

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**UTERİN FİBROİDİ OLAN VE OLMAYAN
OLGULARDA HMGA2 (YÜKSEK HAREKETLİ GRUP
A2) GENİNİN EKSPRESYON VE PROTEİN DÜZEYİ
PROFİLLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Merve Nur AKSAKAL

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Müdürlüğü'nün
21L0230018 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Uterin fibroidi olan ve olmayan olgularda HMGA2 (Yüksek Hareketli Grup A2) geninin ekspresyon ve protein düzeyi profillerinin değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Merve Nur Aksakal

Tarih: 22.07.2022

İmza:

KABUL ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Merve Nur Aksakal tarafından hazırlanan ‘‘Uterin Fibroidi Olan ve Olmayan Olgularda HMGA2 (Yüksek Hareketli Grup A2) Geninin Ekspresyon ve Protein Düzeyi Profillerinin Değerlendirilmesi ‘’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20.07.2022

İmza

Prof.Dr. Fulya TEKŞEN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi
Danışman

İmza

Doç. Dr. Hasibe VERDİ
Başkent Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof.Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik beyan	ii
Kabul Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. Uterin Fibroid (Uterin leiomyom, miyom)	1
1.2. Uterin Fibroid İçin Risk Faktörleri	2
1.2.1. Yaş	2
1.2.2. Irk	3
1.2.3. Hormonal faktörler	3
1.2.4. Genetik	4
1.2.5. Kalıtsal Duyarlılık	5
1.2.6. Nokta Mutasyonları	6
1.2.7. Kromotripsis	7
1.2.8. Kromozomal değişikliklerin hedef genleri	7
1.2.9. Epigenetik	8
1.2.10. Yaşam tarzı ve beslenme	9
1.2.11. Endokrin sistemini etkileyen faktörler	10
1.2.12. Obezite	10
1.3. Miyom nasıl oluşur?	10
1.4. Miyom oluşumundaki sinyal yolları	12
1.5. Miyom ve genler arasındaki ilişki	16
1.6. HMGA2 gen ve proteinleri	19
1.7. Fibroid ve HMGA2 geni arasındaki ilişki	22
1.8. HMGB1 gen ve proteinleri	26
1.9. Fibroid ve HMGB1 arasındaki ilişki	28
1.10. HMGA2 ve Wnt/ β -catenin	28
1.11. Fibroid ve Wnt β -catenin yolu	30
2.GEREÇ ve YÖNTEM	34
2.1. RNA İzolasyonu	34
2.2. Agaroz Jel Elektroforezi	35
2.3. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	36
2.4. Western Blot Analizi	38
3.BULGULAR	40
3.1. HMGA2 Gen İfadesi (Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)	41
3.2. HMGB1 Gen İfadesi (Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)	44
3.3. Beta Katenin Gen İfadesi (Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)	46

3.4. Protein İfadesi (Western Blotting)	47
4.TARTIŞMA	52
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	60
ÖZET	63
SUMMARY	64
KAYNAKLAR	65
EKLER	76
Ek-1- Etik Kurul Onay Belgesi	76
ÖZGEÇMİŞ	77



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, Uterin Fibroidi Olan ve Olmayan Olgularda HMGA2 (Yüksek Hareketli Grup A2) Geninin Ekspresyon ve Protein Düzeyi Profillerinin Değerlendirilmesi araştırılmıştır.

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Müdürlüğü'nün 21L0230018 proje numarası ile desteklen çalışmamız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

Tezimde bana yol gösteren, en zor zamanımda bile bilgi ve yardımlarıyla ufkumu açan, beni yönlendiren ve destekleyen, hoşgörüsüyle hiçbir zaman manevi desteğini esirgemeyen, hayatımın her aşamasında minnettar olacağım saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Tezin başlamasında büyük emeği geçen, benden yardımlarını esirgemeyen fakat pandemi nedeniyle beraber çalışmaya devam edemediğimiz değerli ilk danışmanım Prof. Dr. Fulya TEKŞEN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığım teknikleri öğrenmemde büyük emeği geçen, her aşamada bilgisi ve hoşgörüsüyle büyük katkı sağlayan Dr. Tülin ÖZKAN'a teşekkür ederim.

Deneylerimin her aşamasında, yardımlarını benden esirgemeyen Araştırma Görevlisi Nurbanu GÖNÜLKIRMAZ ve Alper Tunga DAĞCAN'a teşekkür ederim.

Dokuların toplamasında büyük emek verip özveri içinde yardımcı olan Prof. Dr. Fulya DÖKMECİ ve Dr. Nur ERSAN'a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans sürecinde içinde bulunduğum ortamda yardımlarından dolayı tüm arkadaşlarım ve tüm Tıbbi Biyoloji Ailesi'ne teşekkür ederim.

İş yerinde, her türlü yardımı ve fedakarlığı sağlayan, değerli çalışma arkadaşım Araştırma Görevlisi Sara ÇIBİK'a teşekkür ederim.

Beni dünyanın en özel evladı ve ablası hissettiren, bir gün olsun kırmadan, sevgiyle ve hissettiğim sonsuz güven duygusu ile, bana her türlü maddi ve manevi desteği sağlayarak bugünlere getiren canım babam, canım annem ve sevgili kardeşlerim Özge ve Oğuzhan'a sonsuz teşekkür ederim.



SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Derece, Santigrat
CT	Eşik Siklus
dH ₂ O	Distile Su
Dk	Dakika
g	Gravite
G	Gram
mM	Mili Molar
Sn	Saniye
ug	Mikro gram
μl	Mikro litre
μM	Mikro molar
EMT	Epitelyal Mezenkimal Transisyon
EtOH	Etil alkol
HPRT	Hipoksantin-Guanin Fosforibosiltransferaz (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase)
MAPK	Mitojenle-Etkinleşen Protein Kinaz (Mitogen-Activated Protein Kinaz)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
HB-EGF	Heparin Bağlayıcı Epidermal Büyüme Faktörü
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
TGF-α	Transforme Edici Büyüme Faktörü-alfa
TGF-β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü-beta
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü

RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
ERK	Hücre dışı Sinyal Düzenleyici Kinaz
PI ₃ K	Fosfatidilinozitol 3-kinaz
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
UL	Uterin leiomyom
HLM	Hidrofik leiomyom



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Uterin fibroid için FIGO (Federation of gynecology and obstetrics) sistemi sınıflandırma	2
Şekil 1.2. Miyometriyal dokunun fibroide dönüşmesinde Östrojen ve Progesteronun rolü	3
Şekil 1.3. Fibroid hücrelerinde en sık görülen moleküler değişiklikler	5
Şekil 1.4. Miyometriyumun fibroide dönüşmesinde etkili faktörler	11
Şekil 1.5. Sinyal yolaklarının biyolojik süreçlerdeki etkisi	14
Şekil 1.6. Uterus fibrozunda mekanotransdüksiyon ve hücre dışı matris (ECM) değişikliklerinde Wnt sinyalinin rolü	15
Şekil 1.7. Uterin fibroidde Wnt ve diğer ana sinyal yolları arasındaki etkileşimin şematik gösterimi	15
Şekil 1.8. Uterin fibroidlerde artan ve azalan genler	19
Şekil 1.9. HMGA2 geninin kromozom üzerindeki lokasyonu	20
Şekil 1.10. HMGA proteinlerinin kromatin mimarisindeki rollerinin şematik gösterimi	20
Şekil 1.11. HMGA genlerinin etkili olduğu biyolojik süreçler	24
Şekil 1.12. HMGA proteinlerinin kromatin kompaktlığını değiştirmesi	26
Şekil 1.13. a) HPRT geni için CT grafiği, b) HMGA2 geni için CT grafiği, c) HMGB1 geni için CT grafiği, d) beta katenin geni için CT grafiği	40

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. qRT-PCR Yapılan Genlerin Primer Dizileri	37
Çizelge 3.1. HMGA2 geninin miyom ve miyometriyum dokularındaki ifade analizi	41
Çizelge 3.2. HMGA2 geninin ifadesinin istatistik analiz sonuç tablosu	43
Çizelge 3.3. HMGB1 geninin miyom ve miyometriyum dokularındaki ifade analizi	44
Çizelge 3.4. HMGB1 geninin ifadesinin istatistik analiz sonuç tablosu	45
Çizelge 3.5. Beta Katenin geninin miyom ve miyometriyum dokularındaki ifade analizi	46
Çizelge 3.6. Protein ifade düzeyinde sağlıklı miyometriyum, hasta miyom ve hasta miyometriyum arasındaki kat artışları	48
Çizelge 3.7. Bir membrandaki hasta miyom, hasta miyometriyum ve sağlıklı miyometriyumdaki HMGA2 ve Beta Aktin protein bantları	49
Çizelge 3.8. Hasta miyom ve miyometriyum dokusundaki 18 ve 12 kDa ağırlığındaki HMGA2 protein bantları	49
Çizelge 3.9. Sağlıklı miyometriyum dokusundaki 18 ve 12 kDa ağırlığındaki HMGA2 protein bantları	49

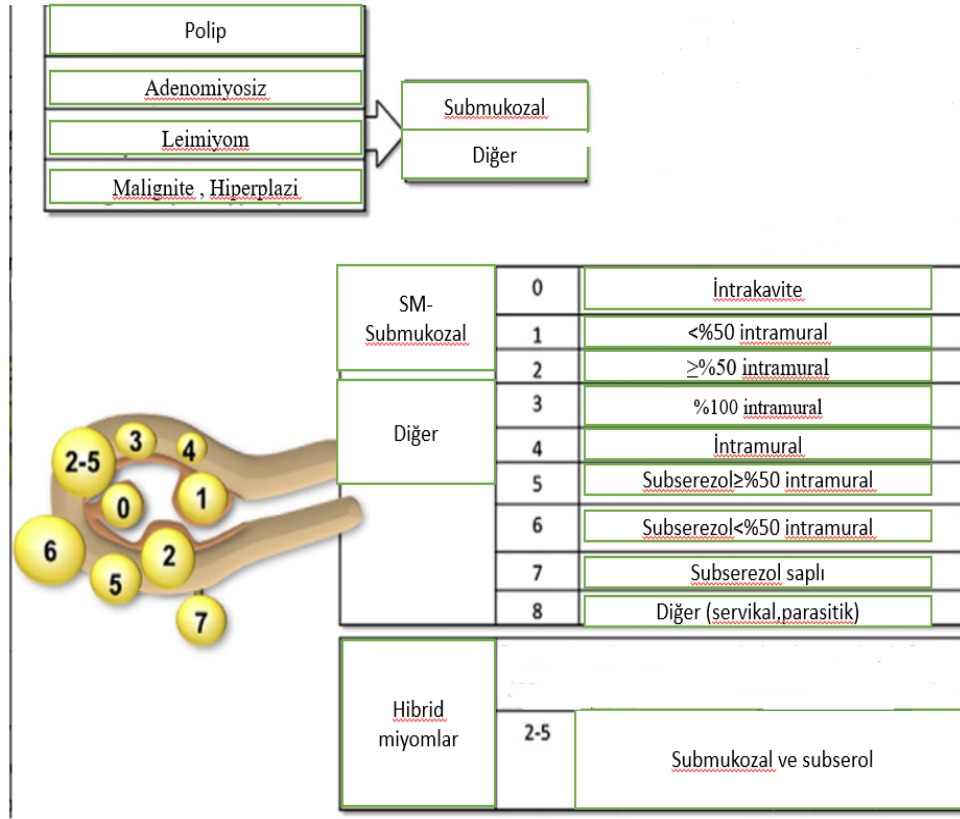
1. GİRİŞ

1.1 Uterin Fibroid (Uterin leiomyom, miyom)

Uterin leiomyomları (UL'ler) veya uterin fibroidleri, uterusun düz kas bölgesi olan miyometriyumun steroid hormona duyarlı, iyi huylu monoklonal tümörleridir (Walker ve ark., 2005).

Kadınların yaklaşık %77'sinin yaşamları boyunca fibroid geliştireceği ve bunların yaklaşık %15- 30'unun ise pelvik ağrı, aşırı kanama, menoraji, anemi, üriner inkontinans gibi semptomlar göstereceği; yine bu kadınlarda tekrarlayan gebelik kaybı, erken doğum ve bazı durumlarda kısırlık gösterdiği bilinmektedir (Catherino ve ark., 2013).

Fibroidler bulundukları yere göre subserozal, intramural, submukozal veya pedünküle olarak sınıflandırılır (Şekil 1).



Şekil 1.1 Uterin fibroid için FIGO (Federation of gynecology and obstetrics) sistemi sınıflandırma (Munro ve ark., 2011).

1.2. Uterin Fibroid İçin Risk Faktörleri

1.2.1. Yaş

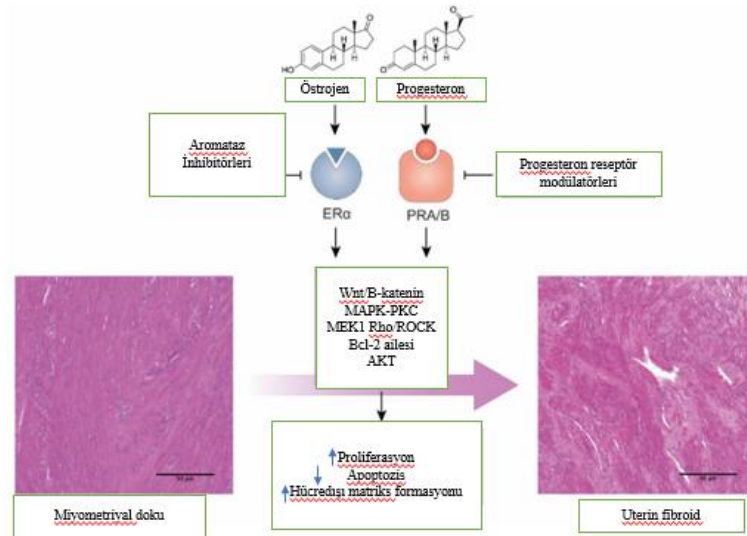
Yaş ile birlikte uterin fibroid görülme olasılığı da artar. Özellikle 50'li yaşlarda bu oran maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Yaş, fibroidlerin gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. Patolojik olarak teşhis edilen fibroidlerin insidansı yaşla birlikte artar ve 50 yaşında zirveye ulaşır. Miyomlar ergenlikten önce ortaya çıkmaz ve menopozla birlikte sıklığı azalır (Marshall ve ark., 1997; Laughlin ve ark., 2009).

1.2.2. Irk

Siyahi kadınlarda; Hispanik, Asya ve Beyaz kadınlara göre 2-3 kat fazla fibroid insidansı bulunurken, Hispanik, Asya ve Beyaz kadınlar arasında fibroid insidansı benzerdir (Marshall ve ark., 1997; Laughlin ve ark., 2009).

1.2.3. Hormonal faktörler

Fibroid gelişimi üzerindeki hormonal etkilerle ilgili kapsamlı klinik kanıtlara rağmen, östrojenlerin ve progesteronun fonksiyonel rolü belirsizliğini korumaktadır (Lethaby ve ark., 2015; Marsh ve ark., 2006; Deng ve ark., 2012; Tristan ve ark., 2012 ve Sangkomkamhang ve ark., 2020).



Şekil 1.2. Miyometrial dokunun fibroide dönüşmesinde Östrojen ve Progesteronun rolü (Machado ve ark., 2021).

Östrojen, östrojen reseptörü-a (ERα) ile birlikte, progesteron reseptörü (PR) ekspresyonunu indükleyerek fibroidleri progesterona duyarlı hale getirir.

Progesteron reseptörü PR, birden fazla geni düzenlemek; proliferasyonu, hayatta kalmayı ve hücre dışı matrisin anormal çoğalımını desteklemek için fibroid düz kas hücrelerinde on binlerce DNA bölgesine bağlanır (Maruo ve ark., 2004; Sabry ve ark., 2012).

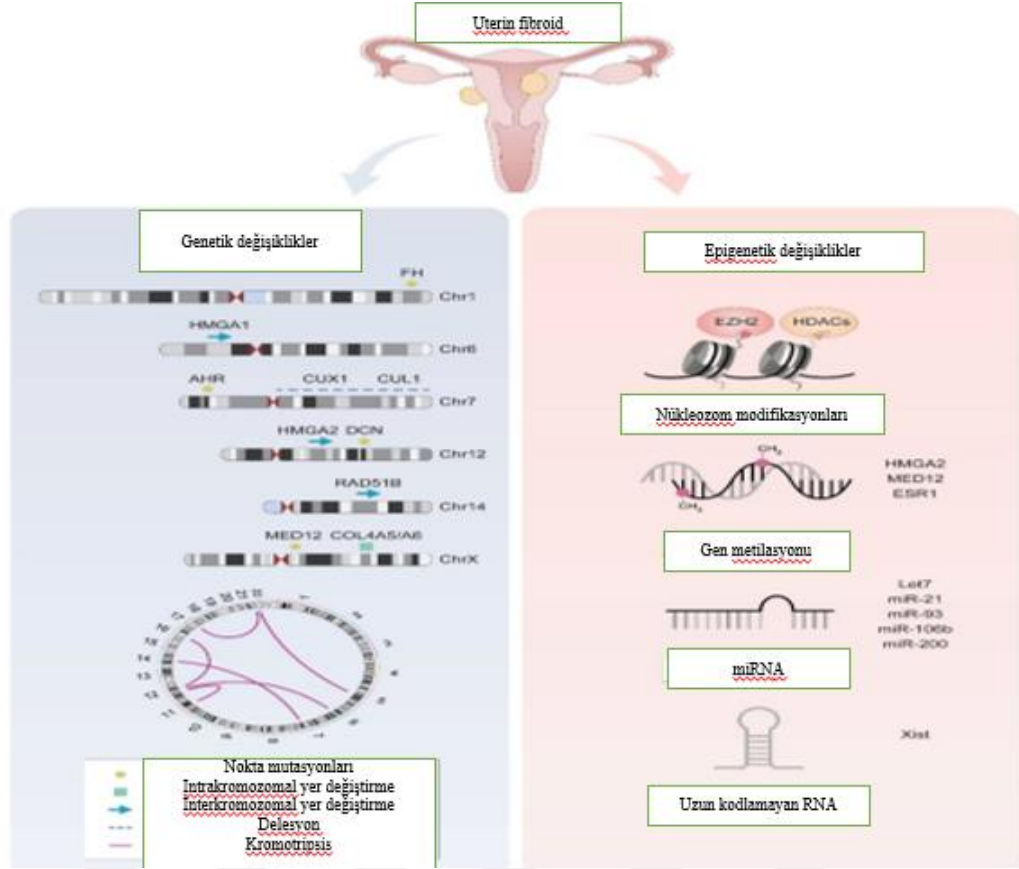
Progesteron ve östrojenler, ilgili reseptörleri ve diğer parakrin sinyalleri arasındaki etkileşim fibroid etyopatogenezinde anahtar rol almaktadır. Progesteron; östrojen reseptörlerini baskılayabilir, ancak östrojen bozulmaları hem östrojen hem de progesteron ile ilişkili genlerin ve yolların işlevini değiştirebilir.

Östrojenin ana formu olan östradiol, MAPK-PKC yolu boyunca PDGF başta olmak üzere spesifik büyüme faktörlerinin üretimini tetikleyebilir ve bu da proliferasyon veya ölümsüzleşmenin artmasına neden olabilir.

Östradiol ayrıca proliferasyonu teşvik etmek için ER α yoluyla Wnt / β -Katenin yolunu aktive edebilir. Böylece; östrojen, progesteron, gibi hormonlar uterin fibroid gelişiminde rol oynar.

1.2.4. Genetik

Çoğu tümör gibi, fibroid de germline değişiklikleri ve somatik mutasyonlar (nokta mutasyonları ve kromozomal anormallikler) dahil olmak üzere kompleks genetik arka planlara sahiptir.



Şekil 1.3. Fibroid hücrelerinde en sık görülen moleküler değişiklikler (Machado-Lopez ve ark., 2021).

1.2.5. Kalıtsal Duyarlılık

Fibroidler sıklıkla kendiliğinden ortaya çıksa da kalıtsallık değerleri %8 ile %70 arasında değişir (Luoto ve ark., 2000; Ge ve ark., 2017 ve Bray ve ark., 2019).

Fibroid gelişimine kalıtsallık atfeden ilk çalışmalardan bazıları, monozigotik ikizler arasında dizigotik ikizler arasında olduğundan daha yüksek uyum düzeyleri gözlemleyen ikiz çalışmalar idi (Luoto ve ark., 2000; Sneider ve ark., 1998).

Herediter dayanaklı çalışmalar da birinci derece akraba kadınlar arasında fibroid insidansının akraba olmayan bireylere göre daha yüksek olduğunu bulmuştur (Vikhlyayeva ve ark., 1995, Sato ve ark., 2002, Voorhis ve ark., 2002).

Ayrıca, fibroidlerin ailesel prevalansı, spesifik semptomatolojisinden daha yüksek sıklık ile anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur.

Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), kadınları fibroide yatkın hale getirebilecek genetik varyantlar aramıştır. Bazı çalışmalar, hastaların ırkına / etnik kökenine bağlı olarak farklı duyarlılık lokusları bulmuştur, bu da Afrika kökenli kadınlarda fibroid riskinin artması gibi popülasyonlar arasındaki insidans oranlarındaki farklılıkları açıklamaktadır (Cha ve ark., 2011; Wise ve ark., 2012; Bondagji ve ark., 2017 ve Eggert ve ark., 2012).

1.2.6. Nokta Mutasyonları

Bireyleri fibroide yatkın hale getirebilecek germline mutasyonlarının yanı sıra, bu tümörler genellikle genlerin ve genomik bölgelerin yaygın olarak araştırılan bir alt kümesini etkileyen birkaç somatik mutasyon biriktirir. Somatik mutasyonlardan etkilenen en alakalı genlerden biri, MED12'dir (Makinen ve ark., 2011; Lee ve ark., 2018; Park ve ark., 2018 ve Aiabnoor ve ark., 2018).

MED12 mutasyonlarının arkasındaki mekanizmalardan biri, değiştirilmiş transkripsiyon regülasyonu nedeniyle birçok genin değişmiş ekspresyon profillerine yol açabilen MED12-CDK8 etkileşiminin bozulmasıdır (Park ve ark., 2018).

1.2.7. Kromotripsis

Crasta ve arkadaşları tarafından gözlemlenen kromozom parçalanması kromotripsis olarak adlandırılır. Kromotripsis, kromozomların bir veya birkaç bölgesinde onlarca ila yüzlerce genomik yeniden düzenlemenin elde edilmeyi tanımlar.

Fibroiddeki kromozomal yeniden düzenlemeler bazen homolog kromozomlardan sadece birinde sınırlı genomik bölgeleri etkileyen birçok kırılma noktasına sahip sayısız delesyon olarak ortaya çıkar. (Stephens ve ark., 2011).

Bu tür karmaşık kromozomal yeniden düzenlemenin arkasındaki nedenler belirsizliğini korumaktadır (Koltsova ve ark., 2019).

Kromotripsis başlangıçta malign süreçlerle ilişkili olmasına rağmen, fibroidde çok sayıda genomik bölgede yeniden düzenlemelerin saptanması, bu tümörün etiopatolojisindeki mekanizmalardan biri olabileceğini düşündürmektedir (Markowski ve ark., 2013).

1.2.8. Kromozomal değişikliklerin hedef genleri

Kromozomal anormallikler fibroiddeki genomun herhangi bir yerinde meydana gelebilirken, spesifik genler sıklıkla bu tür olaylardan etkilenir ve tümörigenezi yönlendirebilecek bozulmuş biyolojik süreçlere yol açar.

Fibroidlerde 12q14-15 bölgesindeki yeniden düzenlemelerin HMGA2 geninin ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Gross ve ark., 2003; Klemke ve ark., 2009).

Transkripsiyon regülasyonunda yer alan bu HMGA2 proteinin artmış ekspresyonu, anjiyogenez, ERa aracılı hücre proliferasyonu ve homolog rekombinasyon, DNA onarımı dahil olmak üzere farklı mekanizmalar yoluyla fibroid gelişimi ile

ilişkilendirilmiştir (Li ve ark., 2020; Schoenmakers ve ark., 1999 ve Mehine ve ark., 2016).

Kromozomun 7q22 bölgesindeki delesyonlar fibroid ile ilişkilendirilirken, etkilenen hedef gen kesin olarak tanımlanmamıştır. Bu delesyonlar LHFPL3, LAMB1 veya HPB1 gibi çeşitli genlerin ekspresyonunu değiştirirken, en çok kabul gören hedef genlerden biri CUX1'dir.

7q delesyonları, CUX1'in hem artmış hem de azalmış ekspresyonuna neden olabilir, bu da RAD51B'ye benzer bir süreçte fibroid gelişimine neden olabilecek bir tümör baskılayıcı veya onkogenik rol aldığı düşünülmektedir (Vanni ve ark., 1999; Vanharanta ve ark., 2007; Saito ve ark., 2005; Ptacek ve ark., 2007; Hodge ve ark., 2009; Zeng ve ark., 1997 ve Moon ve ark., 2002).

Son olarak, Alport sendromu ile ilişkili Kolajen IV genleri COL4A5 ve COL4A6'yı etkileyen X kromozomundaki delesyonlar, fibroidler de dahil olmak üzere düz kas tümörlerinin (diffüz leiomyomatoz) gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Zhou ve ark., 1993; Heidet ve ark., 1995 ve Nozu ve ark., 2017).

1.2.9. Epigenetik

İnsanlarda, gen ekspresyonunu etkileyen epigenetik mekanizmalar, fibroid oluşumunda çok önemli bir rol oynamaktadır (Yang ve ark., 2016; Lagana ve ark., 2017).

Başlıca epigenetik mekanizmalar DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, mikroRNA'lar (miRNA'lar) ve uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) ile düzenlemeyi içerir.

DNA metilasyonu normal gelişim için gereklidir ve bu süreçte, tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu ve / veya onkogenlerin hipometilasyonu ile ilişkili olan FOXO1, TERT ve WNT4 gibi anahtar embriyonik gelişim genlerini etkileyen anormallikler tümöreneze yol açabilir. (Välimäki ve ark., 2018; Martinez ve ark., 2015 ve Miozzo ve ark., 2015).

Spesifik olarak, DNA metilasyonunun değişiklikleri, ESR1 (östrojen reseptörü 1)'in artmış mRNA ekspresyonu ile ilişkilidir. (Asada ve ark., 2008).

Son zamanlarda, HMGA2 ekspresyonunun yukarı regülasyonunun her zaman translokasyona bağlı görünmediği, ancak HMGA2 genindeki hipometilasyon ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. (George ve ark., 2019).

Ek olarak, DNA metilasyonu ve MED12 mutasyonu birlikte, kök hücre proliferasyonunu ve fibroid gelişimini aktive etmede önemli bir rol oynayan progesteron / PR aracılı RANKL gen ekspresyonunu etkileyen karmaşık bir düzenleyici ağ oluşturur (Kol'tsova ve ark., 2017; Liu ve ark., 2017).

Bu bulgularla birlikte, DNA metilasyonunun normal miyometriyal mRNA ekspresyon profilini değiştirerek fibroid patogenezinde anahtar bir rol oynayabileceğini düşünülmektedir.

1.2.10. Yaşam tarzı ve beslenme

Fiziksel aktivite azlığı, stres, sigara, alkol, kafein kullanımı, kırmızı et, D vitamini eksikliği fibroid gelişiminde rol oynar.

1.2.11. Endokrin sistemini etkileyen faktörler

İlaçlarda bulunan zararlı kimyasallar, dioksitler, poliklorinlenmiş bifeniller, organoklorin gibi kimyasallar fibroid formasyonuna yol açar.

1.2.12 Obezite

Obezite, insülin direnci, hiperlipidemi fibroid oluşumunda etkilidir.

1.3 Miyom nasıl oluşur?

Fibroidler tipik fibrotik dokular olarak tanımlanırlar. Hücre dışı matriks (ECM) proteinleri olan; Kolajen 1A1, Fibronektin ve Versikan proteinlerinin fibroidlerde yüksek eksprese olduğu bildirilmektedir. (Gelse ve ark., 2003).

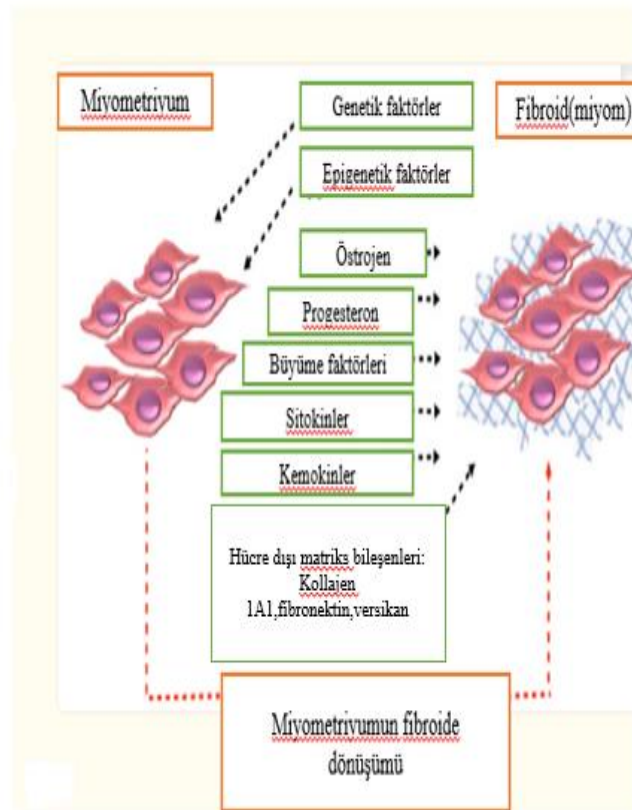
Yine yapılan birçok araştırma, fibroidlerinin normal miyometriyumdan yaklaşık %50 daha fazla hücre dışı matriks (ECM) içerdiğini göstermiştir (Fujita ve ark., 1985; Arici ve ark., 2000; Norian ve ark., 2009; Stewart ve ark., 1994 ve Giuliani ve ark., 2019).

Hücre dışı matriks (ECM)'in, fibroid oluşumu ve gelişiminde rol oynadığı düşünülen moleküller olan büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, anjiyojenik ve enflamatuar yanıt mediatörleri ve proteazlar için bir kaynağı temsil ettiği öne sürülmüştür (Malik ve ark., 2010; Walker ve ark., 2005; Hulboy ve ark., 1997; Ohara ve ark., 2009 ve Protic ve ark., 2016).

Fibroid fizyolojisinde; Epidermal büyüme faktörü (EGF), heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF),

insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), transforme edici büyüme faktörü-alfa (TGF- α), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), asidik fibroblast büyüme faktörü (asidik-FGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bazik-FGF), aktivin ve miyostatin, uterus içindeki östrojenlere ve progesteron etkisine aracılık eden en önemli büyüme faktörleridir (Flake ve ark., 2003; Ciarmela ve ark., 2008; Ciarmela ve ark., 2009; Ciarmela ve ark., 2011 ve Sozen ve ark., 2002).

Buna ek olarak, interlökin IL-1, IL-6, IL-11, IL-13, IL-15, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), granülosit makrofaj-koloni-stimüle edici faktör (GM-CSF) ve eritropoietin (EPO), östrojenler ve progesteron ile etkileşime giren ve fibroid büyümesinde önemli bir rol oynayan sitokinlerdir (Hatthachote ve ark., 1999; Litovkin ve ark., 2007; Kurachi ve ark., 2001 ve Syssoev ve ark., 2008).



Şekil 1.4. Miyometriyumun fibroide dönüşmesinde etkili faktörler (Zannotti ve ark., 2021).

1.4 Miyom oluşumundaki sinyal yolakları

PI3K/AKT-mTOR sinyal yolağı, protein ve insan fibroidinin transkripsiyonel profillemesinden elde edilen kanıtlara ve ayrıca Eker sıçan hayvan modeline dayanarak yapılan araştırmada, fibroidde yukarı regüle sinyal yolaklarından biri olarak tanımlanmıştır (Crabtree ve ark., 2009). Protein düzeyinde, fibroidde PTEN, p-AKT, p-GSK3 ve CD2 proteinleri de dahil olmak üzere PI3K/AKT yolak proteinlerinin ve hedeflerinin normal miyometriyuma kıyasla artmış aktivasyonu, fibroid patogeneğinde PI3K/AKT sinyalizasyonunun aktivasyonunu göstermektedir (Kovács ve ark., 2003; Karra ve ark., 2010).

Ras / Raf / MEK (mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz) / ERK (hücre dışı sinyal-regüle edilmiş kinaz) sinyal yolağı, hücre proliferasyonunun, farklılaşmasının ve hücre sağkalımının düzenlenmesinde rol oynar (Kolch ve ark., 2000). Ras / Raf / MEK / ERK yolu tarafından aktive edilen AP-1 ailesi transkripsiyon faktörlerinin iki üyesi, c-Fos ve c-Jun, sağlıklı miyometriyuma kıyasla fibroidde daha düşük mRNA seviyeleri göstermektedir (Gustavsson ve ark., 2000; Lessl ve ark., 1997). Shc, Grb2 ve ERK ve 15 farklı RTK proteinleri, sağlıklı miyometriyuma kıyasla fibroidde daha yüksek oranda eksprese edilir (Yu ve ark., 2008).

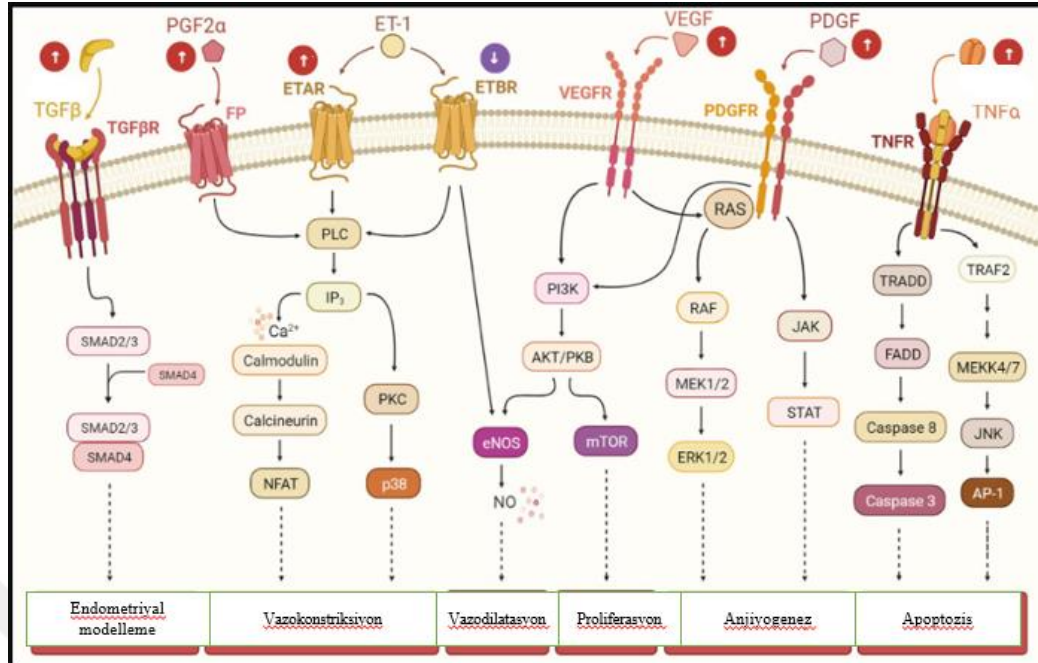
WNT Sinyal Yolağının da fibroid tümör etiyolojisinde sinyal verdiğine dair bazı kanıtlar vardır. Kanonik WNT sinyallemede, β -katenin çekirdekte birikir ve spesifik transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açar (Ono ve ark., 2014). Wnt5b de dahil olmak üzere WNT sinyal genleri, fibroidde aşırı eksprese edilir (Mangioni ve ark., 2005). Ono ve arkadaşlarının çalışmaları WNT ve β -katenin inhibitörlerinin fibroid büyümesini ve proliferasyonunu engelleyebileceğini göstermiştir, bu da kanonik WNT sinyallemede fibroidde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Son olarak, Tanwar ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar, yapısal olarak aktif β -kateninin fare uterusunda fibroid benzeri tümörleri yönlendirdiğini ve bu tümörlerde

TGF- β ve mTOR sinyallemesinin aktivasyonuna katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Tanwar ve ark., 2009).

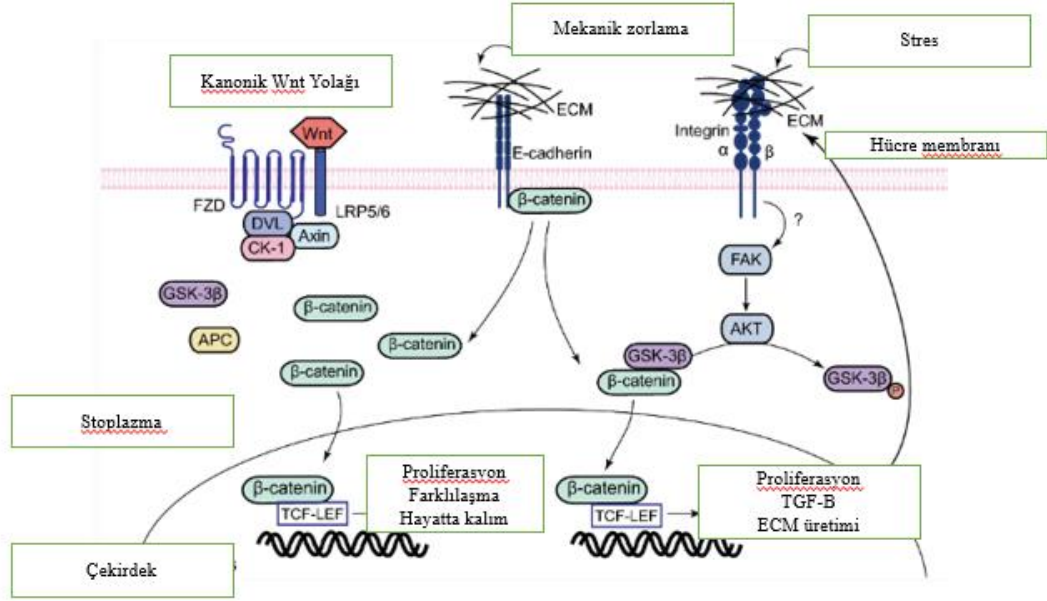
Fibroid hücre proliferasyonu ve tümör büyümesinde çeşitli büyüme faktörlerinin rol oynadığı görülmektedir. Fibroidde aşırı eksprese edilen başlıca büyüme faktörleri, Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β), epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve insülin büyüme faktörü (IGF)'dir (Parker ve ark., 2007). TGF- β sinyalizasyonunun aktivasyonu, düz kas hücresi proliferasyonu ve hücre dışı matriks (ECM) birikimi yoluyla fibroid etiyojisine önemli bir katkıda bulunmuştur (Borahay ve ark., 2015; Ciarmela ve ark., 2011). TGF- β üç ayrı izoformu (TGF- β 1, 2 ve 3) miyometriyumda mevcuttur. TGF- β 1 ve 2, normal miyometriyum ve fibroid dokusu arasında benzer seviyelerde eksprese edilirken, TGF- β 3 UL'de oldukça fazla eksprese edilir (Ciarmela ve ark., 2011). TGF- β 3 ekspresyon seviyeleri, adet döngüsünün her aşamasında dalgalanır, salgı fazında zirveye ulaşır, bu dalgalanmada progesteron ve östrojen hormonlarının etkisi olduğu düşünülmektedir (Ciarmela ve ark., 2011).

Fibroid dokusunun mRNA ve protein analizi, fibroid hasta örneklerinin yaklaşık üçte birinin, MAPK sinyalini aktive ederek mitogenezi uyardığı gösterilen İnsülin Büyüme Faktörü (IGF-1) seviyelerinin arttığını göstermektedir (Parker ve ark., 2007; Borahay ve ark., 2015).

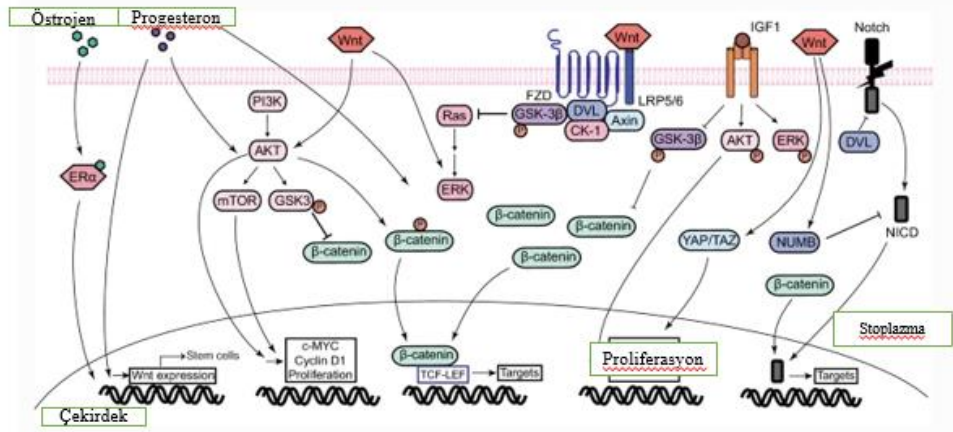


Şekil 1.5. Sinyal yollarının biyolojik süreçlerdeki etkisi (Navarro ve ark., 2021).

Uterus fibroidlerinin varlığı, adet döngüsünde yer alan endometriyal yollara müdahale edebilir ve ağır adet kanamasına neden olabilir. Hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer faktörler arasındaki denge, siklik endometriyal büyümeyi ve kanamayı düzenler. Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β), reseptörleri (TGF- β R) ve aşağı yönlü SMAD'leri, adetler sırasında endometriyal yeniden şekillenme için önemlidir ve bu faktörlerin aşırı seviyeleri, fibrinolitik ve antikoagülan bileşenlerin gen ekspresyonlarını baskılayabilir. Prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) ve endotelin-1 (ET-1), menstrüasyon döneminde spiral arter vazokonstriksiyonu ve miyometriyal daralmada rol oynar. En spesifik endotel hücre büyüme faktörü olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), endometriyal yenilenmenin önemli bir süreci olan endometriyal anjiyogenezde rol oynamaktadır. Nitrik oksit (NO), ET-1 ve VEGF sinyalizasyonunun çıkış yönünde üretilir ve güçlü bir vazodilatördür.



Şekil 1.6. Uterus fibrozunda mekanotransdüksiyon ve hücre dışı matris (ECM) değişikliklerinde Wnt sinyalinin rolü (Sabeh ve ark., 2021).



Şekil 1.7. Uterin fibroidde Wnt ve diğer ana sinyal yolları arasındaki etkileşimin şematik gösterimi (Sabeh ve ark., 2021).

Yukarıda Wnt/ β -katenin sinyalleşmesinde birkaç sinyal yolu gösterilmiştir. Östrojen ve progesteron, kök hücreler üzerinde pro-proliferatif bir etki uygulayan olgun miyometriyal hücrelerde Wnt ekspresyonunu indükler. Wnt, progesteron ve IGF'nin, Ser552'de β -katenin'i fosforile eden Akt'yi aktive ettiği, onu aktive ettiği ve

hedef genlerinin ekspresyonunu indüklemesine izin verdiği gösterilmiştir. Akt aktivasyonu ayrıca c-MYC ve siklin D1 dahil olmak üzere -katenin yolu gibi Wnt/ β 'nin aşağı akış sinyalleme hedeflerinin ifadesini de artırır.

1.5. Miyom ve genler arasındaki ilişki

Fibroidin ana genetik etmenleri MED12, HMGA2, FH ve COL4A5- COL4A6 genlerini içerir (Mehine ve ark., 2014).

MED12 geni, anahtar transkripsiyon enzimi olan RNA polimerazın aktivitesinin düzenlenmesinde yer alan aracı kompleksin proteinlerinden birini kodlar. MED12 geninin somatik mutasyonları, LM'li hastaların %70-75'inde saptanır (Makinen ve ark., 2011, Osinovskaya ve ark., 2016).

Fumaratehidrataz geni (FH), trikarboksilik asit döngüsündeki bir enzimi kodlar ve kalıtsal leiomyomatozis gelişimi ile ilişkilidir. FH, klasik bir tümör baskılayıcı gendir. FH genindeki mutasyonlar, bialelik inaktivasyonu durumunda tümör LM gelişimini uyarır; LM'ye sahip hastalarda bu genin mutasyon oranı, bialelik FH kaybı olan %10,5'tir (Lehtonen ve ark., 2004; Mehine ve ark., 2016).

COL4A5-COL4A6 genleri, X kromozomunun uzun kolunda haritalanır. Kollajen genlerinin spesifik delesyonlarının varlığı, yaygın leiomyomatozis ile ilişkilidir. (Mehine ve ark., 2016). COL4A5 ve COL4A6 genlerindeki delesyonlarını IRS4 geninin etkilediği varsayılmaktadır (Mehine ve ark., 2016).

Gelişim aşamasına, lokalizasyonuna ve tümörün tipine bağlı olarak, ana büyüme faktörlerinin (EGF, HB-EGF, VEGF, bFGF, PDGF, TGF- β ve ADM) gen ekspresyonu önemli ölçüde değişir (Tal ve ark., 2014). Epidermal büyüme faktörü (EGF), heparin

bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF), asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF), dönüştürücü büyüme faktörleri- α ve - β (TGF- α ve TGF- β), ana fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve reseptörleri de LM'nin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. FGF- β , VEGF ve TGF- β proteinlerinin izoformları, düşük konsantrasyonlarda bile, LM hücrelerinin proliferasyonunu önemli ölçüde güçlendirir.

LM hacminin düzenlenmesinde önemli bir rol, dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β 3) tarafından gerçekleştirilir.

Normal miyometriyum ve LM dokularında, anjiyogenez genlerinin ekspresyonu önemli ölçüde farklılık gösterir. Böylece, TGFB1 geni için LM dokularında normal miyometriyum ile karşılaştırıldığında artan ekspresyon gözlemlenir (Tal ve ark., 2014).

Tümör nekroz faktörü (TNF- α), interlökinler (IL-1 ve IL-6) ve ayrıca kemokinler ve bunların reseptörleri (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, eotaksin, eotaksin-2, IL) dahil olmak üzere birçok sitokin -8, CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1 ve CXCR2), LM'nin gelişmesinde rol alır (Ciavattini ve ark., 2013).

LM'nin büyümesinde önemli bir faktör, daha önce de belirtildiği gibi, hücre dışı matristir. Hücre dışı matrisin büyümesini belirleyen daha önce bahsedilen faktörlere ek olarak, D vitamini gelişiminde önemli bir rol oynar (Feofilova ve ark., 2017). LM hücreleri tarafından ECM'nin ana bileşenleri (kollajenler, fibronektin ve proteoglikanlar) normal miyometriyum hücrelerinden çok daha aktif olarak üretilir (Malik ve ark., 2010). ECM oluşumunda özellikle önemli bir rol, profibrotik aktiviteye sahip büyüme faktörü-dönüştürücü büyüme faktörü β tarafından oynanır. TGF- β 3 alt ünitesinin TGFB3 geni (sinyal aracı TGF- β), LM hücrelerinde aşırı eksprese edilir (Norian ve ark., 2009).

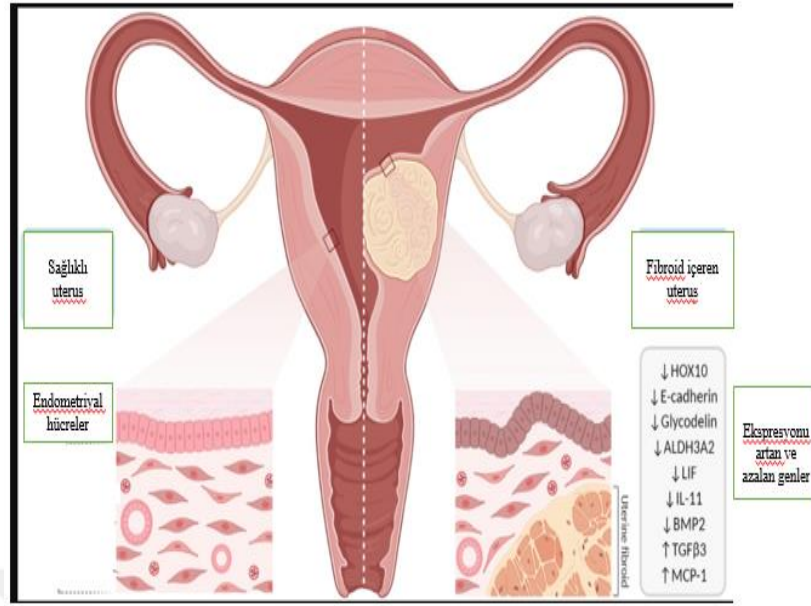
Let-7 ailesi gibi mikroRNA'lar, fonksiyonel gen aktivitesine katıldığı bilinen önemli küçük moleküllerdir (Peng ve ark., 2008). HMGA2'nin ayrıca Let-7 ailesi tarafından hedeflenen genlerden biri olduğu tahmin edilmektedir ve leiomyoma hücrelerinde Let-7b'nin aşırı ekspresyonu, HMGA2 ekspresyonunun baskılanmasıyla sonuçlanmıştır (Wang ve ark., 2007).

HMGA2, Let-7 mikroRNA'larının ana hedeflerinden biridir, bu nedenle Let-7: HMGA2 düzenleyici mekanizmasının düzensizliğinin leiomyom büyümesini destekleyen anahtar genetik olaylardan biri olabileceği tahmin edilmektedir.

14q23-24'e eşlenen rekombinasyon ailesinin bir üyesi olan RAD51B1, HMGA2 için translokasyon ortağı olarak güçlü bir adaydır.

İnsan PCPE geni (PCOLCE), uterus leiomyomatasında (Xing ve ark., 1997) kromozomun 7q22' de meydana gelen değişiklikler ile bağdaştırılmıştır (Tahakara ve ark., 1994).

PCPE geni, hücre büyümesi ve farklılaşmasının kontrolünde rol oynamıştır ve PCOLCE'nin 7q22'deki kromozomal konumu, onu kromozomal yeniden düzenlemelerin leiomyomata ile ilişkili olduğunu gösterir (Xing ve ark., 1997).

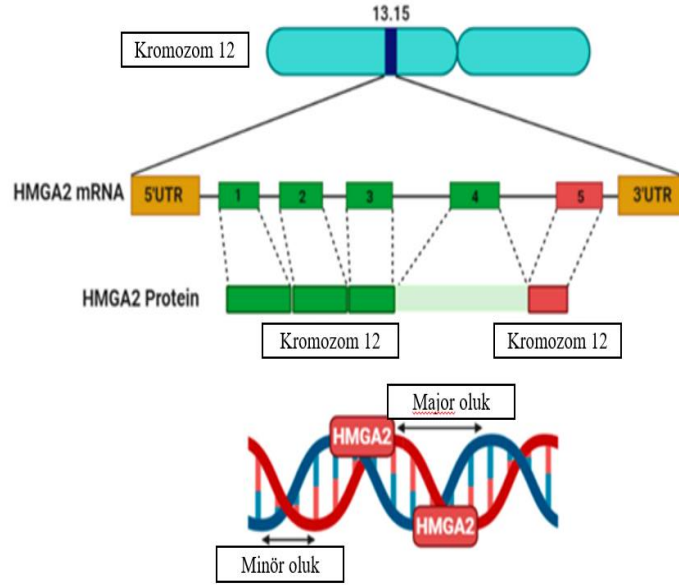


Şekil 1.8. Uterin fibroidlerde artan ve azalan genler (Navarro ve ark., 2021).

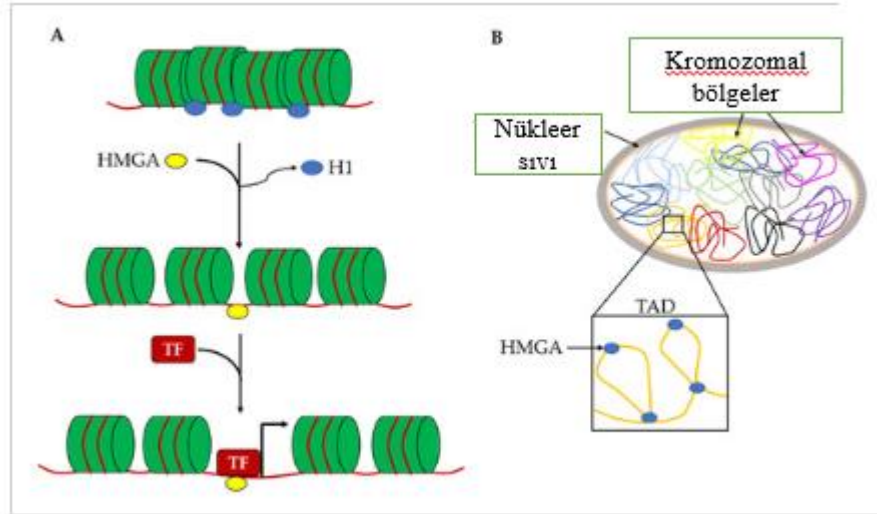
1.6. HMGA2 gen ve proteinleri

Yüksek Hareketlilik Grubu proteinleri; (HMG) histon olmayan proteinlerdir. HMG proteinleri ailesinin üyeleri daha önce sırasıyla HMGI/Y, HMG1-2 ve HMG14/17 olarak adlandırılırken, günümüzde HMGA, HMGB ve HMGN olarak adlandırılıp üç grupta toplanmaktadır (Bustin ve ark., 2001). Bu proteinler; nükleozom ve kromatin yapısının modüle edilmesinde, transkripsiyon, replikasyon ve DNA onarımı gibi önemli nükleer aktivitelere diğer proteinlerin etkin katılımının düzenlenmesinde rol oynayan yardımcı “mimari faktörlerdir”.

“Yüksek Hareketlilik Grubu” terimi, jel elektroforetik ayırmalar sırasında diğer kromatin proteinlerine göre olağandışı çözünürlük özellikleri, küçük boyutları ve hızlı hareketlilikleri nedeniyle HMG proteinleri için kullanılmıştır.



Şekil 1.9. HMGA2 geninin kromozom üzerindeki lokasyonu. (Mansoori ve ark., 2021).



Şekil 1.10. HMGA proteinlerinin kromatin mimarisindeki rollerinin şematik gösterimi. (Parisi ve ark., 2020)

HMGA2 geni, insan kromozomu 12q13-15'te bulunan 140 kb'den fazla genomik alana dağılmış beş ekzon içerir. İlk üç ekzon, AT-bağlanma alanı bölgesini kodlarken, ekson 4 bir protein bağlayıcısını kodlar ve ekson 5, transkripsiyonu aktive etmeyen asidik alanı kodlar.

HMGA2 proteini, DNA'nın minör oluğundaki AT açısından zengin bölgelere bağlanır ve daha sonra DNA'da konformasyonel değişiklikleri indükleyerek transkripsiyonu düzenler.

Lokalizasyonlarına ve nükleer işlevlerine ek olarak, bu proteinler ayrıca mitokondri içine girebilir mitokondriyal DNA'ya bağlanabilir.

HMGA proteinlerinin AT kancası dediğimiz bölgenin aminoasit sekansı içeren BBXRGGRPBB (B = K veya R residue, X = G veya P residue) bölge bu proteinlerin DNA 'ya bağlanmasını sağlar.

HMGA proteinleri aynı zamanda aktivitelerini düzenlemeye yardımcı olan asidik bir kuyruğa (HMGA1 ve HMGA2 arasında farklı sırayla) sahiptir.

AT kancaları ve asidik kuyruğun yanı sıra, iki protein herhangi bir özel üç boyutlu alan veya herhangi bir düzenli yapı göstermez. Bu iki protein; düzensiz proteinler olarak kabul edilirler ve genellikle bunların "serbest yapısal proteinler" olduğu varsayılır. Bu da proteinlerin DNA'yı bağlamasına, konformasyonel durumunu değiştirmesine ve diğer birkaç proteinle etkileşime girmesine izin verir.

Bu "serbest yapısal proteinlerin" çoğu, HMGA1 ve HMGA2'nin güçlendirici (enhancer) adı verilen düzenleyici kompleksler halinde birleşmeyi tercih eder.

HMGA proteinleri, birçok transkripsiyon faktörü ile etkileşime girme yetenekleri nedeniyle, farklı nükleer işlevler için bir tür "moleküler yapıştırıcı" olarak görülmüş, gen düzenlenmesi ve hücre biyolojisi süreçlerinin birçok yönüyle ilişkilendirilmiştir.

Çeşitli biyolojik olaylarda, makromoleküller kompleksleri değiştirir veya bu kompleksleri birleştirir.

Bunu yaparak, bu proteinler DNA'ya direkt olarak bağlanır. DNA'nın konformasyonunu değiştirir. Böylece, Transkripsiyon Faktörlerinin (TF), DNA'ya bağlanmasını kolaylaştırır.

Sonuç olarak, HMGA proteinleri, hem DNA'ya hem de transkripsiyon faktörlerine bağlanarak multiprotein kompleksini oluşturur.

1.7. Fibroid ve HMGA2 geni arasındaki ilişki

HMGA2 geni, Siklin genleri ile ilişkilendirilmiştir. Siklin D, Siklin E, Siklin A ve Siklin B2 genleri hücre döngüsünde rol alır. Aynı zamanda hücre proliferasyonunda da rol alan bu genler, S fazından meydana gelen proliferasyondan sorumludur. Ayrıca HMGA2 kanser hücresi proliferasyonunu desteklemektedir. Kanserde son zamanlarda yapılan çalışmalar, HMGA2 proteininin, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve anjiyogenez gibi karakteristik tümörijenizasyon süreçlerinde önemli rol oynayabileceğini ve endotel hücrelerinde, endotel progenitör hücrelerinde anjiyogenezi düzenlemek için HMGA2'nin gerekli olduğunu göstermiştir. HMGA2'nin oral skuamöz hücreli karsinomda aşırı eksprese edildiği ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)-A, VEGF-C ve fibroblast büyüme faktörü-2 gibi anjiyojenik genlerin bu tümörde arttığı ve yüksek damarlanma oranı rapor edilmiştir (Sakata ve ark., 2019).

UL'lerde anjiyogenezin düzenlenmesi üzerindeki HMGA2 rolü, olağan tip leiomyoma ile karşılaştırıldığında hidrofik leiomyom (HLM) olarak bilinen alışılmadık bir leiomyom tipinde tanımlanmıştır (Griffin ve ark., 2019). Bu çalışma, HMGA2'nin HLM'lerin %76'sında aşırı eksprese edildiğini ve olağan tip leiomyoma kıyasla bu tümörlerde artmış bir vasküler yoğunluk bildirilmiştir. Vaskülarizasyonun tümör hacminde önemli bir rol oynadığı düşünüldüğünde, bu tümörlerde HMGA2 aşırı ekspresyonu ile birlikte daha yüksek damar yoğunluğu, UL'de aşırı eksprese edilen HMGA2 ile gözlenen büyük hacmi açıklayabilir. Bu bulgular, HMGA2 aşırı ekspresyonunun, anjiyogenezi teşvik ederek ve sonuç olarak vaskülariteyi artırarak,

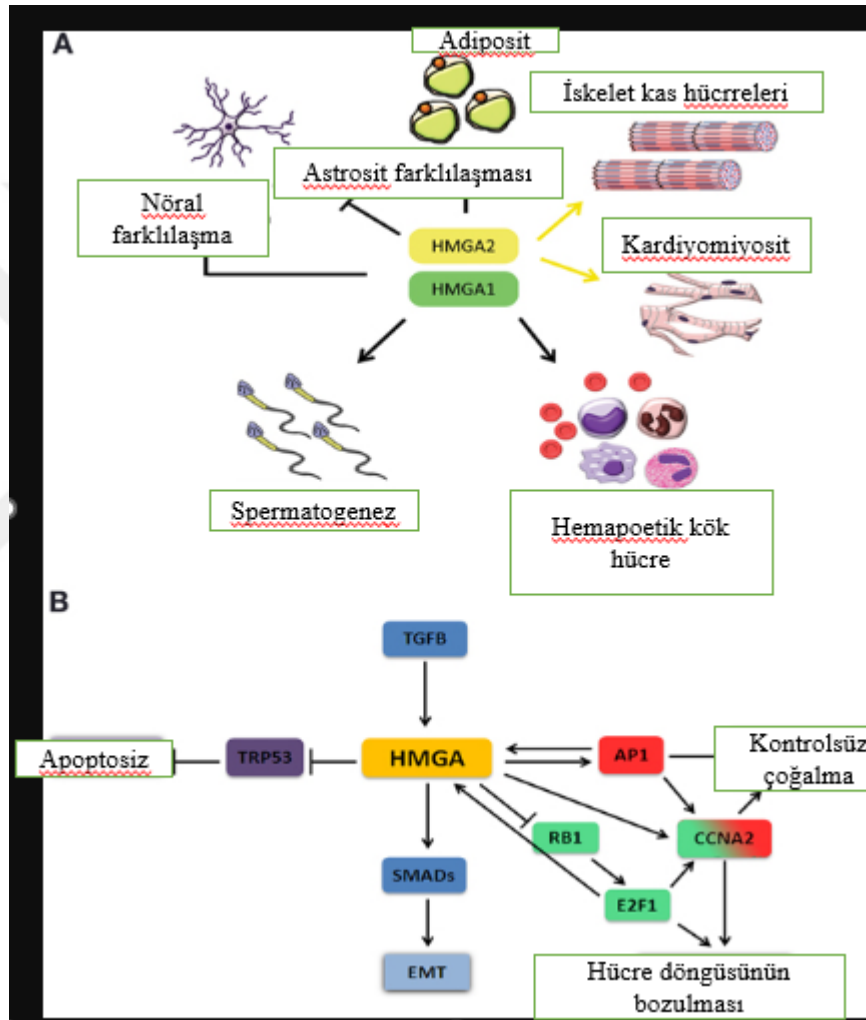
tümörlerin büyük boyutlarda büyümesine izin vererek HLM'nin tümörijenезinde rol oynadığını göstermektedir (Griffin ve ark., 2019).

UL'de anjiyogenezin desteklenmesinde HMGA2'nin rolü konusunda histolojik araştırmada HMGA2-UL'nin bitişik miyometriyum ile karşılaştırıldığında artmış vaskülarizasyon yoğunluğu gösterdiğini ve HMGA2-UL'deki bu damar yoğunluğunun MED12-UL'den önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Li ve ark., 2020). Ek olarak, miyometriyumlar MED12-UL karşılaştırıldığında anjiyojenik faktör IGF2, β -fibroblast büyüme faktörü (β -FGF), tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), VEGF-A, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 1 ve 2'nin (VEGFR1-VEGFR2) önemli yüksek ifadelenmesi HMGA2-UL'de gözlenmiş ve bu anjiyojenik faktörler özellikle HMGA2 yüksek ifadelenmesi ile pozitif korelasyon göstermiştir. Bu bulgular, HMGA2 geninin, proanjiyogenik faktörlerin yukarı regülasyonunu ve ayrıca antianjiyogenik faktörlerin aşağı regülasyonunu uyardığı belirlenmiştir (Li ve ark.,2020). Bu araştırmada ayrıca, leiomyom ve miyometriyal hücrelerde HMGA2 aşırı ekspresyonunun, endotel hücrelerinde hücre hareketliliğini ve göçünü artıran, anjiyogeneز ve vaskülogenezi artıran belirli faktörlerin salgılanmasını düzenlediğı de gösterilmiştir. HMGA2 güdümlü UL'de anjiyogeneze aracılık eden faktörlerden biri, HMGA2 aşırı eksprese edildiğinde leiomyom ve miyometriyal hücrelerde ekspresyonu artan ve susturulduğunda endotel hücrelerinin zayıflatılmış bir göçü gözlenen IGF2BP2 olabileceğı de önerilmiştir. (Li ve ark., 2020). Son olarak, in vivo analiz, HMGA2 geninin aşırı eksprese edildiğı miyometriyal hücrelerin, HMGA2 aşırı ekspresyonu olmayan miyometriyal hücrelerden gelen greftlere göre daha büyük hacimli, daha yüksek proliferasyona ve daha fazla damar yapısına sahip greftlere yol açtığını gösterdi ve HMGA2'nin anjiyogeneز uterus düz kas hücrelerinin ve sonuç olarak tümör boyutunda düzenleme ve aktivasyonda önemli bir rol oynadığını göstermiştir.

Bununla birlikte, HMGA2'nin UL'de anjiyogenezi teşvik ettiğı moleküler mekanizmalar ve bunların UL gelişimi ve büyümesine etkisinin daha fazla araştırılması gerektiğı belirtilmiştir (Ferro ve ark., 2020).

HMGA2; Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT) oluşumunda kritik öneme sahiptir. HMGA2 mezenkimal protein ekspresyonunu doğrudan veya dolaylı olarak indükler.

Fibroidde de normal miyometriyuma göre %50 daha fazla Epitelyal Mezenkimal Geçişin var olduğu bilindiği için, HMGA2 geninin fibroidde etkili olacağı düşünülmektedir (Ozturk ve ark., 2014).



Şekil 1.11. HMGA genlerinin etkili olduğu biyolojik süreçler (Ozturk ve ark., 2014)

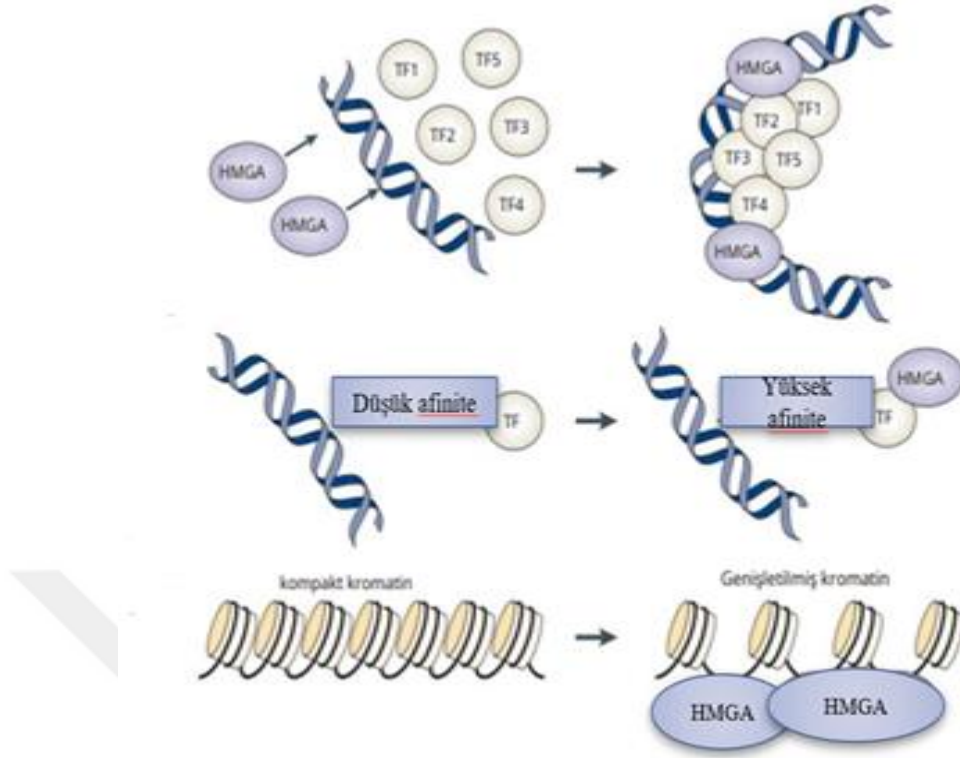
E2F1, hücre döngüsünde rol alan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. E2F1'in HMGA2 tarafından aktivasyonunda, HMGA2 pRB' ya bağlanır. HMGA2 ve pRB arasındaki etkileşim sonucu histon deasetilaz1 (HDAC1) kompleksten uzaklaştırılır. HDAC1'in uzaklaştırılması sonucu, histon asetilaz (pCAF/p300) onun yerine geçer. Histon asetilaz, E2F1' e bağlanarak aktif hale getirir. Böylece, birbirine bağlı halde

bulunan HMGA2 ve pRB da kompleksten ayrılır. HMGA2, pRB'yi kendine bağladığı için hücrenin S fazına girmesi engellenemez. E2F1 de salınım (release) formda olduğu için, hücre proliferasyonu devam eder.

HMGA proteinlerinin Aktivatör protein 1 (AP1) kompleksi üzerindeki etkisi ise şöyle açıklanır. Aktivatör protein 1 (AP1), sitokinler, büyüme faktörleri, stres ve bakteriyel ve viral enfeksiyonlar dahil olmak üzere çeşitli uyaranlara yanıt olarak gen ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür.

AP1 kompleksi: JUN, JUNB, JUND, FOS, FOSB, FRA1, FRA2 proteinlerini içerir. Bu kompleks, aynı DNA dizisine bağlanır, çeşitli hetero ve homodimer yapısının ortaya çıkmasına yol açar. Yine bu kompleks, hücre proliferasyonu, tümör genez ve metastazda yer alan çeşitli hedef genlerin aktivasyonundan sorumludur. HMGA2, AP1 transkripsiyon faktörüne bağlanır. HMGA2, bu transkripsiyon faktörüne bağlanarak normal hücreleri transforme hücrelere çevirir. Bu dönüşüm de hücre proliferasyonu ve tümör genezi etkiler.

HMGA proteinleri transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek, DNA'ya bağlanır. Bu kompleks afiniteyi artırır. Kompakt olan kromatin yapısı, açılır.



Şekil 1.12. HMGA proteinlerinin kromatin kompaktlığını değiştirmesi (Fusco ve ark., 2007)

1.8. HMGB1 geni ve proteinleri

İnsan HMGB1 proteini, iki homolog DNA bağlama alanı (A-box, 1-79 aa; B-box, 89-162 aa) oluşturan 215 amino asit (aa) kalıntısına (MW: 25-30 kDa) sahiptir.

Histonlar gibi HMGB1 de en önemli kromatin proteinleri arasındadır. Çekirdekte HMGB1, nükleozomlar, transkripsiyon faktörleri ve histonlarla etkileşime girer (Bianchi ve ark., 2005). Bu nükleer protein, DNA'yı organize eder ve transkripsiyonu düzenler (Klune ve ark., 2008). Bağlandıktan sonra, HMGB1, diğer proteinlerin bağlanmasını kolaylaştıran DNA'yı bükerek (Murugesapillai ve ark., 2017). HMGB1, birçok transkripsiyon faktörü ile etkileşim halinde birçok genin transkripsiyonunu destekler. Ayrıca paketlenmiş DNA'yı gevşetmek ve kromatini yeniden modellemek

için nükleozomlarla etkileşime girer. Çekirdek histonlarla temas, nükleozomların yapısını değiştirir. Çekirdekte HMGB1'in varlığı, çeviri sonrası değişikliklere bağlıdır. Protein asetillenmediğinde çekirdekte kalır, ancak lizin üzerindeki hiperasetilasyon, sitozole yer değiştirmesine neden olur (Klune ve ark., 2008).

İmmünojenik PCD tarafından salınan bir DAMP molekülü türü olarak, yüksek mobiliteli grup kutusu 1 (HMGB1), ilk olarak 1973'te tanımlanan kromatin ile ilişkili bir proteindir (Goodwin ve ark., 1973). Kromatine sıkı bir şekilde bağlandığı için ancak zar yapısı bozulmuş hücrelerden salgılanabilmektedir (Scaffidi ve ark., 2002). Hücre dışı ortama salgılandıktan sonra, HMGB1, çeşitli hücrel reseptörlerle etkileşime girebilir ve hem doğal hem de adaptif bağışıklık tepkilerini düzenleyerek bağışıklık etkinleştiricilerle kompleksler oluşturabilir (Kang ve ark., 2013). Örneğin, gelişmiş glikasyon son ürünleri (RAGE) ve Toll benzeri reseptör (TLR)'lerine bağlanma yoluyla HMGB1, kaspaz 1 kesimlenmesini aktive edebilir ve makrofaj piroptozunu indükleyebilir (Xu ve ark., 2014). HMGB1, epigenetik kromatin remodülasyonu yoluyla fare makrofajlarında inflamatuvar gen ekspresyonlarını düzenleyen NF- κ B için de bir koaktivatördür (Ma ve ark., 2017). IL1p'ye benzer şekilde, HMGB1 ayrıca dendritik hücre (DC) olgunlaşmasında, tümör antijen sunumunda rol oynar (Gao ve ark., 2019). HMGB1 sinyali doğrudan T ve B lenfositlerini tetikleyebilir.

Araştırmalar ayrıca HMGB1'in kompleman proteini ile birlikte anti-inflamatuvar makrofaj M2'ye monosit farklılaşmasını indükleyebileceğini ve böylece bağışıklık homeostazını düzenleyebileceğini göstermiştir (Son ve ark., 2016). Ayrıca, HMGB1 ve bunun tümör hücreleri üzerindeki RAGE reseptörü ile etkileşimi tümör hücresi otofajisini doğrudan düzenleyebilir ve HMGB1 aracılı tümörigenez ile sonuçlanabilir (Khambu ve ark., 2020). Ayrıca, HGMB1 blokajı tümör büyümesini inhibe edip kontrol noktası immünoterapisi ile sinerjik olarak çalışabilir (Hubert ve ark., 2021).

1.9. Fibroid ve HMGB1 arasındaki ilişki

Zhang ve ark., yaptığı çalışmada, Ginsenosid'in kanserin önlenmesi ve tedavisinde önemli bir rol oynayan doğal bir fitokimyasal olduğu bildirilmiştir. Yine çok sayıda araştırma, ginsenosidlerin apoptozu hızlandırabileceğini, proliferasyonu, metastazı ve anjiyogenezi engelleyebileceğini ve çeşitli kanser hücrelerinde bağışıklığı artırabileceğini göstermiştir. Ginsenosid Rb1 ile tedavi edilen uterin fibroid hücrelerinin hücre canlılığını saptamak için MTT yöntemi kullanılmış ve Ginsenosid Rb1'in uterin fibroid hücre proliferasyonunu engellediği saptanmıştır.

Yukarıda bahsedilen çalışmada, rahim fibroid hücrelerinin proliferasyon ve apoptoz yeteneklerini tespit etmek için gen müdahalesi (HMGB1'i susturma ve HMGB1'i aşırı ifade etme) yapılmıştır. HMGB1'in susturulması sonucunda, proliferasyonun azaldığı ve uterus fibroid hücrelerinde apoptozunun olduğu görülmüştür. HMGB1'in aşırı ekspresyonu ise, ginsenosid Rb1 inhibisyonunu ortaya çıkarmış, bunun sonucunda uterus fibroid hücrelerinin proliferasyonun arttığı bildirilmiştir.

Özetle, miyomda ginsenosid Rb1, HMGB1'in ifadesinin susturulması ile ilişkilidir. Bu ilişki sonucu, uterin fibroid hücrelerinin proliferasyonu inhibe edebilir ve apoptoza teşvik edebilir. Bu bilgiler ışığında ise uterin fibroidlerin klinik tedavisi için bir temel sağlayabilir (Zhang ve ark., 2019).

1.10. HMGA2 ve Wnt/ β -katenin

Hem fizyolojik ortamlarda hem de kanserde HMGA2 ve Wnt sinyali arasında karmaşık bir etkileşim vardır. HMGA2, Wnt sinyalinin aşağı regülasyonu yoluyla insan normal akciğer fibroblast WI-38 hücrelerinde yaşlanmayı tetikler (Shi ve ark.

2017). Malignitelerde, HMGA2, Wnt/ β -katenin yolunun aktivasyonu yoluyla mide kanserlerinde epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) uyardığı bilinmektedir (Zha ve ark. 2013). HMGA2 baskılanmasının Wnt1 transgenik farelerde meme tümörü gelişimini bozduğu rapor edilmiştir (Morishita ve ark. 2013). Ayrıca WNT10B/ β -katenin yolunun üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde HMGA2 ekspresyonunu kontrol ettiği bildirilmiştir (Wend ve ark. 2013). Kanser ilerlemesini uyarmak için HMGA2 ve Wnt arasında karşılıklı olarak teşvik edici bir ilişki bulunmaktadır.

HMGA2'nin EMT'yi ortaya çıkarabildiğini ve Wnt/ β -katenin yolu ile yakından ilişkili olan birkaç geni, Wnt/ β -katenin yolunu aktive ederek, promotörlerine doğrudan bağlanarak ve böylece düzenleyebildiğini göstermiştir. HMGA2 aşırı ekspresyonunun sadece in vitro ve in vivo gastrik epitel kökenli hücrelerin onkojenik özelliklerini geliştirmekle kalmayıp aynı zamanda EMT'yi de desteklediği bulunmuştur. Mide kanseri hücrelerinde HMGA2'nin *ChIP-on-chip* analizinde HMGA2'nin Wnt/ β -katenin yolunu aktive ederek TWIST1 ve AXIN1 üzerinden EMT'yi uyurabileceği bulunmuştur. HMGA2, AXIN1'in ekspresyonunu baskılayabilir ve promotörlerine bağlanarak TWIST1'in ekspresyonunu artırabilir. HMGA2'nin aşırı ekspresyonunun Wnt/ β -katenin yolunu aktive edip etmediğini belirlemek için farklı hücre tiplerinde β -katenin ekspresyonu incelenmiştir. HMGA2'nin, AXIN1'in transkripsiyonunu baskılayarak β -katenin'i yıkımdan koruduğunu ve böylece β -katenin'in çekirdeğe girmesini ve Wnt/ β -katenin yolunu aktive ettiği belirlenmiştir (Zha ve ark., 2013).

Wnt/ β -katenin sinyal yolu, kolorektal adenomun karsinogenezinde kilit bir rol oynar. Ek olarak, çoğalma, farklılaşma, transformasyon ve metastaz gibi çeşitli biyolojik süreçlerde yer alan yüksek mobilite grubu AT-hook 2 (HMGA2) proteini, komşu normal dokulara kıyasla kolorektal kanser dokularında önemli ölçüde yüksek seviyelerde eksprese edilir. HMGA2 ekspresyonunun pozitiflik oranının, tümör ilerlemesi sırasında kademeli olarak arttığı belirlenmiştir. HMGA2 ekspresyonu, Wnt/ β -katenin sinyal protein ekspresyonu Wnt, β -katenin, sikline bağımlı kinaz 4 (CDK4) ve siklin D1] ile pozitif korelasyonu belirlenmiştir. HCT 116 insan kolorektal

kanser hücre hattında HMGA2 yıkımı, β -katenin ekspresyonunu ve bunun aşağı akış hedefleri olan CDK4 ve siklin D1'i baskılamıştır. Ayrıca, Wnt veya β -katenin'in susturulması HMGA2 ifadesini azaltmıştır. Birlikte ele alındığında, bu çalışmanın sonuçları, sporadik kolorektal tübüler adenomun karsinogenezinde HMGA2 ve Wnt/ β -katenin sinyal yolunun koordineli düzenlenmesini önermektedir (Li ve ark., 2021).

Wnt10b/ β -katenin sinyali, fare meme hücre dizilerinde HMGA2 ekspresyonunu ve meme tümörü hücre dizilerinde proliferasyonu doğrudan düzenler. WNT10B'nin kanonik β -katenin sinyalini aktive ettiği ve HMGA2'nin TNBC'de doğrudan Wnt kanonik sinyal yolunun bileşenleri tarafından proliferasyonuna ve yukarı regülasyonuna yol açtığı bildirilmiştir. WNT10B'nin kanonik β -katenin sinyalini aktive ettiği ve HMGA2'nin yukarı regülasyonuna yol açtığı belirlenmiştir (Li ve ark., 2021).

Sitoplazmik β -katenin proteini, sinyal iletiminde rol oynar ve hem hücre-hücre yapışma proteini E-cadherin hem de tümör baskılayıcı gen ürünü APC ile ilişkilidir. β -katenin insanlarda CTNNB1 geni tarafından kodlanan bir proteindir.

1.11. Fibroid ve Wnt/ β -katenin yolu

Uterin leiomyomu, kadın üreme sisteminin en yaygın tümörüdür ve tek bir transforme miyometriyal düz kas hücresinden kaynaklanır. Muazzam tıbbi, psikososyal ve finansal etkiye rağmen, leiomyom patobiyolojisinin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Sinyal yollarındaki değişikliklerin leiomyom biyolojisinde etkili olduğu düşünülmektedir. Wnt/ β -katenin yolu, leiomyomların oluşumunun çeşitli yönlerinde yer alıyor gibi görünmektedir. Örneğin, Wnt5b leiomyomda aşırı eksprese edilir ve Wnt/ β -katenin yolu, leiomyomda en

yaygın mutasyonlar olan MED12 mutasyonlarının tümörjenezdeki rolüne aracılık ediyor gibi görünmektedir. Ayrıca, Wnt/ β -katenin yolu, olgun miyometriyal veya leiomyoma hücrelerinin östrojen/progesteron tedavisinin, leiomyoma kök hücrelerinin proliferasyonunu ve tümör büyümesini indükleyen Wnt11 ve Wnt16 ekspresyonunun artmasına yol açtığı parakrin bir rol oynar. β -katenin'in yapıcı aktivasyonu, hayvan modellerinde miyometriyal hiperplaziye ve leiomyoma benzer lezyonlara yol açar. Wnt/ β -katenin sinyali aynı zamanda mekanik transdüksiyon ve hücre dışı matris düzenlemesi ve leiomyomdaki ilgili değişiklikler ile yakından ilgilidir ve Wnt/ β -katenin sinyallemesi ile östrojen, progesteron, TGF β gibi leiomyom gelişimini ve büyümesini düzenlediği bilinen diğer PI3K/Akt/mTOR, Ras/Raf/MEK/ERK, IGF, Hippo ve Notch sinyal yollar arasında ilişki bildirilmektedir. Son olarak, kanıtlar, β -katenin inhibitörleri kullanılarak kanonik Wnt yolunun inhibisyonunun leiomyoma hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir. Etkili tedavi için leiomyom gelişiminin moleküler mekanizmalarını anlamak esastır. Bu derlemede tartışılan spesifik Wnt/ β -katenin yolu molekülleri, terapötik hedefleme için zorlayıcı adaylar oluşturmaktadır (Sabeh ve ark., 2021). Wnt sinyali, çeşitli hücresel süreçlere aracılık eden karmaşık ve çok düzenleyici yollardan biridir. Leiomyom hücrelerinde upregüle olduğu ve leiomyomatogeneze yer aldığı bildirilmiştir.

UL'nin monoklonal tümörler olduğu varsayılır, bu da her tümörün tek bir yetişkin miyometriyal kök hücreden kaynaklandığı anlamına gelir (Lobel ve ark.2006, Linder ve ark., 1965). UL'de Wnt/ β -katenin yolunun katılımı son yıllarda giderek daha fazla tanımlanmıştır (Ono ve ark., 2013; Ko ve ark., 2018; Hendy ve ark., 2017 ve Bulun ve ark., 2013). Bununla birlikte, UL'de β -katenin ekspresyonu, farklı çalışmalar arasında değişiklik göstermektedir. UL'de miyometriyum ile karşılaştırıldığında β -katenin aşırı ekspresyonu, insan primer UL hücreleri (Zaitseve ve ark., 2013 ve Ono ve ark., 2014) kullanılarak gösterilmiştir, ancak bir rapor insan UL dokusunu miyometriyum dokusuyla karşılaştırırken kayda değer bir fark göstermemiştir (Tai ve ark., 2003). Birkaç Wnt ligandı UL'de aşırı eksprese edilir ve sonuç olarak UL oluşumunu ve büyümesini teşvik etmek için Wnt/ β -katenin yolunu uyarmaktadır. Örneğin, insan primer UL'sinde Wnt4 ve Wnt5A'nın aşırı eksprese edildiği ve Wnt11 ve Wnt16'nın

leiomyoma kök hücrelerinde aşırı eksprese edildiği bulunmuştur (Markovski ve ark., 2012; Mangioni ve ark., 2005 ve Ono ve ark., 2013). APC, DKK1 ve DKK3 gibi diğer Wnt inhibitörleri insan UL dokusunda normal komşu miyometriyuma göre yukarı regüle edilmiştir (Ko ve ark., 2018). İlaveten, komşu miyometriyuma kıyasla UL dokusunda sFRP1 mRNA ve proteinde bir artış gözlenirken, leiomyosarkom hücre hattında sFRP1'in inhibisyonu apoptozun indüklenmesiyle sonuçlanmıştır (Fukuhara ve ark., 2002) bu da UL'de Wnt yolunun daha fazla araştırmayı gerektiren ikili bir rolü oldu şeklinde yorumlanmıştır.

UL gelişiminde Wnt/ β -katenin yolağının etkisi embriyolojik çalışmalarla da desteklenmektedir. Farelerin embriyonik gelişimi sırasında aktif β -katenin'in aşırı ekspresyonu, histolojik olarak UL'ye benzeyen tümörlere dönüşen miyometriyal hiperplazi ile sonuçlanmıştır (Tanwar ve ark., 2009).

Fibroid alanındaki birçok çalışma, anormal WNT sinyalinin uterus fibroidlerinin gelişiminde rol oynadığı hipotezini desteklemektedir (Bulun ve ark., 2013). Gerçekten de, fare uterin mezenkiminde β -katenin'in aşırı aktivasyonunun, insan uterin leiomyomlarına benzer mezenkimal tümörlerinin gelişmesine yol açtığı gösterilmiştir (Tanwar ve ark.,2009).

Hücre dışı matriks (ECM), uterus fibroidlerinin önemli bir bileşenidir ve ECM proteinlerinin aşırı birikimi, fibroidlerin büyümesinden sorumludur (Stewart ve ark., 2016). Dokuların mekanik özelliklerindeki değişikliklerin organ sistemlerinin gelişiminde, kök hücre fonksiyonlarında ve hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Du ve ark., yaptığı çalışmada, WNT sinyallemede integrin-FAK yolunun aktivasyonu yoluyla artan ECM sertliği ile birlikte β -katenin seviyelerinde bir artış olduğunu gösteren kanıtlar elde edilmiştir (Du ve ark., 2016).

Uterin leiomyomlar çok sert tümörlerdir ve hiperaktif integrin-FAK sinyaline sahip oldukları bilinmektedir. Yi ve ark., hücreleri bilinen sertlikteki hidrojeller üzerinde kültürleyerek ECM sertliğinin fibroid hücreler üzerindeki etkisini inceleyip β -katenin ekspresyonunun sertlikteki artışla birlikte arttığını bulmuşlardır. Bu sonuçlar, miyomların mekanik özelliklerindeki değişikliklerin β -katenin gibi biyokimyasal sinyallerin ifadesinde nasıl değişikliklere yol açtığına dair yeni bir anlayış sağlamaktadır (Yi ve ark., 2017).

Bu tez projesinin amacı, HMGA2 ve HMGB1 ile beta katenin genlerinin birlikte uterin fibroidlerinde ifadenmesinin belirlenmesidir. Projemizde HMGA2 ve beta katenin ifadenmesinin UL gelişimine katkıda bulunması beklenirken, HMGB1 ifadenmesinde azalmanın UL gelişmesini destekleyebileceği hipotezi kurulmuştur.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmamızda; Ankara Üniversitesi Cebeci Hastanesine başvuran 31 hasta ve 20 kontrol grubu olmak üzere, 51 kadına ait, 82 doku örneği kullanılmıştır. Bahsedilen 82 dokunun; 31'i hasta grubunun miyom dokusu, 31'i hasta grubunun miyometrium dokusu ve 20 tanesi de kontrol grubunun miyometrium dokusudur.

Kontrol grubu kadınlarından normal, fibroid içermeyen, miyom dışı nedenlerle yapılan histerektomi sonucunda miyometrium dokusundan örnek alınmıştır.

Hasta grubu kadınlardan ise çeşitli semptomlar nedeniyle (aşırı kanama, pelvik ağrı vs.) yapılan histerektomi sonucunda fibroid (miyom) ve miyometrium dokusundan örnek alınmıştır.

2.1. RNA İzolasyonu

Fibroid (miyom) ve miyometrium dokusundaki genlerin ifadelerini kantitatif eş zamanlı PCR (qRT-PCR) ile belirlemek amacıyla tüm dokulardan RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sırasında aşağıdaki yöntem uygulanmıştır.

- Fibroid (miyom), miyometrium dokusuna (1gr dokuya 1 ml Trizol) Trizol eklenmiş ve doku homojenizatör ile homojenize edilmiştir.

- Her tüpe 200 µl kloroform eklenmiştir. Tüpler elle 10 sn boyunca alt üst yapılmıştır. Alt üst yapıldıktan sonra oda ısısında 10 dk inkübe edilmiştir. 10 dk inkübasyondan sonra, tüpler 4°C'de 12,000 x g.'de, 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası kırmızı fenol-kloroform fazı (alttaki faz), DNA (ara faz) ve RNA (renksiz-akıcı

üst faz) olmak üzere 3 faz oluşmuştur. Üst fazda yer alan RNA yeni bir tüpe aktarılmıştır.

- Üzerine 500 µl izopropil alkol eklendikten sonra tüpler oda ısısında 10 dk inkübe edilip 4°C’de 12,000 x g.de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra pellete 1 ml %75’lik etanol eklenerek RNA pelleti yıkanmıştır. En son aşamada örnekler 7,500 x g de 5 dk 4°C’de santrifüjlenmiştir.

- RNA pelleti oda sıcaklığında bekletilerek kurutulmuş, sonrasında RNA, DNAaz RNAaz içermeyen su içinde çözülmüştür. Elde edilen RNA’ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Daha sonra %1’lik Agaroz Jel’de yürütülerek RNA’ların kalitesi görüntülenmiştir.

2.2 Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen RNA örnekleri %1’lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. %1’lik agaroz jelin hazırlanışı:

- 100 ml 1X TBE tampon bir beher içerisine alınarak üzerine 1 gr toz agaroz tartılıp eklenmiştir.

- Beher mikrodalga fırında 300°C’de yaklaşık 2 dk ısıtılarak agarozun erimesi ve su içerisinde çözünmesi sağlanmıştır.

- Beher kabin içerisine alınarak dış yüzeyinin musluk altına tutularak el yakmayacak kıvama gelene kadar bir miktar soğuması sağlanmıştır.

- Behere 2 µl Bio-safety boya eklenerek karıştırılmış ve jel tankında donmaya bırakılmıştır.

- Donan jel, içerisinde 1X TBE tamponu bulunan elektroforez tankına aktarılmıştır.

- Nükleaz içermeyen sudan 8 ul, RNA örneklerinden 2 µl, DNA yükleme tamponundan 2 µl karıştırılarak jeldeki kuyucuklara 10 µl yüklenmiştir.

- Örnekler 80 voltta 25 dk yürütülmüş ve daha sonra jel görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

2.3. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)

- qRT-PCR yöntemi kullanılarak HMGA2, HMGB1, Beta-katenin ve HPRT genlerinin ifadesi kantitatif olarak analiz edilmiştir. İlk olarak dokulardan izole edilen RNA örneklerinden 1000 ng kullanılarak iScript enzimi (BioRAD) ile cDNA sentezlenmiştir.

- cDNA sentezi bittikten sonra 20 µl olan hacim 80 µl nükleaz içermeyen su eklenerek total hacim 100 µl' ye tamamlanmıştır.

- qRT-PCR uygulamalarında kullanılacak olan fibroid (miyom) dokusunda bakılacak olan HMGA2 ve HPRT genlerine özgü primerler GC içerikleri (%GC), erime sıcaklıkları (T_m) ve dimer oluşturup oluşturmadıkları (dG) dikkate alınarak PerlPrimer programında tasarlanmıştır.

Primerlerin Tm derecesi Gradient PCR ile tayin edilmiş olup 60°C olarak belirlenmiştir. İlgili genlerin mRNA'ları SYBR Green floresans boyası ve BioRad qPCR cihazı kullanılarak kantitasyonu yapılmıştır. Primer dimerizasyonu ise erime sıcaklığına bakılarak kontrol edilmiştir. İlgili genlerin ifade seviyeleri hipoksantin guanin fosforiboziltransferaz (HPRT)'e normalize edilmiştir.

Araştırmamızda internal kontrol olarak Aktin ve GAPDH primerleri kullanılmıştır fakat bu primerlerin bizim dokularımızda geç sıklusa girdiklerini gözlemledik. Bunun sonucunda daha sağlıklı sonuçlar almak için daha erken sıklusa giren HPRT primeri internal kontrol olarak kullanılmıştır.

HMGA2 Forward
AGACCCAAAGGCAGCA
HMGA2 Reverse
TCCTCTTCGGCAGACTC
HMGB1 Forward
ATGGGCAAAGGAGATCCCTA
HMGB1 Reverse
ATTCTATCATCTCTTCT
Beta-Katenin Forward
ATTACAACCTCTCCACAACCT
Beta-Katenin Reverse
CAGACAGATAGCACCTTCAG
HPRT Forward
TGACACTGGCAAAACAATGCA
HPRT Reverse
GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

Çizelge 2.1 qRT-PCR Yapılan Genlerin Primer Dizileri

2.4 Western Blot Analizi

HMGA2 protein tayini için western blot analizi yapılmıştır. Fibroid (miyom), miyometriyum dokusundan, Bradford metoduna göre protein tayini yapılmıştır.

- Bu dokuların %12'lik SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile moleköl büyüklüklerine göre ayrılmaları sağlanmıştır. Bu amaçla, eşit miktarda protein içeren örnekler 4X Laemni yükleme tamponu 1X'e karşılık gelecek şekilde karıştırılmış ve 95°C'de 5 dakika denatüre edilmiştir. Eşit miktarda protein (20 µg) içeren dokular, %12'lik SDS-PAGE'e yüklenerek 90 V'da yaklaşık 2 saat jelde yürütülmüştür.

- PVDF membrana transfer edilerek blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir. PVDF membran BIORAD marka kullanılmıştır. BIORAD transfer cihazında hızlı protokol kullanarak 3 dk 25 V'da transfer yapılmıştır.

- Transfer gerçekleştikten sonra, membran bloklama işlemi %5 yağsız süt tozunun TBS'deki çözeltisi kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat düşük hızda sallanması ile gerçekleştirilmiştir.

- Bloklama işlemi gerçekleştikten sonra, membran 3 kere 10 dakika aralıklarla TBS-Tween çözeltisi ile yıkanmıştır

- Primer antikor (Cell Signaling, Rabbit-HMGA2 antibody ve Cell Signaling, Rabbit- Beta-actin antibody) ile inkübasyon aşamasında, HMGA2 primer antikor, PBS içerisinde 1:1000 seyreltilmiş ve membran ile +4°C'de bir gece düşük hızda sallanarak

inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membran üç kez PBS tween çözeltisi ile, 10'ar dakika orta hızda sallanarak yıkanmıştır.

- Daha sonra membran, 1:1000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor (Cell Signaling HRP Konjuge Sekonder Antibody) ile 1 saat orta hızda sallanarak, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

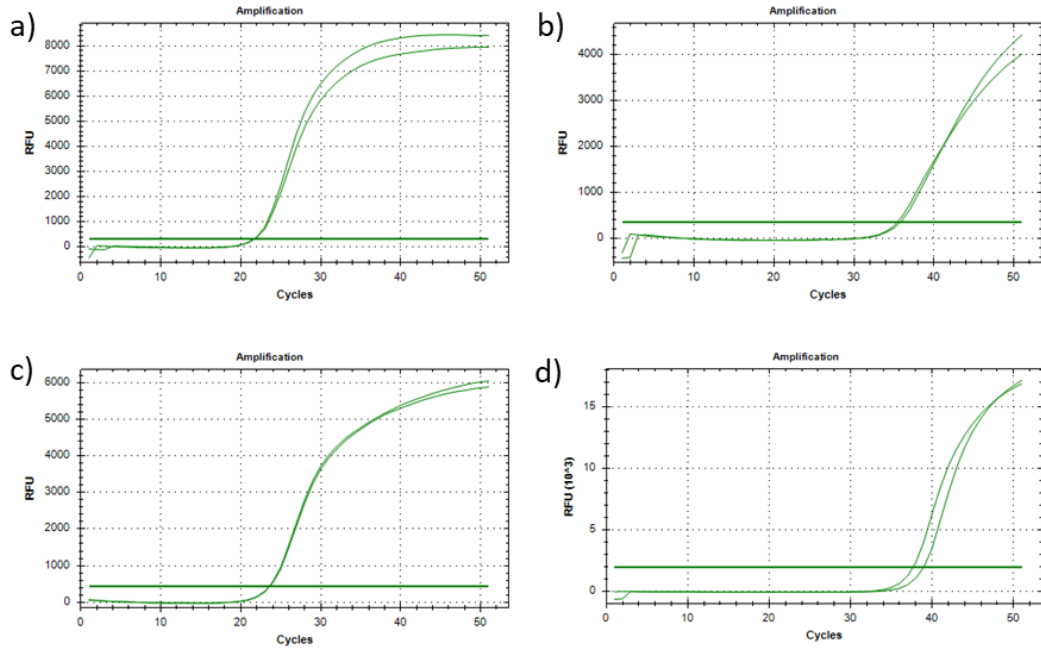
- Bu inkübasyondan sonra membran 3 kere 10'ar dk aralıklarla TBS-Tween ile yıkanmıştır.

- Yıkanan membran BIORAD Clarity ajanı kullanılarak (1:1) BIORAD görüntülenme cihazı ile görüntülenmiş ve ImageJ programı ile analiz gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

HMGA2, HMGB1 ve beta katenin gen ifadesinin analizi toplam 82 doku üzerinde yapılmıştır. Bu 82 dokunun 31'i hasta grubunun miyom dokusu, 31'i hasta grubunun miyometrium dokusu ve 20 tanesi de kontrol grubunun miyometriyum dokusudur.

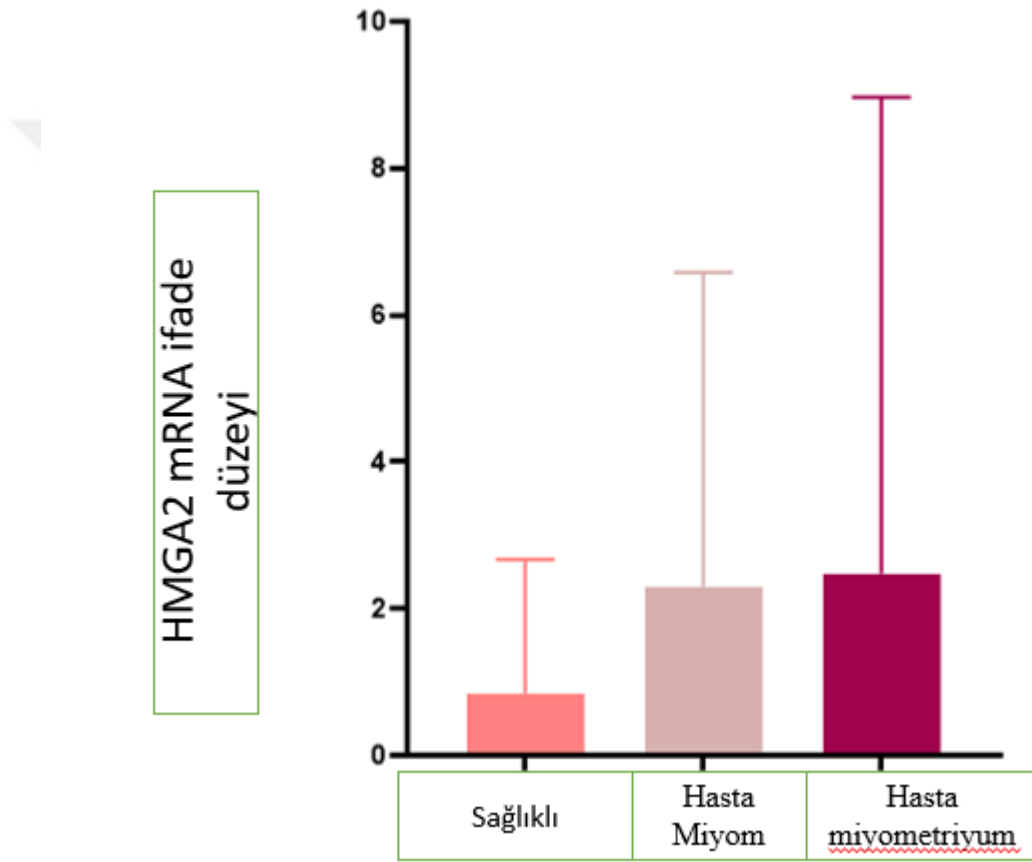
Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) için CT grafikleri



Şekil 1.13 a) HPRT geni için CT grafiği, b) HMGA2 geni için CT grafiği, c) HMGB1 geni için CT grafiği, d) beta katenin geni için CT grafiği

Yukarıdaki grafiklerde HPRT, HMGB1, HMGA2 ve Beta Katenin genleri için CT grafikleri gösterilmiştir. Bu grafiklerde de görüldüğü üzere HPRT (internal kontrol) ve HMGB1 geni siklusa erken girerken, HMGA2 ve Beta Katenin geni siklusa geç girmiştir.

3.1. HMGA2 Gen İfadesi (Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)



Çizelge 3.1. HMGA2 geninin sağlıklı miyometriyum, hasta miyom ve hasta miyometriyum dokularındaki mRNA ifade analizi

Araştırmamızda, sağlıklı 20 miyometriyum dokusundan 17 tanesinde HPRT ifadesi gözlemledik. İnternal kontrolün çalıştığı 17 dokudan yalnızca 7 tane sağlıklı miyometriyumda HMGA2 ifadesine rastlanırken 10 dokuda HMGA2 geni ifadesi gözlenmemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda sağlıklı 20 miyometriyum dokusunda HMGA2 geninin ifade edilmesi yüzdesi %35 olarak görülmüştür.

Hasta miyometriyumu için; 24 hasta miyometriyumu üzerinde çalışılmıştır. Bu 24 hasta miyometriyumunun 8 tanesinin HPRT (internal kontrol)'si çalışmamıştır. İnternal kontrolü çalışan 16 hasta miyometriyumundan ise 6 tanesinin HMGA2 gen ifadesine rastlanmamıştır. Bu sonuçlar doğtultusunda internal kontrolü çalışan 16 hasta miyometriyum dokusunda HMGA2 geninin ifade edilmesi yüzdesi %62,5 olarak görölmüştür.

Araştırmamızda, 19 hasta miyom dokusu üzerinde çalışılmıştır. Bu 19 hasta miyomunun, 19 unun internal kontrolü çalışırken, çalışan 19 miyom dokusunun 9 tanesinde HMGA2 geni ifadesine rastlanmamıştır. Bu sonuçlar doğtultusunda internal kontrolü çalışan 19 hasta miyom dokusunda HMGA2 geninin ifade edilmesi yüzdesi %52,63 olarak görölmüştür.

Hasta miyom ve miyometriyum dokularında sağlıklı miyometriyum dokusuna göre HMGA2 gen ifadesinin kat artışları hesaplanmıştır. Hasta miyom ve miyometriyumunda sağlıklı miyometriyumuna göre bir artış tespit edilmiş olup, istatistiksel anlam yakalanamamıştır.

HMGA2 geninin mRNA ifadelenmesi sağlıklı miyometriyum dokularında ortalama 0,84 iken (std±1,82); hasta miyom dokusunda ortalama 2,30 (std±4,28); ve hasta miyometriyum dokusunda ortalama 2,47 (std±6,49) olarak tespit edilmiştir.

HMGA2 geninin hasta miyom ve miyometriyum dokusunda mRNA ifadesinde sağlıklı miyometriyum dokusuna göre önemli bir artış saptanmasına rağmen bu fark “ki kare testi” sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (p=0,593).

Report

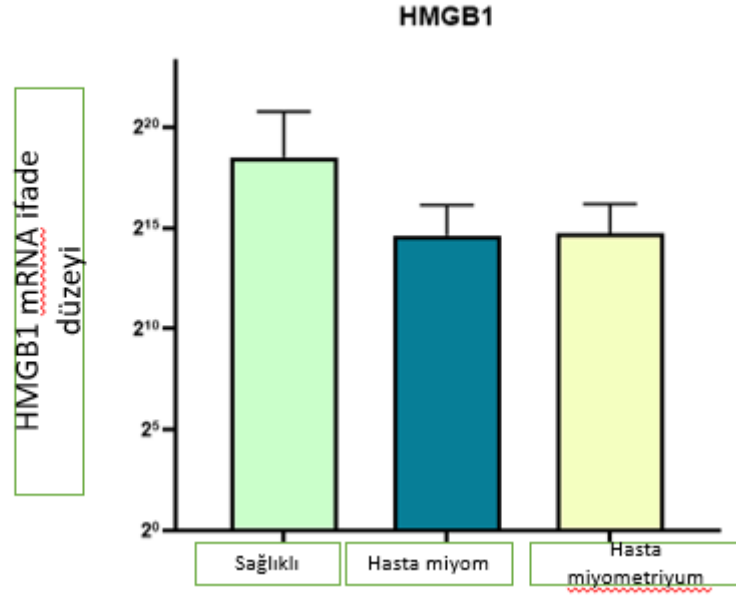
grup		real_time	protein
sağlıklı	N	13	13
	Mean	,8459519424	,0000
	Std. Deviation	1,824720227	,00000
	Median	0E-10	,0000
	Minimum	0E-8	,00
	Maximum	5,37321023	,00
hasta miyom	N	19	19
	Mean	2,305719951	,1099
	Std. Deviation	4,281301299	,33776
	Median	,0126983450	,0000
	Minimum	0E-8	,00
	Maximum	15,78830385	1,43
hasta miyometrium	N	13	13
	Mean	2,479659996	,4839
	Std. Deviation	6,491104540	,49885
	Median	0E-10	,4164
	Minimum	0E-8	,00
	Maximum	22,63972116	1,29
Total	N	45	45
	Mean	1,934258539	,1862
	Std. Deviation	4,516098199	,39176
	Median	0E-10	,0000
	Minimum	0E-8	,00
	Maximum	22,63972116	1,43

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of real_time is the same across categories of grup.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,593	Retain the null hypothesis.

Çizelge 3.2. HMGA2 geninin ifadesinin istatistik analiz sonuç tablosu

3.2. HMGB1 Gen İfadesi (Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)



Çizelge 3.3. HMGB1 geninin sağlıklı miyometriyum, hasta miyom ve hasta miyometriyum dokularındaki mRNA ifade analizi

Araştırmamızda, 16 hasta miyom dokusu üzerinde çalışılmıştır. Bu 16 hasta miyomunun, hepsinde hem HPRT hem de HMGB1 geni ifadelenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda internal kontrolü çalışan 16 hasta miyom dokusunda HMGB1 geninin ifade edilmesi yüzdesi %100 olarak görülmüştür.

Hasta miyometriyumu için ise; 19 hasta miyometriyumu üzerinde çalışılmıştır. Bu 19 hasta miyometriyumunun 19 unda da internal kontrol çalışırken, 1 tanesinde HPRT (internal kontrol) ifadesi görüldüğü halde, HMGB1 ifadesi görülmemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda internal kontrolü çalışan 19 hasta miyometriyum dokusunda HMGB1 geninin ifade edilmesi yüzdesi %94,7 olarak görülmüştür.

Sağlıklı miyometriyumda 18 doku üzerinde çalışılmıştır. Bu 18 sağlıklı miyometriyumunun 18'inde de internal kontrol çalışırken, internal kontrolü 18 dokunun 2 tanesinde HPRT (internal kontrol) geni ifadesi olduğu halde HMGB1 ifadesi görülmemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda internal kontrolü çalışan 18 hasta miyometriyum dokusunda HMGB1 geninin ifade edilmesi yüzdesi %88,88 olarak görülmüştür.

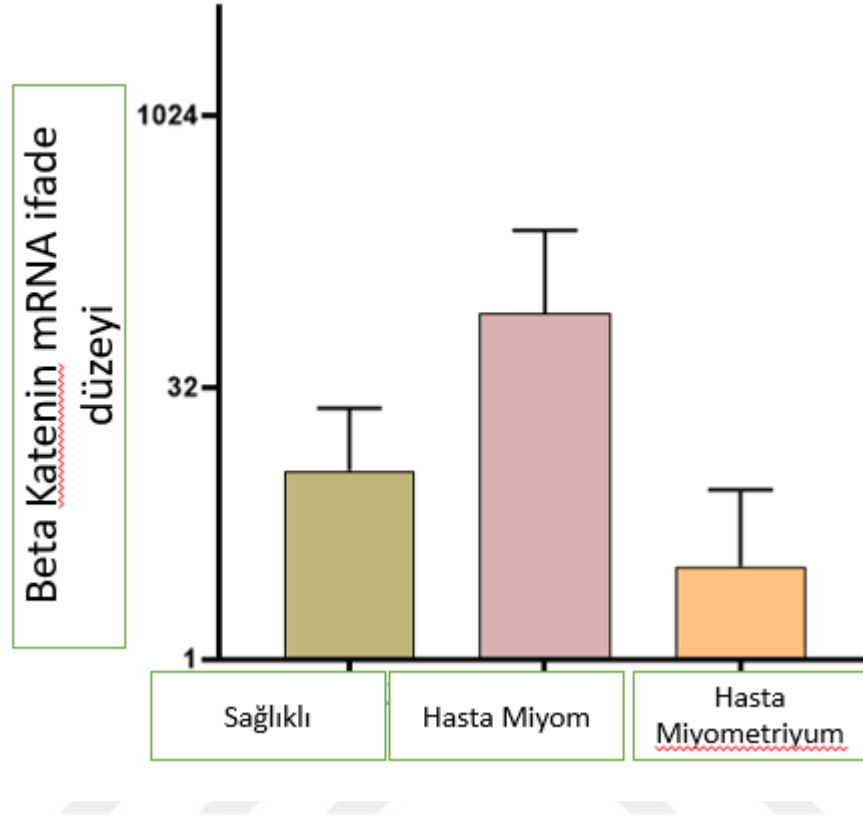
HMGB1 geninin mRNA ifadelenmesi sağlıklı miyometriyum dokularında ortalama 367482(std±12841,67); hasta miyom dokusunda ortalama 25129(std±57172,79); ve hasta miyometriyum dokusunda ortalama 26983(std±6,49) olarak tespit edilmiştir.

HMGB1 geninin sağlıklı miyometriyumunda, hasta miyom ve hasta miyometriyumuna göre daha fazla mRNA ifadesine rastlanmıştır. Hasta miyometriyumunda ise hasta miyomuna göre daha fazla mRNA ifadesine rastlanmıştır. Bu kat artışı 'Independent-Samples Kruskal-Wallis Testi' yapılarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p \leq 0,704$).

Hypothesis Test Summary		
	Null Hypothesis	Test
		Sig.
1	The distribution of HMGB1 is the same across categories of grup.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test
		,704

Çizelge 3.4. HMGB1 geninin ifadesinin istatistik analiz sonuç tablosu

3.3. Beta Katenin Gen İfadesi (Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)



Çizelge 3.5. Beta katenin geninin sağlıklı miyometriyum, hasta miyom ve hasta miyometriyum dokularındaki mRNA ifade analizi

Araştırmamızda, 8 hasta miyom dokusu üzerinde çalışılmıştır. Bu 8 hasta miyomunun, 2 tanesinde Beta katenin ifadesi görülmemiştir. (HPRT ifadesi olduğu halde) Bu sonuçlar doğrultusunda internal kontrolü çalışan 8 hasta miyom dokusunda Beta katenin geninin ifade edilmesi yüzdesi %75 olarak görülmüştür.

Hasta miyometriyumu için ise; 12 hasta miyometriyumu üzerinde çalışılmıştır. Bu 12 hasta miyometriyumunun hepsinde internal kontrol çalışırken, internal kontrolü çalışan 12 miyometriyumun 4 tanesinde HPRT ifadesi olduğu halde Beta katenin ifadesi görülmemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda internal kontrolü çalışan 8 hasta miyom dokusunda Beta katenin geninin ifade edilmesi yüzdesi %66,66 olarak görülmüştür.

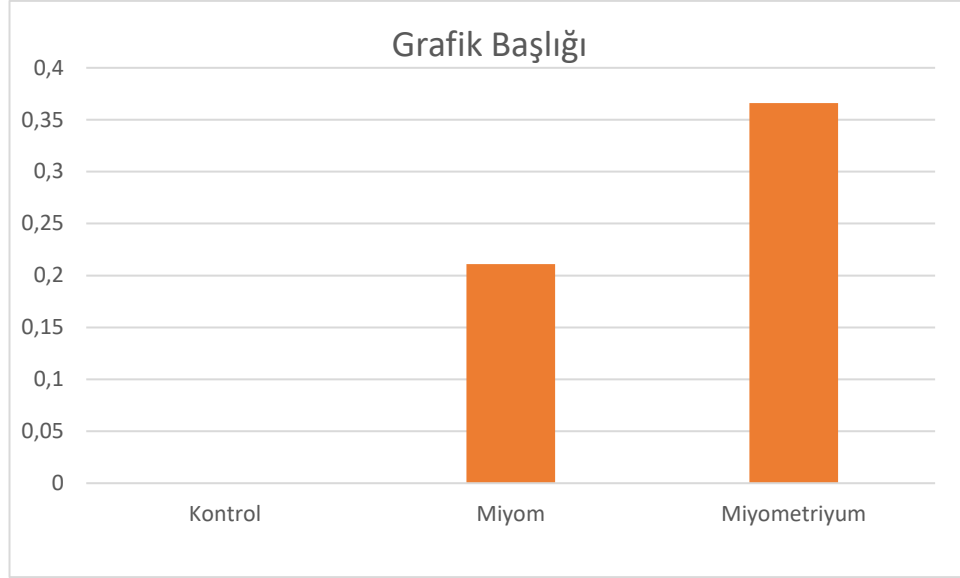
Sağlıklı miyometriyumda 4 doku üzerinde çalışılmıştır. Bu 4 sağlıklı miyometriyumunun, 4'ünde de Beta Katenin ifadesi görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda internal kontrolü çalışan 4 sağlıklı miyometriyum dokusunda Beta katenin geninin ifade edilmesi yüzdesi %100 olarak görülmüştür.

Beta katenin geninin mRNA ifadelenmesi sağlıklı miyometriyum dokusunda ortalama 11,13; hasta miyom dokusunda ortalama 82.975 ve hasta miyometriyum dokusunda ortalama 3,29 olarak tespit edilmiştir.

Beta katenin geninin hasta miyometriyum dokusunda mRNA ifadesi sağlıklı miyometriyum dokusuna göre önemli bir düşüş saptanmıştır, yine bu analizde hasta miyometriyumuna göre hasta miyomunda bir artış görülmektedir. Fakat dokular arasındaki gen ifadesinin artış veya azalışı ‘‘Ordinary one-way ANOVA testi’’ yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p =0,2575).

3.4 Protein İfadesi (Western Blotting)

Protein ifadesi düzeyi ImageJ analiz programına göre kontrol ve sağlıklı dokulardaki protein bant kalınlıklarına göre yapılmıştır. Bant kalınlıkları her dokuda HMGA2 /Beta Aktin oranı olarak birbirine göre kıyaslanmıştır. Beta aktin antikoru burada internal kontrol olarak kullanılmıştır. İstatistiksel analiz ise bu verilere göre yapılmıştır.

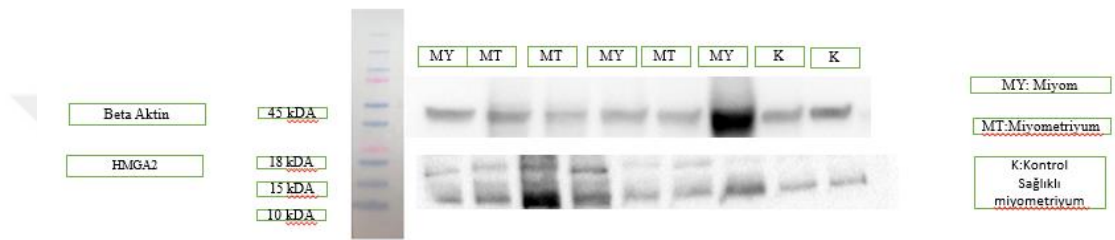


Çizelge 3.6. Protein ifade düzeyinde sağlıklı miyometriyum (Kontrol), hasta miyom ve hasta miyometriyum arasındaki kat artışları.

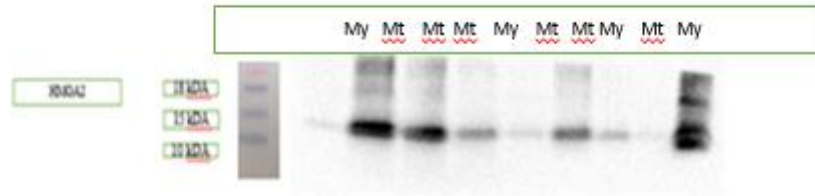
Yukarıdaki çizelgede protein ifade düzeyinde sağlıklı miyometriyum, hasta miyom ve hasta miyometriyum arasındaki kat artışları verilmiştir. Bu sonuçlara göre sağlıklı miyometriyumunda 18 kDa ağırlığında HMGA2 proteinin ifadesine rastlanmazken, HMGA2 protein ifadesi hasta miyom ve miyometriyumu kıyaslandığında hasta miyometriyumunda hasta miyomuna göre daha fazla ifade edildiği saptanmıştır.

HMGA2 proteinin beklenen ağırlığının yaklaşık 12 kDa olmasına rağmen, gözlemlenen protein ağırlığının 18 kDa olduğu bilinmektedir. Bu farklılığın sebebinin post translasyonel modifikasyonlar, post translasyonel bölünmeler, protein yüklerinin değişmesi ve başka deneysel faktörler olacağı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2022).

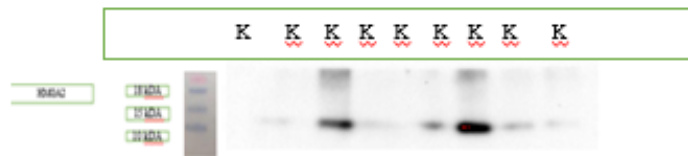
Başka marka antikorlar (Abcam, Sigma) ve bu tez çalışmasında kullanılan (Cell Signaling 5269) HMGA2 antikorunun protein ağırlığı 18 kDa olarak bildirilmiştir. Membranımızda hem 12 kDa hem de 18 kDa ait bantlar görülmüştür, fakat kullanılan antikorumuzdaki protein ağırlığı 18 kDa olarak belirlendiği için hesaplamalar ona göre yapılmıştır.



Çizelge 3.7. Bir membrandaki hasta miyom, hasta miyometriyum ve sağlıklı miyometriyumdaki HMGA2 ve Beta Aktin protein bantları



Çizelge 3.8. Hasta miyom ve miyometriyum dokusundaki 18 ve 12 kDa ağırlığındaki HMGA2 protein bantları



Çizelge 3.9. Sağlıklı miyometriyum dokusundaki 18 ve 12 kDa ağırlığındaki HMGA2 protein bantları

Yukarıda çizelge 3.5, çizelge 3.6 ve 3.7’de görüldüğü üzere HMGA2 protein bantlarının bazı dokularda 12 kDa ağırlığında, bazılarında 18 kDa ağırlığında ve bazılarında ise her ikisinde de olduğu gözlemlenmiştir.

Bu sonuçlara göre HMGA2 protein ifadesi olan 19 hasta miyom dokusunun 13 tanesi 12 kDa ağırlığında bant verirken, 6 tanesi ise 18 kDa ağırlığında bant vermiştir. 12 kDa’ da bant veren miyom dokusu oranı %68,41 iken 18 kDa’da bant veren miyom dokusu oranı ise %31,57’dir. Miyom dokusu için 12 kDa ağırlığında bant verip mRNA transkript düzeyinde HMGA2 ifadesi olan dokuların oranı ise %42,1 iken 18 kDa ağırlığında bant verip mRNA transkript düzeyinde HMGA2 ifadesi olan dokuların oranı %31,57’dir.

HMGA2 protein ifadesi olan 13 hasta miyometriyum dokusunun 9 tanesi 12 kDa ağırlığında bant verirken, 4 tanesi ise 18 kDa ağırlığında bant vermiştir. 12 kDa’ da bant veren hasta miyometriyum dokusu oranı %69,20 iken 18 kDa’da bant veren miyom dokusu oranı ise %30,76’dir. Hasta miyometriyum dokusu için 12 kDa ağırlığında bant verip mRNA transkript düzeyinde HMGA2 ifadesi olan dokuların oranı ise %46,15 iken 18 kDa ağırlığında bant verip mRNA transkript düzeyinde HMGA2 ifadesi olan dokuların oranı %23,07’dir.

HMGA2 protein ifadesi olan 13 sağlıklı miyometriyum dokusunun 7 tanesi 12 kDa ağırlığında bant verirken, 18 kDa ağırlığında bant veren sağlıklı miyometriyum dokusu gözlemlenmemiştir. 12 kDa’ da bant veren sağlıklı miyometriyum dokusu oranı %53,84 iken 18 kDa’da bant veren sağlıklı miyometriyum dokusu oranı ise %0’dır. Sağlıklı miyometriyum dokusu için 12 kDa ağırlığında bant verip mRNA transkript düzeyinde HMGA2 ifadesi olan dokuların oranı ise %30,76’dır.

HMGA2 proteinin Western analizinde sağlıklı miyometriyumda 18 kDa’ da HMGA2 ifadesine rastlanmamıştır. Hasta miyom dokusunda ortalama 0,109

(std±0,337) tespit edilirken; ve hasta miyometriyum dokusunda bu ortalama 0,483 (std± 0,498) olarak tespit edilmiştir. HMGA2 proteinin hasta miyom ve miyometriyum dokusunda sağlıklı miyometriyum dokusuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,001$).

Western blotting için HMGA2 proteinin bulunup bulunmamasına göre; sağlıklı miyometriyum 14, hasta miyomu 19 ve hasta miyometriyum 13 doku üzerinde analiz yapılmıştır.

HMGA2 proteininin dokularda bulunup bulunmadığını belirten analizde sağlıklı miyometriyumunda 18 kDa'da ifade edilmediği gözlenen çalışmada, hasta miyomu ve hasta miyometriyum analizlendiğinde proteinin ifade edildiği dokuların yüzdeleri sırasıyla %0; %27,3 ve %72,7 olarak belirlenmiştir. Bu değerler için farklılık oluşturan grup hasta miyometriyum olarak saptanmıştır. 'ki kare testi' sonucunda $p=0,021$ değerine göre HMGA2 proteininin hasta miyom ve miyometriyumunda ifade edilmesi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. TARTIŞMA

Uterin miyomlar, genital bölgenin sık görülen iyi huylu tümörleridir. Doğurganlık çağındaki kadınların yaklaşık %80'inde kadınların fiziksel ve zihinsel sağlığını ciddi şekilde tehlikeye atan rahim miyomları vardır. Fibroid olarak da bilinen uterin leiomyomlar (UL), miyometriyum olarak adlandırılan düz kas katmanından kaynaklanan benign tümörlerdir. Fibroid oluşumunda birçok faktör etkilidir. Bu etmenlerden biri de genetik mekanizmalardır. Somatik alterasyonlar altında yapısal kromozomal değişiklikler fibroid oluşumunu ya da gelişimini yaklaşık olarak %40 oranında etkilerken, nükleotid düzeyde mutasyonlar fibroid oluşumunu ya da gelişimini yaklaşık %70 oranında etkilemektedir (Z. Ordulu, 2016).

HMGB1'in ifadesi pankreas kanseri, rektum kanseri, midede tümör gelişimi, tümör boyutu, invazyon ve lenfatik metastaz ile ilişkili bulunmuştur (Goodwin ve ark., 1973 ve Bianchi ve ark., 2009). HMGB1'in baskılanması önemli ölçüde yumurtalık kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve in vitro invazyonunu inhibe eder. Uterus fibroidlerinde HMGB1 ekspresyonu, paraneoplastik dokulardakinden önemli ölçüde daha yüksek bulunmuş, bu da HMGB1'in uterine fibroid oluşumuyla yakından ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

HMGB1 hem pro- hem de anti-tümörjenik biyoaktivitelere sahiptir. HMGB1, p53, p73 ve RB gibi tümör baskılayıcı genlerle etkileşime girerek tümör oluşumunu baskılar.^{16,17} Ayrıca, HMGB1, sınırsız replikasyon potansiyeli, sürekli anjiyogenez, apoptozdan kaçınma, büyümede kendi kendine yeterlilik gibi Sinyaller, büyüme inhibitörlerine duyarsızlık ve doku invazyonu ve metastazı kanserin ayırt edici özellikleri üzerinde karmaşık etkilere sahiptir (Yang ve ark.,2014; Xie ve ark.,2016 ve Zuo ve ark., 2014). Bununla birlikte, HMGB1'in endometriyal kanserin invazyon ve metastazındaki rolünü belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, HMGB1 ekspresyonunun normal endometriyal hücrelerde endometriyal kanser hücrelerine

göre çok daha yüksek ifadelendiği bulunmuş ve özellikle yüksek metastatik hücre dizilerinde HMGB1 ekspresyon seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir. HMGB1 hedefli siRNA ile supresyon endometriyal kanser hücrelerinin proliferasyonunu, istilasını ve metastazını önemli ölçüde arttırmış ve EMT sürecini uyarmıştır.

Çalışmamızda sağlıklı miyometriyumda yüksek miktarda HMGB1 ifadesi görülmüştür. Fakat hasta miyom ve miyometriyumunda HMGB1 ifadesi yakın olarak bulunup, bu ifadeler istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da sağlıklı miyometriyuma göre oldukça düşük saptanmıştır. Özellikle uterin fibroidlerde HMGB1'in ifadesinin düşük olmasının miyom gelişimine katkıda bulunduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu da literatürdeki Zhang ve ark., çalışmalarıyla uyumlu bir sonuçtur. 2019'da yapılan bu çalışma HMGB1'in ifadesinin düşüklüğünün fibroid hücrelerinin proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptoza teşvik ettiği görülmüştür. Bizim yaptığımız çalışmada ise HMGB1 geninin ifadesinin sağlıklı miyometriyumunda yüksek olması, hasta miyomunda sağlıklı miyometriyumuna göre azalmasının fibroid gelişimini desteklediği görülmüştür. Bu sonuçlara göre fibroid tedavisinde özellikle HMGB1'in hedeflenmesinin etkili olacağı görüşünü desteklemektedir.

Hem transkript hem protein düzeyinde HMGA2 gen ifadelenmesi dikkate alındığında bu genin özellikle hasta miyometriyumunda sağlıklı miyometriyum ve hasta miyomuna göre çok daha fazla ifade edildiği keşfedilmiştir. Yaptığımız protein düzeyi ekspresyon çalışmalarında ise hasta miyometriyumunda, sağlıklı miyometriyum ve hasta miyomuna göre HMGA2 proteinin ifadesinin olduğunu bulduk. Bu da literatürde yer alan uterin fibroidlerdeki HMGA2 geninin ifadesinin açıklandığı az sayıda çalışmaya karşılık hasta miyometriyumunda HMGA2 ifadesinin fazla olduğunu bildiren ilk çalışmadır. Protein düzeyi ekspresyon çalışmalarımızda sağlıklı miyometriyumda HMGA2 ifadelenmesi görülmemiştir. Transkript düzeyinde HMGA2 ifadesinin olup, protein düzeyinde bu ifadenin görülmemesinin nedeninin posttranskripsiyonel modifikasyonlar, kesimlenme (splice) varyantları veya miRNA'lar olabileceği düşünülmektedir.

HMGA2'nin gelişim sürecindeki dokulardaki bir rolünün, çoğalma veya farklılaşma için ekzojen sinyallere duyarlılığı modüle etmek olduğunu düşünülmektedir. Bu işlev, steroid hormon reseptörleri tarafından transaktivasyonu arttırdığı gösterilen başka bir DNA mimari faktörü olan HMGB1'in rolüne benzerdir (Romine ve ark., 1998 ve Boonyaratanakornkit ve ark., 1998). Bu işlev, gelişmekte olan embriyoda veya belki de hasar onarımı sırasında kritik olabilir, ancak çoğu normal yetişkin dokusunda gerekli olmayabilir.

Kanserle ilgili son çalışmalar, HMGA2 proteininin, epitelial-mezenkimal geçiş (EMT) ve anjiyogenez gibi karakteristik tümör geniz süreçlerinde önemli bir rol oynayabileceğini bildirmiştir (Sakata ve ark., 2019). Bu çalışmalar, endotelial hücrelerde ve endotel progenitor hücrelerinde anjiyogenezi düzenlemek için HMGA2'nin gerekli olduğunu göstermiştir.

HMGA2 geninin anjiyogenez düzenlemesinde önemli bir rol oynadığını, bu genin aşırı ekspresyonunu artmış damar yoğunluğu ve dolayısıyla tümör gelişimi ile ilişkilendirdiğini ortaya koymuştur. Bu bağlamda, UL'lerde anjiyogenezin düzenlenmesi üzerindeki HMGA2 rolü, olağan tip leiomyom ile karşılaştırıldığında hidrofik leiomyom (HLM) olarak bilinen alışılmadık bir leiomyom tipinde tanımlanmıştır (Griffin ve ark., 2019). Griffin ve ark. yaptığı çalışmada HMGA2'nin hidrofik leiomyomlarının (HLM) %76'sında aşırı eksprese edildiğini ve olağan tip leiomyoma kıyasla bu tümörlerde artmış bir vasküler yoğunluğun gözlemlendiğini bildirilmiştir. Vaskülasyonun tümör hacminde önemli bir rol oynadığını düşünüldüğünde, bu tümörlerde HMGA2 aşırı ekspresyonu ile birlikte bu çalışmada gözlemlenen önemli ölçüde daha yüksek damar yoğunluğu, aşırı eksprese edilen HMGA2 ile UL'de gözlenen büyük hacmi açıklayabilir. Bu bulgular, HMGA2 aşırı ekspresyonunun, anjiyogenezi teşvik ederek ve sonuç olarak vaskülariteyi artırarak, tümörlerin büyük boyutlara büyümesine izin vererek hidrofik leiomyomlarının tümörizasyonunda rol oynadığını göstermektedir (Griffin ve ark., 2019).

Vaskülarizasyonun tümör hacminde önemli bir rol oynadığı göz önüne alındığında, HMGA2 aşırı ekspresyonuna sahip UL'ler daha büyük olma eğilimindedir, çünkü HMGA2 anjiogenezi artıran anjiyojenik faktörleri teşvik eder ve sonuç olarak hücre proliferasyonunu ve endotel hücrelerinin göçünü arttırarak UL büyüme hızının artmasına neden olur.

Leiomyomda neoplazmanın düz kas yapısında bazı özellikler mevcuttur. Bunlar, histolojik olarak heterojendir ve çoklu varyantlar mevcuttur. Hidrofik leiomyom (HLM), en son Dünya Sağlık Örgütü'nün uterus mezenkimal tümörleri sınıflandırmasında yer alan yukarıda belirtilen varyantlardan biridir (Kurman ve ark., 2014). Hidrofik değişiklik, uzun yıllardır leiomyomların bir alt kümesinin bilinen bir özelliği olmasına rağmen, Clement ve arkadaşlarının ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO 2014) makalesi, tümöre özgü histolojinin net bir tanımını açıklamıştır (Clement ve ark., 1992). Bu antite karakteristik olarak sulu ödem, artmış vaskülarite ve nodüller veya kordonlar halinde düzenlenmiş tümör hücreleri gösterir. Tüm bu özellikler zonal dağılımlarda görülür ve bu nedenle özellikle yaygın hidrofik değişikliğin ve aynı zamanda olağan tip leiomyom (ULM) mimarisinin kaybının olduğu durumlarda tanısal zorluklara neden olabilir.

Hidrofik leiomyom (HLM) ile ilgili literatürden elde edilen bilgilerin çoğu, patolojiye özel dergilerde yayınlanmış çok azı ise vaka raporlarından ve serilerden gelmektedir. Bu gözlem, HLM tanısı ile ilgili farkındalık ve netlik eksikliğini vurgulamaktadır. HLM'nin patolojik olarak anlaşılması, tümörigenezin bilinmeyen bir etiyolojisi nedeniyle ek olarak karmaşıktır.

Dolayısıyla bizim çalışmamızda kullanılan dokular normal miyom dokusu olarak kabul edildiğinde HMGA2 geninin mRNA düzeyinde transkript iadelenmesi istatistiksel olarak anlamlı çıkmamasının nedeni bu miyomların hidrofik miyom olarak tanımlanmamasından kaynaklanıyor olabilir.

Mas ve ark., yaptığı çalışmada, insan miyometriyal hücrelerinde Yüksek Mobilitate Grubu A proteinlerinin (HMGA2) kesilmiş formunun aşırı ekspresyonunun, leiomyom benzeri doku oluşumunu indüklediği bulunmuştur. HMGA2'nin kesik/kısa formunun, varsayılan tümör başlatan leiomyom hücrelerine doğru miyometriyal hücre dönüşümünü indüklediğini ve leiomyomların kökenini ve yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesini anlamak için yeni olanaklar açtığını göstermektedir (Mas ve ark., 2015).

Yukarıda bahsedilen sonuçlar doğrultusunda HMGA2 geninin alternatif kesimlenme (alternative splicing) formunun olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla HMGA2 primeri tasarlanırken bu özelliğin göz önünde bulundurulması HMGA2 geninin mRNA ifadesinde değişikliğe neden olabilir.

Bu tez kapsamında uterin fibroidde HMGA2 ve HMGB1 genlerinin birlikte çalışmasıyla, bu genlerin fibroid gelişimine katkısı araştırılmıştır. Uterin fibroidde HMGA2 ve HMGB1 genleri birlikte ilk defa incelenmiştir. Sonuç olarak HMGB1'in ekspresyonunun fibroid gelişimini engellediği ve HMGA2 ekspresyonunun fibroid oluşumuna katkıda bulunduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Bu bulgular literatürle uyumlu bulgulardır. Yine araştırmamızda beta katenin gen ifadesinin Zha ve ark., çalışmaları ile uyumlu olarak fibroid dokusunda yüksek ifade edildiği bulunmuştur.

Fibroid patogenezinde birçok sinyal yolağı yer almaktadır. Bunlardan biri de Wnt/ β -katenin yolağıdır. Wnt / β -katenin yolunun bazal benzeri tümörlerde aktive olduğu gösterilmiştir (Khramtsov ve ark., 2010). Wnt / β -katenin sinyali, Wnt ligandlarının reseptörleri ile etkileşimi ile aktive edilir ve ardından β -katenin stabilizasyonuna yol açar. Stabilize edilmiş β -katenin çekirdeğe yer değiştirir ve hücresel çoğalma, gelişme, farklılaşma, neoplazi ve kök hücre bakımı dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere hücresel tepkileri etkileyen spesifik transkripsiyonel programları indükler (Moon ve ark., 2004; Nusse ve ark., 2005 ve Wend ve ark., 2010).

Wnt/ β -katenin yolağı, miyometriyum veya leiomyom dokularının östrojen/progesteron tedavisinin, leiomyom kök hücrelerinin proliferasyonunu ve tümör büyümesini indükleyen Wnt11 ve Wnt16 ekspresyonunun artmasına yol açan bir parakrin rolü oynar. Wnt/ β -katenin yolu, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını etkileyen transkripsiyonel etkinliğe sahiptir. Araştırmalar, Wnt/ β -katenin yolunun mekanik transdüksiyon ve hücre dışı matriks (ECM) üretimi dahil olmak üzere UL'nin patogenezinde kritik bir rol oynadığını göstermektedir.

Zha ve ark., yaptığı çalışmada HMGA2'nin sadece kanser ilerlemesini ve EMT'yi desteklemekle kalmayıp aynı zamanda kök hücrelerin farklılaşma potansiyelini ve kendi kendini yenileme kapasitesini de sürdürdüğünü göstermektedir. Wnt/ β -katenin yolunun kök hücreler kadar EMT ile de bir bağlantısı vardır. (Zha ve ark., 2013).

HMGA2'nin aşırı ekspresyonunun onkojenik özellikleri geliştirebileceğini ve hem in vitro hem de in vivo olarak kanıtlanmıştır. HMGA2'nin sadece TWIST1 tarafından β -katenin translokasyonu yapmakla kalmayıp, AXIN1'in transkripsiyonunu baskılayarak β -katenin'i fosforilasyon bozulmasından koruduğunu da bulunmuştur. HMGA2 böylece Wnt/ β -katenin yolunu aktive eder ve EMT'yi ortaya çıkarır. HMGA2'nin EMT ve kanser kök hücreleri üzerindeki etkileri ile birlikte çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında, EMT'nin kanser kök hücrelerinin başka özelliği olabileceğini veya kanser kök hücrelerinin kanser hücrelerinin süreç içinde kaçınılmaz bir aşaması olabileceğini tahmin edilmektedir.

Dolayısıyla Wnt/ β -katenin yolağının araştırılması, bu yolağı inhibe eden ilaçlar üzerinde çalışmaları geliştirmeye de devam etmektedir. Bu gelişmelerin de fibroid gelişiminin oluşması veya engellenmesi üzerinde etkili olacağı öngörülmektedir.

Rahim miyomları, kadın genital sisteminin etiyolojisi hala bilinmemektedir. Sitogenetik anormallikler, miyomların büyüdüğü ve geliştiği farklı genetik yolları gösterir. Uterus leiomyomlarının çoğu normal bir karyotipe sahip olsa da, araştırmalar bu tümörlerin kromozom 3, 6, 7, 13, trizomi 12, kromozom 12 ve 14 arasında karşılıklı translokasyon ve monozomi 22 gibi spesifik kromozomal anormallikler taşıdığını göstermektedir. Bu tür kromozomal yeniden düzenlemeler bu tümörlerin büyümesinden olduğu kadar başlamasından da sorumlu olabilir.

Bugüne kadar belirtilen sitogenetik anormallikler, bu tümörler arasında genetik heterojenite göstermektedir. Daha ileri moleküler analizler, fibroid oluşumunda varsayılan aday genlerin belirlenmesine öncü olacaktır. İlgili genlerin tanımlanması, durumun genetik teşhisine, genetik risklerin tahmin edilmesine ve durumun uygun terapötik önlemlerle yönetilmesine yardımcı olabilir.

Mikrodizi teknolojisinin ortaya çıkmasıyla birlikte sitoçiplerin gelişiminin, anormallikleri çok daha büyük bir çözünürlükle tespit etmeye yardımcı olacağını ortaya koymaktadır. Genomik değişiklikleri tanımlamaya ek olarak, sitokinlerin kullanılması, UL'nin patogenezinde yer alan genlerin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Bu bilginin, genotip fenotip korelasyonlarının belirlenmesine yardımcı olacağı beklenmektedir.

Önemli bir araştırma alanı ise fibroid hastası kadınların herediter yapısının incelenmesi ve fibroid gelişimine katkıda bulunan genetik lokusların tanımlanmasıdır. Rahim miyomlarının gelişimi, genler ve çevre arasındaki karmaşık etkileşimi içerir; Uterus leiomyomundan sorumlu genetik ve çevresel mekanizmaların daha fazla anlaşılması ve ortaya çıkarılması, rasyonel gen tedavisi protokollerinin tasarlanmasına yardımcı olacaktır.

Fibroid gelişiminde moleküler süreçlerin önemi göz önüne alındığında, daha iyi tespit, sınıflandırma ve tedavi yöntemleri geliştirmek için kullanılacak geniş bir

moleküler araç ve kaynak yelpazesi vardır. Bu umut verici yaklaşımlar, semptomatolojik hastaların sonuçlarını ve yaşam kalitesini iyileştirmeye, maliyetleri ve olası komplikasyonları azaltmaya fayda sağlayabilir.

Genomik ve transkriptomik yaklaşımlara dayanan son moleküler çalışmalar, majör insan miyometriyal tümörleri için sürücü mutasyonları, anormal düzenleyici programlar ve hastalık alt tiplerini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, bu çalışmalar tüm tümör kütesine odaklanmıştır, bu da popülasyonlardaki hücreler arasındaki kritik farklılıkları gizleyebilir. Bu anlamda, intratümöral heterojenite, tümör biyolojisi ve onkolojisindeki en büyük zorluklardan birini temsil etmektedir. Aslında, hücreler arasındaki etkileşimlerin yanı sıra tümör mikroçevresi içindeki lokal ve özerk mekanizmalar, uterus fibroidlerinin kökenini ve evrimini daha iyi anlamak için gerekli olabilir. Ek olarak, hücrelerin lokal ve özerk mekanizmaları tümör gelişimi ve büyümesinde önemli bir rol oynayabilir.

Bu hücre popülasyonlarının işlevini ve düzenlemesini daha fazla incelemek için, gen ekspresyonlarının tarafsız genom çapında çalışmalarına ihtiyaç vardır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, uterin leiomyoma (UL) gelişiminde HMGA2, HMGB1 ve beta katenin gen ifadenmesinin etkinliği araştırılmıştır.

UL hastalarının miyom ve miyometriumu ile sağlıklı miyometrium dokularında HMGA2 gen ifadenmesi transkript ve protein düzeyinde araştırılmış, HMGB1 ve beta katenin ifadesi ise RNA düzeyinde analiz edilmiştir.

HMGA2 geninin, hasta miyometriyumunda; hasta miyomuna ve sağlıklı miyometriyumuna göre transkript düzeyinde daha fazla ifade edildiği tespit edilse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

Western analizi sonucunda sağlıklı miyometriyumunda HMGA2 proteini ifadenmesi gözlenmezken, hasta miyom ve miyometriyumunda HMGA2 protein düzeyinin sağlıklı miyometriyumuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir.

Embriyonal dönemde ifadesi yüksek olan ve erişkinde pek çok dokuda ifade edilmeyen HMGA2'nin tümörigenezdeki etkinliği birçok yolak ile ilişkilendirilmiştir. Ancak, Türk popülasyonunda Leiomyomda HMGA2 ifadenmesi ilk kez bu proje kapsamında araştırılmıştır.

Projemizin bulguları miyom dokusuna ilaveten hasta miyometriyum dokusunun da sağlıklı miyometriyuma göre çok yüksek HMGA2 protein ifadenmesine sahip olduğunu göstermiştir. Protein fonksiyonel ürün olduğu için elde edilen Western blotting sonuçları en güvenilir datayı oluşturmaktadır.

Uterin leiomyomlu hastaların miyometriyumunun normal miyometriyumdan farklı/yüksek HMGA2 protein ifade profiline sahip olduğu **ilk kez** bu araştırma ile belirlenmiştir. Projemizin bu çıktıları ile hipotezimizi destekleyecek önemli ve özgün sonuçlar elde edilmiştir.

Sağlıklı miyometriyum dokusunda HMGB1 gen ekspresyonu, hasta miyom ve miyometriyumu ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlı olmasa da daha yüksek ifade edildiği görülmüştür. Diğer bir UL ve hasta miyometriyum dokusunda HMGB1 gen ifadelenmesinin azaldığı gözlenmiş ve bu sonuç HMGB1'in proliferasyonu inhibe edip, apoptoz aktivesini arttırdığı hipotezini desteklemektedir.

β -katenin gen ifadelenmesinin hasta miyomunda sağlıklı miyometriyumuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Yine hasta miyom ve hasta miyometriyumunun β -katenin gen ekspresyonu kıyaslandığında miyom dokusunda, hasta miyometriyumuna göre de yüksek ekspresyon belirlenmiştir. Ancak, istatistiksel analiz sonucunda dokular arasındaki bu artış ve azalışlar örneklem sayısı nedeniyle anlamlı bulunmamıştır.

Fibroid karakterizasyonunun net ayrımının yapıldığı çalışmaların artması, özellikle hidrofik türde miyomların kesin olarak tanımlanması, HMGA2 geninin alternatif kesimlenmiş formuna göre primer oluşturması, hasta sayısının artırılıp daha çok örnek üzerinde çalışılması ve miRNA'ların fibroid üzerindeki etkisini anlamak için daha geniş araştırma yapılmasının gelecekteki çalışmalara yön vereceği düşünülmektedir.

İnsan normal miyometriyumunda ve fibroidde bulunan bireysel hücre tiplerinin tam karakterizasyonu, fibroidde yer alan temel fizyolojik ve patolojik süreçleri açıklığa kavuşturmaya ve hastalıkla ilişkili tanı ve tedaviyi daha da iyileştirmeye yardımcı

olacaktır. Bu bağlamda daha fazla genom çalışmalarına yön verip, fibroid altında yatan mekanizmalar daha detaylı açıklanmalıdır.



ÖZET

Uterin Fibroidi Olan ve Olmayan Olgularda HMGA2 (Yüksek Hareketli Grup A2) Geninin Ekspresyon ve Protein Düzeyi Profillerinin Değerlendirilmesi

Fibroid olarak da bilinen uterin leiomyomlar (UL), miyometriyum olarak adlandırılan düz kas katmanından kaynaklanan benign tümörlerdir. Fibroid oluşumunda birçok faktör etkilidir. HMG (Yüksek Hareketli Grup) proteinleri histon olmayan proteinler olup, yapısal faktörler olarak işlev görürler. Uterus fibroidlerinde HMGB1 ekspresyonu, paraneoplastik dokulardakinden önemli ölçüde daha yüksek bulunmuş, bu da HMGB1'in uterine fibroid oluşumuyla yakından ilişkili olabileceği önerilmiştir. HMGA2 geninin doğrudan veya dolaylı olarak fibroid oluşumunu etkileyebileceği öngörülmektedir, fakat konuyla ilgili çalışmalar devam etmekte olup, kesin bir yargı yoktur.

Fibroidlerin patogenezinin kesin olarak bilinmemesi invaziv olmayan yeni tedavilerin gelişimini sınırlamaktadır.

Bu tez kapsamında uterin fibroidli hastalarda HMGA2, HMGB1 ve beta katenin genlerinin birlikte çalışmasıyla, bu genlerin fibroid gelişimine katkısı **ilk kez** araştırılmıştır.

Projemizin bulguları miyom dokusuna ilaveten hasta miyometriyum dokusunun da sağlıklı miyometriyuma göre çok yüksek HMGA2 protein ifadenmesine sahip olduğunu göstermiştir. Protein fonksiyonel ürün olduğu için elde edilen Western blot sonuçları en güvenilir veriyi oluşturmaktadır. Uterin leiomyomlu hastaların miyometriyumunun normal miyometriyumdan farklı/yüksek HMGA2 protein ifade profiline sahip olduğu **ilk kez** bu araştırma ile belirlenmiştir.

Sağlıklı miyometriyum dokusunda HMGB1 gen ekspresyonu, hasta miyom ve miyometriyumu ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlı olmasa da daha yüksek ifade edildiği görülmüştür. Diğer bir deyişle UL ve hasta miyometriyum dokusunda HMGB1 gen ifadenmesinin azaldığı gözlenmiş ve bu sonuç HMGB1'in proliferasyonu inhibe edip, apoptoz aktivesini arttırdığı hipotezini desteklemektedir.

Sonuç olarak HMGB1'in ifadenmesindeki azalmanın fibroid gelişimini desteklediği ve HMGA2 ekspresyonunda ise artışın fibroid oluşumuna katkıda bulunduğu şeklinde yorumlanmıştır. Beta katenin ifadenmesi ise literatürle uyumlu olarak miyom dokusunda daha yüksek bulunmuş ve HMGA2 yüksek ifadenmesine benzer şekilde, yüksek beta katenin ifadesinin UL gelişimini desteklediği belirlenmiştir. Projemizin bu çıktıları ile hipotezimizi destekleyecek önemli ve özgün sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Beta-Katenin, Fibroid (miyom), gen ekspresyonu, HMGA2, HMGB1

SUMMARY

Evaluation of Expression and Protein Level Profiles of HMGA2 (Highly Mobility Group A2) Gene in Subjects with and Without Uterine Fibroid

Uterine leiomyomas (UL), also known as fibroids, are benign tumors that arise from the smooth muscle layer called the myometrium. Many factors are effective in the formation of fibroids. HMG (Highly Mobility Group) proteins are nonhistone proteins and act as structural factors. HMGB1 expression was found to be significantly higher in uterine fibroids than in paraneoplastic tissues, suggesting that HMGB1 may be closely associated with uterine fibroid formation. It is predicted that the HMGA2 gene may directly or indirectly affect fibroid formation, but studies on the subject are ongoing and there is no definite judgment.

The exact pathogenesis of fibroids is unknown, limiting the development of new non-invasive treatments.

In this thesis, the contribution of these genes to fibroid development was investigated for the first time by studying the HMGA2, HMGB1 and beta catenin genes in patients with uterine fibroids.

The findings of our project showed that in addition to myoma tissue, patient myometrium tissue also has very high HMGA2 protein expression compared to healthy myometrium. Since the protein is a functional product, the Western blot results obtained constitute the most reliable data. In this study, it was determined for the first time that the myometrium of patients with uterine leiomyoma had a different/higher HMGA2 protein expression profile than the normal myometrium.

HMGB1 gene expression was found to be higher in healthy myometrial tissue when compared to patient fibroids and myometrium, although it was not statistically significant. In other words, decreased HMGB1 gene expression was observed in UL and patient myometrium tissue, and this result supports the hypothesis that HMGB1 inhibits proliferation and increases apoptosis activity.

As a result, it was interpreted that the decrease in the expression of HMGB1 supports fibroid development and the increase in the expression of HMGA2 contributes to fibroid formation. Beta catenin expression was found to be higher in myoma tissue in accordance with the literature, and it was determined that high beta catenin expression supported the development of UL, similar to the high expression of HMGA2. With these outputs of our project, important and original results have been obtained to support our hypothesis.

Key Words: Beta-Catenin, Fibroid (myoma), Gene Expression, HMGA2, HMGB1

KAYNAKLAR

- AJABNOOR G, MOHAMMED NA, BANAGANAPALLI B, ABDULLAH LS, BONDAGJI ON, MANSOURI N, SHAIK NA (2018). Expanded somatic mutation spectrum of MED12 gene in uterine leiomyomas of Saudi Arabian women. *Frontiers in genetics*, **9**:552.
- ARICI A, SOZEN I (2000). Transforming growth factor- β 3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertility and sterility*, **73**(5):1006-1011.
- ASADA H, YAMAGATA Y, TAKETANI T, MATSUOKA A, TAMURA H, HATTORI N, SUGINO N (2008). Potential link between estrogen receptor- α gene hypomethylation and uterine fibroid formation. *Molecular human reproduction*, **14**(9):539-545.
- AVALOS AM, KIEFER K, TIAN J, CHRISTENSEN S, SHLOMCHIK M, COYLE AJ, MARSHAK-ROTHSTEIN A (2010). RAGE-independent autoreactive B cell activation in response to chromatin and HMGB1/DNA immune complexes. *Autoimmunity*, **43**(1):103-110.
- BIANCHI ME, AGRETI A (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Current opinion in genetics & development*, **15**(5):496-506.
- BONDAGJI NS, MORAD FA, AL-NEFAEI AAA, KHANI A, ELANGO R, ABDULLAH LS, SHAIK NA (2017). Replication of GWAS loci revealed the moderate effect of TNRC6B locus on susceptibility of Saudi women to develop uterine leiomyomas. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, **43**(2):330-338.
- BORAHAY MA, AL-HENDY A, KILIC GS, BOEHRNING D (2015). Signaling pathways in leiomyoma: understanding pathobiology and implications for therapy. *Molecular medicine*, **21**(1):242-256.
- BRAY MJ, DAVIS LK, TORSTENSON ES, JONES SH, EDWARDS TL, EDWARDS DRV (2019). Estimating Uterine Fibroid SNP-Based Heritability in European American Women with Imaging-Confirmed Fibroids. *Human heredity*, **84**(2):73-81.
- BUSTIN M (2001). Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends in biochemical sciences*, **26**(3):152-153.
- CATHERINO WH, PARROTT E, SEGARS J (2011). Proceedings from the national institute of child health and human development conference on the uterine fibroid research update workshop. *Fertility and sterility*, **95**(1):9-12.
- CAVATTINI A, DI GIUSEPPE J, STORTONI P, MONTIK N, GIANNUBILO SR, LITTA P, CIARMELA P (2013). Uterine fibroids: pathogenesis and interactions with endometrium and endomyometrial junction. *Obstetrics and gynecology international*, 2013.
- CHA PC, TAKAHASHI A, HOSONO N, LOW SK, KAMATANI N, KUBO M, NAKAMURA Y (2011). A genome-wide association study identifies three loci associated with susceptibility to uterine fibroids. *Nature genetics*, **43**(5):447-450.
- CIARMELA P, BLOISE E, GRAY PC, CARRARELLI P, ISLAM MS, DE PASCALIS F, PETRAGLIA F. (2011). Activin-A and myostatin response and steroid regulation in human

myometrium: disruption of their signalling in uterine fibroid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **96**(3), 755-765.

CIARMELA P, ISLAM MS, REIS FM, GRAY PC, BLOISE E, PETRAGLIA F, CASTELLUCCI, M. (2011). Growth factors and myometrium: biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Human reproduction update*, **17**(6):772-790.

CIARMELA P, WIATER E, VALE W. (2008). Activin-A in myometrium: characterization of the actions on myometrial cells. *Endocrinology*, **149**(5):2506-2516.

CIARMELA P, WIATER E, SMITH SM, VALE W (2009). Presence, actions, and regulation of myostatin in rat uterus and myometrial cells. *Endocrinology*, **150**(2):906-914.

CLEMENT PB, YOUNG RH, SCULLY RE (1992). Diffuse, perinodular, and other patterns of hydropic degeneration within and adjacent to uterine leiomyomas. Problems in differential diagnosis. *The American journal of surgical pathology*, **16**(1):26-32.

CRABTREE JS, JELINSKY SA, HARRIS HA, CHOE SE, COTREAU MM, KIMBERLAND ML, WALKER CL (2009). Comparison of human and rat uterine leiomyomata: identification of a dysregulated mammalian target of rapamycin pathway. *Cancer research*, **69**(15):6171-6178.

DENG L, WU T, CHEN XY, XIE L, YANG J (2012). Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for uterine leiomyomas. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **(10)**.

DU J, ZU Y, LI J, DU S, XU Y, ZHANG L, YANG C (2016). Extracellular matrix stiffness dictates Wnt expression through integrin pathway. *Scientific reports*, **6**(1):1-12.

EGGERT SL, HUYCK KL, SOMASUNDARAM P, KAVALLA R, STEWART EA, LU AT, MORTON CC (2012). Genome-wide linkage and association analyses implicate FASN in predisposition to uterine leiomyomata. *The American Journal of Human Genetics*, **91**(4):621-628.

FEOFILOVA MA, TOMAREVA EI, EVDOKIMOVA DV (2017). Etiology And Pathogenesis Of Uterine Myoma, Its Relationship With Health And Reproductive Function Of Women (Literature Review). *J. New Med. Technol*, **24**:249-260.

FERRERO H (2020). HMGA2 involvement in uterine leiomyomas development through angiogenesis activation. *Fertility and Sterility*, **114**(5):974-975.

FLAKE GP, ANDERSEN J, DIXON D (2003). Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environmental health perspectives*, **111**(8):1037-1054.

FUJITA M (1985). Histological and biochemical studies of collagen in human uterine leiomyomas. [*Hokkaido Igaku Zasshi*] *The Hokkaido Journal of Medical Science*, **60**(4):602-615.

FUSCO A, FEDELE M (2007). Roles of HMGA proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, **7**(12):899-910.

GAO Q, LI F, WANG S, SHEN Z, CHENG S, PING Y, ZHANG, Y (2019). A cycle involving HMGB1, IFN- γ and dendritic cells plays a putative role in anti-tumor immunity. *Cellular Immunology*, **343**:103850.

- GE T, CHEN CY, NEALE BM., SABUNCU MR, SMOLLER JW (2017). Phenome-wide heritability analysis of the UK Biobank. *PLoS genetics*, **13**(4):e1006711.
- GELSE K, POSCHL E, AIGNER T (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, **55**(12):1531-1546.
- GEORGE JW, FAN H, JOHNSON B, CARPENTER TJ, FOY KK, CHATTERJEE A, TEIXEIRA, JM (2019). Integrated epigenome, exome, and transcriptome analyses reveal molecular subtypes and homeotic transformation in uterine fibroids. *Cell reports*, **29**(12):4069-4085.
- GIULIANI A, GRECO S, PACILÈ S, ZANNOTTI A, DELLI CARPINI G, TROMBA G, CIARMELA P (2019). Advanced 3D imaging of uterine leiomyoma's morphology by propagation-based phase-contrast microtomography. *Scientific reports*, **9**(1):1-11.
- GOODWIN GH, SANDERS C, JOHNS EW (1973). A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *European Journal of Biochemistry*, **38**(1):14-19.
- GRIFFIN BB, BAN Y, LU X, WEI JJ (2019). Hydropic leiomyoma: a distinct variant of leiomyoma closely related to HMGA2 overexpression. *Human pathology*, **84**:164-172.
- GROSS KL, NESKEY DM, MANCHANDA N, WEREMOWICZ S, KLEINMAN MS, NOWAK, RA, MORTON CC (2003). HMGA2 expression in uterine leiomyomata and myometrium: quantitative analysis and tissue culture studies. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **38**(1):68-79.
- GUSTAVSSON I, ENGLUND K, FAXÉN M, SJOBLÖM P, LINDBLÖM B, BLANCK A (2000). Tissue differences but limited sex steroid responsiveness of c-fos and c-jun in human fibroids and myometrium. *Molecular human reproduction*, **6**(1):55-59.
- HATTHACHOTE P, GILLESPIE JI (1999). Complex interactions between sex steroids and cytokines in the human pregnant myometrium: evidence for an autocrine signaling system at term. *Endocrinology*, **140**(6):2533-2540.
- HEIDET L, DAHAN K, ZHOU J, XU Z, COCHAT P, GOULD JD, ANTIGNAC C (1995). Deletions of both $\alpha 5$ (IV) and $\alpha 6$ (IV) collagen genes in Alport syndrome and in Alport syndrome associated with smooth muscle tumours. *Human molecular genetics*, **4**(1):99-108.
- HEIKKINEN T, ÄYRÄVÄINEN A, HÄNNINEN J, AHVENAINEN T, BUTZOW R, PASANEN A, VAHTERISTO P (2018). MED12 mutations and fumarate hydratase inactivation in uterine adenomyomas. *Human reproduction open*, **2018**(4), hoy020.
- HODGE JC, PARK PJ, DREYFUSS JM, ASSIL-KISHAWI I, SOMASUNDARAM P, SEMERE LG, MORTON, CC (2009). Identifying the molecular signature of the interstitial deletion 7q subgroup of uterine leiomyomata using a paired analysis. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **48**(10):865-885.
- HUANG CY, CHANG SF, KE TW, CHEN TW, LAN YC, YOU YS, CHAO KS (2018). Cytosolic high-mobility group box protein 1 (HMGB1) and/or PD-1+ TILs in the tumor microenvironment may be contributing prognostic biomarkers for patients with locally advanced rectal cancer who have undergone neoadjuvant chemoradiotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, **67**(4):551-562.

- HUBERT P, RONCARATI P, DEMOULIN S, PILARD C, ANCION M, REYNDERS C, HERFS, M (2021). Extracellular HMGB1 blockade inhibits tumor growth through profoundly remodeling immune microenvironment and enhances checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, **9**(3).
- HULBOY DL, RUDOLPH LA, MATRISIAN LM (1997). Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular human reproduction*, **3**(1):27-45.
- KANG R, ZHANG Q, ZEH HJ, LOTZE MT, TANG D (2013). HMGB1 in Cancer: Good, Bad, or Both? HMGB1 in Cancer. *Clinical cancer research*, **19**(15):4046-4057.
- KARRA L, SHUSHAN A, BEN-MEIR A, ROJANSKY N, KLEIN BY, SHVEIKY D, BEN-BASSAT H (2010). Changes related to phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in leiomyomas: possible involvement of glycogen synthase kinase 3 α and cyclin D2 in the pathophysiology. *Fertility and sterility*, **93**(8):2646-2651.
- KHAMBUB, HONG H, LIU S, LIU G, CHEN X, DONG Z, YIN XM (2020). The HMGB1-RAGE axis modulates the growth of autophagy-deficient hepatic tumors. *Cell death & disease*, **11**(5):1-15.
- KIRSCHEN GW, ALASHQAR A, MIYASHITA-ISHIWATA M, RESCHKE L, EL SABEH M, BORAHAY MA (2021). Vascular biology of uterine fibroids: connecting fibroids and vascular disorders. *Reproduction*, **162**(2), R1-R18.
- KLEMKE M., MEYER A, NEZHAD MH, BARTNITZKE S, DRIESCHNER N, FRANTZEN C, BULLERDIEK J (2009). Overexpression of HMGA2 in uterine leiomyomas points to its general role for the pathogenesis of the disease. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **48**(2):171-178.
- KLUNE JR, DHUPAR R, CARDINAL J, BILLIAR TR, TSUNG A (2008). HMGB1: endogenous danger signaling. *Molecular medicine*, **14**(7):476-484.
- KOL'TSOVA AS, PENDINA AA, EFIMOVA OA, KAMINSKAYA AN, TIKHONOV AV, OSINOVSKAYA NS, BARANOV VS (2017). Differential DNA Hydroxymethylation in Human Uterine Leiomyoma Cells Depending on the Phase of Menstrual Cycle and Presence of MED12 Gene Mutations. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **163**(5):646-649.
- KOLCH W (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*, **351**(2):289-305.
- KOVÁCS KA, LENGYEL F, KORNYEI JL, VÉRTES Z, SZABÓ I, SUMEGI B, VÉRTES M (2003). Differential expression of Akt/protein kinase B, Bcl-2 and Bax proteins in human leiomyoma and myometrium. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **87**(4-5):233-240.
- KURACHI O, MATSUO H, SAMOTO T, MARUO T (2001). Tumor necrosis factor- α expression in human uterine leiomyoma and its down-regulation by progesterone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **86**(5):2275-2280.
- LAGANÀ AS, VERGARA D, FAVILLI A, LA ROSA VL, TINELLI A, GERLI S, VITALE SG (2017). Epigenetic and genetic landscape of uterine leiomyomas: a current view over a common gynecological disease. *Archives of gynecology and obstetrics*, **296**(5):855-867.

- LAUGHLIN SK, BAIRD DD, SAVITZ DA, HERRING AH, HARTMANN KE (2009). Prevalence of uterine leiomyomas in the first trimester of pregnancy: an ultrasound screening study. *Obstetrics and gynecology*, **113**(3), 630.
- LEE M, CHEON K, CHAE B, HWANG H, KIM HK, CHUNG YJ, KIM, MR (2018). Analysis of MED12 mutation in multiple uterine leiomyomas in South Korean patients. *International Journal of Medical Sciences*, **15**(2):124.
- LEHTONENR., KIURU M, VANHARANTA S, SJOBERG J, AALTONEN LM, AITTOÄÄKI, K. AALTONEN, LA (2004). Biallelic inactivation of fumarate hydratase (FH) occurs in nonsyndromic uterine leiomyomas but is rare in other tumors. *The American journal of pathology*, **164**(1):17-22.
- LESSL M, KLOTZBUECHER M, SCHOEN S, RELES A, STÖCKEMANN K, FUHRMANN U (1997). Comparative messenger ribonucleic acid analysis of immediate early genes and sex steroid receptors in human leiomyoma and healthy myometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **82**(8):2596-2600.
- LETHABY A, VOLLENHOVEN B (2015). Fibroids (uterine myomatosis, leiomyomas) BMJ Clin. Evid, **2015**:814.
- LI D, XIE K, ZHANG L, YAO X, LI H, XU Q, FANG, J. (2016). Dual blockade of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) exhibits potent anti-angiogenic effects. *Cancer Letters*, **377**(2):164-173.
- LI G, LIANG X, LOTZE MT (2013). HMGB1: the central cytokine for all lymphoid cells. *Frontiers in immunology*, **4**:68.
- LIANG J, LIANG L, OUYANG K, LI Z, YI X (2017). MALAT 1 induces tongue cancer cells' EMT and inhibits apoptosis through Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Journal of oral pathology & medicine*, **46**(2):98-105.
- LITOVKIN KV, DOMENYUK VP, BUBNOV VV, ZAPOROZHAN VN (2007). Interleukin-6-174G/C polymorphism in breast cancer and uterine leiomyoma patients: a population-based case control study. *Exp Oncol*, **29**(4):295-298.
- LIU B, CHEN G, HE Q, LIU M, GAO K, CAI B, YAN Q (2020). An HMGA2-p62-ER α axis regulates uterine leiomyomas proliferation. *The FASEB Journal*, **34**(8):10966-10983.
- LUOTO R, KAPRIO J, RUTANEN EM, TAIPALE P, PEROLA M., KOSKENVUO M (2000). Heritability and risk factors of uterine fibroids—the Finnish Twin Cohort study. *Maturitas*, **37**(1), 15-26.
- MA S, MING Z, GONG AY, WANG Y, CHEN X, HU G, CHEN XM (2017). A long noncoding RNA, lincRNA-Tnfaip3, acts as a coregulator of NF- κ B to modulate inflammatory gene transcription in mouse macrophages. *The FASEB Journal*, **31**(3):1215-1225.
- MACHADO-LOPEZ A, SIMÓN C, MAS A (2021). Molecular and cellular insights into the development of uterine fibroids. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(16):8483.
- MÄKINEN N, MEHINE M, TOLVANEN J, KAASINEN E, LI Y, LEHTONEN HJ, AALTONENL A (2011). MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Science*, **334**(6053):252-255.

- MALIK M, NORIAN J, MCCARTHY-KEITH D, BRITTEN J, CATHERINO, WH (2010, May). Why leiomyomas are called fibroids: the central role of extracellular matrix in symptomatic women. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 28, No. 03, pp. 169-179). Published in 2010 by Thieme Medical Publishers.
- MANGIONI S, VIGANÒ P, LATTUADA D, ABBIATI A, VIGNALI M, DI BLASIO AM (2005). Overexpression of the Wnt5b gene in leiomyoma cells: implications for a role of the Wnt signaling pathway in the uterine benign tumor. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **90**(9):5349-5355.
- MANSOORI B, MOHAMMADI A, DITZEL HJ, DUIJF PH, KHAZE V, GJERSTORFF MF, BARADARAN B (2021). HMGA2 as a critical regulator in cancer development. *Genes*, **12**(2), 269.
- MARSH EE, BULUN SE (2006). Steroid hormones and leiomyomas. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, **33**(1):59-67.
- MARSHALL LM, SPIEGELMAN D, BARBIERI RL, GOLDMAN MB, MANSON JE, COLDITZ GA, HUNTER DJ (1997). Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstetrics & Gynecology*, **90**(6): 967-973.
- MARTINEZ-JIMENEZ CP, SANDOVAL J (2015). Epigenetic crosstalk: a molecular language in human metabolic disorders. *Frontiers in Bioscience-Scholar*, **7**(1):46-57.
- MARUO T, OHARA N, WANG J, MATSUO H (2004). Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Human reproduction update*, **10**(3):207-220.
- MEHINE M, KAASINEN E, AALTONEN LA (2013). Chromothripsis in uterine leiomyomas. *The New England journal of medicine*, **369**(22):2160-2161.
- MEHINE M, KAASINEN E, HEINONEN H. R, MÄKINEN N, KÄMPIÄRVI K, SARVILINNA N, AALTONEN LA (2016). Integrated data analysis reveals uterine leiomyoma subtypes with distinct driver pathways and biomarkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**(5):1315-1320.
- MEHINE M, MÄKINEN N, HEINONEN HR, AALTONEN LA, VAHTERISTO P (2014). Genomics of uterine leiomyomas: insights from high-throughput sequencing. *Fertility and sterility*, **102**(3):621-629.
- MEI LL, WANG WJ, QIU YT, XIE XF, BAI J, SHI ZZ (2017). miR-125b-5p functions as a tumor suppressor gene partially by regulating HMGA2 in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*, **12**(10):e0185636.
- MIOZZO M, VAIRA V, SIRCHIA SM (2015). Epigenetic alterations in cancer and personalized cancer treatment. *Future oncology*, **11**(2):333-348.
- MOON NS, RONG ZENG W, PREMDAS P, SANTAGUIDA M, BÉRUBÉ G, NEPVEU A (2002). Expression of N-terminally truncated isoforms of CDP/CUX is increased in human uterine leiomyomas. *International journal of cancer*, **100**(4):429-432.

- MUNRO MG, CRITCHLEY HO, FRASER IS, FIGO Menstrual Disorders Working Group. (2011). The FIGO classification of causes of abnormal uterine bleeding in the reproductive years. *Fertility and sterility*, **95**(7):2204-2208.
- MURUGESAPILLAI D, MCCAULEY MJ, MAHER LJ, WILLIAMS MC (2017). Single-molecule studies of high-mobility group B architectural DNA bending proteins. *Biophysical reviews*, **9**(1):17-40.
- NAVARRO A, BARIANI MV, YANG Q, AL-HENDY A (2021). Understanding the impact of uterine fibroids on human endometrium function. *Frontiers in cell and developmental biology*, **9**:633180.
- NORIAN JM, MALIK M, PARKER CY, JOSEPH D, LEPPERT PC, SEGARS JH, CATHERINO WH (2009). Transforming growth factor β 3 regulates the versican variants in the extracellular matrix-rich uterine leiomyomas. *Reproductive sciences*, **16**(12):1153-1164.
- NOZU K, MINAMIKAWA S, YAMADA S, OKA M, YANAITA M, MORISADA N, IJIMA K (2017). Characterization of contiguous gene deletions in COL4A6 and COL4A5 in Alport syndrome-diffuse leiomyomatosis. *Journal of Human Genetics*, **62**(7):733-735.
- NUSSE R (2005). Wnt signaling in disease and in development. *Cell research*, **15**(1):28-32.
- OHARA N (2009). Sex steroidal modulation of collagen metabolism in uterine leiomyomas. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, **36**(1):10-11.
- OKOLO SO, GENTRY CC, PERRETT CW, MACLEAN AB (2005). Familial prevalence of uterine fibroids is associated with distinct clinical and molecular features. *Human Reproduction*, **20**(8):2321-2324.
- ONO M, YIN P, NAVARRO A, MORAVEK MB, DRUSCHITZ SA, GOTTARDI CJ, BULUN SE (2014). Inhibition of canonical WNT signaling attenuates human leiomyoma cell growth. *Fertility and sterility*, **101**(5):1441-1449.
- ORDULU Z (2016). Fibroids: genotype and phenotype. *Clinical obstetrics and gynecology*, **59**(1):25.
- OSINOVSKAYA NS, MALYSHEVA OV, SHVED NY, IVASHCHENKO TE, SULTANOV IY, EFIMOVA OA, BARANOV VS (2016). Frequency and spectrum of MED12 exon 2 mutations in multiple versus solitary uterine leiomyomas from Russian patients. *International journal of gynecological pathology*, **35**(6):509-515.
- OZTURK N, SINGH I, MEHTA A, BRAUN T, BARRETO G (2014). HMGA proteins as modulators of chromatin structure during transcriptional activation. *Frontiers in cell and developmental biology*, **2**:5.
- PARISI S, PISCITELLI S, PASSARO F, RUSSO T (2020). HMGA proteins in stemness and differentiation of embryonic and adult stem cells. *International journal of molecular sciences*, **21**(1):362.
- PARK M J, SHEN H, SPAETH JM, TOLVANEN JH, FAILOR C, KNUDTSON JF, BOYER TG (2018). Oncogenic exon 2 mutations in Mediator subunit MED12 disrupt allosteric activation of cyclin C-CDK8/19. *Journal of Biological Chemistry*, **293**(13):4870-4882.

- PARKER, KH, HORN LA, OSTRAND-ROSENBERG S (2016). High-mobility group box protein 1 promotes the survival of myeloid-derived suppressor cells by inducing autophagy. *Journal of leukocyte biology*, **100**(3):463-470.
- PARKER KH, SINHA P, HORN LA, CLEMENTS VK, YANG H, LI J, Ostrand-Rosenberg, S. (2014). HMGB1 enhances immune suppression by facilitating the differentiation and suppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*, **74**(20):5723-5733.
- PARKER WH (2007). Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertility and sterility*, **87**(4), 725-736.
- PENG Y, LASER J, SHI G, MITTAL K, MELAMED J, LEE P, WEI JJ (2008). Antiproliferative effects by Let-7 repression of high-mobility group A2 in uterine leiomyoma. *Molecular Cancer Research*, **6**(4):663-673.
- PROTIC O, TOTI P, ISLAM MS, OCCHINI R, GIANNUBILO SR, CATHERINO WH, CIARMELA P (2016). Possible involvement of inflammatory/reparative processes in the development of uterine fibroids. *Cell and tissue research*, **364**(2):415-427.
- PTACEK T, SONG C, WALKER CL, SELL SM (2007). Physical mapping of distinct 7q22 deletions in uterine leiomyoma and analysis of a recently annotated 7q22 candidate gene. *Cancer genetics and cytogenetics*, **174**(2):116-120.
- ROMINE LE, WOOD JR, LAMIA LA, PRENDERGAST P, EDWARDS DP, NARDULLI AM (1998). The high mobility group protein 1 enhances binding of the estrogen receptor DNA binding domain to the estrogen response element. *Molecular Endocrinology*, **12**(5):664-674.
- SABRY M, AL-HENDY A (2012). Innovative oral treatments of uterine leiomyoma. *Obstetrics and gynecology international*, 2012.
- SAITO E, OKAMOTO A, SAITO M, SHINOZAKI H, TAKAKURA S, YANAIHARA N, TANAKA T (2005). Genes associated with the genesis of leiomyoma of the uterus in a commonly deleted chromosomal region at 7q22. *Oncology reports*, **13**(3):469-472.
- SANGKOMKAMHANG US, LUMBIGANON P, LAOPAIBOON M, MOL BWJ (2013). Progestogens or progestogen-releasing intrauterine systems for uterine fibroids. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **(2)**.
- SATO F, MORI M, NISHI M, KUDO R, MIYAKE H (2002). Familial aggregation of uterine myomas in Japanese women. *Journal of epidemiology*, **12**(3):249-253.
- SCAFFIDI P, MISTELI T, BIANCHI ME (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, **418**(6894):191-195.
- SCHOENMAKERS EF, HUYSMANS C, VAN DE VEN WJ (1999). Allelic knockout of novel splice variants of human recombination repair gene RAD51B in t (12; 14) uterine leiomyomas. *Cancer research*, **59**(1):19-23.
- SNIEDER H, MACGREGOR AJ, SPECTOR TD (1998). Genes control the cessation of a woman's reproductive life: a twin study of hysterectomy and age at menopause. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **83**(6):1875-1880.

- SON M, PORAT A, HE M, SUURMOND J, SANTIAGO-SCHWARZ F, ANDERSSON U, DIAMOND B (2016). C1q and HMGB1 reciprocally regulate human macrophage polarization. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, **128**(18):2218-2228.
- SOZEN I, ARICI A (2002). Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. *Fertility and sterility*, **78**(1):1-12.
- STEPHENS PJ, GREENMAN CD, FU B, YANG F, BIGNELL GR, MUDIE LJ, CAMPBELL PJ (2011). Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, **144**(1):27-40.
- STEWART EA, FRIEDMAN AJ, PECK K, NOWAK RA (1994). Relative overexpression of collagen type I and collagen type III messenger ribonucleic acids by uterine leiomyomas during the proliferative phase of the menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **79**(3):900-906.
- SUNDBERG E, FASTH AE, PALMBLAD K, HARRIS HE, ANDERSSON U (2009). High mobility group box chromosomal protein 1 acts as a proliferation signal for activated T lymphocytes. *Immunobiology*, **214**(4):303-309.
- SUZUKI Y, MIMURA K, YOSHIMOTO Y, WATANABE M, OHKUBO, Y, IZAWA S, KONO K (2012). Immunogenic Tumor Cell Death Induced by Chemoradiotherapy in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma Antigen-Specific T-cell Response following Chemoradiotherapy. *Cancer research*, **72**(16):3967-3976.
- SYSSOEV KA, KULAGINA NV, CHUKHLOVIN AB, MOROZOVA EB, TOTOLIAN AA (2008). Expression of mRNA for chemokines and chemokine receptors in tissues of the myometrium and uterine leiomyoma. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **145**(1):84-89.
- TAI CT, LIN WC, CHANG WC, CHIU TH, CHEN GT (2003). Classical cadherin and catenin expression in normal myometrial tissues and uterine leiomyomas. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **64**(2):172-178.
- TAKAHARA K, KESSLER E, BINIAMINOV L, BRUSEL M, EDDY RL, JANI-SAIT S, GREENSPAN DS (1994). Type I procollagen COOH-terminal proteinase enhancer protein: identification, primary structure, and chromosomal localization of the cognate human gene (PCOLCE). *Journal of Biological Chemistry*, **269**(42), 26280-26285.
- TAL R, SEGARS JH (2014). The role of angiogenic factors in fibroid pathogenesis: potential implications for future therapy. *Human reproduction update*, **20**(2):194-216.
- TANWAR PS, LEE HJ, ZHANG L, ZUKERBERG LR, TAKETO MM, RUEDA BR, TEIXEIRA JM (2009). Constitutive activation of Beta-catenin in uterine stroma and smooth muscle leads to the development of mesenchymal tumors in mice. *Biology of reproduction*, **81**(3):545-552.
- TRISTAN M, OROZCO LJ, STEED A, RAMIREZ-MORERA A, STONE P (2012). Mifepristone for uterine fibroids. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (8).
- VALIMAKI N, KUISMA H, PASANEN A, HEIKINHEIMO O, SJOBERG J, BUTZOW R, AALTONEN LA (2018). Genetic predisposition to uterine leiomyoma is determined by loci for genitourinary development and genome stability. *Elife*, **7**:e37110.

- VAN VOORHIS BJ, ROMITTI PA, JONES MP (2002). Family history as a risk factor for development of uterine leiomyomas. Results of a pilot study. *The Journal of Reproductive Medicine*, **47**(8):663-669.
- VANHARANTA S, WORTHAM NC, LANGFORD C, EL-BAHRAWY M, VAN DER SPUY Z, SJOBERG J, AALTONEN LA (2007). Definition of a minimal region of deletion of chromosome 7 in uterine leiomyomas by tiling-path microarray CGH and mutation analysis of known genes in this region. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **46**(5):451-458.
- VANNI R, SCHOENMAKERS EF, ANDRIA M (1999). Deletion 7q in uterine leiomyoma: fluorescence in situ hybridization characterization on primary cytogenetic preparations. *Cancer genetics and cytogenetics*, **113**(2):183-187.
- VIKHYAEVA EM, KHODZHAIEVA ZS, FANTSCHENKO ND (1995). Familial predisposition to uterine leiomyomas. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, **51**(2):127-131.
- WALKER CL, STEWART EA (2005). Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science*, **308**(5728):1589-1592.
- WANG T, ZHANG X, OBIJURU L, LASER J, ARIS V, LEE P, WEI, JJ (2007). A micro-RNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **46**(4):336-347.
- WANG Z, YANG C, LI L, JIN X, ZHANG Z, ZHENG H, HUANG, J (2020). Tumor-derived HMGB1 induces CD62Ldim neutrophil polarization and promotes lung metastasis in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis*, **9**(9):1-17.
- WEND P, HOLLAND JD, ZIEBOLD U, BIRCHMEIR W (2010). Wnt signaling in stem and cancer stem cells. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. **21**, No. 8, pp. 855-863). Academic Press.
- WISE LA, RUIZ-NARVAEZ EA, PALMER JR, COZIER YC, TANDON A, PATTERSON N, REICH D (2012). African ancestry and genetic risk for uterine leiomyomata. *American journal of epidemiology*, **176**(12):1159-1168.
- XING YP, POWELL WL, MORTON CC (1997). The del (7q) subgroup in uterine leiomyomata: genetic and biologic characteristics: Further evidence for the secondary nature of cytogenetic abnormalities in the pathobiology of uterine leiomyomata. *Cancer genetics and cytogenetics*, **98**(1):69-74.
- XU J, JIANG Y, WANG J, SHI X, LIU Q, LIU Z, FAN J (2014). Macrophage endocytosis of high-mobility group box 1 triggers pyroptosis. *Cell Death & Differentiation*, **21**(8):1229-1239.
- YANG Q, MAS A, DIAMOND MP, AL-HENDY A (2016). The mechanism and function of epigenetics in uterine leiomyoma development. *Reproductive Sciences*, **23**(2):163-175.
- YOUNG RH (2014). WHO classification of tumours of female reproductive organs. *Kurman RJ Carcangiu ML Herrington CS Young RH Monodermal teratomas and somatic-type tumours arising from a dermoid cyst*, 63-66.
- YU L, SAILE K, SWARTZ CD, HE H, ZHENG X, KISSLING GE, DIXON D (2008). Differential expression of receptor tyrosine kinases (RTKs) and IGF-I pathway activation in human uterine leiomyomas. *Molecular medicine*, **14**(5):264-275.

- ZANNOTTI A, GRECO S, PELLEGRINO P, GIAN TOMASSI F, DELLI CARPINI G, GOTERI G, CIARME LA, P (2021). Macrophages and Immune Responses in Uterine Fibroids. *Cells*, **10**(5):982.
- ZENG WR, SCHERER SW, KOUTSILIERIS M, HUIZENGA JJ, FILTEAU F, TSUI LC, NEPVEU A (1997). Loss of heterozygosity and reduced expression of the CUTL1 gene in uterine leiomyomas. *Oncogene*, **14**(19):2355-2365.
- ZHA C, MENG X, LI L, MI S, QIAN D, LI Z, LIU Y (2020). Neutrophil extracellular traps mediate the crosstalk between glioma progression and the tumor microenvironment via the HMGB1/RAGE/IL-8 axis. *Cancer Biology & Medicine*, **17**(1):154.
- ZHANG XN, LAM AT, CHENG Q, COUROUBLE VV, STRUTZENBERG TS, LI J, ZHANG Y (2022). Discovery of an NAD⁺ analogue with enhanced specificity for PARP1. *Chemical science*, **13**(7):1982-1991.
- ZHOU J, MOCHIZUKI T, SMEETS H, ANTIGNAC C, LAURILA P, DE PAEPE A, REEDERS, ST (1993). Deletion of the paired $\alpha 5$ (IV) and $\alpha 6$ (IV) collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science*, **261**(5125):1167-1169.

EKLER

Ek-1- Etik Kurul Onay Belgesi



İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARARI



Tarih: 18.07.2022

Sayın
Prof.Dr.Asuman SUNGUROĞLU
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Prof.Dr.Fulya TEKŞEN'in sorumluluğunda yürütülmesi planlanan "**Uterin Fibroidi Olan ve Olmayan Olgularda HMGA2 (Yüksek Hareketli Grup A2) Geninin Ekspresyon ve Protein Düzeyinin Değerlendirilmesi**" başlıklı tez çalışmasının Prof.Dr.Asuman SUNGUROĞLU'nun sorumluluğunda yürütülmesi, Prof.Dr.Fulya TEKŞEN'in çalışmaya araştırmacı olarak katılması ve incelenecek genlere HMGB1, beta katenin, Vegf, Siklin D, let7 ve lin28 genlerinin RT-PCR ile analizinin eklenmesine ilişkin belgeler incelenerek, etik açıdan uygun bulunmuştur.

Karar no: İ07-391-22

Prof.Dr.Hakan ERGÜN
İnsan Araştırmaları Etik Kurulu
Başkanı