

## Protein-Protein Interaction Network: The Identification of Key Genes and Pathways Involved in Nonfunctioning Pituitary Adenoma Tumorigenesis

Nahid Safari-Alighiarloo<sup>\*1</sup>, Seyyed Mohammad Tabatabaei<sup>2</sup>, Nasibeh Khayer<sup>3</sup>, Nahid Hashemi Madani<sup>1</sup>, Mohammad Ebrahim Khamseh<sup>\*1</sup>

1. Endocrine Research Center, Institute of Endocrinology and Metabolism, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Medical Informatics Department, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

3. Skull Base Research Center, The Five Senses Health Institute, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract

**Background:** Nonfunctioning pituitary adenomas (NFPAs) are among the most prevalent subtypes of pituitary adenomas, presenting no clinical hormone elevation. The lack of definitive biomarkers for prognosis and treatment, combined with a significant risk of recurrence, poses substantial challenges to management. This study aims to identify key genes and biological pathways involved in NFPAs tumorigenesis using a systems biology approach.

**Methods:** The dataset with accession number GSE26966 was analyzed to identify differentially expressed genes (DEGs) in NFPAs. Interactions between DEGs at the protein level were constructed using protein-protein interaction (PPI) data collected from the IntAct database. Cytoscape software, igraph, and MCL packages were used to construct the PPI network, analyze its topology, and cluster it.

**Results:** 1,135 differential genes were identified between NFPAs and normal pituitary samples based on  $|\log_2FC| > 2$  and  $FDR < 0.05$ . Of these, 323 were up-regulated and 812 were down-regulated. The constructed PPI network consisted of 6,960 nodes and 15,691 edges. According to network clustering, cell cycle regulation, chromatin organization and assembly regulation, transcription regulation, and actin cytoskeleton regulation were the most significant pathways. Using topological analysis, CDKN1A, BHLHE40, FHL2, H1-2, H2BC21, and FGFR3 were identified as central hub nodes in the PPI network. These genes were also involved in the biological pathways mentioned above.

**Conclusion:** This study demonstrated that a systems biology approach, integrating gene transcriptome data with protein interaction data, can effectively identify pathways and biomarkers in NFPAs tumorigenesis.

**Keywords:** Nonfunctioning pituitary adenomas (NFPAs), Transcriptome, Protein-protein interaction (PPI) network, Topology, Clustering

### Please cite this article as:

Safari-Alighiarloo N, Tabatabaei SM, Khayer N, Hashemi Madani N, Khamseh ME. Protein-Protein Interaction Network: the Identification of Key Genes and Pathways Involved in Nonfunctioning Pituitary Adenoma Tumorigenesis. *ijdl*. 2026; 25(6):535-543.

DOI: [10.18502/ijdl.v25i6.20858](https://doi.org/10.18502/ijdl.v25i6.20858)

**\*Corresponding Author:** Nahid Safari-Alighiarloo; **Email:** [safari.n@iums.ac.ir](mailto:safari.n@iums.ac.ir)  
Endocrine and Metabolism Research Institute, Firoozeh Alley, Valiasr Square, Tehran, Iran. Tel: +982188945246

**\*Corresponding Author:** Mohammad Ebrahim Khamseh; **Email:** [khamseh.m@iums.ac.ir](mailto:khamseh.m@iums.ac.ir)  
Endocrine and Metabolism Research Institute, Firoozeh Alley, Valiasr Square, Tehran, Iran. Tel: +982188945246

## شبکه برهم کنش پروتئین-پروتئین: شناسایی ژن‌های کلیدی و مسیرهای دخیل در تومورزایی آدنوم هیپوفیز غیر عملکردی

ناهید صفری علی قیارلو<sup>۱\*</sup>، سید محمد طباطبایی<sup>۲</sup>، نصیبه خیر<sup>۳</sup>، ناهید هاشمی مدنی<sup>۱</sup>، محمد ابراهیم خمسه<sup>۱\*</sup>

۱- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز، پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲- گروه انفورماتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳- مرکز تحقیقات قاعده جمجمه، پژوهشکده سلامت حواس پنجگانه، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

### چکیده

**مقدمه:** آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی (NFPAs) فاقد شواهد بالینی افزایش هورمون هستند. عدم وجود نشانگرهای زیستی قابل اعتماد برای پیش‌آگهی و درمان، همراه با خطر قابل توجه عود، سبب ایجاد چالش‌های اساسی برای مدیریت بیماری شده است. هدف این مطالعه شناسایی ژن‌های کلیدی و مسیرهای زیستی در تومورزایی آدنوم هیپوفیز غیرعملکردی با استفاده از روش سیستم بیولوژی است.

**روش‌ها:** مجموعه داده میکروارای با شماره دسترسی GSE26966 برای شناسایی ژن‌های افتراقی بین نمونه‌های آدنوم هیپوفیز غیرعملکردی و هیپوفیز سالم آنالیز شد. برهم‌کنش‌های بین ژن‌های افتراقی در سطح پروتئین با استفاده از داده‌های برهم‌کنش پروتئین-پروتئین (PPI) جمع‌آوری شده از پایگاه داده IntAct، ایجاد شد. نرم افزار cytoscape، پکیج‌های igraph و MCL برای ساخت، آنالیز توپولوژیکی و خوشه‌بندی شبکه استفاده شدند.

**یافته‌ها:** ۱۱۳۵ ژن افتراقی،  $FDR < 0.05$  و  $\log_2FC > 2$ ، بین نمونه‌های آدنوم هیپوفیز غیرعملکردی و هیپوفیز سالم شناسایی شدند که ۳۳۳ ژن افزایش و ۸۱۲ ژن کاهش بیان داشتند. شبکه PPI شامل ۶۹۶۰ گره و ۱۵۶۹۱ یال بود. براساس آنالیز خوشه‌بندی، تنظیم چرخه سلولی، تنظیم سازمان‌دهی و تجمع کروماتین، تنظیم رونویسی و تنظیم مسیر اسکلت سلولی اکتین، مهم‌ترین مسیرهای درگیر بودند. با آنالیز توپولوژیکی شبکه، ژن‌های CDKN1A، BHLHE40، FHL2، H1-2، H2BC21 و FGFR3 به‌عنوان گره‌های هاب مرکزی شناسایی شدند. این ژن‌ها در مسیرهای زیستی ذکر شده نیز درگیر بودند.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که روش سیستم بیولوژی با رویکرد تلفیق داده‌های رونوشت ژن با داده‌های برهم‌کنش پروتئین‌ها توانایی شناسایی مسیرها و نشانگرهای زیستی بالقوه در تومورزایی آدنوم هیپوفیز غیرعملکردی دارد.

**واژگان کلیدی:** آدنوم هیپوفیز غیرعملکردی، ترانسکریپتوم، شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین، توپولوژی، خوشه‌بندی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۲۱

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Safari-Alighiarloo N, Tabatabaei SM, Khayer N, Hashemi Madani N, Khamseh ME. Protein-Protein Interaction Network: the Identification of Key Genes and Pathways Involved in Nonfunctioning Pituitary Adenoma Tumorigenesis. *ijdl*. 2025; 25(6):535-543.

\* **نویسنده مسئول:** ناهید صفری علی قیارلو، آدرس: تهران، میدان ولیعصر، کوچه فیروزه، پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم، تلفن: ۰۲۱۸۸۹۴۵۲۴۶، پست الکترونیک: safari.n@iums.ac.ir

\* **نویسنده مسئول:** محمد ابراهیم خمسه، آدرس: تهران، میدان ولیعصر، کوچه فیروزه، پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم، تلفن: ۰۲۱۸۸۹۴۵۲۴۶، پست الکترونیک: khamseh.m@iums.ac.ir

## مقدمه

آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی (NFPA) تومورهای خوش‌خیم آدنوهیپوفیز هستند که با شواهد بالینی افزایش ترشح هورمون همراه نیستند. عدم فعالیت هورمونی اغلب می‌تواند باعث تأخیر در تشخیص و درمان به موقع آدنوم هیپوفیز غیرعملکردی شود. آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی عموماً آدنوم‌های هیپوفیز گنادوتروپ هستند و تقریباً یک سوم از کل تومورهای هیپوفیز را تشکیل می‌دهند [۱]. بیشتر آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی به‌صورت ماکروآدنوم با اثرات توده‌ای و اختلال عملکرد هیپوفیز بروز می‌کنند. نقص میدان بینایی و سردرد علائم غالب هستند و هیپوگنادیسم شایع‌ترین نقص هیپوفیز است [۲].

بیش از ۳۵ درصد از آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی می‌توانند به‌صورت موضعی به نواحی مجاور، یعنی کیاسمای بینایی، سینوس کاورنوس یا سینوس اسفنوئید، حمله کنند [۳]. در حال حاضر، جراحی درمان استاندارد خط اول برای اکثر آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی است [۴]. برداشتن کل تومور از طریق جراحی ممکن است به دلیل آسیب احتمالی به ساختارهای حیاتی اطراف غیرممکن باشد. پس از درمان جراحی، آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی اغلب پیشرفت می‌کنند. بقایای تومور نیاز به جراحی یا پرتودرمانی دارند و مشکلات بیشتر را ایجاد می‌کنند [۵]. بنابراین، یک درمان کمکی و یا جایگزین پس از جراحی برای آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی مورد نیاز است [۶].

در حال حاضر، علی‌رغم شیوع آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی، درمان دارویی استاندارد برای آنها وجود ندارد [۷]. علاوه بر این، آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی معمولاً در برابر درمان پزشکی مقاومت نشان می‌دهند. بنابراین، ارائه اطلاعاتی در مورد ویژگی‌های زیستی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی لازم است [۸]. اگرچه مطالعات مولکولی زیادی انجام شده است، اما هنوز مشخص نیست چه عواملی تومورزایی، تهاجمی بودن آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی و پاسخ به درمان‌های کمکی را تعیین می‌کنند [۹]. شناسایی نشانگرهای مولکولی جدید برای بهینه‌سازی و شخصی‌سازی رویکردهای درمانی ضروری است.

داده‌های برهم‌کنش می‌توان در ساختارهای شبکه‌ای گنجانده و مدل‌سازی کرد تا سازکارهای مولکولی زیربنایی سرطان را بهتر درک کرد. گره‌ها<sup>۲</sup> در این شبکه‌ها موجودیت‌های زیستی (مانند ژن‌ها، پروتئین‌ها، mRNA و متابولیت‌ها) و یال‌ها<sup>۳</sup>، تعاملات بین

آنها هستند [۱۰]. مطالعه برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین<sup>۴</sup> (PPI) درک جامعی از فرآیندهای بیولوژیکی، سازکارهای پروتئینی و کمپلکس‌های پروتئینی ارائه می‌دهد [۱۱]. نظریه گراف نشان می‌دهد که ساختار توپولوژیکی شبکه PPI به عملکردهای بیولوژیکی متصل است و اطلاعات اساسی و مستقیمی در مورد شبکه ارائه می‌دهد [۱۲]. کمپلکس‌های پروتئینی در شبکه‌های PPI با استفاده از راهبردهای خوشه‌بندی به‌طور مؤثر شناسایی می‌شوند. در بسیاری از فرآیندهای سلولی، کمپلکس‌های پروتئینی نقش حیاتی دارند، بنابراین برای درک عملکرد سلولی، شناسایی دقیق کمپلکس‌های پروتئینی ضروری است [۱۴، ۱۳].

هدف ما استفاده از نظریه شبکه برهم‌کنش پروتئین‌ها برای یافتن ژن‌ها و مسیرهای مهمی است که در تومورزایی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی نقش دارند. در این مطالعه از مجموعه داده ریزآرایه برای تعیین ژن‌های افتراقی مرتبط با تومورزایی (GSE26966) در آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی استفاده شد. ژن‌های افتراقی شناسایی شده با داده‌های PPI که با تأیید آزمایشگاهی از پایگاه داده IntAct جمع‌آوری شده بودند، ادغام شدند. تجزیه و تحلیل توپولوژیکی و خوشه‌بندی شبکه PPI ساخته‌شده، منجر به شناسایی ژن‌های کلیدی و مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با تومورزایی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی گردید.

## روش‌ها

## پیش پردازش و آنالیز داده‌های بیان ژن

مجموعه داده با شماره دسترسی GSE26966 از پایگاه داده NCBI قسمت<sup>۵</sup> GEO گرفته شد. پلتفرم این مجموعه Affymetrix Human Genome Plus 2.0 Array بود. این مجموعه داده شامل ۱۴ نمونه آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی (۱۱ نمونه گنادوتروپ و سه نمونه null cell) و ۹ نمونه هیپوفیز سالم جمع‌آوری شده از افراد بدون اختلال عملکرد غدد درون‌ریز در کالبد شکافی ۲ تا ۱۸ ساعت پس از مرگ بود [۱۵]. از GEOquery package در نرم‌افزار R (نسخه ۴.۱.۰) برای دانلود و خواندن داده‌های پروفایل استفاده کردیم. پروفایل‌های بیان با استفاده از روش quantile نرمال‌سازی شدند. از بسته limma (نسخه ۳.۳۴.۵) برای شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت<sup>۶</sup> (DEGs) استفاده کردیم. معیار  $FDR^7 < 0.05$  با استفاده از روش Benjamini-Hochberg برای کنترل معناداری استفاده شد.

<sup>۵</sup> Gene Expression Omnibus<sup>۶</sup> Differentially expressed genes<sup>۷</sup> False Discovery Rate<sup>۱</sup> Nonfunctioning pituitary adenomas<sup>۲</sup> Nodes<sup>۳</sup> Edges<sup>۴</sup> Protein-protein interaction network

## ساخت شبکه برهم‌کنش پروتئین-پروتئین (PPI)

شبکه PPI برای درک روابط بین ژن‌های با بیان متفاوت در سطح پروتئین ساخته شد. داده‌های PPI جمع‌آوری شده توسط روش‌های آزمایشگاهی و با دقت از پایگاه داده IntAct (Jul 2023) بازیابی شدند [۱۶]. پس از دریافت فایل با فرمت MI-TAB 2.7 داده‌ها ویرایش شدند تا هرگونه تعامل با ترکیبات شیمیایی یا تعاملات غیرانسانی حذف شود. سپس DEGs روی PPI نگاشته شدند تا تعاملات بین آنها و اولین همسایگان‌شان (گره‌هایی که مستقیماً با ژن‌های افتراقی تعامل داشتند) شناسایی شوند. نرم‌افزار Cytoscape (نسخه ۳.۹.۱) شبکه‌های PPI را ایجاد و نمایش داد [۱۷].

## آنالیز توپولوژیکی شبکه PPI

تحلیل توپولوژیکی شبکه PPI با استفاده از igraph package in R انجام شد [۱۸]. سه معیار مرکزیت برای ارزیابی اهمیت گره‌ها در شبکه‌های PPI استفاده شد: درجه رأس (k)، مرکزیت بینابینی<sup>۱</sup> و closeness centrality (CC). درجه رأس به تعداد برهم‌کنش‌هایی که یک گره را به بقیه گره‌ها متصل می‌کند، اشاره دارد. گره‌هایی که درجه رأس بالاتری در شبکه PPI دارند، هاب نامیده می‌شوند و معمولاً در مرکز شبکه قرار دارند [۱۹]. معیار مرکزیت بینابینی یک گره، تعداد کوتاه‌ترین مسیرهای بین هر گره و سایر گره‌هایی که از گره مورد نظر عبور می‌کنند، تعریف می‌شود. نودهای با مرکزیت بینابینی بالا، که به‌عنوان گلوگاه نیز شناخته می‌شوند، جریان داده‌ها را در یک شبکه نظارت می‌کنند [۱۹]. معیار closeness centrality، برای محاسبه میانگین فاصله بین یک گره مورد نظر و تمام گره‌های دیگر در یک شبکه استفاده می‌شود. گره‌های با CC بالا نشان‌دهنده این است که اطلاعات می‌توانند به سرعت به سایر گره‌های شبکه منتقل شوند [۱۹].

## خوشه‌بندی و تحلیل غنی‌سازی عملکردی

الگوریتم خوشه‌بندی مارکوف توسط package MCL در محیط R به‌منظور یافتن خوشه‌های عملکردی در شبکه‌های PPI استفاده شد [۲۰]. پارامتر inflation روی ۲ تنظیم شد. فرایندهای زیستی GO<sup>۲</sup> و مسیرهای زیستی براساس KEGG<sup>۳</sup> در پایگاه داده Enrichr (https://maayanlab.cloud/Enrichr/) برای شناسایی عملکردها و مسیرهای زیستی خوشه‌ها استفاده شدند. عبارت‌های برتر با مقادیر  $FDR < 0.05$  را از نظر آماری معنی‌دار انتخاب شدند.

## یافته‌ها

## اطلاعات بالینی افراد

میانگین سنی ۹ نمونه مربوط به هیپوفیز سالم ۵۵/۹ سال گزارش شد. نمونه‌های تومور از هشت مرد و شش زن با میانگین سنی ۶۱/۴ سال با تومورهای گوندوتروپ جمع‌آوری شد. هیچ تفاوت معناداری بین سن نمونه‌های سالم و تومور مشاهده نشد. تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی نشان داد که چهار نمونه به‌عنوان آدنوم null cell و ۱۰ نمونه به‌عنوان تومورهای گوندوتروپ طبقه‌بندی شدند. اندازه تومور از ۱ X ۱/۳ سانتی‌متر تا ۵/۶ X ۳/۶ X ۲/۷ سانتی‌متر متغیر بود. هشت مورد از ۱۴ تومور تهاجمی و/یا عودکننده بودند، درحالی‌که شش مورد باقی‌مانده غیرتهاجمی و غیرعودکننده بودند.

## شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی

ژن‌های افتراقی از مقایسه آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی با نمونه‌های هیپوفیز سالم (مجموعه داده GSE26966) شناسایی شدند. پس از حذف ژن‌های ناشناخته و غیرگذکننده، براساس  $|\log_2FC| > 2$  و  $FDR < 0.05$ ، تعداد ۱۱۳۵ ژن با بیان متفاوت بین نمونه‌های آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی و هیپوفیز سالم شناسایی کردیم؛ آنها با تومورزایی مرتبط بودند. از این تعداد، ۳۲۳ مورد افزایش بیان و ۸۱۲ مورد کاهش بیان داشتند (جدول تکمیلی ۱).

## آنالیز شبکه‌های PPI و شناسایی ژن‌های مرکزی

شبکه‌های PPI با استفاده از ژن‌های متفاوت بیان شده ساخته شدند. ما شبکه‌های اولیه را براساس شواهد موجود در پایگاه داده IntAct گسترش دادیم تا اولین همسایه‌های ژن‌های افتراقی را نیز در بر بگیرد. با گسترش شبکه‌ها به اولین همسایه‌های ژن‌های افتراقی، توانستیم برهم‌کنش‌های شناسایی نشده بین ژن‌های افتراقی که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم به هم متصل بودند را نیز در نظر بگیریم و شناسایی ماژول‌های شبکه اصلی را در یک شبکه ژنی جامع آسان‌تر کنیم. شبکه PPI با استفاده از ژن‌های افتراقی به‌دست آمده از مقایسه NFPAs با نمونه‌های هیپوفیز سالم ایجاد شد که شامل ۶۹۶۰ ژن/پروتئین (گره) و ۱۵۶۹۱ برهم‌کنش (یال) است. شبکه PPI با معیارهای درجه رأس، مرکزیت بینابینی و closeness centrality مورد ارزیابی قرار گرفتند تا اهمیت هر گره تعیین شود. رتبه‌بندی گره‌ها براساس هر سه معیار مرکزیت انجام شد و در نهایت گره‌هایی که ۵ درصد بالاتر از هر کدام از مقادیر مرکزیت

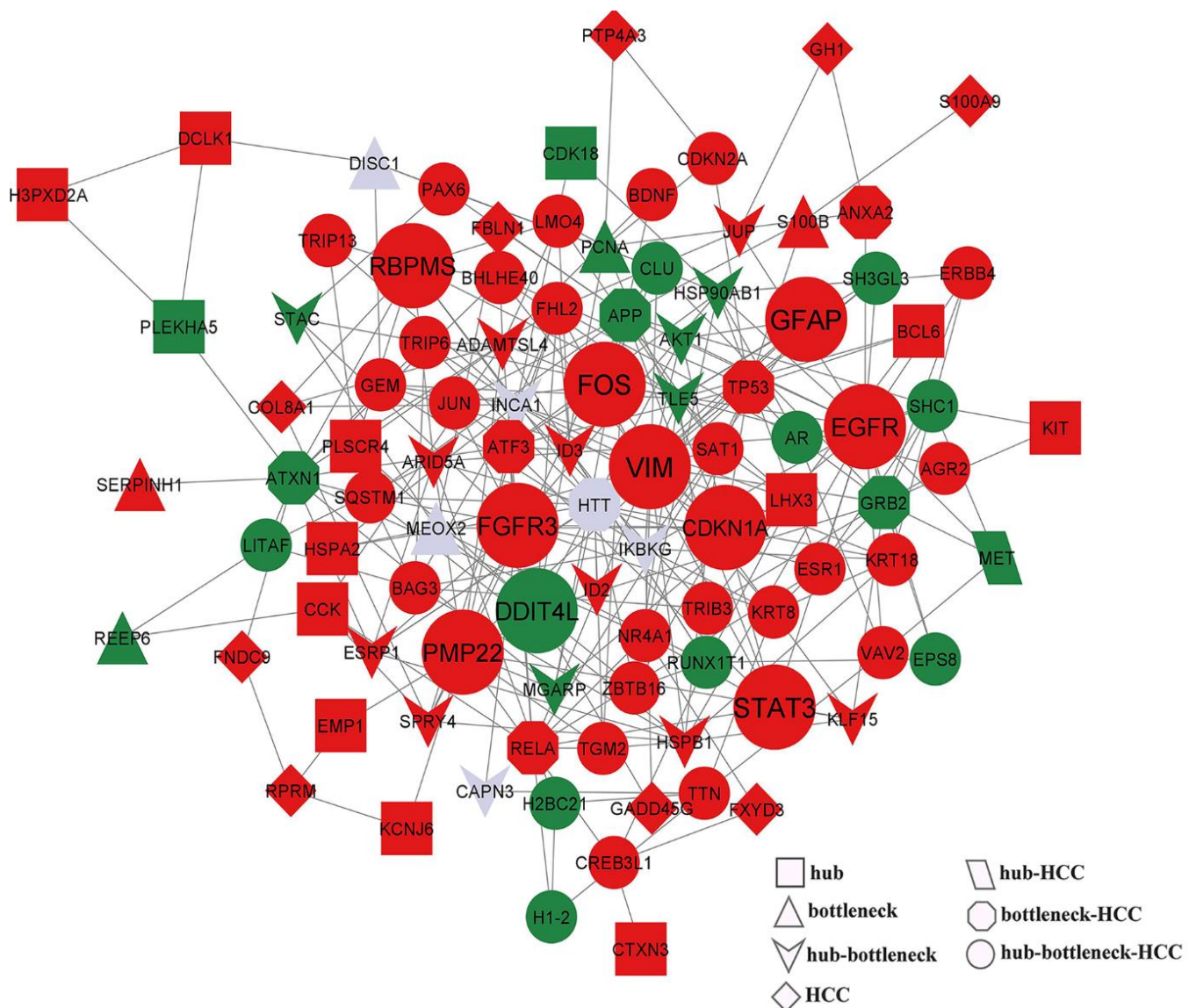
<sup>3</sup> Kyoto encyclopedia of genes and genomes<sup>1</sup> Betweenness centrality<sup>2</sup> Gene Ontology

بالقوه ژن‌های کلیدی در خوشه‌ها حاصل شود. معیار  $FDR < 0.05$ ، برای انتخاب مسیرهای معنادار مورد استفاده قرار گرفت. با اعمال الگوریتم MCL، ۲۵۷ خوشه با بیشتر از هشت گره را در شبکه PPI شناسایی کردیم. ما ۱۳ خوشه را که شامل ژن‌های کلیدی بودند، برای شناسایی مسیرهای مهم دخیل در تومورزایی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی انتخاب کردیم (شکل ۲). فرآیندهای زیستی و مسیرهای غنی‌شده برتر مربوط به خوشه‌ها در جدول ۱ خلاصه شده‌اند. ژن‌های مرکزی‌تر در شبکه PPI که در خوشه‌هایی غنی شده‌اند، به‌عنوان ژن‌های کلیدی شناسایی شده‌اند. سه معیار مرکزیت برای ژن‌های کلیدی در جدول ۲ آورده شده است.

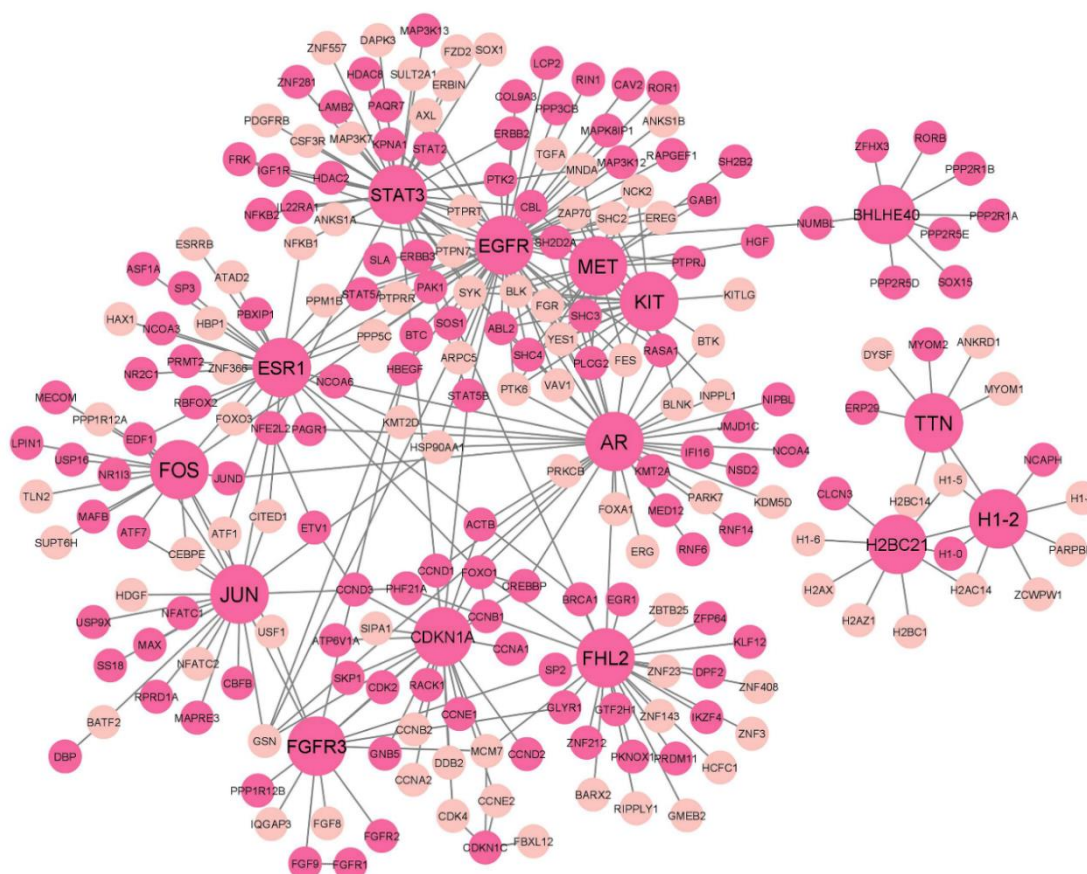
را به‌دست آورده بودند، انتخاب شدند. لیست نهایی ژن‌های مرکزی‌تر براساس ژن‌های همپوشانی بین هر کدام از مقادیر مرکزیت در شبکه PPI استخراج شد (شکل ۱). ده ژن با بالاترین امتیاز مرکزیت شامل، EGFR، FGFR3، VIM، RBPMS، PMP22، CDKN1A، GFAP، DDIT4L، STAT3 و FOS بود.

### تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی خوشه‌ها با ژن‌های کلیدی

غنی‌سازی عملکردی خوشه‌های شناسایی شده با استفاده از پایگاه داده‌های GO و KEGG انجام شد تا بیشترین تعداد مسیرهای درگیر در تومورزایی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی و عملکردهای



شکل ۱- شبکه PPI ساخته شده از ۱۰۲ ژن افتراقی درگیر در تومورزایی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی که به‌عنوان گره‌های مرکزی (هاب، گلوگاه و closeness centrality بالا) شناسایی شدند



شکل ۲- خوشه‌بندی شبکه PPI براساس ژن‌های افتراقی بین آدنوم‌های هیپوفیز غیر عملکردی با بافت‌های هیپوفیز سالم  
ژن‌های کلیدی در خوشه‌ها با اندازه بزرگتر نشان داده شده‌اند. گره‌های با رنگ صورتی پررنگ، ژن‌های افتراقی هر خوشه هستند و گره‌های با رنگ صورتی کم‌رنگ، اولین همسایه‌های ژن‌های افتراقی هستند.

جدول ۱- مهم‌ترین فرآیندها، مسیرهای زیستی و ژن‌های مرکزی مرتبط با تومورزایی آدنوم‌های هیپوفیز غیر عملکردی

| Cluster-ID | Go biological processes                                                | Adjusted p-value | KEGG pathway                                           | Adjusted p-value | Enriched central genes |
|------------|------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------|------------------|------------------------|
| 1          | Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway       | 4.61E-29         | ErbB signaling pathway                                 | 6.40E-22         | EGFR                   |
|            | Enzyme-linked receptor protein signaling pathway (GO:0007169)          | 2.04E-25         | MAPK signaling pathway                                 | 2.56E-12         | EGFR/MET/KIT           |
| 2          | Positive regulation of lipase activity (GO:0060193)                    | 0.033            | Regulation of actin cytoskeleton                       | 0.0266           | FGFR3                  |
| 3          | Regulation of cyclin-dependent protein kinase activity (GO:1904029)    | 3.67E-16         | Cell cycle                                             | 1.11E-20         | CDKN1A                 |
| 4          | Negative regulation of transcription by RNA polymerase II (GO:0000122) | 0.0391           | Epstein-Barr virus infection                           | 0.0070           | STAT3                  |
| 5          | Regulation of nucleic acid-templated transcription (GO:1903506)        | 0.004            | -                                                      | -                | BHLHE40                |
| 6          | Regulation of androgen receptor signaling pathway (GO:0060765)         | 6.65E-07         | -                                                      | -                | AR                     |
| 7          | Positive regulation of transcription, DNA-templated (GO:0045893)       | 4.37E-05         | -                                                      | -                | ESR1                   |
| 8          | Regulation of transcription by RNA polymerase II                       | 4.70E-06         | PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer | 7.63E-04         | JUN                    |
| 9          | Positive regulation of transcription by RNA polymerase II (GO:0045944) | 0.0136           | -                                                      | -                | FOS                    |
| 10         | regulation of transcription by RNA polymerase II (GO:0006357)          | 3.34E-05         | -                                                      | -                | FHL2                   |
| 11         | Negative regulation of chromatin organization (GO:1905268)             | 0.00476          | -                                                      | -                | H1-2                   |
| 12         | Regulation of protein secretion (GO:0050708)                           | 0.00365          | -                                                      | -                | TTN                    |
| 13         | Chromatin assembly (GO:0031497)                                        | 0.0050           | Neutrophil extracellular trap formation                | 9.71E-05         | H2BC21                 |

جدول ۲- ویژگی توپولوژیکی گره‌های مرکزی در شبکه PPI که در مسیرهای زیستی نیز درگیر بودند

| Gene name | Degree | Betweenness centrality | Closeness centrality |
|-----------|--------|------------------------|----------------------|
| EGFR      | 340    | 2546369.352            | 4.98E-05             |
| FGFR3     | 327    | 1846357.435            | 4.79E-05             |
| CDKN1A    | 179    | 1023048.843            | 4.74E-05             |
| STAT3     | 150    | 870576.7472            | 4.69E-05             |
| FOS       | 148    | 779863.9352            | 4.59E-05             |
| FHL2      | 140    | 714236.3047            | 4.55E-05             |
| BHLHE40   | 98     | 380360.3169            | 4.51E-05             |
| AR        | 114    | 409662.1295            | 4.38E-05             |
| H1-2      | 156    | 874800.1058            | 4.27E-05             |
| ESR1      | 100    | 402045.8941            | 4.36E-05             |
| TTN       | 100    | 555961.2022            | 4.34E-05             |
| H2BC21    | 168    | 888064.5383            | 4.23E-05             |
| JUN       | 85     | 327729.8058            | 4.48E-05             |
| MET       | 87     | 181048.3129            | 4.26E-05             |
| KIT       | 63     | 66351.4858             | 3.97E-05             |

## بحث

تشخیص و درمان آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی یک نیاز پزشکی قابل توجه است زیرا این آدنوم‌ها بدون بروز علائم اولیه تظاهر می‌کنند، اغلب تهاجمی هستند، برداشتن کامل آنها دشوار است و عود بالایی دارند [۶]. شناسایی نشانگر زیستی برای تشخیص و درمان هدفمند ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه، ما ژن‌های کلیدی و مسیرهای بیولوژیکی دخیل در تومورزایی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی را با تجزیه و تحلیل شبکه‌های PPI مربوط به ژن‌های افتراقی که از مقایسه آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی با نمونه‌های هیپوفیز سالم حاصل شده است، شناسایی کردیم.

چرخه سلولی یکی از مهم‌ترین مسیر بیولوژیکی مرتبط با تومورزایی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی بود. تنظیم چرخه سلولی در حال حاضر یکی از موضوعات تحقیقاتی اصلی در تومورزایی آدنوم هیپوفیز است [۲۱]. CDKN1A که با نام p21 نیز شناخته می‌شود، به عنوان یک گره هاب و گلوگاه شناخته شده و closeness centrality بالایی را در شبکه PPI نشان می‌دهد. بیان CDKN1A در آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی در مقایسه با هیپوفیزهای نرمال کاهش یافته بود. روند مشابهی نیز در مطالعات دیگر مشاهده شد که در آنها سلول‌های تومور هیپوفیز سطح پایین‌تری از بیان ژن CDKN1A داشتند [۲۲، ۲۳]. ژن CDKN1A با مهار پیشرفت چرخه سلولی در فاز G1، رشد تومور را در شرایط *in vitro* و *in vivo* سرکوب می‌کند [۲۴]. در تجزیه و تحلیل زیستی خوشه‌بندی شبکه PPI، CDKN1A با ژن‌های CDKN1C، CDKN1A، CCND2، CCNE1، CCND3، CCNB2، CCNA1 و SKP1 برهم‌کنش دارد. ژن SKP1 در آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی در مقایسه با نمونه‌های هیپوفیز سالم افزایش بیان دارد. این ژن متعلق به کمپلکس Skp1/Cul1/F-box (SCF) است که CDKN1A را هدف قرار می‌دهد. این کمپلکس از طریق تخریب پروتئازومی،

یوبیکوئیتیناسیون پروتئین‌ها را کاتالیز کرده و چندین فرآیند سلولی، به‌ویژه چرخه سلولی را تنظیم می‌کند [۲۵]. یک سیستم یوبیکوئیتین-پروتئازوم ناکارآمد در طول چرخه سلولی می‌تواند منجر به افزایش تومورزایی و اختلال در رشد سلول شود [۲۶].

تنظیم سازمان‌دهی و تجمع کروماتین یکی دیگر از مسیرهای زیستی مهم دخیل در تومورزایی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی بود. H1-2 (HIST1H1C) و H2BC21 (HIST2H2BE) به عنوان گره‌های هاب و گلوگاه شناخته شدند و closeness centrality بالایی را در شبکه PPI داشتند. این ژن‌ها در تومورهای هیپوفیز در مقایسه با هیپوفیز سالم افزایش بیان داشتند. تومورهای هیپوفیز، برخلاف سایر *solid tumors*، اغلب دچار تغییرات اپی‌ژنتیکی، عمدتاً متیلاسیون DNA و بازسازی کروماتین از طریق تغییرات هیستون پس از ترجمه می‌شوند [۲۷]. با حفظ الگوهای خاص متیلاسیون DNA، برهم‌کنش فیزیکی پروتئین H1-2 با DNA می‌تواند در تنظیم اپی‌ژنتیکی بیان ژن نقش داشته باشد [۲۸]. ژن H1-2 در نمونه‌های موش‌ها یا انسان‌های مبتلا به کارسینوم هپاتوسلولار بیش از حد بیان می‌شود و تکثیر سلولی را افزایش می‌دهد [۲۹]. ژن HIST2H2BE هیستون H2B را کُدگذاری می‌کند که در سرطان معده بیش از حد بیان می‌شود و نشانگر تکثیر سلولی است [۳۰]. ژن HIST2H2BE (histone cluster 2) نقش مهمی در پیشرفت کارسینوم مجرای تهاجمی ایفا می‌کند [۳۱].

نظم رونویسی، دیگر فرآیند زیستی دخیل در تومورزایی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی بود. در مقایسه تومورهای هیپوفیز با نمونه‌های سالم، پنج فاکتور رونویسی، BHLHE40، STAT3، FHL2، AR، JUN و FOS کاهش بیان داشتند. این ژن‌ها در شبکه PPI به عنوان گره‌های مرکزی شناسایی شدند. پروتئین BHLHE40 متعلق به خانواده مارپیچ-حلقه-مارپیچ، ابرخانواده تنظیم‌کننده‌های رونویسی است که در بسیاری از بافت‌ها بیان می‌شود. BHLHE40 نقش

ممکن است در شناسایی ژن‌های افتراقی مؤثر باشد. انجام مطالعات آزمایشگاهی تکمیلی برای تأیید نقش ژن‌های کلیدی شناسایی شده در تومورزایی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی ضروری است.

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه، ما داده‌های بیان ژن و برهم‌کنش پروتئین-پروتئین را برای درک جامع‌تر و دقیق‌تر مسیرهای بیولوژیکی و ژن‌های مهم مرتبط با آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی ادغام کردیم. طبق یافته‌های ما، تومورزایی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی ممکن است تحت تأثیر اختلال در تنظیم چرخه سلولی و تغییرات اپی‌ژنتیک، به‌ویژه سازمان‌دهی و تجمع کروماتین، تنظیم رونویسی و تنظیم اسکلت سلولی قرار بگیرد. ژن‌های *H1-2*, *FHL2*, *BHLHE40*, *CDKN1A*, *H2BC21* و *FGFR3* دارای بالاترین مقادیر درجه رأس (هاب)، مرکزیت بینایی (گلوگاه) و *closeness centrality* در شبکه شناسایی بودند. این ژن‌ها در مسیرهای زیستی ذکر شده نیز غنی شده بودند. ژن‌های کلیدی غنی شده در مسیرهای زیستی به‌عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه جدید برای تشخیص و درمان هدفمند آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی پیشنهاد می‌شوند. با این حال، مطالعات بیشتری برای روشن شدن چگونگی عملکرد این ژن‌ها در آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی مورد نیاز است.

## منابع مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (شماره گرنت: ۱۳۷۳۰) انجام شده است.

## بیانیه هیئت بررسی نهادی

این مطالعه براساس اعلامیه هلسینکی انجام شد و به تأیید هیئت بازرینی نهادی و کمیته اخلاق پژوهشکده غدد درون‌ریز دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران IR.IUMS.REC.1397.873 رسید.

## تعارض منافع

مؤلفان اظهار می‌کنند که منافع متقابلی از تألیف و انتشار این مقاله وجود ندارند.

## سپاسگزاری

از تمامی نویسندگان محترم بابت مشارکت فعال در انجام این پروژه صمیمانه قدردانی می‌کنیم.

پیچیده‌ای در سرطان ایفا می‌کند، به‌طوری‌که بسته به بافت و مرحله بیماری، ممکن است تومورزایی را تقویت یا سرکوب کند. در سرطان ریه و مری، *BHLHE40* با تعامل با *p53* سبب سرکوب رشد تومور می‌شود، اما در شرایط هیپوکسی توسط *HIF-1α* در سرطان معده و کارسینوم‌های هپاتوسلولار نیز پیشرفت تومور را تحریک می‌کند [۳۲]. ژن *FHL2* با تنظیم کاهشی در بافت تومور به‌عنوان یک سرکوب‌کننده تومور عمل می‌کند و با محدود کردن تکثیر سلولی، به‌طور مؤثر مانع از توسعه تومور می‌شود. از سوی دیگر، *FHL2* با تنظیم افزایشی در بافت تومور و اتصال به چندین فاکتور رونویسی به‌عنوان یک انکوپروتئین عمل می‌کند تا آپوپتوز سلولی را سرکوب کند، تکثیر و مهاجرت سلولی را تحریک کند و پیشرفت تومور را ارتقا دهد. بنابراین، *FHL2* در تومورهایی با عملکردهای مستقل و پیچیده، یک شمشیر دولبه محسوب می‌شود [۳۳].

تنظیم مسیر اسکلت سلولی اکین، از فرایندهای زیستی مهم در تومورزایی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی بود. ژن *FGFR3* در این مسیر غنی شده است. این ژن به‌عنوان گره هاب و گلوگاه شناخته شده است و *closeness centrality* بالایی را در شبکه *PPI* برخوردار بود. در شبکه *PPI*، *FGFR3* با ژن‌های افتراقی مانند *FGFR1*, *FGFR2*, *FGF9*, *PPP1R12B* تعامل دارد. بیان ژن‌های *FGFR3* و *FGFR2* در تومورهای هیپوفیز در مقایسه با هیپوفیز سالم کاهش یافته است. گیرنده فاکتور رشد فیروپلاست (*FGFR*) یک گیرنده تیروزین کیناز غشایی است که مسئول واسطه‌گری پاسخ‌های سلولی به سیگنالینگ *FGFs* است [۳۴]. نتیجه مطالعه *Abbass* و همکاران نشان داد که آدنوم‌های هیپوفیز بیان زیرگروه و ایزوفرم‌های *FGFR* را تغییر داده‌اند و عملکرد نامنظم *FGF/FGFR* در تومورزایی هیپوفیز نقش دارد [۳۵]. بیان *FGFR2* به‌دلیل تغییرات اپی‌ژنتیکی در تومورهای هیپوفیز انسان کاهش یافته است [۳۶]. ژن *FGFR3* بسته به نوع سلول، تکثیر سلولی را مهار یا تحریک می‌کند [۳۷]. بیان *FGFR3* در سلول‌های سرطان کولورکتال کاهش یافته است [۳۸].

این مطالعه با رویکرد چندسطحی مبتنی بر ادغام داده‌های بیان ژنی و شبکه‌های برهم‌کنش پروتئینی تأیید شده تجربی از پایگاه *IntAct*، تحلیل توپولوژیکی شبکه *PPI* و خوشه‌بندی ماژول‌های عملکردی، امکان شناسایی ژن‌های هاب و مسیرهای زیستی دخیل در رفتار تهاجمی آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی را فراهم ساخت. با وجود نتایج ارزشمند این پژوهش، چند محدودیت قابل ذکر است. نخست، تحلیل‌ها بر پایه داده‌های ریزآرایه موجود و برهم‌کنش پروتئینی تجربی موجود در پایگاه *IntAct* ممکن است تمامی برهم‌کنش‌های زیستی مرتبط با آدنوم‌های هیپوفیز غیرعملکردی را پوشش ندهند. همچنین، ناهمگونی ذاتی در داده‌های عمومی و تفاوت‌های تکنیکی میان پلتفرم‌ها

## References

1. Ntali G. and JA. Wass, Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary*. 2018; 21:111-118.
2. Ferrante E, et al. Non-functioning pituitary adenoma database: a useful resource to improve the clinical management of pituitary tumors. *Eur J Endocrinol*. 2006; 155(6):823-829.
3. Day PF, et al. Incidence and prevalence of clinically relevant pituitary adenomas: retrospective cohort study in a Health Management Organization in Buenos Aires, Argentina. *Chives of endocrinology and metabolism*. 2016; 60:554-561.
4. Even-Zohar N. and Greenman Y. Management of NFAs: medical treatment. *Pituitary*, 2018; 21:168-175.
5. Galland F, et al. Differential gene expression profiles of invasive and non-invasive non-functioning pituitary adenomas based on microarray analysis. *Endocr Relat Cancer*. 2010; 17(2):361.
6. Modena D, et al. Identification of a Novel SSTR3 Full Agonist for the Treatment of Nonfunctioning Pituitary Adenomas. *Cancers*. 2023; 15(13):3453.
7. Ilie MD, and Raverot G. Treatment options for gonadotroph tumors: current state and perspectives. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020; 105(10):e3507-e3518.
8. Sav A. Editorial: Diagnosis and treatment of non-functioning pituitary tumors. *Front. Endocrinol*. 2025; 16:1558988.
9. Hosseinkhan N, et al. A systematic review of molecular alterations in invasive non-functioning pituitary adenoma. *Endocrine*. 2022; 77(3):500-509.
10. You Y, et al. Artificial intelligence in cancer target identification and drug discovery. *Signal Transduct Target Ther*. 2022; 7(1):156.
11. Bailey TL, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37 (suppl\_2): W202-W208.
12. Raman K. Construction and analysis of protein-protein interaction networks. *Autom Exp*. 2010; 2: 1-11.
13. Gavin AC, et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 2002; 415(6868):141-147.
14. Safari-Alighiarloo N, et al. Identification of new key genes for type 1 diabetes through construction and analysis of protein-protein interaction networks based on blood and pancreatic islet transcriptomes: *J Diabetes*. 2017; 9(8):764-777.
15. Michaelis KA, et al. Identification of growth arrest and DNA-damage-inducible gene  $\beta$  (GADD45 $\beta$ ) as a novel tumor suppressor in pituitary gonadotrope tumors. *Endocrinology*. 2011; 152(10):3603-3613.
16. Orchard S, et al. The MIntAct project—IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(D1):D358-D363.
17. Shannon P, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003; 13(11):2498-2504.
18. Csardi, M.G., Package 'igraph'. *Last accessed*. 2013; 3(09):2013.
19. Barabási AL, Gulbahce N, and Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nat Rev Genet*. 2011; 12(1):56-68.
20. Enright AJ, Van Dongen S, and Ouzounis CA. An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(7):1575-1584.
21. Quereda V, and Malumbres M. Cell cycle control of pituitary development and disease. *J Mol Endocrinol*. 2009; 42(2):75-86.
22. Taniguchi-Ponciano K, et al. The kinome, cyclins and cyclin-dependent kinases of pituitary adenomas, a look into the gene expression profile among tumors from different lineages. *BBMC Med Genomics*. 2022; 15(1):52.
23. Formosa R, Borg J, and Vassallo J. Aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a potential tumour suppressor in pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer*. 2017; 24(8):445.
24. Gartel AL, Serfas MS, and Tyner AL, p21—negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996; 213(2):138-149.
25. Koepp DM, Harper JW, and Elledge SJ. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*. 1999; 97(4):431-434.
26. Kao SH, Wu HT, and Wu KJ. Ubiquitination by HUWE1 in tumorigenesis and beyond. *J Biomed Sci*. 2018; 25:1-15.
27. Ezzat S, Cheng S, and Asa SL. Epigenetics of pituitary tumors: Pathogenetic and therapeutic implications. *Mol Cell Endocrinol*. 2018; 469:70-76.
28. Fan Y, et al. Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell*. 2005; 123(7):1199-1212.
29. Wang Q, et al. Histone H1. 2 promotes hepatocarcinogenesis by regulating signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Cancer Sci*. 2022; 113(5):1679-1692.
30. Hao Y, et al. IPO-38 is identified as a novel serum biomarker of gastric cancer based on clinical proteomics technology. *J Proteome Res*. 2008; 7(9):3668-3677.
31. He B, et al. miR-646/TET1 mediated demethylation of IRX1 promoter upregulates HIST2H2BE and promotes the progression of invasive ductal carcinoma. *Genomics*. 2021; 113(3):1469-1481.
32. Kiss Z, Mudryj M, and Ghosh PM. Non-circadian aspects of BHLHE40 cellular function in cancer. *Genes Cancer*. 2020; 11(1-2):1.
33. Zhang J, Zeng Q, and She M. The roles of FHL2 in cancer. *Clin Exp Med*. 2023; 1-12.
34. Ornitz DM. and Itoh N. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015; 4(3):215-266.
35. Abbass SAA, Asa SL, and Ezzat S. Altered expression of fibroblast growth factor receptors in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(4):1160-1166.
36. Zhu X, et al. Epigenetic silencing through DNA and histone methylation of fibroblast growth factor receptor 2 in neoplastic pituitary cells. *Am J Pathol*. 2007; 170(5):1618-1628.
37. Raoof S, et al. Targeting FGFR overcomes EMT-mediated resistance in EGFR mutant non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2019; 38(37):6399-6413.
38. Jang JH. Reciprocal relationship in gene expression between FGFR1 and FGFR3: implication for tumorigenesis. *Oncogene*. 2005; 24(5):945-948.