmış bir IGF-1 düzeyi ile karşılaşıldı(şekil 36).Tek tek IGF-1 düzeyleri incelendiğinde ise F1 paramutant dişilerin kontrol grubuna kıyasla anlamlı istatistiksel artışı saptandı ($p<0, 05$) (Şekil 33). Diğer gruplardaki düzeyler hemen hemen eşit seviyelerde idi. IGF-1 kan ekspresyon tablosuna bakıldığında ise dişilerde F0 ve F1 grubunda belki de tek örnek olması sebebiyle F0'dan F1'e bir azalma beklerken ilginç bir şekilde artış görüldü. Öyle ki F0 grubundaki dişi neredeyse kontrol (n=6) grubundaki dişilerle aynı ekspresyon seviyesine sahipti. Erkeklerdeki ekspresyon seviyesi ise hipotezimize uygun bir şekilde F0>F1>kontrol şeklindedir. Fakat istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilememiştir. Dolayısı ile ekspresyon bulguları ve ELISA bulguları birleştirildiğinde hipotezimize uyumlu sonuçlar olmadığı görülmüştür. Hipotalamus ekspresyonunda F0'dan F1'e her iki cinsiyette de bir azalma vardır. Fakat kontrol gruplarının ekspresyonları paramutantlardan fazla çıkmıştır.İstatistiksel olarak anlamlılık tespit edilemeyen bu bulgular bizim hipotezimize de bütünüyle desteklememektedir.Hipofiz ekspresyonunda yine hipotalamustaki tabloya benzer şekilde kontrollerin ekspresyonları paramutantlardan yüksektir.Bu bulgular farelerdeki iri fenotipi açıklamamaktadır.

İstatistiksel olarak anlamsız sonuçlanan bu bilgiler ışığında miR-124'ün IGF-1 in ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olmadığı söylenebilir. Grandjean ve ark. [284] tarafından yapılan çalışmada da bizim bulgularımızla uyumlu olarak erken embriyonik safhada paramutantlarda IGF-1 aşırı eksprese bulunmamıştır.

GHRH kan ekspresyon grafiğine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı saptanmasa da özellikle erkeklerde $F0 > F1 > \text{kontrol}$ şeklinde azalan bir eğri karşımıza çıkmaktadır. Dişilerde de tek örnek olmasına rağmen F0 dişi F1 ve kontrol dişilerden daha fazla ekspresyon göstermiştir (Şekil 21). Bu bulgular fenotipik bulgularımıza paralel ve destekler niteliktedir. Kandaki GH fazlalığına bağlı olarak GH in negatif feedback etkisiyle hipotalamustan GHRH salınımının baskılanması beklenmektedir. Hipofiz ve hipotalamusta ise negatif feedback mekanizması sonucu hem erkek hem de dişilerde beklenildiği gibi $\text{kontrol} > F1 > F0$ şeklinde bir ekspresyon sıralaması saptanmıştır (Şekil 21).

IGF'yi yüksek afinite ile bağlayan altı veya daha fazla ilgili protein ailesi olan IGFBP'nin, IGF'nin aktivitesini düzenlediği ve hücre büyümesini etkilediği bildirilmiştir [285, 286]. IGFBP'ler dolaşımdaki IGF'lerin yarı ömrünü düzenler. Endokrin fonksiyonlarına ek olarak, IGFBP'ler ayrıca yerel dokulardaki IGF mevcudiyetini ve biyolojik aktivitesini de modüle eder. IGFBP'ler, hücre bağlam ve deneysel koşullara bağlı olarak IGF eylemlerini inhibe edebilir ve / veya kuvvetlendirebilir. Vasküler düz kas hücrelerinde, IGF-I ile birlikte eklendiğinde, IGFBP-2 veya IGFBP-4, IGF-I kaynaklı DNA sentezi üzerinde inhibe edici bir etki gösterirken, IGFBP-5, IGF-I'in mitojenik etkisini kuvvetlendirir [287]. IGFBP-3 ve -5 gibi bazı IGFBP'lerin IGF'den bağımsız içsel biyolojik aktivitelere sahip oldukları gösterilmiştir [245], [288], [289]. Çalışmalar, IGFBP'lerin protein sentezini azaltmak ve kas hücre farklılaşmasını inhibe etmek için IGF'yi sekestre edebileceğini göstermiştir [290]. Diğer çalışmalar, IGFBP'lerin IGF içermeyen çeşitli biyolojik eylemler yaptığını göstermiştir. Örneğin, IGFBP-5'in, IGFBP-5'e spesifik hücre yüzeyi bağlama alanlarını içeren IGF-bağımsız bir mekanizma ile kemik hücresi proliferasyonunu kısmen uyardığı öne sürülmüştür [291]. Bu nedenle, bu genlerin, IGF'ye bağlanma ve IGFR'lere bağlanma reseptörünü bloke etme yoluyla protein sentezini inhibe etme rollerinin ötesinde, alternatif bir yoldan işleyebileceği sonucuna

varılmıştır [292]. IGFBP-5, iskelet kasları tarafından salgılanan ana IGFBP'dir. IGFBP5, IGF-I ile etkileşime girerek kas hücresi proliferasyonunu destekleyebilen veya bağımsız fonksiyon gösteren IGFBP'lerden biridir [293, 294]. Birçok durumda IGFBP5, IGF'nin yokluğunda da, IGF'den bağımsız eylemlerin varlığını gösteren biyolojik aktiviteler uygular. Bu kavram, IGFBP-5'in çekirdekte beklenmedik şekilde lokalizasyonu ve IGFBP-5'e özgü membran bağlı IGFBP-5 reseptör (ler) inin bulunması ile desteklenmiştir [295]. Literatürdeki çalışmalar, yerel IGFBP-5'in kas büyümesinde ve farklılaşmasında kritik bir rol oynadığını göstermiştir. IGFBP-5 nakavt fareler, muhtemelen diğer IGFBP'lerin telafi edici etkileri nedeniyle, kas gelişiminde belirgin bir anormallik göstermezken [296], IGFBP-3, -4 ve -5 üçlü nakavt fareler, kaslarında önemli ölçüde azalış göstermişlerdir [297]. Zhang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada sığır iskelet kasında miR-143 ün IGFBP5 i hedefleyerek iskelet kası hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasını etkilediğini bulmuşlardır [298]. MiR-143'ün aşırı ekspresyonu, azalmış IGFBP5 proteini seviyesine ve kısıtlanmış hücre çoğalmasına ve farklılaşmasına neden olup, miR-143'ün aşağı regülasyonu, IGFBP5 proteinin ve kısıtlı hücre proliferasyonunun artmasına neden olmuştur. IGF sinyal yolunun önemli bir bileşeni olan IGFBP5, sığır kas hücresi gelişimine büyük katkı sağladığı gösterilmiştir [298]. Salih ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Igfbp5 aşırı ekspre eden transgenik farelerde anlamlı derecede artmış yenidoğan mortalitesi, tüm vücut büyümesi inhibisyonu ve gecikmiş kas gelişimi gözlenmiştir [216]. Bizim bulgularımıza bakılıp, IGFBP5'in kandaki ekspresyon paterni incelendiğinde dişi paramutantlarda tek örnek olduğundan erkekler üzerinden yorumlamak daha doğru olacaktır. Erkeklerde ise F0>F1>kontrol şeklinde bir ekspresyon mevcut olup, istatistiksel olarak anlamlı saptanmasa da Zhang ve arkadaşlarının sonuçlarını destekler nitelikte sonuçlanmıştır (Şekil 22). Hipotalamustaki ekspresyonlara bakıldığında erkeklerde F0 ve F1 ekspresyonları hemen hemen aynı olup kontrol erkeklerden yüksektir. Dişilere bakıldığında ise F0'dan F1'e beklenildiği gibi bir azalma varken, kontrol dişilerdeki yüksek ekspresyon seviyesi dikkati çekmektedir. Bu, kontrol dişi sayısının fazlalığından dolayı olmuş olabilir. F0 ve F1 paramutant dişilerde de sayı artsaydı, onlarda da kontrolden daha yüksek seviyeler görülebilirdi (Şekil 22). Hipofizdeki ekspresyonlara bakıldığında erkeklerde F0 ve F1'deki artmış ekspresyon seviyeleri dikkati çekmektedir. (şekil 22). .F1 paramutant erkeğin kontrol erkek ve F1

paramutant dişilere göre istatistiksel olarak anlamlandırılmamış da artmış ekspresyonu dikkati çekmektedir. Nitekim F1 paramutant erkekler ağırlık olarak bu gruplardan daha ağırdır. Aynı zamanda F0 paramutant erkeğin, F0 paramutant dişilere ve kontrol erkeklere kıyasla daha fazla ekspresyon gösterdiği istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da grafikte bariz olarak izlenmektedir (Şekil 22). Aynı şekilde F0 paramutant erkekler de kontrol dişi ve paramutant dişilerden bariz olarak daha irilerdir. Bu bulgular Zhang ve arkadaşlarının bulgularına paralellik göstermektedir. Dolayısıyla ile miR-124, *IGFBP5*'in ekspresyonunu artırıp IGF-1 in aktivitesini dolaylı yoldan artırarak ya da IGF-1 den bağımsız olarak IGFBP-5 spesifik hücre yüzeyi bağlanma alanları vasıtasıyla direk olarak büyümelerinin artmasına neden olmuş olabilir. Çalışmamızda her ne kadar grafikteki sonuçlarla bu sonuca varılabilse de bu söylemin tam olarak doğrulanabilmesi için örneklem sayısının arttığı yeni çalışmalarla desteklenmesi gerekir. Bizim çalışmamızın dezavantajı olarak bazı gruplarda yeterli örnek sayısı elde edilememiştir. Bu yüzden grafikte görülen bulgularımız istatistiksel olarak doğrulanamamıştır. Çünkü bu düşük örnek sayısına sahip gruplar ve kontrolleri için istatistiksel analiz yapılamamıştır.

GHR'nin kandaki ekspresyonu incelendiğinde dişiler tek örnek olduğundan erkekler üzerinden yorum yapmak daha doğru olacaktır. İstatistiksel olarak anlamlı saptanmasa da F0 ve F1 den kontrole bir azalma göze çarpmaktadır. F1 tek örnek olduğu için F0 a göre yüksekliği bilgi verici değildir (Şekil 23). GHR hipofiz ekspresyonlarında erkeklerde yine istatistiksel olarak anlamlı olmayan sonuçlarda fenotipik bulgularımızla uyumlu olarak F0>F1>kontrol şeklinde bir sıralama göze çarpmaktadır. Dişilerde örnek sayısının azlığı sebebiyle yorum yapmak çok sağlıklı olmayacaktır (Şekil 23). GHR hipotalamus ekspresyonlarında ise birbirine yakın ekspresyon seviyeleri gözlenmiş olup, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (Şekil 23). Paganı ve arkadaşları uzun boylu ve kısa boylu çocukların periferik kan hücrelerindeki GHR ekspresyonunu inceledikleri çalışmada uzun deneklerde belirgin şekilde daha yüksek GHR gen ekspresyon seviyelerini tespit etmişlerdir [299]. Bizim çalışmamızda da kandaki bulgularda istatistiksel olarak anlamlı saptanmasa da F0 ve F1 den kontrole doğru bir azalma göze çarpmaktadır. Literatürdeki çalışma ile uyumlu gözükmektedir.

İnsülin benzeri büyüme faktörü-I reseptörü (IGF-IR), hücre çoğalmasının ve uzunlmasına kemik büyümesinin önemli bir aracısıdır. IGF-IR, tirozin kinaz bölgesinde% 80-95 homolojiye sahip insülin reseptörü ile yakından ilgilidir [234]. IGF-I'in IGF-IR'e bağlanması, IGF-IR'nin tirozin kinaz aktivitesinin transmembran aktivasyonuna neden olur. İnsanda, IGF-I reseptörü geni, kromozom 15'in (15q26.3) uzun kolunun distalinde bulunur [235]. İntrauterin büyüme geriliği ve postnatal büyüme açığı olan hastalarda Kromozom 15q'nin monoalelik kaybı, IGF-I reseptörü geninin mutasyonları ve bir kopyasının kaybı bulunmuştur [236]. Farelerde *IGF-IR* gen nakavt deneyleri, her iki alelin null mutasyonunu taşıyan farelerin şiddetli ve bir allel null mutasyon olanlarda orta düzeyde embriyonik ve postnatal büyüme yetmezliği sergilediklerini göstermiştir [237]. Son zamanlarda, intrauterin gelişme geriliği ve doğum sonrası büyüme eksikliği olan hastalarda, kromozom 15q'nin monoalelik kaybı ve uzun kolunun distalinin delesyonu nedeniyle IGF-I reseptör geninin bir kopyasının kaybı tespit edilmiştir [240], [241]. Kromozom 15'in distal kolundan materyal kaybı olan hastalar, intrauterin gelişme geriliği, postnatal büyüme eksikliği ve ayrıca bazen kraniyofasiyal ve iskelet anormallikleri ve hafif-orta zeka geriliği gösterirler [242, 243]. Yapılan bir başka çalışmada obez çocuklar ve normal çocuklar arasındaki kan *IGF1R* ekspresyonları karşılaştırılmış ve obez çocuklarda *IGF-1R* mRNA ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur [300].

IGF1R kandaki ekspresyon seviyeleri incelendiğinde paramutant dişiler birer örnek olmasına rağmen kontrole göre daha yüksek bir ekspresyon sergilemişlerdir. Erkeklerle bakıldığında ise, tek örnek olan F1 paramutant erkek ciddi şekilde artmış bir ekspresyon göstermiştir. F0 paramutant erkekte kontrole hafif bir azalma olsa da bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. F1 paramutant erkeğin kontrol erkek ve F1 paramutant dişilere göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artmış bir ekspresyonu grafikte bariz şekilde görülmektedir (şekil 24). *IGF1R* hipotalamus ve hipofizdeki ekspresyon bulgularında ise istatistiksel olarak anlamlı bir bulgu elde edilememiştir (Şekil 24). Literatürdeki bilgiler ışığında *IGF1R* ekspresyon artışının iri fenotipe yol açması beklenmektedir. Nitekim erkeklerdeki kan ekspresyon bulgularımız da bu beklentiyi karşılamaktadır. MiR-124, *IGF1R*'nin kandaki ekspresyonunu artırıp *IGF1R*'nin IGF-1'e bağlanması üzerinden dolaylı olarak IGF-1 biyoyararlanımının artırılması ile artmış bir vücut büyüklüğüne sebep olmuş olabilir. Bununla birlikte F1

paramutant kan örneğinin tek örnek olması nedeniyle istatistiksel analize dahil edilememiştir. Dolayısıyla beklediğimiz istatistiksel artışı gözlemleyemedik. F0 paramutant erkeklerde de beklediğimiz anlamlı artışın olmaması nedeniyle bu sonuç şaibeli kalmaktadır. Dahil olan moleküler yolakları daha iyi aydınlatmak için daha çok örneklerin olduğu daha ileri çalışmalar gereklidir.

Dolaşım sisteminde, IGFBP'ler, IGF'lerin yarı ömürlerini uzatmada ve reseptör bağlanması için IGF'lerin mevcudiyetinin düzenlenmesinde hayati bir rol oynar. IGFBP'ler IGF'ler için IGF reseptörlerinden daha yüksek bir afiniteye sahiptir; bu nedenle, IGFBP'ler, IGF'lerin biyoaktivitesinin ve biyoyararlanımının düzenlenmesine katılmaktadırlar. İnsanlarda, dolaşımdaki IGF'lerin % 75-80'i IGFBP'lerle bir üçlü kompleks ve asit labil bir alt ünite (ALS) oluşturur ve % 20'si IGFBP'lerle bir ikili kompleks oluşturur. IGF'lerin < % 1'i dolaşımda serbest formdadır [301]. IGFBP'lerin genellikle iki eylemi vardır: IGF'ye bağımlı ve IGF'den bağımsız eylemler: IGF'ye bağlı eylemlere göre, IGFBP'ler IGF ye bağlanarak IGF'nin yarı ömrünü artırırlar ve insülin alıcısına potansiyel bağlanmasını bloke ederler [302]. IGFBP'lerin IGF yi IGF1 reseptöründen 10 kat daha yüksek afinite ile bağlanması nedeniyle, IGFBP'ler çoğu durumda IGF eylemlerini inhibe eder [303]. IGF'den bağımsız eylemler için, IGFBP'ler ayrıca hücre göçünü, çoğalmasını ve hayatta kalmasını engelleyebilir [301].

IGFBP1, IGFBP ailesinin tanımlanmış ilk üyesidir, IGF eylemini reseptörüyle etkileşime girmesini önleyerek engellemektedir [304]. *Igfbp1* birçok dokuda eksprese edilir ve en yüksek ekspresyon karaciğerdedir [305], [250].

IGFBP1'in ana kaynağı karaciğerdir ve insülin, IGFBP1 sentezinin merkezi düzenleyicisidir [306]. Proinflamatuvar sitokinler, glukokortikoidler, cAMP, oksidatif stres ve hipoksi dahil olmak üzere teşvik edici faktörler, IGFBP1'in sentezini artırır [307]. İnsülin eksikliği nedeniyle, tip 1 diyabetli bireylerde IGFBP1 seviyeleri artmıştır [308]. Ayrıca, açlık ve artmış beslenme plazma IGFBP1 seviyelerini düşürmüştür [309, 310]. IGFBP1 ayrıca büyümede rol oynar. İzole sıçan hepatositlerinde, *Igfbp1* mRNA ekspresyonu, büyüme hormonu (GH) tarafından inhibe edilmiştir [311] Ek olarak, IGFBP1 plasental fonksiyonda önemli bir rol oynar ve IGF'lere bağlanarak ve onların aktivitelerini inhibe ederek embriyonik büyümeyi ve gelişmeyi inhibe eder, [308, 312].

Literatürdeki bazı çalışmalar IGFBP1 ile doğum ağırlığı arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir [313, 314], [315].

IGFBP1 in kandaki ve hipofizdeki ekspresyon bulguları incelendiğinde birbirine yakın ekspresyon seviyeleri izlenmektedir. Hipotalamustaki ekspresyon bulgularına bakıldığında F0 paramutant erkeklerdeki düşük ekspresyon seviyeleri dikkati çekmektedir. Bundan kaynaklı F1 paramutant erkeklerin F0 paramutant erkeklerle kıyasla istatistiksel anlamlı ekspresyon artışı görülmüştür ($p=0,0053$) (Şekil 25). Literatürdeki bilgiler ışığında iri olan farelerde düşük, zayıf olan farelerde ise yüksek ekspresyon beklemekteyiz. F0 paramutant erkekler fenotip olarak en iri fare grubudur. Dolayısı ile bu grupta *IGFBP1* ekspresyonunun düşük bulunması IGF nin reseptörü ile bağlanmasını kolaylaştırıp biyoyararlanımını artırması sebebiyle büyümenin hızlanmasına yol açmış olabilir. F1 jenerasyon hem erkek hem dişilerde artmış ekspresyon dolayısı ile IGF nin etkisi inhibe edilerek F0 jenerasyonuna göre fenotipte hafif te olsa bir küçülmeye sebep olmuş olabilir.

GHRL geni şişmanlık ile ilişkilendirilmiştir, çünkü yağ dokusunda bir artışa neden olur ve karaciğerde ve pankreasta diyabetojenik bir etkiye sahiptir. Plazma ghrelin düzeylerinin BMI ve gıda alım düzenleri ile ters ilişkili olduğu; genel olarak obez bireylerde seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir [316], [317]. Meksikalı çocukların periferik beyaz kan hücrelerinde obezite ile ilişkili aday genlerin ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada *GHRL* geninin obez çocuklarda yüksek oranda ifade edildiği görülmüştür [318]. Bizim çalışmamızda da *GHRL* kan ekspresyon düzeylerinde daha iri olan paramutant erkeklerde kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir ekspresyon artışı gözlenmiştir (Şekil 26).

GHRL için hipotalamus ve hipofiz ekspresyonlarında kontrol grubunda paramutantlara göre artmış bir ekspresyon izlenmektedir (Şekil 26). Çalışmamızda GH düzeyleri incelendiğinde (Şekil 35) kontrollerin en düşük, F0 jenerasyonunun ise en yüksek seviyelerde olduğu görülmektedir. Bu durumda kontroller düşük olan GH seviyelerini ghrelinle artırmak için artmış bir ekspresyon sergilemiş olabilirler. (Şekil 26). Fakat her iki dokuda da ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilememiştir.

miR-124- 3p mikroenjeksiyonu sonucu hem prenatal hem postnatal dönemde daha iri paramutant farelerin oluşturulduğu çalışmamız, literatürde hiç miR-124'ün GH/IGF-1 sistemi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışma olmaması ve benzer tek yayın olması nedeniyle orijinaldir. Bununla birlikte epigenetik gibi henüz tam olarak anlaşılammış ve karmaşık bir konu olması sebebiyle çalışmamızın dezavantajları da olmuştur. Çalışma sonucu elde ettiğimiz bulgular farelerde mikroenjeksiyon sonucu oluşan bu iri fenotipe ilgili mekanizmaların aydınlatılmasına yardımcı olabilir, fakat tek başına yeterli değildir. Bu mekanizmanın tam olarak aydınlatılabilmesi için örneklem sayısının artırıldığı benzer çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir ve bu konuda yapılmış daha çok çalışmaya gereksinim vardır.

Sonuç olarak;

miR-124 enjeksiyonu farelerde kilo artışı ve iri fenotipe neden olmaktadır. Çalışmamızda bu etkinin bir sonraki kuşakta azalarak ta olsa devam ettiği belirlenmiştir.

IGFBP1 in hipotalamustaki ekspresyon bulgularında erkekler arasında istatistiksel anlamlı bir artış saptanmıştır. Dolayısı ile IGFBP1 geninin artmış büyümede rolü olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca F1 neslinde F0 nesline göre oluşan küçülmenin de IGFBP1 ekspresyonundaki artış nedeni ile olabileceği kanısındayız.

Diğer taraftan GH ekspresyonundaki artış ile kilo artışı arasında pozitif bir korelasyon olduğu diğer bir bulgumuzdur .IGFBP5 ve IGF1R genlerinin ise büyümeye katkı sağladıklarını düşündürecek sayısal olarak oldukça yüksek ekspresyon bulgularımız olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlandırılmamıştır. Bu durumun temel nedeninin de örnek sayısındaki yetersizlik olduğunu düşünmekteyiz.

Bundan sonra yapılacak olan araştırmalar için önerimiz bu genler için daha çok örnekle benzer çalışmalar planlanmasıdır.

Bunların yanında miR-124 mikroenjeksiyonunun miR-124 ekspresyon seviyesini arttırıp arttırmadığı araştırılabilir.

Ayrıca özellikle fetal büyümede önemli rolü olduğu bilinen IGF-II ve reseptörü bizim çalışmamızda bakılmamıştır. Bu genlerin de içinde bulunduğu, daha fazla örnek sayısıyla daha ileri çalışmalar planlanabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Can Mİ, A.A., *Epigenetic Mechanisms and Some Recent Studies*. Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi, 2016. **6**(2): p. 445-452.
2. Martin, C. and Y. Zhang, *Mechanisms of epigenetic inheritance*. Current Opinion in Cell Biology, 2007. **19**(3): p. 266-272.
3. Holliday, R., *Epigenetics A Historical Overview*. Epigenetics, 2006. **1**(2): p. 76-80.
4. Moosavi, A. and A. Motevalizadeh Ardekani, *Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases*. Iran Biomed J, 2016. **20**(5): p. 246-58.
5. Arunachalam, G., et al., *MicroRNA Signature and Cardiovascular Dysfunction*. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2015. **65**(5): p. 419-429.
6. Ying SY, C.D., *The MicroRNA*. Methods Mol Biol, 2018. **1733**: p. 1-25.
7. Thatcher, E.J. and J.G. Patton, *Small RNAs have a big impact on regeneration*. Rna Biology, 2010. **7**(3): p. 333-338.
8. Ponomarev, E.D., et al., *MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP-alpha-PU.1 pathway*. Nature Medicine, 2011. **17**(1): p. 64-U234.
9. Gonzalez-Estevez, C., et al., *Diverse miRNA spatial expression patterns suggest important roles in homeostasis and regeneration in planarians*. International Journal of Developmental Biology, 2009. **53**(4): p. 493-505.
10. Donkin, I. and R. Barres, *Sperm epigenetics and influence of environmental factors*. Mol Metab, 2018. **14**: p. 1-11.
11. Rassoulzadegan, M., et al., *RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 469-74.

12. Yakar, S. and O. Isaksson, *Regulation of skeletal growth and mineral acquisition by the GH/IGF-1 axis: Lessons from mouse models*. Growth Horm IGF Res, 2016. **28**: p. 26-42.
13. Lewitt, M.S., *The Role of the Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor System in Visceral Adiposity*. Biochem Insights, 2017. **10**: p. 1178626417703995.
14. Eugster, E.A. and O.R.H. Pescovitz, *Commentary - Gigantism*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1999. **84**(12): p. 4379-4384.
15. Beckers, A., et al., *The causes and consequences of pituitary gigantism*. Nature Reviews Endocrinology, 2018. **14**(12): p. 705-720.
16. Chentli, F., et al., *Etiologies and clinical presentation of gigantism in Algeria*. Horm Res Paediatr, 2012. **77**(3): p. 152-5.
17. Eugster, E., *Gigantism*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
18. Gunes, S. and T. Kulac, *The role of epigenetics in spermatogenesis*. Turk J Urol, 2013. **39**(3): p. 181-7.
19. Goldberg, A.D., C.D. Allis, and E. Bernstein, *Epigenetics: A landscape takes shape*. Cell, 2007. **128**(4): p. 635-638.
20. Bird, A., *Perceptions of epigenetics*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 396-8.
21. Felsenfeld, G., *A brief history of epigenetics*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(1).
22. Meissner, A., et al., *Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells*. Nature, 2008. **454**(7205): p. 766-U91.
23. Bond, D.M. and E.J. Finnegan, *Passing the message on: inheritance of epigenetic traits*. Trends in Plant Science, 2007. **12**(5): p. 211-216.
24. Portela, A. and M. Esteller, *Epigenetic modifications and human disease*. Nature Biotechnology, 2010. **28**(10): p. 1057-1068.
25. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Mechanisms of disease: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. New England Journal of Medicine, 2003. **349**(21): p. 2042-2054.
26. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-692.

27. Haluskova, J., *Epigenetic studies in human diseases*. Folia Biologica, 2010. **56**(3): p. 83-96.
28. Bali, P., H.I. Im, and P.J. Kenny, *Methylation, memory and addiction*. Epigenetics, 2011. **6**(6): p. 671-4.
29. Wagner, K.D., et al., *RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse*. Dev Cell, 2008. **14**(6): p. 962-9.
30. Chandler, V.L., *Paramutation: From maize to mice*. Cell, 2007. **128**(4): p. 641-645.
31. Waterland, R.A. and K.B. Michels, *Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis*. Annual Review of Nutrition, 2007. **27**: p. 363-388.
32. Segre, C.V. and S. Chiocca, *Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 690848.
33. Pillai, R.S., *MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?* RNA, 2005. **11**(12): p. 1753-61.
34. Wahid, F., et al., *MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(11): p. 1231-43.
35. Krek, A., et al., *Combinatorial microRNA target predictions*. Nat Genet, 2005. **37**(5): p. 495-500.
36. Agarwal, V., et al., *Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs*. Elife, 2015. **4**.
37. Rupaimoole, R. and F.J. Slack, *MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases*. Nature Reviews Drug Discovery, 2017. **16**(3): p. 203-221.
38. Cui, Y., et al., *MiR-125b orchestrates cell proliferation, differentiation and migration in neural stem/progenitor cells by targeting Nestin*. BMC Neuroscience, 2012. **13**.
39. Morgado, A.L., et al., *MicroRNA-34a Modulates Neural Stem Cell Differentiation by Regulating Expression of Synaptic and Autophagic Proteins*. Molecular Neurobiology, 2015. **51**(3): p. 1168-1183.
40. Gioia, U., et al., *Mir-23a and mir-125b regulate neural stem/progenitor cell proliferation by targeting Musashi1*. Rna Biology, 2014. **11**(9): p. 1105-1112.

41. Garzon, R., G.A. Calin, and C.M. Croce, *MicroRNAs in Cancer*. Annual Review of Medicine, 2009. **60**: p. 167-179.
42. Ma, L. and R.A. Weinberg, *Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis*. Trends in Genetics, 2008. **24**(9): p. 448-456.
43. Kim, Y.K. and V.N. Kim, *Processing of intronic microRNAs*. EMBO J, 2007. **26**(3): p. 775-83.
44. de Rie, D., et al., *An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse*. Nat Biotechnol, 2017. **35**(9): p. 872-878.
45. Gibney, E.R. and C.M. Nolan, *Epigenetics and gene expression*. Heredity (Edinb), 2010. **105**(1): p. 4-13.
46. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
47. Broughton, J.P., et al., *Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity*. Mol Cell, 2016. **64**(2): p. 320-333.
48. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
49. Kim, V.N., *MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(4): p. 156-9.
50. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
51. Chen, L.L. and G.G. Carmichael, *Decoding the function of nuclear long non-coding RNAs*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(3): p. 357-64.
52. Meister, G., *Argonaute proteins: functional insights and emerging roles*. Nat Rev Genet, 2013. **14**(7): p. 447-59.
53. Hammond, S.M., *An overview of microRNAs*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **87**: p. 3-14.
54. Hayder, H., et al., *MicroRNAs: crucial regulators of placental development*. Reproduction, 2018. **155**(6): p. R259-R271.
55. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. Current Biology, 2002. **12**(9): p. 735-739.
56. Suh, M.R., et al., *Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs*. Developmental Biology, 2004. **270**(2): p. 488-498.

57. Kosik, K.S., *OPINION MicroRNAs tell an evo-devo story*. Nature Reviews Neuroscience, 2009. **10**(10): p. 754-759.
58. Conaco, C., et al., *Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2422-7.
59. Smirnova, L., et al., *Regulation of miRNA expression during neural cell specification*. European Journal of Neuroscience, 2005. **21**(6): p. 1469-1477.
60. Jiao, S.J., et al., *miR-124 promotes proliferation and differentiation of neuronal stem cells through inactivating Notch pathway*. Cell and Bioscience, 2017. **7**.
61. Tannenbaum, G.S. and N. Ling, *The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion*. Endocrinology, 1984. **115**(5): p. 1952-7.
62. Laron, Z., *Growth hormone secretagogues. Clinical experience and therapeutic potential*. Drugs, 1995. **50**(4): p. 595-601.
63. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-60.
64. Goldenberg, N. and A. Barkan, *Factors regulating growth hormone secretion in humans*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2007. **36**(1): p. 37-55.
65. Hartman, M.L., et al., *Temporal structure of in vivo growth hormone secretory events in humans*. Am J Physiol, 1991. **260**(1 Pt 1): p. E101-10.
66. Veldhuis, J.D., et al., *Somatotropic and gonadotropic axes linkages in infancy, childhood, and the puberty-adult transition*. Endocr Rev, 2006. **27**(2): p. 101-40.
67. Corpas, E., S.M. Harman, and M.R. Blackman, *Human growth hormone and human aging*. Endocr Rev, 1993. **14**(1): p. 20-39.
68. Jansson, J.O., S. Eden, and O. Isaksson, *Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion*. Endocr Rev, 1985. **6**(2): p. 128-50.
69. hekimsoy, Z., *Büyüme Hormonu ve Etkileri*. Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri Dergisi, 2007. **3**(37): p. 5-9.
70. Waters, M.J. and A.J. Brooks, *Growth hormone receptor: structure function relationships*. Horm Res Paediatr, 2011. **76 Suppl 1**: p. 12-6.
71. Brown, R.J., et al., *Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer*. Nature Structural & Molecular Biology, 2005. **12**(9): p. 814-821.

72. Hilton, D.J., *Negative regulators of cytokine signal transduction*. Cellular and Molecular Life Sciences, 1999. **55**(12): p. 1568-1577.
73. Zhang, J.G., et al., *The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation (vol 96, pg 2071, 1999)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **112**(22): p. E2979-E2979.
74. Wurzbarger, M.I., et al., *The effect of recombinant human growth hormone on regulation of growth hormone secretion and blood glucose in insulin-dependent diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **77**(1): p. 267-72.
75. Clemmons, D.R. and L.E. Underwood, *Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins*. Annu Rev Nutr, 1991. **11**: p. 393-412.
76. Hartman, M.L., et al., *A low dose euglycemic infusion of recombinant human insulin-like growth factor I rapidly suppresses fasting-enhanced pulsatile growth hormone secretion in humans*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2453-62.
77. Moller, N. and J.O. Jorgensen, *Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects*. Endocr Rev, 2009. **30**(2): p. 152-77.
78. Yakar, S., et al., *Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7324-9.
79. Yakar, S., et al., *Circulating levels of IGF-I directly regulate bone growth and density*. J Clin Invest, 2002. **110**(6): p. 771-81.
80. LeRoith, D. and S. Yakar, *Mechanisms of disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor I*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007. **3**(3): p. 302-10.
81. Ooi, G.T., et al., *Growth hormone stimulates transcription of the gene encoding the acid-labile subunit (ALS) of the circulating insulin-like growth factor-binding protein complex and ALS promoter activity in rat liver*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(7): p. 997-1007.
82. Vijayakumar, A., S. Yakar, and D. Leroith, *The intricate role of growth hormone in metabolism*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 32.
83. Kim, Y.D., et al., *Orphan nuclear receptor small heterodimer partner negatively regulates growth hormone-mediated induction of hepatic gluconeogenesis*

- through inhibition of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) transactivation.* J Biol Chem, 2012. **287**(44): p. 37098-108.
84. Quaipe, C.J., et al., *Histopathology Associated with Elevated Levels of Growth-Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I in Transgenic Mice.* Endocrinology, 1989. **124**(1): p. 40-48.
 85. Baumann, G., *Growth hormone binding protein. The soluble growth hormone receptor.* Minerva Endocrinol, 2002. **27**(4): p. 265-76.
 86. Kelly, P.A., et al., *The prolactin/growth hormone receptor family.* Endocr Rev, 1991. **12**(3): p. 235-51.
 87. Lanning, N.J. and C. Carter-Su, *Recent advances in growth hormone signaling.* Rev Endocr Metab Disord, 2006. **7**(4): p. 225-35.
 88. Woelfle, J., D.J. Chia, and P. Rotwein, *Mechanisms of growth hormone (GH) action. Identification of conserved Stat5 binding sites that mediate GH-induced insulin-like growth factor-I gene activation.* J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51261-6.
 89. Wormald, S. and D.J. Hilton, *Inhibitors of cytokine signal transduction.* J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 821-4.
 90. Sotos, J.F. and J. Argente, *Overgrowth disorders associated with tall stature.* Adv Pediatr, 2008. **55**: p. 213-54.
 91. Jelenkovic, A., et al., *Genetic and environmental influences on height from infancy to early adulthood: An individual-based pooled analysis of 45 twin cohorts.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 28496.
 92. Jelenkovic, A., et al., *Genetic and environmental influences on adult human height across birth cohorts from 1886 to 1994.* Elife, 2016. **5**.
 93. Berndt, S.I., et al., *Genome-wide meta-analysis identifies 11 new loci for anthropometric traits and provides insights into genetic architecture.* Nature Genetics, 2013. **45**(5): p. 501-U69.
 94. Mace, A., et al., *CNV-association meta-analysis in 191, 161 European adults reveals new loci associated with anthropometric traits.* Nature Communications, 2017. **8**.
 95. Sotos, J.F., *Overgrowth .2. Hormonal causes.* Clinical Pediatrics, 1996. **35**(11): p. 577-590.

96. Stratakis, C.A., et al., *A syndrome of overgrowth and acromegaloidism with normal growth hormone secretion is associated with chromosome 11 pericentric inversion*. J Med Genet, 2001. **38**(5): p. 338-43.
97. Alvarez-Vazquez, P., et al., *Acromegaloidism with normal growth hormone secretion associated with X-tetrasomy*. Pituitary, 2006. **9**(2): p. 145-9.
98. Eugster, E.A. and O.H. Pescovitz, *Gigantism*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(12): p. 4379-84.
99. Lavrentaki, A., et al., *Epidemiology of acromegaly: review of population studies*. Pituitary, 2017. **20**(1): p. 4-9.
100. Sotos, J.F., *Overgrowth. Hormonal Causes*. Clin Pediatr (Phila), 1996. **35**(11): p. 579-90.
101. Melmed, S., et al., *A consensus on the diagnosis and treatment of acromegaly complications*. Pituitary, 2013. **16**(3): p. 294-302.
102. Katznelson, L., et al., *Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(11): p. 3933-51.
103. Petrossians, P., et al., *Acromegaly at diagnosis in 3173 patients from the Liege Acromegaly Survey (LAS) Database*. Endocrine-Related Cancer, 2017. **24**(10): p. 505-518.
104. Rostomyan, L., et al., *Clinical and genetic characterization of pituitary gigantism: an international collaborative study in 208 patients*. Endocr Relat Cancer, 2015. **22**(5): p. 745-57.
105. Hannah-Shmouni, F., G. Trivellin, and C.A. Stratakis, *Genetics of gigantism and acromegaly*. Growth Horm IGF Res, 2016. **30-31**: p. 37-41.
106. Melmed, S., *Acromegaly*. N Engl J Med, 1990. **322**(14): p. 966-77.
107. Zimmerman, D., et al., *Congenital Gigantism Due to Growth Hormone-Releasing Hormone Excess and Pituitary Hyperplasia with Adenomatous Transformation*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1993. **76**(1): p. 216-222.
108. Hammer, R.E., et al., *Expression of Human Growth Hormone-Releasing Factor in Transgenic Mice Results in Increased Somatic Growth*. Nature, 1985. **315**(6018): p. 413-416.

109. Dubuis, J.M., et al., *Mammotroph Adenoma Causing Gigantism in an 8-Year Old Boy - a Possible Pathogenetic Mechanism*. *Clinical Endocrinology*, 1995. **42**(5): p. 539-549.
110. Vidal, S., et al., *Reversible transdifferentiation: Interconversion of somatotrophs and lactotrophs in pituitary hyperplasia*. *Modern Pathology*, 2001. **14**(1): p. 20-28.
111. Hannah-Shmouni, F., G. Trivellin, and C.A. Stratakis, *Genetics of gigantism and acromegaly*. *Growth Hormone & IGF Research*, 2016. **30-31**: p. 37-41.
112. Araki, Y., et al., *Central Neurocytoma Presenting with Gigantism - Case-Report*. *Surgical Neurology*, 1992. **38**(2): p. 141-145.
113. Isidro, M.L., et al., *Acromegaly due to a growth hormone-releasing hormone-secreting intracranial gangliocytoma*. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2005. **28**(2): p. 162-165.
114. Asada, H., et al., *Mixed pituitary adenoma and gangliocytoma associated with acromegaly--case report*. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 1990. **30**(8): p. 628-32.
115. Asa, S.L., et al., *A case for hypothalamic acromegaly: a clinicopathological study of six patients with hypothalamic gangliocytomas producing growth hormone-releasing factor*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984. **58**(5): p. 796-803.
116. Ghazi, A.A., et al., *Ectopic acromegaly due to growth hormone releasing hormone*. *Endocrine*, 2013. **43**(2): p. 293-302.
117. Faglia, G., M. Arosio, and N. Bazzoni, *Ectopic Acromegaly*. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 1992. **21**(3): p. 575-595.
118. Garby, L., et al., *Clinical Characteristics and Outcome of Acromegaly Induced by Ectopic Secretion of Growth Hormone-Releasing Hormone (GHRH): A French Nationwide Series of 21 Cases*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2012. **97**(6): p. 2093-2104.
119. Beuschlein, F., et al., *Acromegaly caused by secretion of growth hormone by a non-Hodgkin's lymphoma*. *New England Journal of Medicine*, 2000. **342**(25): p. 1871-1876.
120. Biswal, S., et al., *Acromegaly caused by ectopic growth hormone: A rare manifestation of a bronchial carcinoid*. *Annals of Thoracic Surgery*, 2008. **85**(1): p. 330-332.

121. Doga, M., et al., *Ectopic secretion of growth hormone-releasing hormone (GHRH) in neuroendocrine tumors: Relevant clinical aspects*. Annals of Oncology, 2001. **12**: p. S89-S94.
122. Madonna, D., A. Kendler, and A.M.S. Soliman, *Ectopic growth hormone-secreting pituitary adenoma in the sphenoid sinus*. Annals of Otolaryngology and Laryngology, 2001. **110**(1): p. 99-101.
123. Gondim, J.A., et al., *Acromegaly due to an ectopic pituitary adenoma in the sphenoid sinus*. Acta Radiologica, 2004. **45**(6): p. 689-691.
124. Gutmann, D.H., *Recent insights into neurofibromatosis type 1 - Clear genetic progress*. Archives of Neurology, 1998. **55**(6): p. 778-780.
125. Salenave, S., et al., *Acromegaly and McCune-Albright Syndrome*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2014. **99**(6): p. 1955-1969.
126. Lumbroso, S., F. Paris, and C. Sultan, *McCune-Albright syndrome: Molecular genetics*. Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism, 2002. **15**: p. 875-882.
127. Yao, Y., et al., *Clinical characteristics and management of growth hormone excess in patients with McCune-Albright syndrome*. European Journal of Endocrinology, 2017. **176**(3): p. 295-303.
128. Collins, M.T., F.R. Singer, and E. Eugster, *McCune-Albright syndrome and the extraskelatal manifestations of fibrous dysplasia*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2012. **7**.
129. Skogseid, B., J. Rastad, and K. Oberg, *Multiple Endocrine Neoplasia Type-1 - Clinical-Features and Screening*. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 1994. **23**(1): p. 1-18.
130. Guru, S.C., et al., *Menin, the product of the MEN1 gene, is a nuclear protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(4): p. 1630-1634.
131. Bassett, J.H.D., et al., *Characterization of mutations in patients with multiple endocrine neoplasia type 1*. American Journal of Human Genetics, 1998. **62**(2): p. 232-244.
132. Boggild, M.D., et al., *Molecular-Genetic Studies of Sporadic Pituitary-Tumors*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1994. **78**(2): p. 387-392.

133. Carty, S.E., et al., *The variable penetrance and spectrum of manifestations of multiple endocrine neoplasia type 1*. Surgery, 1998. **124**(6): p. 1106-1113.
134. Lee, M. and N.S. Pellegata, *Multiple Endocrine Neoplasia Type 4*. Endocrine Tumor Syndromes and Their Genetics, 2013. **41**: p. 63-78.
135. Lodish, M.B., G. Trivellin, and C.A. Stratakis, *Pituitary gigantism: update on molecular biology and management*. Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity, 2016. **23**(1): p. 72-80.
136. Stratakis, C.A., L.S. Kirschner, and J.A. Carney, *Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(9): p. 4041-6.
137. O'Toole, S.M., et al., *15 YEARS OF PARAGANGLIOMA: The association of pituitary adenomas and pheochromocytomas or paragangliomas*. Endocr Relat Cancer, 2015. **22**(4): p. T105-22.
138. Denes, J., et al., *Heterogeneous genetic background of the association of pheochromocytoma/paraganglioma and pituitary adenoma: results from a large patient cohort*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(3): p. E531-41.
139. Matsuno, A., et al., *Gigantism in sibling unrelated to multiple endocrine neoplasia: case report*. Neurosurgery, 1994. **35**(5): p. 952-5; discussion 955-6.
140. Beckers, A., et al., *Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene*. Endocr Rev, 2013. **34**(2): p. 239-77.
141. Daly, A.F., et al., *Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(5): p. 1891-6.
142. Martucci, F., G. Trivellin, and M. Korbonits, *Familial isolated pituitary adenomas: an emerging clinical entity*. J Endocrinol Invest, 2012. **35**(11): p. 1003-14.
143. Daly, A.F., et al., *GHRH excess and blockade in X-LAG syndrome*. Endocr Relat Cancer, 2016. **23**(3): p. 161-70.
144. Blumberg, D.L., et al., *Acromegaly in an Infant*. Pediatrics, 1989. **83**(6): p. 998-1002.

145. Melmed, S., *Medical progress: Acromegaly*. New England Journal of Medicine, 2006. **355**(24): p. 2558-2573.
146. Katznelson, L., *Diagnosis and treatment of acromegaly*. Growth Horm IGF Res, 2005. **15 Suppl A**: p. S31-5.
147. Patel, Y.C., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of acromegaly: a Canadian perspective*. Clinical and Investigative Medicine-Medecine Clinique Et Experimentale, 2000. **23**(3): p. 172-187.
148. Juul, A., et al., *Serum insulin-like growth factor-I in 1030 healthy children, adolescents, and adults: relation to age, sex, stage of puberty, testicular size, and body mass index*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **78**(3): p. 744-52.
149. Misra, M., et al., *Growth hormone suppression after an oral glucose load in children*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(12): p. 4623-9.
150. Giustina, A., et al., *Criteria for cure of acromegaly: a consensus statement*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(2): p. 526-9.
151. Bowden, S.A., et al., *Successful treatment of an invasive growth hormone-secreting pituitary macroadenoma in an 8-year-old boy*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2007. **20**(5): p. 643-7.
152. Rao, E., et al., *Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome*. Nature Genetics, 1997. **16**(1): p. 54-63.
153. Kanaka-Gantenbein, C., et al., *Tall stature, insulin resistance, and disturbed behavior in a girl with the triple X syndrome harboring three SHOX genes: offspring of a father with mosaic Klinefelter syndrome but with two maternal X chromosomes*. Horm Res, 2004. **61**(5): p. 205-10.
154. Salo, P., et al., *Deletion Mapping of Stature Determinants on the Long Arm of the Y-Chromosome*. Human Genetics, 1995. **95**(3): p. 283-286.
155. Mandel, J.L. and V. Biancalana, *Fragile X mental retardation syndrome: from pathogenesis to diagnostic issues*. Growth Hormone & IGF Research, 2004. **14**: p. S158-S165.
156. Willemsen, R., et al., *The fragile X syndrome: From molecular genetics to neurobiology*. Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews, 2004. **10**(1): p. 60-67.

157. Ballerini, M.G., et al., *Differential impact of simple childhood obesity on the components of the growth hormone-insulin-like growth factor (IGF)-IGF binding proteins axis*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2004. **17**(5): p. 749-57.
158. Argente, J., et al., *Multiple endocrine abnormalities of the growth hormone and insulin-like growth factor axis in prepubertal children with exogenous obesity: effect of short- and long-term weight reduction*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(7): p. 2076-83.
159. Faivre, L., et al., *Overgrowth and trisomy 15q26.1-qter including the IGF1 receptor gene: report of two families and review of the literature*. Eur J Hum Genet, 2002. **10**(11): p. 699-706.
160. Nagai, T., et al., *Postnatal overgrowth by 15q-trisomy and intrauterine growth retardation by 15q-monosomy due to familial translocation t(13;15): dosage effect of IGF1R?* Am J Med Genet, 2002. **113**(2): p. 173-7.
161. Kant, S.G., et al., *Tall stature and duplication of the insulin-like growth factor I receptor gene*. Eur J Med Genet, 2007. **50**(1): p. 1-10.
162. Okubo, Y., et al., *Cell proliferation activities on skin fibroblasts from a short child with absence of one copy of the type I insulin-like growth factor receptor (IGF1R) gene and a tall child with three copies of the IGF1R gene*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(12): p. 5981-8.
163. Toydemir, R.M., et al., *A novel mutation in FGFR3 causes camptodactyly, tall stature, and hearing loss (CATSHL) syndrome*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(5): p. 935-41.
164. Conte, F.A., et al., *A Syndrome of Female Pseudohermaphroditism, Hypergonadotropic Hypogonadism, and Multicystic Ovaries Associated with Missense Mutations in the Gene Encoding Aromatase (P450arom)*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1994. **78**(6): p. 1287-1292.
165. Morishima, A., et al., *Aromatase Deficiency in Male and Female Siblings Caused by a Novel Mutation and the Physiological-Role of Estrogens*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1995. **80**(12): p. 3689-3698.
166. Jones, M.E.E., et al., *Recognizing rare disorders: aromatase deficiency*. Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism, 2007. **3**(5): p. 414-421.

167. Lin, L., et al., *Severe loss-of-function mutations in the adrenocorticotropin receptor (ACTHR, MC2R) can be found in patients diagnosed with salt-losing adrenal hypoplasia*. *Clinical Endocrinology*, 2007. **66**(2): p. 205-210.
168. Mizuguchi, T. and N. Matsumoto, *Recent progress in genetics of Marfan syndrome and Marfan-associated disorders*. *Journal of Human Genetics*, 2007. **52**(1): p. 1-12.
169. Tuncbilek, E. and Y. Alanay, *Congenital contractural arachnodactyly (Beals syndrome)*. *Orphanet J Rare Dis*, 2006. **1**: p. 20.
170. Carson, N.A.J., *Citation Classic - Metabolic Abnormalities Detected in a Survey of Mentally Backward Individuals in Northern-Ireland*. *Current Contents/Clinical Practice*, 1984(30): p. 12-12.
171. Sotos, J.F., *Section V - Syndromes and other disorders associated with overgrowth*. *Clinical Pediatrics*, 1997. **36**(2): p. 91-103.
172. Sparago, A., et al., *Mechanisms causing imprinting defects in familial Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms' tumour*. *Human Molecular Genetics*, 2007. **16**(3): p. 254-264.
173. DeChiara, T.M., E.J. Robertson, and A. Efstratiadis, *Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene*. *Cell*, 1991. **64**(4): p. 849-59.
174. Eggenchwiler, J., et al., *Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes*. *Genes Dev*, 1997. **11**(23): p. 3128-42.
175. Sun, F.L., et al., *Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome*. *Nature*, 1997. **389**(6653): p. 809-15.
176. Ogawa, O., et al., *Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour*. *Nature*, 1993. **362**(6422): p. 749-51.
177. Cottreau, E., et al., *Phenotypic spectrum of Simpson-Golabi-Behmel syndrome in a series of 42 cases with a mutation in GPC3 and review of the literature*. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2013. **163C**(2): p. 92-105.
178. Pilia, G., et al., *Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome*. *Nat Genet*, 1996. **12**(3): p. 241-7.
179. Cole, T.R. and H.E. Hughes, *Sotos syndrome*. *J Med Genet*, 1990. **27**(9): p. 571-6.

180. Kurotaki, N., et al., *Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 365-6.
181. Weaver, D.D., et al., *A new overgrowth syndrome with accelerated skeletal maturation, unusual facies, and camptodactyly*. J Pediatr, 1974. **84**(4): p. 547-52.
182. Opitz, J.M., D.W. Weaver, and J.F. Reynolds, Jr., *The syndromes of Sotos and Weaver: reports and review*. Am J Med Genet, 1998. **79**(4): p. 294-304.
183. Tatton-Brown, K. and N. Rahman, *EZH2-Related Overgrowth*, in *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
184. Giunta, C., et al., *Nevo syndrome is allelic to the kyphoscoliotic type of the Ehlers-Danlos syndrome (EDS VIA)*. American Journal of Medical Genetics Part A, 2005. **133A**(2): p. 158-164.
185. Press, M., *Growth hormone and metabolism*. Diabetes Metab Rev, 1988. **4**(4): p. 391-414.
186. Wallis, M., *The Molecular Evolution of Pituitary Growth-Hormone Prolactin and Placental-Lactogen - a Protein Family Showing Variable Rates of Evolution*. Journal of Molecular Evolution, 1981. **17**(1): p. 10-18.
187. Chen, E.Y., et al., *The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution*. Genomics, 1989. **4**(4): p. 479-97.
188. Esteban, C., et al., *Human growth hormone (GH1) gene polymorphism map in a normal-statured adult population*. Clin Endocrinol (Oxf), 2007. **66**(2): p. 258-68.
189. Jackson-Grusby, L.L., et al., *Chromosomal mapping of the prolactin/growth hormone gene family in the mouse*. Endocrinology, 1988. **122**(6): p. 2462-6.
190. Brissenden, J.E., A. Ullrich, and U. Francke, *Human Chromosomal Mapping of Genes for Insulin-Like Growth Factor-I and Factor-II and Epidermal Growth-Factor*. Nature, 1984. **310**(5980): p. 781-784.
191. Mullis, P.E., et al., *Growth-Characteristics and Response to Growth-Hormone Therapy in Patients with Hypochondroplasia - Genetic-Linkage of the Insulin-Like Growth Factor-I Gene at Chromosome-12q23 to the Disease in a Subgroup of These Patients*. Clinical Endocrinology, 1991. **34**(4): p. 265-274.
192. Zoidis, E., C. Ghirlanda-Keller, and C. Schmid, *Stimulation of glucose transport in osteoblastic cells by parathyroid hormone and insulin-like growth factor I*. Mol Cell Biochem, 2011. **348**(1-2): p. 33-42.

193. Shcheglovitov, A., et al., *SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients*. Nature, 2013. **503**(7475): p. 267-71.
194. Rinderknecht, E. and R.E. Humbel, *The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin*. J Biol Chem, 1978. **253**(8): p. 2769-76.
195. ÇOLAK, R., *İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Proteinler*. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2007. **3**(37): p. 10-7.
196. Wood, A.W., C. Duan, and H.A. Bern, *Insulin-like growth factor signaling in fish*. Int Rev Cytol, 2005. **243**: p. 215-85.
197. Baker, J., et al., *Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth*. Cell, 1993. **75**(1): p. 73-82.
198. Liu, J.P., et al., *Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r)*. Cell, 1993. **75**(1): p. 59-72.
199. Mathews, L.S., et al., *Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I*. Endocrinology, 1988. **123**(6): p. 2827-33.
200. Morison, I.M. and A.E. Reeve, *Insulin-like growth factor 2 and overgrowth: molecular biology and clinical implications*. Mol Med Today, 1998. **4**(3): p. 110-5.
201. Morison, I.M., et al., *Somatic overgrowth associated with overexpression of insulin-like growth factor II*. Nat Med, 1996. **2**(3): p. 311-6.
202. Kappeler, L., et al., *Regulation of growth: Epigenetic mechanisms?* Ann Endocrinol (Paris), 2017. **78**(2): p. 92-95.
203. Kou, K., et al., *Organization, expression, and chromosomal location of the mouse insulin-like growth factor binding protein 5 gene*. Genomics, 1994. **20**(3): p. 412-8.
204. Allander, S.V., et al., *Characterization of the chromosomal gene and promoter for human insulin-like growth factor binding protein-5*. J Biol Chem, 1994. **269**(14): p. 10891-8.
205. Akkiprik, M., et al., *Multifunctional roles of insulin-like growth factor binding protein 5 in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(4): p. 212.

206. Beattie, J., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): a critical member of the IGF axis*. *Biochem J*, 2006. **395**(1): p. 1-19.
207. Kelley, K.M., et al., *Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1996. **28**(6): p. 619-37.
208. Andress, D.L. and R.S. Birnbaum, *Human osteoblast-derived insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(31): p. 22467-72.
209. Ewton, D.Z., et al., *Modulation of insulin-like growth factor actions in L6A1 myoblasts by insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5: a dual role for IGFBP-5*. *J Cell Physiol*, 1998. **177**(1): p. 47-57.
210. Meadows, K.A., J.M. Holly, and C.E. Stewart, *Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis is associated with suppression of insulin-like growth factor binding protein-5 secretion in differentiating murine skeletal myoblasts*. *J Cell Physiol*, 2000. **183**(3): p. 330-7.
211. Schneider, M.R., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits growth and induces differentiation of mouse osteosarcoma cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **288**(2): p. 435-42.
212. Nam, T.J., et al., *Thrombospondin and osteopontin bind to insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-5 leading to an alteration in IGF-I-stimulated cell growth*. *Endocrinology*, 2000. **141**(3): p. 1100-6.
213. Nam, T., A. Morales, and D. Clemmons, *Vitronectin binding to IGF binding protein-5 (IGFBP-5) alters IGFBP-5 modulation of IGF-I actions*. *Endocrinology*, 2002. **143**(1): p. 30-6.
214. Nam, T.J., W. Busby, Jr., and D.R. Clemmons, *Insulin-like growth factor binding protein-5 binds to plasminogen activator inhibitor-I*. *Endocrinology*, 1997. **138**(7): p. 2972-8.
215. Hung, P.S., et al., *Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) suppresses the tumorigenesis of head and neck squamous cell carcinoma*. *J Pathol*, 2008. **214**(3): p. 368-76.
216. Salih, D.A., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein 5 (Igfbp5) compromises survival, growth, muscle development, and fertility in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(12): p. 4314-9.

217. Dehkhoda, F., et al., *The Growth Hormone Receptor: Mechanism of Receptor Activation, Cell Signaling, and Physiological Aspects*. *Frontiers in Endocrinology*, 2018. **9**.
218. Brooks, A.J. and M.J. Waters, *The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications*. *Nature Reviews Endocrinology*, 2010. **6**(9): p. 515-525.
219. Waters, M.J. and A.J. Brooks, *JAK2 activation by growth hormone and other cytokines*. *Biochem J*, 2015. **466**(1): p. 1-11.
220. Brooks, A.J., et al., *Mechanism of Activation of Protein Kinase JAK2 by the Growth Hormone Receptor*. *Science*, 2014. **344**(6185): p. 710-+.
221. Berg, M.A., et al., *Diverse growth hormone receptor gene mutations in Laron syndrome*. *Am J Hum Genet*, 1993. **52**(5): p. 998-1005.
222. De Meyts, P. and J. Whittaker, *Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. **1**(10): p. 769-83.
223. Dupont, J. and D. LeRoith, *Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction*. *Horm Res*, 2001. **55 Suppl 2**: p. 22-6.
224. White, M.F., *Insulin signaling in health and disease*. *Science*, 2003. **302**(5651): p. 1710-1.
225. CW, G., *The IGF axis in the development and progression of prostate cancer*. *Recent Research Developments in Cancer*, 2001: p. 437-462.
226. Hawsawi, Y., et al., *Insulin-like growth factor - Oestradiol crosstalk and mammary gland tumourigenesis*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 2013. **1836**(2): p. 345-353.
227. Hoopes, B.C., et al., *The insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) contributes to reduced size in dogs*. *Mammalian Genome*, 2012. **23**(11-12): p. 780-790.
228. Warshamana-Greene, G.S., et al., *The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy*. *Clinical Cancer Research*, 2005. **11**(4): p. 1563-1571.

229. Jones, H.E., et al., *Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells*. *Endocr Relat Cancer*, 2004. **11**(4): p. 793-814.
230. GO, H., *Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease*. *Cancer Research*, 2002. **62**(10): p. 2942-50.
231. Krueckl, S.L., et al., *Increased insulin-like growth factor I receptor expression and signaling are components of androgen-independent progression in a lineage-derived prostate cancer progression model*. *Cancer Research*, 2004. **64**(23): p. 8620-8629.
232. Jiang, L., et al., *MicroRNA-7 targets IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) in tongue squamous cell carcinoma cells*. *Biochem J*, 2010. **432**(1): p. 199-205.
233. Lau, M.M., et al., *Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality*. *Genes Dev*, 1994. **8**(24): p. 2953-63.
234. Rosenfeld, R.G., *Insulin-like growth factors and the basis of growth*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(23): p. 2184-6.
235. Ullrich, A., et al., *Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Primary Structure - Comparison with Insulin-Receptor Suggests Structural Determinants That Define Functional Specificity*. *Embo Journal*, 1986. **5**(10): p. 2503-2512.
236. Bierich, J.R., et al., *Pseudopituitary Dwarfism Due to Resistance to Somatomedin - a New Syndrome*. *European Journal of Pediatrics*, 1984. **142**(3): p. 186-188.
237. Abuzzahab, M.J., et al., *IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(23): p. 2211-22.
238. Woods, K.A., et al., *Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene*. *N Engl J Med*, 1996. **335**(18): p. 1363-7.
239. Goddard, A.D., et al., *Mutations of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. The Growth Hormone Insensitivity Study Group*. *N Engl J Med*, 1995. **333**(17): p. 1093-8.

240. Roback, E.W., et al., *An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1---qter) and loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene*. Am J Med Genet, 1991. **38**(1): p. 74-9.
241. Momoi, T., et al., *Short stature with normal growth hormone and elevated IGF-I*. Eur J Pediatr, 1992. **151**(5): p. 321-5.
242. de Lacerda, L., et al., *In vitro and in vivo responses to short-term recombinant human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in a severely growth-retarded girl with ring chromosome 15 and deletion of a single allele for the type 1 IGF receptor gene*. Clinical Endocrinology, 1999. **51**(5): p. 541-550.
243. Heathmonnig, E., et al., *Measurement of Insulin-Like Growth Factor-I (Igf-I) Responsiveness of Fibroblasts of Children with Short Stature - Identification of a Patient with Igf-I Resistance*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1987. **64**(3): p. 501-507.
244. Hwa, V., Y. Oh, and R.G. Rosenfeld, *The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily*. Endocr Rev, 1999. **20**(6): p. 761-87.
245. Duan, C. and Q. Xu, *Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions*. Gen Comp Endocrinol, 2005. **142**(1-2): p. 44-52.
246. Boisclair, Y.R., et al., *The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system*. J Endocrinol, 2001. **170**(1): p. 63-70.
247. Clemmons, D.R., *Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(10): p. 821-33.
248. Baxter, R.C., *Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **278**(6): p. E967-76.
249. Clemmons, D.R., *Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions*. Mol Cell Endocrinol, 1998. **140**(1-2): p. 19-24.
250. Rajaram, S., D.J. Baylink, and S. Mohan, *Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions*. Endocr Rev, 1997. **18**(6): p. 801-31.

251. Bae, J.H., D.K. Song, and S.S. Im, *Regulation of IGFBP-1 in Metabolic Diseases*. J Lifestyle Med, 2013. **3**(2): p. 73-9.
252. Lee, J., et al., *Structure and localization of the IGFBP-1 gene and its expression during liver regeneration*. Hepatology, 1994. **19**(3): p. 656-65.
253. Seim, I., et al., *Ghrelin gene-related peptides: Multifunctional endocrine/autocrine modulators in health and disease*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2010. **37**(1): p. 125-131.
254. Sakata, I. and T. Sakai, *Ghrelin cells in the gastrointestinal tract*. Int J Pept, 2010. **2010**.
255. Inui, A., et al., *Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ*. Faseb Journal, 2004. **18**(3): p. 439-456.
256. Dickson, S.L., et al., *The role of the central ghrelin system in reward from food and chemical drugs*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2011. **340**(1): p. 80-87.
257. Burger, K.S. and L.A. Berner, *A functional neuroimaging review of obesity, appetitive hormones and ingestive behavior*. Physiology & Behavior, 2014. **136**: p. 121-127.
258. Schwartz, M.W., et al., *Central nervous system control of food intake*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 661-671.
259. Ariyasu, H., et al., *Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001. **86**(10): p. 4753-4758.
260. Suckale, J. and M. Solimena, *Pancreas islets in metabolic signaling - focus on the beta-cell*. Frontiers in Bioscience-Landmark, 2008. **13**: p. 7156-7171.
261. Ferrini, F., et al., *Ghrelin in Central Neurons*. Current Neuropharmacology, 2009. **7**(1): p. 37-49.
262. Folgueira, C., L.M. Seoane, and F.F. Casanueva, *The brain-stomach connection*. Front Horm Res, 2014. **42**: p. 83-92.
263. Dickson, S.L. and S.M. Luckman, *Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6*. Endocrinology, 1997. **138**(2): p. 771-7.

264. Hewson, A.K. and S.L. Dickson, *Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats*. Journal of Neuroendocrinology, 2000. **12**(11): p. 1047-1049.
265. Dickson, S.L., G. Leng, and I.C.A.F. Robinson, *Systemic Administration of Growth Hormone-Releasing Peptide Activates Hypothalamic Arcuate Neurons*. Neuroscience, 1993. **53**(2): p. 303-306.
266. Lall, S., et al., *Growth hormone (GH)-independent stimulation of adiposity by GH secretagogues*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(1): p. 132-8.
267. Tschop, M., D.L. Smiley, and M.L. Heiman, *Ghrelin induces adiposity in rodents*. Nature, 2000. **407**(6806): p. 908-13.
268. Chebani, Y., et al., *Enhanced responsiveness of Ghrelin(Q343X) rats to ghrelin results in enhanced adiposity without increased appetite*. Science Signaling, 2016. **9**(424).
269. Naleid, A.M., et al., *Ghrelin induces feeding in the mesolimbic reward pathway between the ventral tegmental area and the nucleus accumbens*. Peptides, 2005. **26**(11): p. 2274-2279.
270. Tolle, V., et al., *Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats*. Endocrinology, 2002. **143**(4): p. 1353-1361.
271. Cummings, D.E., et al., *Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2004. **287**(2): p. E297-E304.
272. Waseem, T., et al., *Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways*. Surgery, 2008. **143**(3): p. 334-342.
273. Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, and M. Delgado, *Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis*. Gastroenterology, 2006. **130**(6): p. 1707-1720.
274. Waseem, T., *Commentary: Ghrelin's role in gastrointestinal tract cancer*. Surg Oncol, 2010. **19**(1): p. e1.
275. Waseem, T., et al., *Role of ghrelin axis in colorectal cancer: a novel association*. Peptides, 2008. **29**(8): p. 1369-76.

276. Duxbury, M.S., et al., *Ghrelin promotes pancreatic adenocarcinoma cellular proliferation and invasiveness*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **309**(2): p. 464-8.
277. DiGruccio, M.R., et al., *Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets*. *Molecular Metabolism*, 2016. **5**(7): p. 449-458.
278. Heppner, K.M. and J. Tong, *MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY Regulation of glucose metabolism by the ghrelin system: multiple players and multiple actions*. *European Journal of Endocrinology*, 2014. **171**(1): p. R21-R32.
279. Santos, M., et al., *Ghrelin expression in human and rat fetal lungs and the effect of ghrelin administration in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia*. *Pediatric Research*, 2006. **59**(4): p. 531-537.
280. Yokota, I., et al., *Concentration of the n-octanoylated active form of ghrelin in fetal and neonatal circulation*. *Endocrine Journal*, 2005. **52**(2): p. 271-276.
281. Shiiya, T., et al., *Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002. **87**(1): p. 240-244.
282. Goldstone, A.P., et al., *Elevated fasting plasma ghrelin in prader-willi syndrome adults is not solely explained by their reduced visceral adiposity and insulin resistance*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(4): p. 1718-26.
283. DelParigi, A., et al., *High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in prader-willi syndrome*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(12): p. 5461-4.
284. Grandjean, V., et al., *The miR-124-Sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth*. *Development*, 2009. **136**(21): p. 3647-55.
285. Fawzy, I.O., et al., *Abrogating the interplay between IGF2BP1, 2 and 3 and IGF1R by let-7i arrests hepatocellular carcinoma growth*. *Growth Factors*, 2016. **34**(1-2): p. 42-50.
286. Evdokimova, V., et al., *IGFBP7 Binds to the IGF-1 Receptor and Blocks Its Activation by Insulin-Like Growth Factors*. *Science Signaling*, 2012. **5**(255).

287. Duan, C. and D.R. Clemmons, *Differential expression and biological effects of insulin-like growth factor-binding protein-4 and -5 in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 16836-42.
288. Firth, S.M. and R.C. Baxter, *Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins*. Endocr Rev, 2002. **23**(6): p. 824-54.
289. Jogie-Brahim, S., D. Feldman, and Y. Oh, *Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease*. Endocr Rev, 2009. **30**(5): p. 417-37.
290. Jackman, R.W. and S.C. Kandarian, *The molecular basis of skeletal muscle atrophy*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2004. **287**(4): p. C834-C843.
291. Mohan, S., et al., *Studies on the Mechanisms by Which Insulin-Like Growth-Factor (Igf) Binding Protein-4 (Igfbp-4) and Igfbp-5 Modulate Igf Actions in Bone-Cells*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(35): p. 20424-20431.
292. Xue, Q., et al., *Transcriptomic profile of leg muscle during early growth in chicken*. PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0173824.
293. Kuemmerle, J.F. and H. Zhou, *Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) stimulates growth and IGF-I secretion in human intestinal smooth muscle by Ras-dependent activation of p38 MAP kinase and Erk1/2 pathways*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20563-71.
294. Lee, D.H., J.E. Kim, and Y.J. Kang, *Insulin Like Growth Factor Binding Protein-5 Regulates Excessive Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation in Spontaneously Hypertensive Rats via ERK 1/2 Phosphorylation*. Korean J Physiol Pharmacol, 2013. **17**(2): p. 157-62.
295. Schneider, M.R., et al., *IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own*. J Endocrinol, 2002. **172**(3): p. 423-40.
296. Ning, Y., et al., *Delayed mammary gland involution in mice with mutation of the insulin-like growth factor binding protein 5 gene*. Endocrinology, 2007. **148**(5): p. 2138-47.
297. Ning, Y., et al., *Diminished growth and enhanced glucose metabolism in triple knockout mice containing mutations of insulin-like growth factor binding protein-3, -4, and -5*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(9): p. 2173-86.

298. Zhang, W.R., et al., *miR-143 regulates proliferation and differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells by targeting IGFBP5*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2017. **53**(3): p. 265-271.
299. Pagani, S., et al., *Analysis of growth hormone receptor gene expression in tall and short stature children*. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2017. **30**(4): p. 427-430.
300. Ricco, R.C., et al., *IGF-1R mRNA expression is increased in obese children*. *Growth Hormone & IGF Research*, 2018. **39**: p. 1-5.
301. Yang, G., et al., *Molecular identification of grouper Igfbp1 and its mRNA expression in primary hepatocytes under Gh and insulin*. *Gen Comp Endocrinol*, 2019. **281**: p. 137-144.
302. Allard, J.B. and C.M. Duan, *IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many?* *Frontiers in Endocrinology*, 2018. **9**.
303. Sitar, T., et al., *Structural basis for the inhibition of insulin-like growth factors by insulin-like growth factor-binding proteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(35): p. 13028-13033.
304. Kajimura, S. and C. Duan, *Insulin-like growth factor-binding protein-1: an evolutionarily conserved fine tuner of insulin-like growth factor action under catabolic and stressful conditions*. *Journal of Fish Biology*, 2007. **71**: p. 309-325.
305. Kamei, H., et al., *Duplication and Diversification of the Hypoxia-Inducible IGFBP-1 Gene in Zebrafish*. *Plos One*, 2008. **3**(8).
306. Brismar, K., et al., *Effect of insulin on the hepatic production of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-3, and IGF-I in insulin-dependent diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994. **79**(3): p. 872-8.
307. Forsberg, E.A., et al., *Carnosine decreases IGFBP1 production in db/db mice through suppression of HIF-1*. *Journal of Endocrinology*, 2015. **225**(3): p. 159-167.
308. Bach, L.A., *IGF-binding proteins*. *J Mol Endocrinol*, 2018. **61**(1): p. T11-T28.
309. Hoeflich, A. and V.C. Russo, *Physiology and pathophysiology of IGFBP-1 and IGFBP-2 - consensus and dissent on metabolic control and malignant potential*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2015. **29**(5): p. 685-700.

310. Lewitt, M.S., M.S. Dent, and K. Hall, *The Insulin-Like Growth Factor System in Obesity, Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus*. J Clin Med, 2014. **3**(4): p. 1561-74.
311. Thissen, J.P., J.B. Pucilowska, and L.E. Underwood, *Differential regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein-1 messenger ribonucleic acids by amino acid availability and growth hormone in rat hepatocyte primary culture*. Endocrinology, 1994. **134**(3): p. 1570-6.
312. Kajimura, S., K. Aida, and C. Duan, *Insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) mediates hypoxia-induced embryonic growth and developmental retardation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(4): p. 1240-5.
313. Street, M.E., et al., *Interleukin-6 and insulin-like growth factor system relationships and differences in the human placenta and fetus from the 35th week of gestation*. Growth Horm IGF Res, 2006. **16**(5-6): p. 365-72.
314. Verhaeghe, J., et al., *C-peptide, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in umbilical cord serum: correlations with birth weight*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **169**(1): p. 89-97.
315. Nawathe, A.R., et al., *Insulin-like growth factor axis in pregnancies affected by fetal growth disorders*. Clin Epigenetics, 2016. **8**: p. 11.
316. Scerif, M., A.P. Goldstone, and M. Korbonits, *Ghrelin in obesity and endocrine diseases*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **340**(1): p. 15-25.
317. Williams, D.L., et al., *Overfeeding-induced weight gain suppresses plasma ghrelin levels in rats*. J Endocrinol Invest, 2006. **29**(10): p. 863-8.
318. Ulloa-Martinez, M., et al., *Expression of candidate genes associated with obesity in peripheral white blood cells of Mexican children*. Arch Med Sci, 2016. **12**(5): p. 968-976.

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

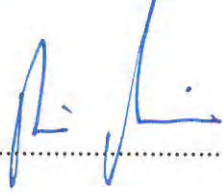
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

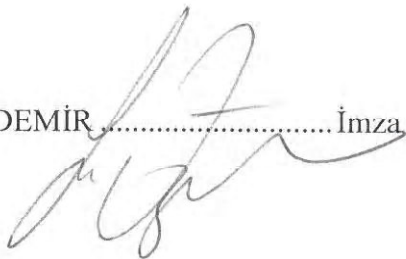
Dr. Neslihan KILIÇ KARADUMAN'e ait "miR-124'ün GROWTH HORMON-INSULIN LIKE GROWTH FACTOR-1(GH-IGF-1) YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih:

23.07.2019

Başkan Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL..........İmza

Üye Prof. Dr. Munis DÜNDAR..........İmza

Üye Dr. Öğr. Üyesi Sevda Yeşim ÖZDEMİR..........İmza