

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Uterus Myomunda Elektron Transport Zincirinden Sorumlu Genlerin Ekspresyon
Düzeylerinin Araştırılması

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimyager

Akile TUNCAL

DANIŞMAN

Prof. Dr. Handan AK

İZMİR

2013

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan (Danışman)

Prof. Dr. Handan AK

Handan

Üye

Prof. Dr. Eser SÖZMEN

Eser

Üye

Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ

Bahattin

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: *18.06.*/2013

ÖNSÖZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D.'nda yüksek lisans eğitimi aldığım süre boyunca yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı bana her konuda yol gösterici olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Handan AK'a,

Bu çalışma süresince çeşitli kaynakları sağlayan, değerli tavsiyeleri ile bana yol gösteren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. H. Hakan AYDIN'a,

E.Ü.T.F. Tıbbi Biyokimya A.D.'nda öğretim üyeleri Prof. Dr. Eser SÖZMEN, Prof. Dr. Taner ONAT, Prof. Dr. Nevbahar TURGAN, Prof. Dr. Ferhan SAĞIN, Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN, Prof. Dr. Yasemin AKÇAY, Doç. Dr. Mert ÖZGÖNÜL, Doç. Dr. Ebru SEZER'e,

E.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.'dan Prof. Dr. Niyazi AŞKAR, Doç. Dr. Ahmet Mete ERGENOĞLU, Doç. Dr. Ahmet Özgür YENİEL ve Uzm. Dr. Ali AKDEMİR'e,

Tez çalışmam sırasında yardımlarını ve zamanını hiçbir zaman esirgemeyen ayrıca bilgi, deneyim ve desteklerini özveriyle aktaran büyük yardımlarını gördüğüm Uzm. Biyokimyager Ali Burak ÖZKAYA'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan zevk aldığım, her konuda desteğini gördüğüm ve ayrıca eğitimimin devamı için gerekli motivasyonu sağlayan değerli arkadaşım Çiğdem ASLAN'a,

Sevgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen büyük yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşım Serhat PİRLİ'ye,

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan eğitim hayatım süresince maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme,

En içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği 13-TIP-005 nolu BAP projesi aracılığıyla sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İzmir, 2013

Akile TUNCAL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİL DİZİNİ	xv
TABLO DİZİNİ	xvi
ŞEKİL KAYNAKLARI	xviii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Uterus Myomu.....	2
2.2. Epidemiyolojik Risk Faktörleri.....	2
2.3. Myom Tipleri.....	4
2.3.1. Myomda İkincil Değişiklikler.....	6
2.4. Patoloji.....	8
2.4.1. Makroskopik Görünüm.....	8
2.4.2. Mikroskopik Görünüm.....	9
2.5. Semptomlar.....	11
2.6. Etiyopatogenez.....	13
2.6.1. Genetik Faktörler.....	14
2.6.2. Hormonal Faktörler.....	15
2.6.3. Büyüme Faktörleri.....	16

2.7. Gebelik ve Myom.....	18
2.8. İnfertilite ve Myom.....	18
2.9. Myomda Tanı.....	19
2.10. Myomlar ve Mitokondriyal Enerji Metabolizması Arasındaki İlişki.....	21
2.10.1. Elektron Transport Zinciri.....	23
2.10.2. Mitokondri.....	24
2.10.3. Zincir Organizasyonu.....	25
2.10.4. Elektron Transport Zinciri Reaksiyonları.....	26
2.10.5. Elektron Transport Zincirine İlişkin Bozukluklar.....	28
3. MATERYAL ve METOD.....	31
3.1. MATERYAL.....	31
3.1.1. Kullanılan Kitler.....	31
3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	31
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	32
3.2. METOD	33
3.2.1. Hasta ve Kontrol Grubundan Örneklerin Eldesi.....	34
3.2.2. Doku Homojenizasyonu ve Total RNA İzolasyonu.....	34
3.2.2.1. Homojenizasyon.....	34
3.2.2.2. RNA İzolasyonu.....	35
3.2.2.3. RNA Saflığının Belirlenmesi ve RNA Bütünlüğü.....	37
3.2.3. ‘Human Mitochondrial Energy Metabolism Array’ Kiti ile Real-Time PCR Analizi.....	38

3.2.3.1. İzole Edilmiş Total RNA'dan cDNA Sentezi.....	38
3.2.4. Verilerin Data Analizi ve Yorumlanması.....	62
4. BULGULAR.....	66
4.1. Demografik Bulgular.....	66
4.2. Doku Homojenizasyonu ve RNA İzolasyonu Sonuçları.....	67
4.3. Real-Time PCR Analizi Sonuçları.....	74
4.4. Sonuçların Analizi ve Yorumlanması.....	81
5. TARTIŞMA	92
ÖZET.....	97
ABSTRACT.....	99
KAYNAKLAR.....	101
ÖZGEÇMİŞ.....	124

KISALTMALAR DİZİNİ

AgNOR: Argirofilik (*Argyrophilic*) nükleolar organize edici bölge

ATP: Adenozin Trifosfat

ATP12A: ATPaz, H⁺/K⁺ taşıması, gastrik olmayan, alfa polipeptit

ATP4A: ATPaz, H⁺/K⁺ değişimi, gastrik, alfa polipeptit

ATP4B: ATPaz, H⁺/K⁺ taşınması, beta polipeptit

ATP5A1: ATP sentaz, H⁺ taşıması, mitokondriyal F1 kompleks, alfa alt birim 1, kardiyak kası

ATP5B: ATP sentaz, H⁺ taşıması, mitokondriyal F1 kompleks, beta polipeptit

ATP5C1: ATP sentaz, H⁺ taşıması, mitokondriyal F1 kompleks, gama polipeptit 1

ATP5F1: ATP sentaz, H⁺ taşıması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim B1

ATP5G1: ATP sentaz, H⁺ taşıması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim C1 (alt birim 9)

ATP5G2: ATP sentaz, H⁺ taşıması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim C2 (alt birim 9)

ATP5G3: ATP sentaz, H⁺ taşıması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim C3 (alt birim 9)

ATP5H: ATP sentaz, H⁺ taşıması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim d

ATP5I: ATP sentaz, H⁺ taşıması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim E

ATP5J: ATP sentaz, H⁺ taşıması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim F6

ATP5J2: ATP sentaz, H⁺ taşıması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim F2

ATP5L: ATP sentaz, H⁺ taşıması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim G

ATP5O: ATP sentaz, H⁺ taşıması, mitokondriyal F1 kompleks, O alt birim

ATP6V0A2: ATPaz, H⁺ taşıması, lizozomal V0 alt birim a2

ATP6V0D2: ATPaz, H⁺ taşıması, lizozomal, V0 alt birim d2

ATP6V1C2: ATPaz, H⁺ taşıması, lizozomal, V1 alt birim C2

ATP6V1E2: ATPaz, H⁺ taşıması, lizozomal, V1 alt birim E2

ATP6V1G3: ATPaz, H⁺ taşıması, lizozomal, V1 alt birim G3

BCS1L: BC1 (ubikinol-sitokrom c redüktaz) sentez- benzeri

cdNA: Tamamlayıcı (komplementer) deoksiribonükleik asit

COX2: Siklooksijenaz 2

COX4I1: Sitokrom c oksidaz alt birim IV izoform 1

COX4I2: Sitokrom c oksidaz alt birim IV izoform 2

COX5A: Sitokrom c oksidaz alt birim Va

COX5B: Sitokrom c oksidaz alt birim Vb

COX6A1: Sitokrom c oksidaz alt birim VIa polipeptit 1

COX6A2: Sitokrom c oksidaz alt birim VIa polipeptit 2

COX6B1: Sitokrom c oksidaz alt birim VIb polipeptit 1

COX6B2: Sitokrom c oksidaz alt birim VIb polipeptit 2

COX6C: Sitokrom c oksidaz alt birim VIc

COX7A2: Sitokrom c oksidaz alt birim VIIa polipeptit 2 (karaciğer)

COX7A2L: Sitokrom c oksidaz alt birim VIIa polipeptit 2 benzeri

COX7B: Sitokrom c oksidaz alt birim VIIb

COX8A: Sitokrom c oksidaz alt birim VIIIA (ubikuitöz)

COX8C: Sitokrom c oksidaz alt birim VIIC

CYC1: Sitokrom c-1

EGF: Epidermal büyüme faktörü

ER α : Östrojen reseptör α

ER β : Östrojen reseptör β

ERK 1: Ekstrasellüler sinyal regüle edici kinaz 1 (*Extracellular-signal-regulated kinase 1*)

ERK 2: Ekstrasellüler sinyal regüle edici kinaz 2 (*Extracellular-signal-regulated kinase 2*)

ETS: Elektron transport zinciri

FADH2: Flavin adenin dinükleotid

FMN: Flavin mononükleotid

GnRH: Gonadotropin releasing hormon

HRT: Hormon replasman tedavisi

Ki 67: Monoklonal antikör Ki 67 tarafından tanımlanmış antijen

LHPP: Fosfolizin fosfohistidin inorganik pirofosfat fosfataz

MAPK1: Mitojen aktive edici protein kinaz 1

MAPK3: Mitojen aktive edici protein kinaz 3

MED12: Mediyatör kompleks alt birim 12

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid

NDUFA1: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 1

NDUFA10: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 10

NDUFA11: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 11

NDUFA2: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt komplek, 2

NDUFA3: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks 3

NDUFA4: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 4

NDUFA5: NADH dehidrogenaz (ubikino) 1 alfa alt kompleks, 5

NDUFA6: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 6

NDUFA7: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 7

NDUFA8: NADH dehidrogenaz (ubikinon 1 alfa alt kompleks, 8

NDUFAB1: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1, alfa/beta alt kompleks, 1

NDUFB10: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 10

NDUFB2: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 2

NDUFB3: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 3

NDUFB4: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 4

NDUFB5: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 5

NDUFB6: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 6

NDUFB7: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 7

NDUFB8: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 8

NDUFB9: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 9

NDUFC1: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1, alt kompleks bilinmeyen, 1

NDUFC2: NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1, alt kompleks bilinmeyen, 2

NDUFS1: NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 1, (NADH-koenzim Q redüktaz)

NDUFS2: NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 2, (NADH-koenzim Q redüktaz)

NDUFS3: NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 3, (NADH-koenzim Q redüktaz)

NDUFS4: NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 4, (NADH-koenzim Q redüktaz)

NDUFS5: NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 5, (NADH-koenzim Q redüktaz)

NDUFS6: NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 6, (NADH-koenzim Q redüktaz)

NDUFS7: NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 7, (NADH-koenzim Q redüktaz)

NDUFS8: NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 8, (NADH-koenzim Q redüktaz)

NDUFV1: NADH dehidrogenaz (ubikinon) flavoprotein 1

NDUFV2: NADH dehidrogenaz (ubikinon) flavoprotein 2

NDUFV3: NADH dehidrogenaz (ubikinon) flavoprotein 3

OXA1L: Oksidaz (sitokrom c) birleştirilmiş 1- benzeri

P53 (TP53): Tümör protein 53

PBS : Fosfat tuz tamponu (*Phosphate Buffered Saline*)

PPA1: Pirofosfataz (inorganik) 1

PPA2: Pirofosfataz (inorganik) 2

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif oksijen türleri

SDHA: Süksinat dehidrogenaz kompleks, alt birim A, flavoprotein

SDHB: Süksinat dehidrogenaz kompleks, alt birim B, demir sülfür

SDHC: Süksinat dehidrogenaz kompleks, alt birim C, integral membran protein

SDHD: Süksinat dehidrogenaz kompleks, alt birim D, integral membrane protein

TCA: Trikarboksilik asit

TGF α : Transforme edici büyüme faktörü α

TGF β : Transforme edici büyüme faktörü β

UQCR11: Ubikinol - sitokrom c redüktaz, kompleks III alt birim XI

UQCRC1: Ubikinol-sitokrom c redüktaz çekirdek protein I

UQCRC2: Ubikinol - sitokrom c redüktaz çekirdek protein II

UQCRFS1: Ubikinol-sitokrom c redüktaz, Rieske demir-sülfür polipeptit 1

UQCRH: Ubikinol-sitokrom c redüktaz bağlı protein

UQCRQ: Ubikinol-sitokrom c redüktaz, kompleks III alt birim VII

USG: Ultrasonografi

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Myom Tipleri.....	4
Şekil 2. Myomun Makroskopik Görünümü.....	8
Şekil 3. Myomun Mikroskopik Karakterizasyonu.....	9
Şekil 4. Kalsifiye Sınırları ile İntramural bir Myomun Transvajinal Sonogramı.....	20
Şekil 5. Elektron Transport Zinciri İle İlişkili Genlerin Sınıflandırılması.....	22
Şekil 6. Mitokondrinin Enerji Mekanizması.....	24
Şekil 7. Elektron Transport Zincirinde Elektron Taşıyıcı Kompleksler.....	26
Şekil 8. 'Human Mitochondrial Energy Metabolism Array' ile Yapılan Real Time PCR Basamakları.....	33
Şekil 9. Elektroforez Sonucu Elde Edilen Bantlar.....	70
Şekil 10. Örneklere ait RNA Elektroferogram Pik Grafikleri.....	73
Şekil 11. Analiz Sonucu Anlamlı Çıkan Gen Listesi.....	89
Şekil 12. $P < 0,1$ ve $P < 0,05$ Anlamlılık Düzeyiyle Ekspresyon Değişimi Gösteren Genlerin Grafiği.....	90
Şekil 13. $P < 0,05$ Anlamlılık Düzeyiyle Ekspresyon Değişimi Gösteren Genlerin Grafiği.....	91

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Myomda Semptomlar.....	12
Tablo 2. RNeasy Mini Kit İçeriği.....	36
Tablo 3. RT ² First Strand Kit İçeriği.....	38
Tablo 4. Genomik DNA Eliminasyon Karışımı.....	39
Tablo 5. Reverse -Transkripsiyon Karışımı.....	39
Tablo 6. Elektron Transport Zinciri ile İlişkili 84 Gen, Housekeeping Genler ve Kontrol Genleri.....	40
Tablo 7. ETZ'den Sorumlu Genler ve Fonksiyonları.....	42
Tablo 8. PCR Bileşenleri Karışımı.....	60
Tablo 9. PCR Çalışma Protokolü.....	61
Tablo 10. Hastaların Demografik Bulguları.....	66
Tablo 11. E.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.'na Başvuran Hastalardan Elde Edilen Dokuların Ağırlıkları.....	67
Tablo 12. Homojenizasyon ve Total RNA İzolasyonu Sonuçları.....	68
Tablo 13. RNA Bütünlüğüne için Yapılan Seyreltme İşlemleri.....	69
Tablo 14. RNA Bütünlüğü Analizi Sonucu Elde Edilen RIN Değerleri.....	73
Tablo 15. cDNA Sentez Sonuçları.....	74
Tablo 16. <i>Threshold</i> Değeri 0,2 iken Elde Edilen Ct Değerleri.....	75
Tablo 17. <i>Threshold</i> Değeri 0,4 iken Elde Edilen Ct Değerleri.....	76

Tablo 18. <i>Threshold</i> Değeri 0,5 iken Elde Edilen Ct Değerleri.....	76
Tablo 19. <i>Threshold</i> Değeri 0,6 iken Elde Edilen Ct Değerleri.....	77
Tablo 20. <i>Threshold</i> Değeri 0,8 iken Elde Edilen Ct Değerleri.....	77
Tablo 21. Tüm Hasta ve Kontrol Örneklerinin Ct Değerleri.....	78
Tablo 22. Tüm Örneklerin Ortalama Ct Değerleri ve Standart Sapması.....	82
Tablo 23. Tüm Örneklerin Kontrol Grup ile Karşılaştırılmış Kat Değişim Değerleri.....	84
Tablo 24. Genlerin Kat Regülasyon ve P - Anlamlılık Değerleri.....	87

ŞEKİL KAYNAKLARI

Şekil 1. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. *Williams Jinekoloji*. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.200.

Şekil 2. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. *Williams Jinekoloji*. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.199.

Şekil 3. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. *Williams Jinekoloji*. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.199.

Şekil 4. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. *Williams Jinekoloji*. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.203.

Şekil 5. Alexander P., (2013) et al., Electron Transport Chain Pathway, *From Wikipedia, the free encyclopedia*, Pathway:WP542

Şekil 6. Kathryn, V. T., et al. (2010 April), Mitochondrial electron transport chain generates superoxide. From: Inter-connection between mitochondria and HIFs. *J Cell Mol Med*; 14(4): 795–804.

Şekil 7. Ou, Y. Y., et al. (2013), Discrimination of Metal-Binding Sites in Electron Transporters Based on RBF Networks with PSSM Profiles and Significant Amino Acid Pairs, *PLoS One*; 8(2):e46572.

Şekil 8. (02/2012), RT² Profiler PCR Array Handbook, *Qiagen*, s. 19.

BÖLÜM I

1. GİRİŞ

Fibroid veya myom olarak bilinen uterin leiomyomlar uterusun iyi huylu tümörleridir. Kliniksel olarak reproduktif çağıdaki kadınların % 25'inde görülmektedir [1]. Myomlar düz kas hücreleri ile değişik miktarlarda fibröz doku ve kollajen matriksten ibaret iyi huylu mezenşimal tümörlerdir [2]. Myomlar en sık histeroktemi sebebidir [3]. Myomlar genelde asemptomatiktir fakat çoğu zaman büyüme ile orantılı olarak ağır ve normal olmayan kanamalar, pelvik bası hissi veya pelvik ağrılar, infertilite, tekrarlayan abortuslar gibi semptomlar ile ortaya çıkabilir [4].

Myomların oluşum mekanizması ile ilgili çeşitli hipotezler bulunmaktadır. Fakat bu hipotezler uterus myomunun oluşum sebebini net bir şekilde açıklayamamaktadır [5]. Myomlar uterus düz kas hücrelerinden köken alırlar, her bir myomun tek bir hücreden köken aldığını destekleyen bazı bulguları bulunmaktadır [6]. Bu konuda yapılan bir *glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G-6-PD) izoenzim* çalışması her bir myomun tek bir monoklonal hücreden köken aldığını göstermiştir [7].

Bugüne kadar uterus myomu olan hastalarda gerçekleştirilen ekspresyon değişimi çalışmalarında enerji metabolizmasında rol oynayan elektron transport zinciri genlerinin ekspresyon düzeyleri henüz araştırılmamıştır [8].

Bu tez çalışmasının amacı, uterus myomunda, elektron transport zincirinden sorumlu başlıca 84 genin ekspresyon düzey değişimlerinin araştırılarak hastalıkla ilişkisini belirlemektir. Bu sebeple uterus myomu etiyopatolojisinde yer alan genlerin ekspresyonlarının belirlenmesi erken tanı ve tedavi açısından yeni ufuklar açabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. UTERUS MYOMU

Uterus myomları, uterusun en sık karşılaşılan tümörleridir. Myomlar; myometriyumun düz kas ve bağ dokusu hücrelerinden kaynaklanan benign tümörü olup fibroid, fibromyom, myom ve leiomyom gibi terimlerle tanımlanmaktadır [8]. Klinik olarak üreme çağındaki kadınların yaklaşık % 20-25'inde görülmektedir ve en sık histerektomi nedenidir [1] [9]. Myomaların 25-44 yaş arası kadınlarda yıllık insidansı 1000'de 12,8 olarak bildirilmiştir [10]. Borgfeldt ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, 25-40 yaş arası asemptomatik kadınlar ultrasonografi eşliğinde değerlendirilmiş, myom prevalansının bu kadınlarda % 5,4 olduğu ve prevalansın yaşla birlikte arttığı saptanmıştır [11]. Beyazlarda siyalara oranla 3 kat daha sık görülen myomlar, kadınların % 60' ında 45 yaşından sonra semptom vermeksizin çoğunlukla benign olarak bulunmaktadır [12]. Uterus myomlu olguların aile öykülerinde de myoma sıklıkla rastlanmaktadır [13].

2.2. EPİDEMİYOLOJİK RİSK FAKTÖRLERİ

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, myomlar ile ilgili olarak ırk, menstrüel öykü, fertilité öyküsü, hormon kullanımı, kilo alımı, sigara içimi, diyet, fiziksel aktivite ve aile öyküsü olmak üzere çeşitli risk faktörleri ortaya koymaktadır [14].

İrk: Faerstein ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada siyah kadınlarda myom sıklığının beyazlara kıyasla 3-9 kat daha fazla olduğunu bildirmiştir [15].

Menstrüel siklus: Tanı metoduna bağılı olmaksızın myom riski kadının menarş yaşı azaldıkça artar [15].

Fertilite öyküsü: Myom riski, canlı çocuk doğuran kadınlarda daha az olup canlı çocuk sayısı arttıkça daha da azalmaktadır. [16] 4-5 çocuk doğuran kadınlarda risk, nullipar kadınlara göre % 70 - 80 daha azdır [17, 18]. Öte yandan çok sayıda çalışmada infertilite öyküsünün myomlar için bir risk faktörü olduğu rapor edilmiştir [15, 18, 19]. Myomlar olguların % 10 - % 15'unda infertiliteye neden olurlar [18, 20].

Eksojen hormon kullanımı: Oral kontraseptif kullanımı ile myom riski arasındaki ilişki tartışmalıdır. Bazı çalışmalar, aralarında çok az veya hiç ilişki bulamazken bazıları artmış riski göstermektedir. Hormon replasman tedavisinin (HRT) postmenopozal kadınlarda myom büyüklüğü ve semptomları üzerine etkilerini değerlendiren az sayıdaki çalışmanın sonuçları çelişkilidir. Ikomi ve arkadaşları postmenopozal hormon replasman tedavisi alan olgularda almayanlara göre myom riskinin 1.6 - 6 kat arttığı ve bu artışın 8 yıl veya daha uzun süreli HRT kullanımı ile birlikte olduğunu bildirmiştir [18]. Palomba ve arkadaşları transdermal HRT alan postmenopozal kadınlarda myom büyüklüğünün önemli oranda arttığını, buna karşın oral HRT kullananlarda bu farkın olmadığını gözlemlemiştir [21].

Obezite ve sigara içimi: Myom riski zayıf kadınlarla karşılaştırıldığında kilolu kadınlarda 2-3 kat daha fazladır ve doğurganlık yıllarında kilo alımı ile artmaktadır. [17] Sigara içenlerde uterin leiomyom riskinin % 20 - 50 azaldığı gösterilmiştir [5].

Fiziksel aktivite ve diyet: Hem egzersiz alışkanlıkları hem de diyet bu tümörlerin gelişimi ile ilgili olabilir. Atletlerde yaşam boyu benign uterin tümör gelişim prevalansı düşüktür [22]. Fazla miktarda kırmızı et ve salam tüketen kadınlarda, histolojik olarak teyid edilmiş 10 cm'den büyük uterin leiomyom bulunma riski 2 kat yüksek iken aşırı miktarda yeşil sebze tüketen kadınlarda ise risk % 50 azalmıştır [23].

Aile Öyküsü: Aile ve ikiz çalışmaları, birinci derece akrabaları etkileyen kadınlarda myom oluşum riskinin yaklaşık iki kat daha fazla olduğunu göstermiştir [24].

2.3. MYOM TIPLERİ

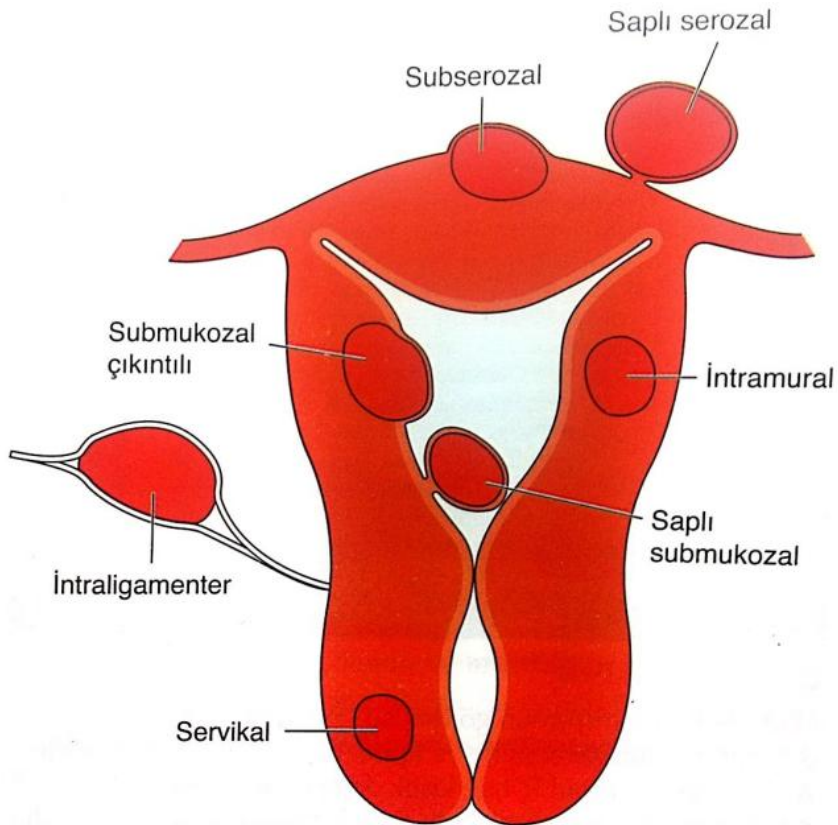
Myomlar uterustaki anatomik lokalizasyonlarına göre başlıca 4 tipe ayrılırlar. Myomlar uterusun herhangi bir yerinde olabilirler [7] [25]. (Şekil 1)

1-Subseroz

2-İntramural

3-Submüköz

4-Servikal



Şekil 1. Myom Tipleri (Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.200.)

Subseroz Myomlar: Serozanın hemen altında bulunurlar. Uterusun asimetrik şekilde büyümesinde önemli rolleri vardır. Bu tümörlerin semptom vermeksizin bir sapla peritoneal kaviteye doğru çok büyük boyutlarda büyüme eğilimleri vardır. Peritoneal kaviteye büyüme sonucunda abdominal organlarla çoğunlukla da omentum ve mezenter ile damarsal ilişkiye girip bu organlardan beslendiğinde parazitik myom adını alır. Yanlarda broad ligamentin iki yaprağı arasında gelişmesi durumunda intraligamenter myom adını alır. İntraligamenter myomlar büyük çaplara ulaştığında üretere pelvik kan damarlarına bası yaparak bunlarla ilgili patolojilerin oluşmasına yol açarlar [28].

İntramural Myomlar: Uterus duvarı içerisinde yer alan ve en sık görülen myom tipidir. Genellikle uterusun myometriumu içerisinde izole ve kapsülsüz nodüller olarak yerleştiklerinde uterusun seroza ve endometriuma çıkıntı yapmazlar. Bu tümörler büyüdüklerinde uterusun kavitede düzensizliklere veya uterusun eksternal yüzünde çıkıntılara hatta saplı myomların gelişmesine de neden olabilirler. Menoraji ve infertilite nedeni olabilirler [28].

Submukoz Myomlar: Endometriumu hemen altında yerleşen bu tümörler uterusun kaviteye doğru veya saplı şekilde büyüyerek serviksten vajene çıkıp, vajene doğmuş myom şeklini de alabilirler. Bu tümörler endometriumda düzensiz gelişim göstererek anormal uterusun kanamalarının meydana gelmesinde erken rol oynarlar [28].

Servikal Myomlar: Serviksın muskuler yapısından orijin alan nadir tümörlerdir. Hem parametriumu hem de vajene doğru gelişim gösterme özelliği vardır. Mesane boyuna bası yapmaları halinde dizüri, sık idrar yapma ve inkontinansa, parametriuma doğru büyüme göstermeleri halinde pelvik kan ve lenf akımında staza, üreterlerin basısı sonucunda hidroüreter daha sonra da hidronefroza, gebelik

durumunda da distosilere neden olabileceği düşünölmelidir. Ayrıca kanama, infertilite ve enfeksiyon nedeni olabilirler [28].

Myomlar tek veya birden çok olabilir. Çoğu myom rahim kas tabakada intramural yerde başlamaktadır. Daha fazla büyüme ile, bazı lezyonlar rahim dışına doğru veya iç boşluğuna doğru gelişebilir. Myom içinde ikincil değişiklikler gelişebilir [28].

2.3.1. Myomda İkincil Değişiklikler

Bu değişiklikler benign ya da malign yönde olabilir.

1- Benign Değişiklikler

a- Atrofik Dejenerasyon: Gebelikten sonra ve menapozda tümör ölçüsünde gerileme meydana gelmesi ile klinikte görölen semptom ve bulguların kaybolmasına sebep olmaktadır [28].

b- Hyalin Dejenerasyon: Genellikle asemptomatik eski myomlar olup beyaz renkte, ancak sarı, yumuşak ve sıklıkla jelatinöz alanları içeren hyalin dejenerasyon gösterirler. Myomda en sık değişiklik hyalin dejenerasyondur. Hyalinize alandaki kesi yüzeyi düzgün ve homojendir ve geri kalan myomdaki sarmal benzeri düzeni göstermez. En küçükleri dışında neredeyse tüm myomlar dağılmış hyalin dejenerasyon alanları içermektedir. Sonuçta bunların sıvılaşmasıyla berrak sıvı veya jelatinimsi materyal ile dolu kistik kaviteler oluşur [28].

c- Kistik Dejenerasyon : Genellikle nekroz veya hyalen dejenerasyonu takiben meydana gelen likefaksiyon sonrasında çok sayıda sünger görünümlü ve düzensiz küçük boşluklar şeklindeki şekillenmeler çıplak gözle görölmektedir. Kistik dejenerasyona uğramış tümör dokusu palpasyonla yumuşak kıvamlı olarak algılanabilmektedir [28].

d- Kalsifik Dejenerasyon : Sıklıkla subseröz myomlarda gözlenir. Genellikle postmenapozal kadınlarda çoğunlukla vasküler obstrüksiyon sonucunda sirkülasyonun etkilenmesine bağlı olarak kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfatın tümör dokusunda çökmesiyle kalsifik dejenerasyon meydana gelmektedir [28].

e- Septik Dejenerasyon: Dolaşım bozukluğu, tümör merkezinde nekroza yol açabilir bunu enfeksiyon takip edebilir. Septik dejenerasyon ateş, pelviste hassasiyet, şiddetli ağrı ve akut batın tablosunun meydana gelmesine sebep olabilmektedir [28].

f- Kırmızı Dejenerasyon: Genellikle gebeliğin bir komplikasyonu olarak görülebilirse de herhangi bir zamanda ve menapoza yakın bir süreçte ortaya çıkabilmektedir. Venöz trombozis ve intertisiyel hemoraji ile birlikte olan konjesyon, myomdaki renk değişiminden sorumludur.

g- Yağlı Dejenerasyon: Hyalin ve kistik değişikliği takiben oluşur. Nadir ve asemptomatik bir dejenerasyondur.

h. Nekrotik Dejenerasyon: Saplı myomların torsiyonu sonrasında akut karın ağrısı, pelvik hassasiyet, ateş ve lökositozla karakterize klinik duruma neden olmaktadır [26].

2- Malign Değişiklikler:

Gerçek insidansı bilinmemekte olup malign değişim riski kaynaklarda % 0,1 - 0,5 arasında verilmektedir [27]. Genel olarak subseröz myom, submüköz myoma göre daha çok fibröz doku içerir. Submüköz myom subseroza göre daha çok düz kas içerir. Sarkomatöz değişiklik submüköz myomlarda daha sık görülür.

2.4. PATOLOJİ

2.4.1. Makroskopik Görünüm

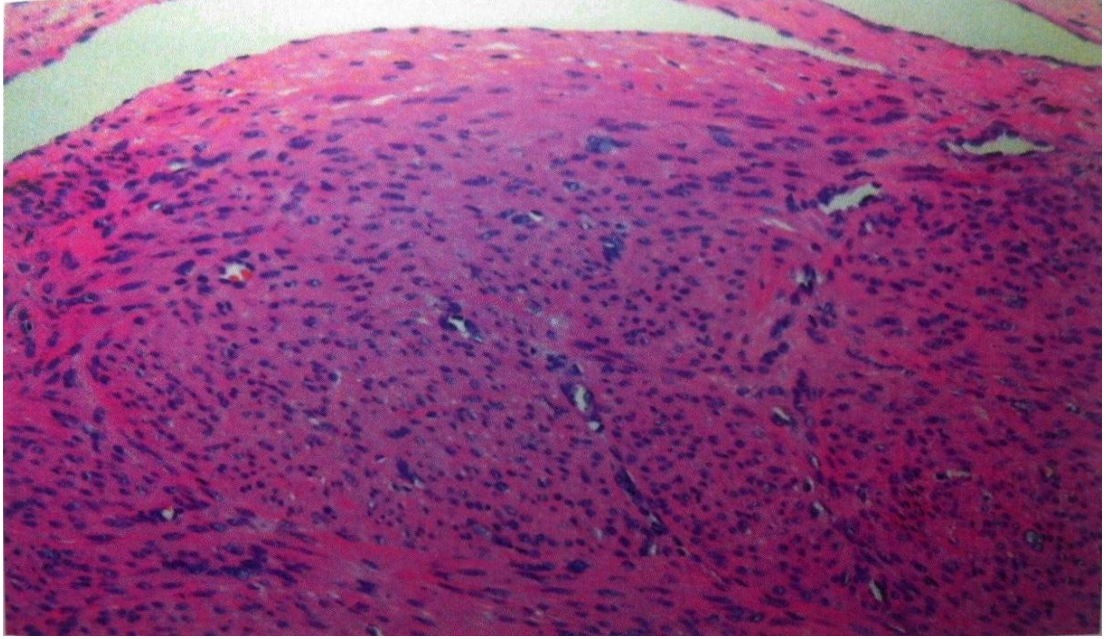
Makroskopik olarak genellikle küre şeklinde, iyi sınırlı, myometriümdan daha açık renkte, beyaz sert lezyonlar olup myometrial kesi yüzeyinden çıkıntılıdır. Kesit yüzey, genellikle halka dizilişli, iç içe geçmiş düz adele liflerinden ibarettir. Etraflarındaki normal adele dokusundan areolar doku ve bakıya uğramış myometriümun teşkil ettiği yalancı kapsül vasıtasıyla kolay bir şekilde ayrılabilirler [7]. (Şekil 2)



Şekil 2. Myomun Makroskopik Görünümü, submuköz fibroid içinde kistik dejenerasyon (Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.199.)

2.4.2. Mikroskopik Görünüm

Mikroskopta küçük büyütmede iğ şekilli düz adele hücreleri demetler halinde birbirleri ile dik açı teşkil edecek şekilde dizilmişlerdir. Bu adele demetleri gross olarak girdap teşkil edecek şekilde ve uzun mesafeler boyunca uzanır. İğ şeklindeki ve uzun olan bu hücrelerin sitoplazması, hemotoxylin-eozin boyamada küçük pembe liflidir [7]. (Şekil 3)



Şekil 3. Myomun Mikroskopik Karakterizasyonu (Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.199.)

Mikroskopik olarak çok sayıda değişik myom şekilleri vardır. Bunlar:

1. Hüresel leiomyom
2. 'Bizarre' leiomyom
3. Lipoleiomyomlar

Hücrel leiomyom: Komşu dokulara göre, daha fazla hücre ihtiva ederler. Ancak mitotik aktivitede artış nekroz ve hücrel atipi yoktur [7].

'Bizarre' leiomyoma: Gross olarak tipik myoma benzer. Ancak mikroskopik olarak fokal, geniş sitoplazmalı, büyük nükeuslu, oldukça değişik şekilli dev hücreleri mevcuttur [7].

Lipoleiomyomlar: Tipik myoma benzer. Ancak düz adele hücreleri arasında yağ hücreleri vardır [7].

Myometriumun sarkomaya benzeyen ve yanlışlıkla leiomyosarkom tanısı alabilen ancak histopatolojik olarak benign bulguları olan dört değişik patolojisi vardır [7]. Bunlar:

1. Benign Metastaz Gösteren Myom
2. İntravenöz Leiomyomatozis
3. Leiomyomatozis Peritonealis Disseminata
4. Lenfanjioleiomyomatozis

1. Benign Metastaz Gösteren Myom: Leiomyomatozis peritonealis disseminata ve intravenöz leiomyomatozisli olguların örneği olduğu düşünülür. Morfolojik olarak hiçbir metastaz kapasitesi olmayan düz adele neoplazmının metastazıdır. Bazı olgularda olay yeni bir primer tümör olarak tanımlanır. Bazı olgular uterustan köken alan ve akciğerler, retroperitoneum veya pelviste rejyonel lenf nodlarında tekrar ortaya çıkan morfolojik olarak benign bir tümör gibi görünmektedir [7].

2. İntravenöz leiomyomatozis: Myomun, myom dışındaki vasküler boşluğa yayılımıdır. Damarlara gözle görülebilecek şekilde uzanım gösteren benign düz kas tümörü olarak tanımlanmaktadır. Damarlardaki benign düz kas büyümesi myomun kenarından başlayabilir. Bu tümörler oldukça nadir olup morfolojik ve histolojik bulguları tamamen benignidir [7].

3. Leiomyomatozis peritonealis disseminata: Abdomende submezotelyal bağ dokusuna doğru nadir nonneoplastik çok odaklı düz kas proliferasyonudur. Olguların 2/3'ü siyahtır. Çoğunlukla gebelikte veya hormon kullanımı esnasında peritoneal kavitede çok sayıda leiomyom gelişir. Bu lezyonlar hemen tamamen benignidir. Genellikle gebeliği takiben spontan olarak kaybolur [7]. Ancak leiomyomatozis peritonealis disseminatada sadece uterusun, diğer pelvik ve abdominal iç organların subperitoneal yüzeyleri tutulur ve kan damarlarının lümenlerinin invazyonu görülmez [7].

4. Lenfanjioleiomyomatozis: Lenf damarlarındaki düz kas hücrelerinin proliferasyonu ile karakterize özellikle reproduktif dönemdeki kadınlarda görülen myom tipidir [7].

2.5. SEMPTOMLAR

Myomlar rutin pelvik muayeneler sırasında saptanabilir. Myomlar bazı kadınlarda tedavi gerektiren semptomlara neden olsa da, genellikle asemptomatiktirler [28]. Uterin myomlu olguların % 50'sinden az bir kısmı semptomatiktir [3]. Semptomlar tek olabileceği gibi birden fazla da olabilir. Semptomlar myom sayısı, yeri ve büyüklüğüne bağlı olarak değişiklik gösterir [4]. Myomlu olgularda görülen semptomlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Myomda Semptomlar

Anormal uterin kanama
Dismenore
Pelvik basınç hissi
Sık idrara çıkma
Konstipasyon
Disparoni
İnfertilite
Tekrarlayan abortuslar
Prematüre doğum
Abdominal distansiyon

Anormal Uterin Kanama: Myomların en önemli bulgusudur. Genellikle şiddetli ve uzamış menstruasyon şeklindedir. En sık görülen şekli menoraji olup olguların % 30'unda görülür [16]. Örneğin submukozal bir myom özellikle endometrial kaviteye doğru büyümüş ise menorajiye neden olur [18].

Myomlardaki anormal uterin kanamanın nedenleri:

- a- Endometrial yüzey artışı
- b- Uterusun damarlanma ve kan akımında artış
- c- Normal uterin kontraktilitenin olmayışı

d- Submukozal myom üzerindeki endometrial ülserasyon

e- Myometriumdaki venöz pleksüse bası olabilmesi gibi nedenler sayılabilir.

Myomlarla ilgili araştırmalar, çok sayıda büyüme faktörleri veya reseptörlerindeki disregülasyonun, vasküler fonksiyon ve anjiogenezis üzerinde doğrudan etkileri olduğunu göstermektedir [29].

Pelvik Basınç Hissi ve Sık İdrara Çıkma: Myomun pelvik organlara bası yapması tedavi endikasyonudur. Bu basıdan en çok mesane etkilenir. Basıya bağlı olarak idrara yetişememe, sık idrara çıkma ve bazen de idrar inkontinansı görülmektedir. Hatta akut idrar retansiyonu ve overflow inkontinansa neden olarak ameliyatı gerekli kılar. Bu etki myomun hızlı büyümesine bağlı, mesane boynunun ve üretranın pubik kemik arasında basıya uğraması sonucudur. Daha sıklıkla üç aylık gebelik haftasında olan tümörler Douglas'a hapsolurlar. Serviksi üretraya doğru iterek idrar akımında tıkanıklık oluştururlar [30].

2.6. ETİYOLOGENEZ

Myomların oluşum sebebi kesin olarak anlaşılamamıştır [31]. En çok kabul gören teorilerden bir tanesi düz kas hücresi, bağ dokusu hücresi ve kan damarlarının orijin aldığı birçok potansiyele sahip primitif hücreler tarafından myomların oluştuğuna inanılmaktadır [32].

Diğer bir teori ise bu tümörlerin matur kas hücresi veya stromal bağ dokusu elemanlarından kaynaklandığıdır [32]. Genetik yatkınlıklar, prenatal hormon maruziyeti ve hormonlar, büyüme faktörleri myom gelişimine neden olmaktadır [12]. Vücut kitle indeksinde artmayla myom arasında ilişki olduğu bulunmuştur [15]. Myom gelişiminde erken menarş, düşük parite, ilk doğumunu geç yaşta yapmış

olmak, infertilite ve oral kontraseptiflere erken yaşta başlanması (13-16 yaşlar) risk faktörlerini oluşturmaktadır [15].

2.6.1. Genetik Faktörler

Myom başlıca myometriyumun düz kas hücrelerinden oluşmasına rağmen, çeşitli miktarda fibröz konnektif doku da içermektedir. Tek bir neoplastik hücrenin monoklonal çoğalması ile oluşur ve tek bir hücre popülasyonu içerir [33]. Son zamanlarda yapılan sitogenetik, moleküler ve epidemiyolojik çalışmalar leiomyomların patogenezi ve patofizyolojisinde genetik eğilimin rolü olduğu bildirilmektedir [34].

Birçok epidemiyolojik bulgunun özellikle erken başlangıçlı olgularda önemli olarak genetik etkinin gösterilmesi, genetik ve kalıtsal nedenler olarak kabul edilir. Birinci dereceden akrabaların 2,5 kat riski bulunurken, erken başlangıçlı olgular göz önüne alındığında yaklaşık 6 kat risk bulunur. Monozigot ikizler, histeroktemi için dizigotik ikizlere göre benzer oranlara sahiptir [35].

Kalıtım, büyük olasılıkla myom gelişimine neden olan başlangıç mutasyonuna yatkınlıkta rol oynamaktadır. Myomaların yaklaşık % 40 - 50'sinde tümör spesifik kromozomal anormallikler tespit edilmiştir [35]. Bu anormallikler içinde t(12-14) (q15;q23-24), del(7) (q22q32) trizomi 12 ve 3q'nun delesyonuna rastlanır [35]. MED 12 proteininin spesifik mutasyonları myomların % 70'inde bildirilmiştir [36].

2.6.2. Hormonal Faktörler

Myom büyümesinde östrojen ve progesteron hormonlarının önemli etkileri olduğunu gösteren araştırmalar vardır. Her ikisi de östrojen ve progesteron genellikle büyümeyi teşvik edici olarak kabul edilse de bunlar, bazı durumlarda büyümeyi sınırlamaya neden olur. Paradoksal olarak, myom nadiren çok yüksek steroid hormon

düzeylelerine rağmen gebelik sırasında büyür ve gebelikte belli bir koruyucu etkisi görülmektedir [37]. Bu koruyucu etki kısmen östrojen ve oksitosin reseptör arasındaki etkileşim aracılığıyla olabilir [38]. Myomlar reproduktif çağda görülür, sıklıkla gebelikte büyür, menopozda geriler. Östrojenler myom bünyesinde önemli bir role sahip görünüyorsa da tek başlarına tümör gelişimine yol açmazlar. Moleküler çalışmalarda normal myometrium ile karşılaştırıldığında myomlarda östrojen ve progesteron reseptörlerinde artış olduğu bildirilmiştir [39, 40]. Östrojen, spesifik nükleer reseptörlerine bağlanarak hedef hücrede fizyolojik etkilerini gösterir. Bu reseptörler östrojen reseptör α (ER α) ve östrojen reseptör β (ER β)'dir [41]. ER α ve ER β mRNA, myometrium ve myomda eksprese edilmektedir [41, 42]. ER β 'nin aktivasyon derecesi ER α 'dan düşük olmasına rağmen, her iki reseptör hedef genlerde transkripsiyonu uyarır [43]. ER α ve ER β mRNA düzeyi myometriumla karşılaştırıldığında myomlarda daha yüksektir. Myomalarda normal endometriumla karşılaştırıldığında pek çok östrojen regüle eden genin (konnesin 43 gap- junction protein, tip I ve tip III kollajen, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), paratiroid hormon benzeri peptit ve progesteron reseptör genleri) ekspresyonunun arttığı görülmüştür [44]. Östrojen, mitojen-aktive eden protein kinaz yolunu ve hücre içi proteinlerin (büyüme ile ilişkili protein, fosfatidilinozitol 3-kinaz, fosfolipaz C, trombosit-derive büyüme faktörü) protein kinaz fosforilasyonu ile myom hücrelerinde mitojenik etki yapar. Bununla birlikte östrojen aktivasyonu ile epidermal büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü ve trombosit-derive büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerinin salınımına aracılık eder [45, 46].

Myom patogeneğinde progesteron da önemli rol oynamaktadır [4, 47]. Progesteron myomlarda mitotik aktiviteyi ve proliferasyonu stimüle eder. Kawaguchi ve arkadaşları siklusun sekretuar fazında myomlarda mitotik aktivitenin arttığını ve myom büyümesinin progesteron düzeylerinden etkilendiğini savunmuşlardır [48].

Myomda progesteron reseptör mRNA ve protein düzeyleriyle birlikte, komşu myometriyumda proliferasyonla ilişkili antijen Ki-67 ve AgNOR seviyesi de artmıştır [49, 50]. Tiltman 1985'te medroksiprogesteron asetat tedavisinin, tedavi edilmeyen grupla karşılaştırıldığında mitotik aktiviteyi arttırdığını yayınlamıştır [51]. Diğer taraftan progestinler GnRH agonistinin neden olduğu myom küçülmesini inhibe eder [52, 53]. Progesteron antagonisti olan mifepriston (RU-486) ile yapılan tedavi direk antiprogestin etkisiyle myomun regresyonuna neden olmaktadır. Bu bulgular progesteronun myom büyümesinde önemli rol oynadığını desteklemektedir.

2.6.3. Büyüme Faktörleri

Yapılan çalışmalar, myomların büyümesinde polipeptid yapılı büyüme faktörleri üzerine odaklanmaktadır. Myomlardan anormal miktarlarda salınan çok sayıda büyüme faktörü, mezenşimal kökenli patolojik durumlarda da anormal olarak salınır. Büyüme faktörlerinin hepsi hücre proliferasyonu ile birlikte ekstrasellüler matrix yapımında artış ile karakterizedir. Bu büyüme faktörleri düz adale hücrelerinin proliferasyonunu, apoptozisi ve ekstrasellüler matrix yapımını düzenlemekle kalmaz aynı zamanda vasküler endotelial hücrelerin proliferasyon ve migrasyonunu da düzenler [40].

Polipeptid yapılı büyüme faktörleri; epidermal büyüme faktörü (EGF), transforming büyüme faktörü-alfa ($TGF\alpha$), insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF), trombosit derive büyüme faktörü (PDGF) ve anjiogenetik faktörlerdir. EGF, 17β östradiol aracılığıyla tüm genital sistemde büyümeye neden olur [4]. Myomda, komşu myometriuma oranla sekretuar fazda daha yüksek konsantrasyonlarda EGF tespit edilmiştir. Progesteron da myom hücrelerinde EGF yapımını artırır. Östrojen ve progesteron kombinasyonunun mitojenik aktiviteyi uyarmasının, myomda EGF ve EGF reseptör ekspresyonuyla olduğu düşünülmektedir [54]. GnRH agonistleriyle

tedavi, EGF bağlanma bölgesinde azalmaya neden olur [4]. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I) pek çok hücrede büyüme, farklılaşma ve büyüme hormonunun biyolojik etkilerine aracılık eden anabolik ajandır. Myomlarda myometriumu karşılaştırıldığında IGF-I konsantrasyonu ve IGF-I reseptör mRNA seviyeleri daha yüksek bulunmuştur [55]. IGF-I'in myomlarda hücre proliferasyonuna neden olması yanında, BCL-2 gen ekspresyonu ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) down-regülasyonu yaparak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir [56]. IGF-I, bu etkilerini östrojen aracılığıyla progesteron reseptörlerini arttırarak göstermektedir. Bu nedenle IGF-I reseptör mRNA'sı menstrüel siklusun geç proliferatif fazında tespit edilmektedir [55]. Hücre kültürü çalışmalarında progesteron eklenen myom hücrelerinde, tedavi eklenmeyen grup ile karşılaştırıldığında, IGF-I reseptör mRNA ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur [55]. Transforming büyüme faktörü- β (TGF- β) dokularda morfogenezis ve büyümeyi uyaran ve pek çok alt tipi olan proteindir [57]. Fibronektin ve kollajen gibi ekstrasellüler matriks proteinlerini arttırarak etkisini gösterir. TGF- β siklusun sekretuar fazında myometrium ve myomda yüksek konsantrasyonda bulunur. Trombosit derive büyüme faktörü (PDGF) fibroblastlarda ve düz kas hücrelerinde potansiyel mitojendir. Myom büyümesinde önemli rol oynar [58].

Fibroidlerde hormonlar tarafından belirgin bir şekilde etkilenmiş olan ERK1 ve ERK2 gibi ekstrasellüler sinyal yolları ile çeşitli faktörlerin anlamlı ilişkisi olduğu belirtilmiştir [59]. Endotelin ve vasküler endotelyal büyüme faktörü gibi anjiogenetik faktörler anjiogenezi ve direkt mitojenik aktiviteyi arttırarak myomda tümör büyümesine neden olurlar [60].

2.8. GEBELİK VE MYOM

Gebelikte myomların ortaya çıkardığı riskler genel anlamda myomun rahim içersinde yerleştiği yere ve myomun boyut ve sayısına bağlıdır [61]. Tüm gebeliklerin yaklaşık % 1,4 – 8,6'sında uterusda myomlar görülür [62]. Gebelikte yükselen seks steroidleri nedeniyle myomların büyüdüğü ve semptomların arttığı klasik bir bilgi olmakla birlikte prospektif bir çalışma göstermiştir ki, bu büyüme sadece 1. trimesterde olur ve gebeliğin sonuna doğru çoğu myom özellikle büyük olanlar küçülür [63]. Uterin myomlar gebelik seyri boyunca birtakım komplikasyonlara neden olabilmektedirler. İmplantasyon submüköz myom üzerinde olursa düşük riski yüksektir. İnamural ve subseröz myomu olan olgularda ilk trimester gebelik kaybı % 40, ikinci trimester gebelik kaybı ise % 17 olarak bildirilmiştir [64]. Plasentanın myoma yakın yerleştiği durumlarda ise erken gebelikte kanama ve düşük olabilmektedir. Gebelikte myomların neden olabileceği diğer komplikasyonlar şunlardır; preterm doğum (% 15-20), intrauterin gelişme geriliği (% 10), prezentasyon bozuklukları (% 20), ablasyo plasenta, postpartum kanama ve dejenerasyona bağlı karın ağrısıdır [65].

2.9. İNFERTİLİTE ve MYOM

İnfertilite etiyolojisinde uterin myomlar tüm vakaların % 5 – 10'unu etkilemektedir [66]. Ancak diğer eşlik eden infertilite nedenleri dışlandığında tek başına myomlar infertilite vakalarının sadece % 2 - 3'ünden sorumludur [62].

Myomların fertilitiyi etkileme mekanizmaları şunlardır;

- I. Kornulara yerleşip endoservikal kanalı tıkayarak veya tubal ostiumlara yakın yerleşip anatomik distorsiyona neden olarak sperm migrasyonunu bozabilir.
- II. Serviks-tuba mesafesini arttırıp spermlerin tubaya ulaşmasını zorlaştırabilir.

- III. Uterin kavitenin normal yapısını ve endometriumu etkileyerek implantasyonu engelleyebilir.
- IV. Uterin kavitenin hacmini ve genişleme kapasitesini azaltarak düşüklere neden olabilir.
- V. Fokal endometrial vasküler bozukluk, endometrial inflamasyon, vasoaktif madde salınımı ve lokal androjenlerde artış nedeniyle düşüklere neden olabilir.

Myomu olan hastalarda reproduktif sonuçları etkileyen faktörler; myom büyüklüğü, yerleşimi, ek infertilite faktörü olup olmadığı ve hastanın yaşıdır [62].

2.9. MYOMDA TANI

Tipik belirtilerle gelen bir kadında yapılan jinekolojik değerlendirme ile (muayene ve ultrasonografi (USG)) tanı konur. (Şekil 4) Myom şüphesi olan olguların çoğunda ilk basamak için yeterli bir tanısal yöntemdir. Ancak USG bazı ileri derecede büyümüş uteruslarda yetersiz kalabilmektedir. Tanı yöntemlerini şu şekilde gösterebiliriz.

- I. **Jinekolojik Muayene:** Küçük subseröz myomlar dışındaki myomların tanısında en iyi yöntem pelvik muayenedir. Uterus normalden daha iri ve sert palpe edilir.
- II. **Görüntüleme Yöntemleri:**
 - IIa. **Ultrasonografi:** Myom nodülü myometriumdaki farklı eko veren bir lezyon olarak kolayca tanınır. Myom boyutu ve lokalizasyonu yüksek doğrulukla saptanabilir.
 - IIb. **Bilgisayarlı Tomografi&Manyetik Rezonans Görüntüleme:** Myomların sayısı, lokalizasyonu, boyutu ile ilgili kesin bilgi verirler ancak yüksek maliyet nedeniyle pek kullanılmazlar.

IIc. Histerosalpingografi (HSG): Submüköz myomlar uterin kavitede yer işgal eden lezyonlar olarak izlenebilir.

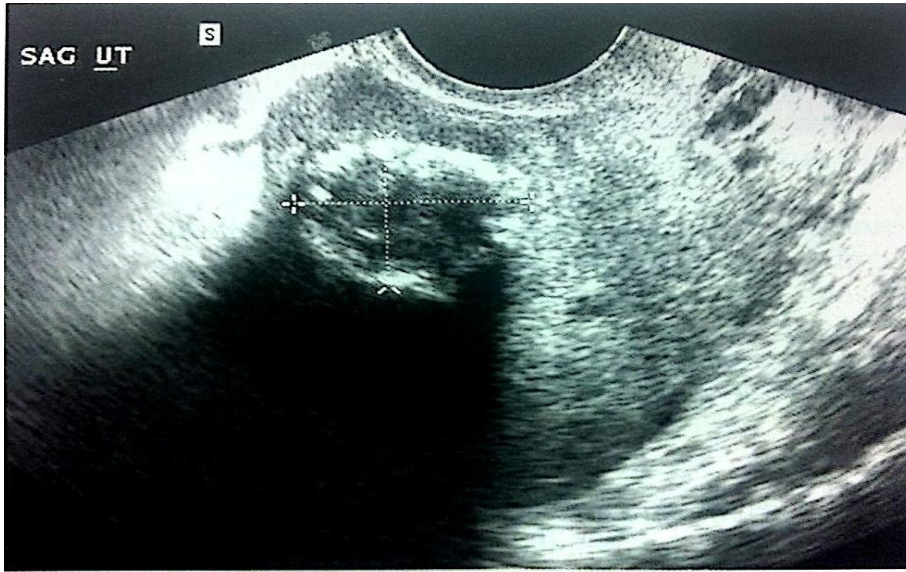
III. Özel İncelemeler:

IIIa. Histeroskopi: Submüköz myomların tanı ve tedavisinde kullanılır.

IIIb. Laparoskopi: Myomun ayırıcı tanısı için kullanılabilir.

IIIc. Salin İnfüzyon Sonografi (SİS): Submüköz myom tanısında kullanılabilir.

IIId. Dilatasyon&Küretaj: Özellikle kanayan myomlarda diğer patolojileri ekarte etmek veya submüköz myomun ayırıcı tanısı için yapılır.



Şekil 4. Kalsifiye Sınırları ile İnamural Bir Myomun Transvajinal Sonogramı

(Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Jinekoloji. (Y. Ceylan, Çev.). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2010, s.203)

Myom tanısı sıklıkla pelvik muayenede düzensiz kontürlü büyümüş bir uterusun tespiti ile genellikle zor değildir, ancak gebelik dahil herhangi bir pelvik kitle yanlışlıkla myom olarak değerlendirilebilir.

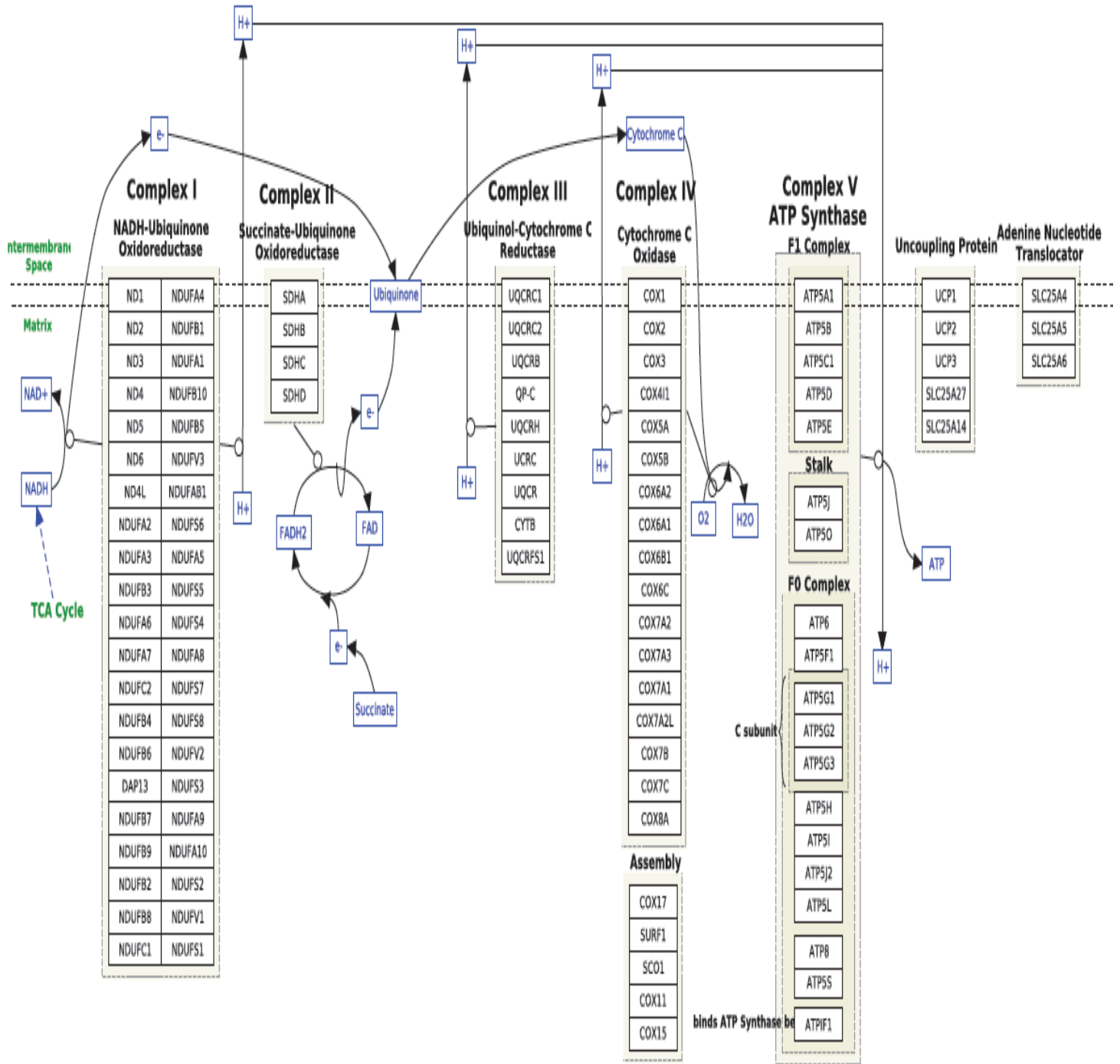
Ayırıcı tanıda:

1. Gebelik
2. Adenomyozis
3. Kanser
4. Myometrial hipertrofi
5. Subinvolyasyon
6. Konjenital Anormaliler
7. Tubo-ovarian kitleler düşünölmelidir.

2.10. Myomlar ve Mitokondriyal Enerji Metabolizması Arasındaki İlişki

Uterusun düz kas hücrelerinden köken alan benign tümörler olan uterus myomunun patofizyolojisi tam olarak anlaşılammıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, uterus myomu hastalarında çok sayıda genin ekspresyon değışimleri araştırılmasına rağmen [67], kanserde önemli rol oynayan enerji metabolizması ile ilişkili genler hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

İnsan mitokondriyal enerji metabolizmasında, oksidatif fosforilasyon komplekslerini ve elektron transport zinciri bileşenlerinin kodladığı genleri içeren mitokondriyal solunumda başlıca 84 gen yer almaktadır. (Şekil 5)



Şekil 5. Elektron Transport Zinciri İle İlişkili Genlerin Sınıflandırılması

(Alexander P., (2013) et al., Electron Transport Chain Pathway, From Wikipedia, the free encyclopedia, Pathway:WP542)

İç mitokondriyal membrana gömülü olan 4 protein kompleksinin aracılığı ile glikoliz ve TCA döngüsünün metabolitleri olan NADH ve FADH₂'nin oksidasyonları gerçekleşir. V. protein kompleksi olan ATP sentaz aracılığı ile bu proseslerde oluşan serbest enerji, oksidatif fosforilasyon ve ATP sentezinde kullanılır. Bu işlemlerin düzensizliği kanser gelişiminin önemli bir patolojik sonucudur [68].

2.10.1. Elektron Transport Zinciri

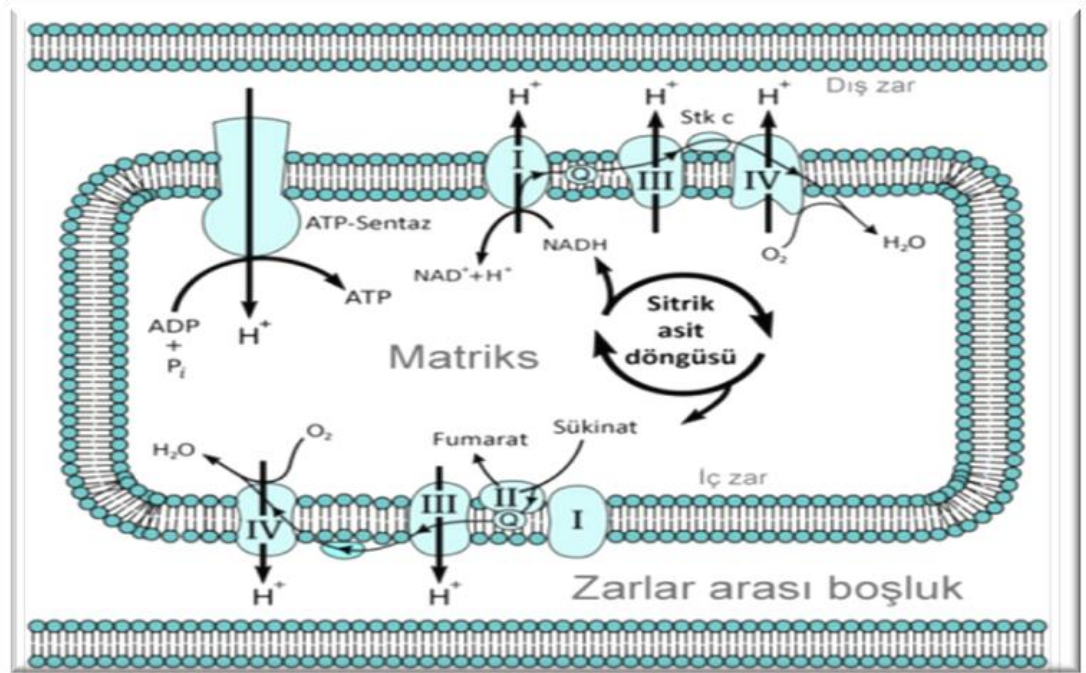
Elektron taşıma sistemi veya elektron taşıma zinciri, NADH ve FADH₂ gibi elektron taşıyıcılarının verdikleri elektronları ETS elemanlarında redoks tepkimelerine sokarak ATP üretimini sağlayan sistemdir. Elektronlar, son elektron alıcısı oksijene varana kadar ETS elemanları boyunca taşınırlar ve enerji kaybederler. Elektronların verdiği enerji ETS elemanları tarafından protonların aktif taşınmasında kullanılır. ETS elemanlarının üzerinde bulunduğu çift katlı fosfolipid zarının iki tarafında potansiyel fark oluşturulur. Bu potansiyel fark daha sonra ATP sentezi için kullanılır. Bu işlem *oksidatif fosforilasyon* olarak tanımlanır. ETS elemanları, ökaryotik hücrelerde mitokondri ve kloroplast organellerinde bulunur.

Ökaryotik hücrelerde enerji temel olarak organik bileşiklerin oksidatif fosforilasyonu ile elde edilir. Oksidatif fosforilasyon, moleküler oksijene elektron transferi yolunda ATP sentezidir. Oksidatif fosforilasyon, aerobik organizmaların anaerobiklere kıyasla solunum substratlarından daha fazla bir oranda serbest kullanılabilir bir enerjiyi yakalamalarına olanak verir. Yağ asitlerinin ve amino asitlerin oksidasyonu sırasında serbest kalan faydalı enerjinin tümü ve karbonhidratların oksidasyonundan açığa çıkanın tamamına yakını mitokondrilerin içinde, indirgeyici ekivalanlar halinde kullanılabilir duruma getirilir. Oksidatif fosforilasyonun gerçekleşmesi için mitokondrinin iç zarının iki tarafında bir

potansiyel fark oluşturulması gerekir. ETS, bu potansiyel farkı NADH ve FADH₂'nin verdiği yüksek enerjili elektronlardan aldığı enerjiyle protonları (H⁺) mitokondri matriksinden zarlar arası bölgeye taşıyarak sağlar.

2.10.2. Mitokondri

Mitokondri, indirgeyici ekivalanların ilk aşamada üretiminden sorumlu β-oksidasyon ve sitrik asit siklusu enzimleri gibi enzim sistemlerini içerir. Mitokondriler, solunum zinciri olarak bilinen ve indirgeyici ekivalanları toplayıp taşıyan ve onları su oluşturmak üzere O₂ ile birleştiren bir dizi katalizör içerirler. Mitokondride, açığa çıkan serbest enerjiyi ATP halinde yakalayan bir mekanizma bulunur. (Şekil 6)



Şekil 6. Mitokondrinin Enerji Mekanizması (Kathryn V. T., et al. (2010 April), Mitochondrial electron transport chain generates superoxide. From: Inter-connection between mitochondria and HIFs. J Cell Mol Med; 14(4): 795–804.)

Mitokondri, membranlar arası boşluk ile ayrılmış iki membrandan oluşur. Dış membran, küçük moleküllere geçirgendir ve kanallar oluşturan, **porin** adı verilen

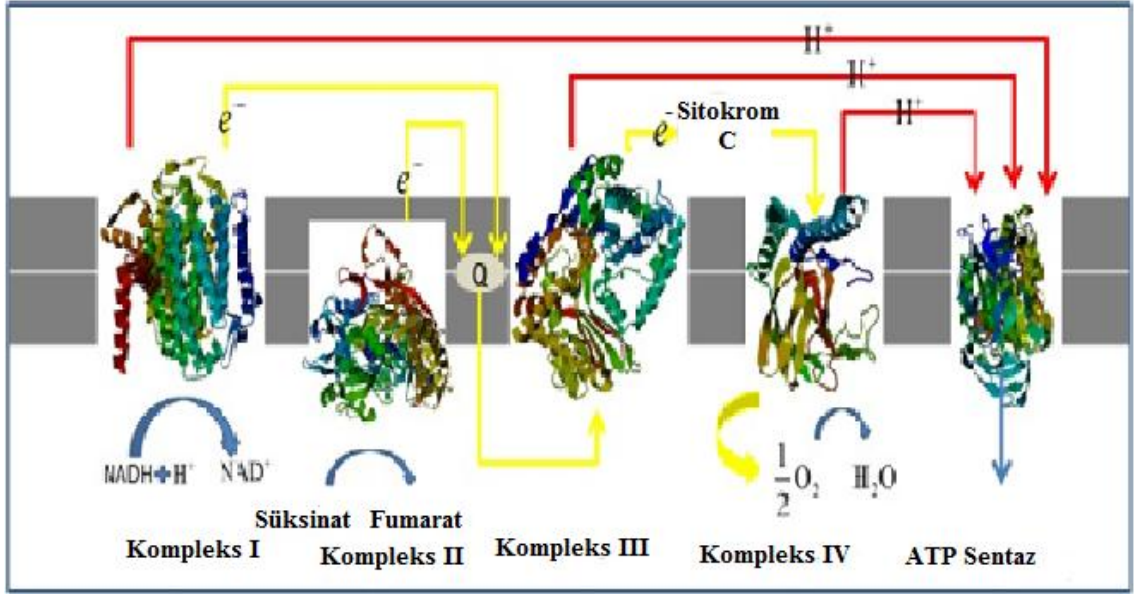
proteinleri içerir. İç mitokondriyal membranda, pirüvat ve yağ asitlerinin taşınmasında ve oksidatif fosforilasyonda görevli proteinler yer alır. İç membranın kıvrılmasıyla kristalar meydana gelmektedir; böylece yüzey alanının artması sağlanır. Mitokondri iç membranının çevrelediği bölge mitokondriyal matriks adını alır. Sitozolde gerçekleşen glikoliz olayı sırasında NADH ve sonunda pirüvat oluşmaktadır. Pirüvattan, yağ asitlerinin ve amino asitlerin karbon iskeletinin yıkılımlından oluşan asetil-CoA'nın mitokondri matriksinde sitrik asit döngüsüne girdiğini ve böylece NADH ve FADH₂ oluştuğunu bilinmektedir. Oluşan NADH ve FADH₂'ler, iç mitokondriyal membranda bulunan elektron transport zincirine (solunum zinciri) aktarılırlar.

2.10.3. Zincir Organizasyonu

Mitokondri iç zarı beş ayrı enzim kompleksine ayrılabilir. Bunlara kompleks I, II, III, IV ve V adı verilir. Kompleks I - IV'ün her birisi elektron transport zincirinin bir bölümünü içerir. Kompleks V ise ATP sentesini katalize eder. Her kompleks elektronlarını koenzim Q ve sitokrom C gibi göreceli olarak hareketli elektron taşıyıcılarına verir. Elektron transport zincirinin her taşıyıcısı bir elektron vericisinden elektronları alır ve zincirdeki bir sonraki taşıyıcıya verir. Bu elektronlar sonunda oksijen ve protonlarla birleşerek su oluştururlar. Elektron transport işlemini solunum zinciri yapan bu oksijen gereksinimidir. Vücudun oksijen tüketiminin en büyük bölümü burada gerçekleşir [69].

2.10.4. Elektron Transport Zinciri Reaksiyonları

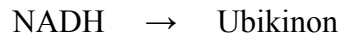
İç mitokondriyal membranda bulunan elektron transport zincirinde 4 ayrı elektron taşıyıcı kompleks yer almaktadır. Kompleksler Şekil 7’de gösterilmiştir.



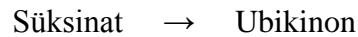
Şekil 7. Elektron Transport Zincirinde Elektron Taşıyıcı Kompleksler (Ou, Y. Y., et al. (2013), Discrimination of Metal-Binding Sites in Electron Transporters Based on RBF Networks with PSSM Profiles and Significant Amino Acid Pairs, PLoS One; 8(2):e46572.)

Her biri zincirin bir yerinde elektron transferini katalizler.

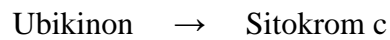
Kompleks I : (NADH: Ubikinon oksidoredüktaz veya NADH dehidrogenaz)



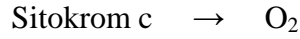
Kompleks II : (Süksinat dehidrogenaz veya süksinat:ubikinon oksidoredüktaz)



Kompleks III : (Sitokrom bc 1 kompleksi veya ubikinon : sitokrom c redüktaz)



Kompleks IV : (Sitokrom oksidaz veya sitokrom aa3)



Kompleks V: ATP sentetaz kompleksidir. Bu protein kompleksleri iç membran partikülleri olarak adlandırılırlar ve mitokondri iç zarının iç yüzeyine bağlanmışlardır. Mitokondri matriksine doğru çıkıntı yapan küreler şeklinde görülür.

Koenzim Q dışında bu zincirin tüm üyeleri proteindir. Bunlar bazı dehidrogenazlarda olduğu gibi enzim olarak işlev yapabilirler, demir-kükürt merkezinin bir bölümü olarak demir taşıyabilirler, sitokromlarda olduğu gibi bir porfirin halkası ile koordineli olabilirler veya sitokrom a+a₃ kompleksinde olduğu gibi bakır taşıyabilirler.

1. **NAD oluşumu:** NAD⁺, substratlarından iki hidrojen atomu çıkaran dehidrogenazlar tarafından NADH' a indirgenir. Her iki elektron, fakat sadece bir proton NAD'ye taşınarak, NADH ve serbest bir proton, (H⁺) oluşur.

2. **NADH dehidrogenaz:** Serbest proton ve NADH tarafından taşınan hidrid iyon daha sonra mitokondri iç zarında yerleşmiş bir enzim kompleksi olan (Kompleks I) *NADH dehidrogenaza* aktarılır. Bu kompleks kendisine sıkıca bağlanmış bir molekül flavin mononükleotid içerir ve bu koenzim iki hidrojen atomunu alarak FMNH₂ haline gelir. *NADH dehidrogenaz* ayrıca demir-kükürt merkezleri oluşturmak üzere kükürt atomları ile çiftler oluşturmuş birkaç demir atomu da içerir. Bunlar hidrojen atomlarının zincirin bir sonraki üyesi olan *ubikinon'a* (koenzim Q) aktarılması için gereklidir.

3. **Koenzim Q :** *Koenzim Q*, uzun bir izoprenoid kuyruğu olan bir kinon türevidir. Biyolojik sistemlerde çok yaygın olarak bulunduğu için *ubikinon* olarak da adlandırılır. Koenzim Q, hidrojenleri hem NADH dehidrogenaz tarafından

oluşturulmuş FMNH₂ den hem de *süksinat dehidrogenaz* ve *açıl CoA dehidrogenaz* tarafından oluşturulmuş FADH₂'den (Kompleks II) alabilir.

4. **Sitokromlar:** Elektron transport zincirinin geri kalan üyeleri sitokromlardır. Her biri bir atom demir taşıyan porfirin halkasından oluşmuş bir hem grubu içerirler. Hemoglobinin hem grubundan farklı olarak sitokromun demir atomu, tersinir elektron taşıyıcı görevinin gereği olarak tersinir olarak Fe⁺³ şeklinden Fe⁺² şekline dönüşür. Elektronlar zincirde koenzim Q 'dan sitokrom b ve c (Kompleks III), ve a + a₃ (Kompleks IV)'e doğru ilerlerler.

5. **Sitokrom a + a₃:** Bu sitokrom kompleksi hem halkasının demirinin moleküler oksijen ile direkt olarak reaksiyona girebileceği bir serbest bağ yapısına sahip olan tek elektron taşıyıcısıdır. Bu bölgede, taşınmış elektronlar, moleküler oksijen ve serbest protonlar su oluşturmak üzere bir araya getirilirler. Sitokrom a + a₃ (*sitokrom oksidaz*) bu kompleks reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için gerekli olan bağlı bakır atomları da içerir.

6. **Yere özgün inhibitörler:** Elektron transportunun yere özgün inhibitörleri tanımlanmıştır. Bu bileşikler zincirin bir komponentine bağlanıp oksidasyon /redüksiyon reaksiyonunu engelleyerek elektron geçişini önlerler. Bu nedenle bu engelin gerisindeki elektron taşıyıcıları tamamen indirgenmiş, ilerisindikiler ise yükseltgenmiş şekilde bulunurlar [69].

2.10.5. Elektron Transport Zincirine İlişkin Bozukluklar

Mitokondriyal ensefalopatiler olarak tanımlanan ve nörolojik semptomlarla ortaya çıkan elektron transport zinciri bozuklukları tanımlanmıştır.

1) **Sitokrom Oksidaz Defekti**

ETS'nin sonunda yer alan ve indirgenme eşdeğerlerini moleküler oksijene aktaran *sitokrom oksidaz* eksikliğinde iskelet kası tutulumu yaygın olarak görülmektedir. Otozomal olarak kalıtılan bu bozuklukta mitokondriyal DNA mutasyonları da gözlenmektedir. İskelet kasının yanı sıra bağ dokusu beyin, böbrek ve karaciğerde hasara yol açan bu enzimin eksikliğinin 4 farklı türü tanımlanmıştır.

a) **Benign İnfantil Mitokondriyal Miyopati**

Ciddi klinik sonuçları bulunan bu hastalık iskelet kasında etkili olmaktadır. Diğer dokularda tutulum gözlenmemektedir.

b) **İnfantil Mitokondriyal Miyopati**

Laktik asidoz yaygın olduğu bu hastalıkta iskelet kasının yanısıra diğer dokularda (kalp ve böbrekler) etkilenmektedir.

c) **Leigh Sendromu**

Pürivat dehidrogenaz eksikliğinin yanı sıra elektron transport zinciri komplekslerinde (kompleks I, II ve IV) bozuklukların görüldüğü bir hastalıktır.

d) **Fransız- Kanada Tipi Eksiklik**

Leigh Sendromu benzeri semptomların görüldüğü bu hastalıkta iskelet kası, beyin, bağ dokusu ve karaciğer etkilenmektedir.

2) **Kearn-Sayre Sendromu**

Bu nadir nöromusküler hastalıkta kronik progresif esktemal oftalmopleji, kardiyomyopati ve atipik retinitis pigmentosa görülmektedir. İşitme kaybı, ataksi, kas güçsüzlüğü ve boy kısalığı görülen bu hastalıkta serebrospinal sıvı proteinleri artmıştır.

3) MERRF Hastalığı

Beyin ve kaslarda disfoksiyona yol açan hastalıkta tüm vücudu etkileyen myoklonik nöbetler, ataksi, disartni, sağırılık, nistagmus, laktik asidoz ve kısa boy görülmektedir. Maternal genlerde mitokondri hücre yapısında bozukluğa yol açan mutasyonlar bulunmaktadır.

4) MELAS Sendromu

ETS'den sorumlu kompleks I ve sitokrom oksidaz kalıtsal eksikliği, mitokondriyal ensefalomyopati olarak tanımlanan bir kas hastalığına yol açmaktadır.

5) Lhon Sendromu

Mitokondriyal DNA nükleotid dizilimindeki G-A mutasyonuna bağlı olarak görülen nöroretinal dejenerasyondur.

BÖLÜM II

3. MATERYAL ve METHOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan Kitler

- 1) RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen, Katalog No: 74104) 50 RNeasy Mini Spin Kolon, Toplama Tüpü (1,5 mL ve 2 mL), RNaz İçermeyen Reaktifler ve Tamponlar
- 2) RT² First Strand Kit (96 x 96) (Qiagen, Katalog No: 330401) 96 x 10 µL tek zincir cDNA sentez reaksiyonu için; 4 Tüp GE2 Tamponu (80 µL/tüp), 4 tüp BC5 Ters Transkriptaz Karışımı (80 µL/tüp); RT² PreAMP PCR Mastermix (600 µL); Yan Reaksiyon Azaltıcı (96 µL)
- 3) RT² PCR Array Yükleme Rezervuarı (Qiagen, Katalog No: 338162) 12 x 5 mL kapasiteli, ışınlama ile sterilize edilmiş yükleme rezervuarı
- 4) RT² SYBR Green qPCR Master Mix (Qiagen, Katalog No: 330522) 12 Array, 16,2 mL
- 5) '*Human Mitochondrial Energy Metabolism*' RT² Profiler PCR Array (Qiagen, Katalog No: 330231) 96 kuyucuklu mikroplak formatına uygun olarak ilgili genlerin analizi için 12 Array

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

- 1) Steril Mikro Pipetler (10, 100, 1000 µL)
- 2) Steril Mikro Pipet Uçları (10, 100, 1000 µL)
- 3) Alkol (% 70'lik ve % 80'lik Etanol Çözeltisi)
- 4) PBS Çözeltisi (1X)

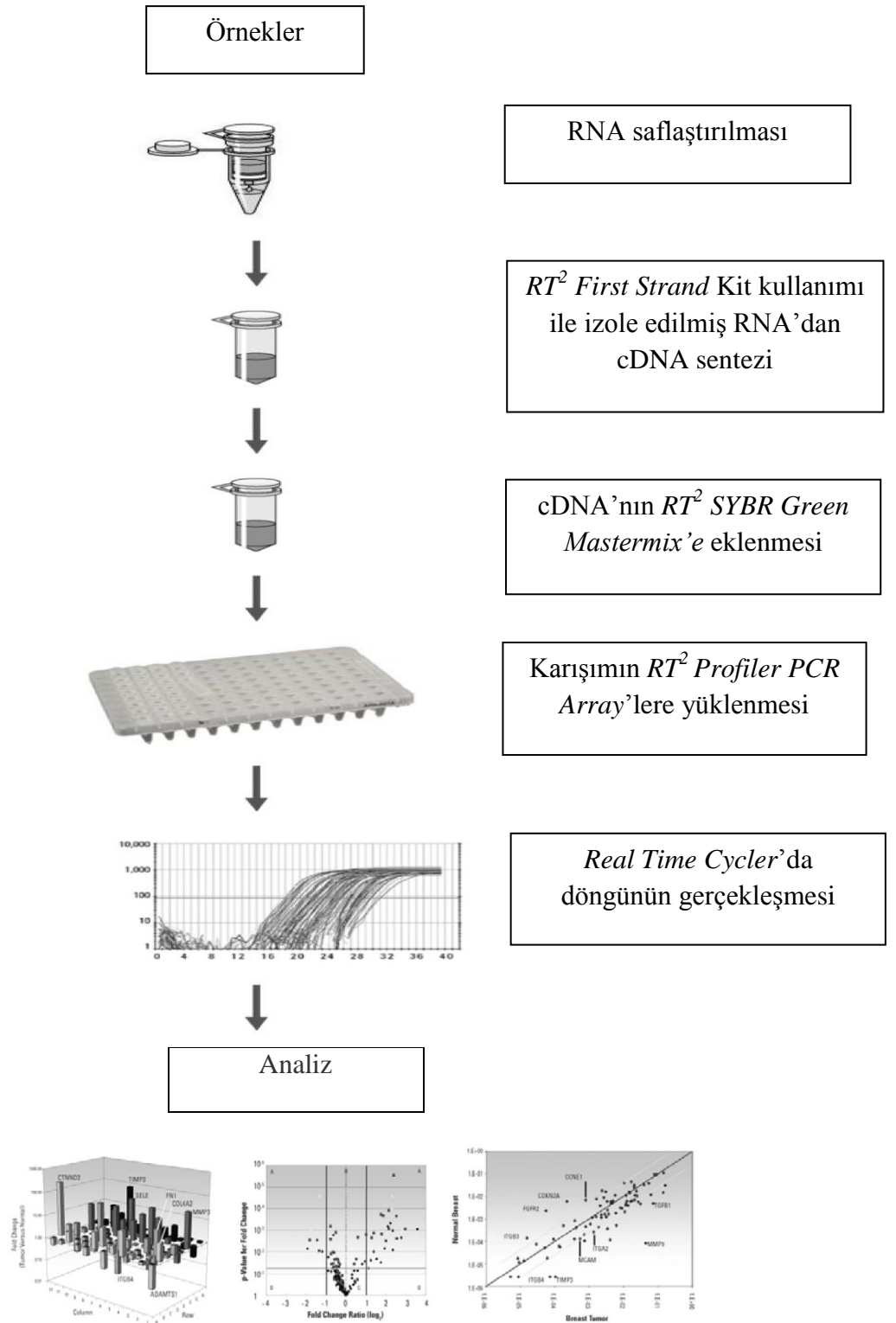
- 5) Ependorf Tüp (1,5 mL)
- 6) PCR Tüpu
- 7) Cam Malzemeler (Beher, Erlen ve Mezür)
- 8) Pudrasız Eldiven
- 9) Pens
- 10) Neşter

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- 1) Applied Biosystems 7900 Real Time PCR Cihazı
- 2) Applied Biosystems PCR System 9700 Gold Blok Thermal Cyclers
- 3) Nanadrop ND-100 DNA, RNA ve protein ölçümü için spektrofotometre
- 4) Agilent 2100 Biyoanalizör
- 5) Xiril Medix Dispomix Homojenizatör
- 6) Çift kapılı buzdolabı (Arçelik)
- 7) Eppendorf Minispin plus mikrosantrifuj
- 8) Thermo -80° C derin dondurucu
- 9) Sartorius dijital hassas terazi
- 10) Thermo soğutmalı santrifuj
- 11) Thermo mikrosantrifuj – Vortex
- 12) Thermomixer Eppendorf marka 1,5 mL

3.2. METOD

Yapılan çalışmada izlediğimiz prosedür şekil 8’de gösterilmektedir.



Şekil 8. ‘Human Mitochondrial Energy Metabolism Array’ ile Yapılan Real Time

PCR Basamakları ((02/2012), RT^2 Profiler PCR Array Handbook, Qiagen s. 19.)

3.2.1. Hasta ve Kontrol Grubundan Örneklerin Eldesi

Ege Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.'nda uterus myomu tanısı konup historektomi olmuş 16 kişiden 23-35,5 mg ağırlığında uterus myom dokusu ve komşu dokudan normal doku alındı. Olgular 22-64 yaş aralığında reproduktif çağındaki kadınlardan seçildi.

Her hastanın yaşı, tanı yaşı, ailesinde uterus myom görülme durumu, eğer ailesinde uterus myom hastası varsa bu kişiyle yakınlık derecesi hasta bilgileri olarak kaydedildi. Operasyon öncesinde olgulardan uterus myom dokusu ve komşu dokudan normal doku alınacağına dair hastalara çalışma hakkında bilgilendirme yapıldı ve onayı alınmış reproduktif çağındaki 6 hasta çalışmaya dahil edildi.

Alınan doku örneklerinin RNAlater solüsyonu içinde Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.'ndan Tıbbi Biyokimya A.D.'na transferi gerçekleştirildi. Dokular, alındığı günden itibaren 1 gece +4°C bekletilip analiz edileceği tarihe kadar -80°C'ye kaldırılıp muhafaza edildi.

3.2.2. Doku Homojenizasyonu ve Total RNA İzolasyonu

3.2.2.1. Homojenizasyon

Homojenizasyon işlemi aşağıdaki protokole göre uygulandı.

- Çalışılacak dokular -80°C'den çıkartılıp oda sıcaklığında çözüldü.
- Doku steril bir pens ile mikrosantrifüj tüpten alınıp temizlendi ve daha sonra PBS (1X) çözeltisine daldırılarak tamamen RNAlater'den arındırıldı.
- Dokular buz üzerinde bistüri yardımıyla mekanik olarak parçalandı.
- Parçalanmış dokular steril tartım kabında tartıldı.
- Parçalanmış her bir doku örneği ayrı bir Dispomix homojenizasyon tüpüne aktarıldı.

- Homojenizasyon tüplerinin üzerine, yaklaşık 20-30 mg aralığındaki doku örnekleri için 600 µL RLT + 6 µL merkaptoetanol homojenizasyon tamponu hazırlanıp, doku üzerine ilave edildi.
- Homojenizasyon tüpleri Dispomix Xril cihazında profil 10 programı ile 2 tekrarlı çalışıldı.
- Köpüklenme meydana gelen örneklerde Dispomix tüpü +4°C’de 3-4 dakika bekletilerek köpüklenme giderildi.
- Dispomix tüpündeki lizat Nüve NF800R markalı cihazda 4 dakika 4000 rpm’de 2 kez santrifüj edildi.
- Santrifüj edilen dispomix tüpündeki lizatın 600 µL üst kısımdan alınıp pipet yardımı ile 1,5 µL’lik mikrosantrifüj tüpe konuldu.
- Daha sonra 3 dakika maksimum hızda (13,400 rpm) santrifüj edildi.
- Santrifüj aşamasının ardından üst faz (yaklaşık 600 µL) AllPrep DNA Mini Spin kolona aktarıldı.
- Spin kolona aktarılan üst faz 10,000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi.

3.2.2.2. RNA İzolasyonu

RNA İzolasyonunda dikkat edilmesi gereken başlıca 2 nokta bulunmaktadır.

1. RNA elde edecek şekilde doku veya hücrelere uygulanacak işlemler
2. İzole edilen RNA’nın saklanması

RNA izolasyon işlemi için RNeasy Mini Kit kullanıldı. (Tablo 2)

Tablo 2. RNeasy Mini Kit İçeriği (Qiagen, Katalog No: 74104)

RNeasy Mini Kit
RNeasy Mini Spin Kolonları (pembe)
Toplama Tüpleri (1,5 mL)
Toplama Tüpleri (2 mL)
Tampon RLT
Tampon RW1
Tampon RPE (konsantre)
RNaz İçermeyen Su

Homojenizasyon aşamasının ardından RNA izolasyonu adımına geçildi. RNA izolasyon işlemi aşağıdaki protokole göre uygulandı.

Spin kolona aktarılan üst faz santrifüj edildikten sonra alttaki sıvıya 500 µL % 70'lik etanol çözeltisi konuldu (üst faz atıldı). Pipetleme yardımı ile iyice karıştırıldı. (Bu aşamada santrifüj yapılmayıp hemen bir sonraki adıma geçilir). Örnek hızlı bir şekilde RNeasy Mini Elute Spin kolona konulup 10,000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Bu aşamada santrifüj edildikten sonra fazla köpüklenme gözleendiğinden köpüklenmeyi gidermek için 10,000 rpm'de 6 saniye daha santrifüj edildi.

Santrifüj edildikten sonra hala daha köpük varsa pipet yardımı ile üstteki köpük alındı ve alttaki sıvı atıldı. Ardından spin kolona 700 µL RW1 tamponu konuldu. Tekrar oda sıcaklığında 10,000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi ve alttaki sıvı atıldı. 100 µL RPE + 400 µL % 70'lik etanol çözeltisi karıştırılarak RPE tamponu hazırlandı. Hazırlanan 500 µL RPE tamponu örnek üzerine eklendi. 10,000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Örnek üzerine (spin kolona) 500 µL % 80'lik etanol

eklendi. 10,000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Alttaki tüp sıvı ile birlikte atıldı. Yeni bir 2 mL'lik toplama tüpü takıldı. Daha sonra membranın kuruması için spin kolonun kapağı açılarak 13.400 rpm'de (maksimum hız) 5 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj edildikten sonra spin kolon 1,5 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Spin kolonun tam ortasından (membrana denk gelecek şekilde) 14 µL RNaz içermeyen su örnek üzerine konuldu. Maksimum hızda (13,400 rpm'de) 1 dakika santrifüj edildi. RNA izolasyonu tamamlandı ve miktar ölçümü yapıldı.

3.2.2.3. RNA Saflığının Belirlenmesi ve RNA Bütünlüğü

İzole edilen total RNA'ların miktarları ölçüldükten sonra Agilent 2100 biyoanalizör cihazı ile Agilent RNA6000 Nano Kit (Katalog No: 5067-1511) kullanılarak total RNA bütünlüğüne (degrade olup olmama durumuna) bakıldı

Nükleik asit konsantrasyonu genellikle bir köre karşı 260 nm'de absorbans ölçülerek belirlenir. Kontaminantların varlığı oran hesaplaması ile ayırt edilebilir. Proteinler 280 nm'de absorblandığı için A_{260}/A_{280} oranı nükleik asitin saflığını hesaplamak için kullanılır. Saf RNA'nın A_{260}/A_{280} oranı 1,8 – 2,0 aralığındadır. Buna göre A_{260}/A_{280} oranı 1,9 – 2,1 olan örnekler çalışmaya dahil edildi.

RNA'nın Bütünlüğü

PCR analiz sonuçlarının optimal değerlerde olması, ribozomal RNA'nın bant bütünlüğünü koruması için önemlidir. Her bir doku örneğinden izole edilen total RNA ların miktarları ölçüldükten sonra RNA saflığı ve konsantrasyonu (250 ng/µL ve üzeri), absorbans oranları ($A_{260}/A_{280} \rightarrow 1,8 - 2,0$, $A_{260}/A_{230} \rightarrow 2 - 2,2$) seçme kriteri olarak bakılıp seçildi. Agilent 2100 Biyoanalizör cihazı ile RNA bütünlüğüne bakıldı. Analiz öncesi çipe yükleme için RNA' lara seyreltme işlemi uygulandı. 18 S (sol) ve 28 S (sağ) rRNA elektroferogram ile 2 ayrı pik göstermesi beklendi.

3.2.3. 'Human Mitochondrial Energy Metabolism Array' Kiti ile Real Time PCR

Analizi

Real Time PCR analizini gerçekleştirmeden önce izole edilmiş total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi.

3.2.3.1. İzole Edilmiş Total RNA'dan cDNA Sentezi

İzole edilmiş total RNA'dan tek zincirli cDNA sentezi için RT² First Strand Kit kullanıldı. Kit içeriği Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. RT² First Strand Kit İçeriği

RT² First Strand Kit	(12)
Katalog No	330401
20 µL Reaksiyonların Sayısı	12
Tampon GE	24 µL
(5x) BC3 Tamponu	48 µL
RE3 Ters-Transkriptaz Karışımı	24 µL
Kontrol P2	12 µL
RNaz İçermeyen Su	1 µL

cDNA sentezi aşağıdaki protokole göre uygulandı.

- İlk olarak RT² First Strand Kit içeriğindeki reaktifler (10-15 saniye) santrifüj edilerek tüpün dibinde toplatıldı.
- PCR cihazında cDNA sentezi için 2 programlı sıcaklık ayarı yapıldı (95°C, 42°C).
- Her bir RNA örneği için genomik DNA eliminasyon karışımı aşağıdaki Tablo 4'e göre hazırlandı.

Tablo 4. Genomik DNA Eliminasyon Karışımı

Bileşenler	Miktar
RNA	25 ng-25 µg
GE Tamponu	2 µL
RNaz İçermeyen Su	Değişken
Toplam Hacim	10 µL

- Her bir RNA örneği için gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra toplam hacim 10 µL olacak şekilde 8 µL örnek üzerine 2 µL genomik eliminasyon tamponu konuldu.
- Tekrardan spin yapıldı.
- Genomik DNA eliminasyon karışımı 42 °C’de 5 dakika inkübe edildi.
- Daha sonra reverse - transkripsiyon karışımı hazırlandı. (Tablo 5)

Tablo 5. Reverse - Transkripsiyon Karışımı

Bileşenler	Hacim (µL)
BC3 Tamponu	4 µL
Kontrol P2	1 µL
Reverse - Transkriptaz Karışımı	2 µL
RNaz İçermeyen Su	3 µL
Toplam Hacim	10 µL

- 10 µL genomik DNA karışımı içeren her tüpe 10 µL reverse - transkripsiyon karışımı (1 reaksiyon için) pipetaj yapılarak eklendi.
- Spin yapıldı.
- 42°C’de 15 dakika inkübe edildi.
- Daha sonra hemen 95°C de 5 dakika inkübe edilerek reaksiyon durduruldu.
- Cihaz sıcaklığı ayarlanarak +4°C’ye düşürüldü.
- cDNA sentezi yapılmış örneklerin, ND-1000 UV-Vis (Nanodrop) cihazında 230 nm’de absorbansları ölçüldü.

Kantitatif Real Time PCR yöntemi ile gen ekspresyon analizi, elektron transport zincirinde görevli 84 gen için dizayn edilmiş olan *Human Mitochondrial Energy Metabolism PCR Array* ile gerçekleştirildi. Sistem 96 kuyucuklu mikroplak formatında olup aşağıdaki Tablo 6’da gösterilen gen listesi (84 gen, 5 housekeeping gen ve 7 kontrol gen (Genomik DNA Kontrol, Ters Transkriptaz Kontrol, Pozitif PCR Kontrol)) için spesifik olarak dizayn edilmiş primerler içermektedir.

Tablo 6. Elektron Transport Zinciri ile İlişkili 84 Gen, Housekeeping Genler ve Kontrol Genleri

Elektron Transport Zinciri ile İlişkili Genler
Kompleks I (NADH-Koenzim Q Redüktaz): NDUFA1, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA2, NDUFA3, NDUFA4, NDUFA5, NDUFA6, NDUFA7, NDUFA8, NDUFAB1, NDUFB10, NDUFB2, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB5, NDUFB6, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB9, NDUFC1, NDUFC2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS5, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NDUFV3.

Kompleks II (Süksinat-Koenzim Q Redüktaz): SDHA, SDHB, SDHC, SDHD.	
Kompleks III (Koenzim Q-Sitokrom c Redüktaz): BCS1L, CYC1, UQCR11, UQCRC1, UQCRC2, UQCRFS1, UQCRH, UQCRQ	
Kompleks IV (Sitokrom c Oksidaz): COX4I1, COX4I2, COX5A, COX5B, COX6A1, COX6A2, COX6B1, COX6B2, COX6C, COX7A2, COX7A2L, COX7B, COX8A, COX8C.	
Kompleks V (ATP Sentaz): ATP12A, ATP4A, ATP4B, ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, ATP5F1, ATP5G1, ATP5G2, ATP5G3, ATP5H, ATP5I, ATP5J, ATP5J2, ATP5L, ATP5O, ATP6V0A2, ATP6V0D2, ATP6V1C2, ATP6V1E2, ATP6V1G3, LHPP, OXA1L, PPA1, PPA2.	
<u>Housekeeping Genler</u>	
Beta-2-Mikroglobulin	-
Hipoksantin Fosforiboziltransferaz-1	HPRT, HGPRT
Ribozomal Protein L13a	L13A, TSTA1
Gliseraldehid-3-Fosfat Dehidrogenaz	GAPD, G3PD, MGC88685
Aktin, Beta	PS1TP5BP1
<u>Kontrol Genler</u>	
Genomik DNA Kontaminasyon	HIGX1A
Revers Transkripsiyon Kontrolü	-
Pozitif PCR Kontrolü	-

Tablo 7'de ise ETZ'den sorumlu 84 gen ile ilgili literatür özetleri gösterilmektedir.

Tablo 7. ETZ'den Sorumlu Genler ve Fonksiyonları

KOMPLEKS 1 (NADH – KOENZİM Q REDÜKTAZ) GENLERİ		
GEN SEMBOLÜ	GEN İSMİ	AÇIKLAMA
NDUFA1	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 1, 7.5 kDa	Elektronları NADH'tan ubikinona transfer eder. Yüksek oranda korunmuş iki etki alanı yapısının olması, bu özelliği ile protein fonksiyonu için kritik bir öneme sahiptir. İç mitokondriyal membrandaki NADH: ubikinon oksidoredüktaz kompleksi için bir dayanak noktası oluşturduğu düşünülmektedir [70].
NDUFA10	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 10, 42 kDa	NADH'tan solunum zincirine elektronları transfer eder. Bu protein hidrofobik protein fraksiyonunun bileşenidir ve NADH dehidrogenaz aktivitesi ile oksidoredüktaz aktivitesi vardır [71].
NDUFA11	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 11, 14.7 kDa	Bu gen membrana bağlı mitokondriyal kompleks 1'in alt birimini kodlar. Mutasyonları ağır mitokondriyal kompleks 1 eksikliği ile ilişkilidir.
NDUFA2	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 2, 8 kDa	Kompleks 1 aktivitesinin düzenlenmesinde yer alabilir veya redoks prosesinde bunun birleştirilmesi yolu ile yardımda bulunabilir. Bu gendeki mutasyonlar Leigh sendromu, erken başlangıçlı progresif nörodejeneratif bozukluğu ile ilişkilidir [72, 73].
NDUFA3	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks 3, 9 kDa	NADH dehidrogenaz (kompleks 1) mitokondriyal solunum zinciri alt birimlerinden biri olan bu genin katalizde yer almadığına inanılmaktadır. Kompleks 1 fonksiyonlarından NADH'tan solunum zincirine elektronları transfer eder. Enzim için elektron alıcısının ubikinon olduğuna inanılmaktadır [71].

NDUFA4	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 4, 9 kDa	Bu proteinin, NADH dehidrogenaz aktivitesi ve oksidoredüktaz aktivitesi vardır. NDUFA4, NADH'tan solunum zincirine elektron aktarır. Enzim için elektron alıcısının ubikinon olduğuna inanılmaktadır. [74]
NDUFA5	NADH dehidrogenaz (ubikino) 1 alfa alt kompleks, 5, 13 kDa	NADH'tan ubikinona elektron transfer eder. Spesifik bir rolü bilinmemektedir. NDUFA5, başlatıcı metioninin ve bir sonraki amino asitin N-asetilasyonunun çıkarılmasıyla post- translasyonel modifikasyona uğradığı varsayılır [75].
NDUFA6	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 6, 14 kDa	NDUFA6 geni tarafından kodlanan NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, alt birim 6 insanlarda bulunan bir enzimdir. Mitokondrinin elektron transport zincirinde bulunan ilk enzim kompleksidir [72].
NDUFA7	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 7, 14.5 kDa	Bu gen iç mitokondriyal membranda yer almaktadır ve NADH: ubikinon oksidoredüktaz (kompleks 1)'in alt birimini kodlar. Kompleks 1 fonksiyonlarından NADH'tan solunum zincirine elektronları transfer eder [76, 77].
NDUFA8	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 alfa alt kompleks, 8, 19 kDa	Bu proteinin NADH dehidrogenaz ve oksidoredüktaz aktivitesi vardır. NDUFA8, NADH' tan solunum zincirine elektronların transfer edilmesinde önemli bir rol oynar. Enzim için elektron alıcısının ubikinon olduğuna inanılmaktadır [77].
NDUFAB1	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1, alfa/beta alt kompleks, 1, 8 kDa	NDUFAB1 proteini bir fosfopantenin bağlanma bölgesi içermektedir. Bu genin transkripsiyonları insan dokularında geniş bir yelpazede bulunmaktadır. En yüksek ekspresyon düzeylerinde azalma, sırasıyla erişkin kalbi, iskelet kası ve fetal kalp olarak gözlemlenmiştir [78].

NDUFB10	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 10, 22 kDa	Tirozin kinaz inhibisyonu mitokondriyal solunum aracılığıyla kompleks 1 aktivitesinin spesifik düşmesine izin verir. Bu da kompleks 1 alt birimi olan NDUFB10'nun düşük fosforilasyonu ile ilişkilidir [79].
NDUFB2	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 2, 8 kDa	Bu proteinin NADH dehidrogenaz ve oksidoredüktaz aktivitesi vardır. NDUF8, NADH' tan solunum zincirine elektronların transfer edilmesinde önemli bir rol oynar. Enzim için acil elektron alıcısı ubikinon olduğuna inanılmaktadır [71, 80].
NDUFB3	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 3, 12 kDa	Bu gen ETZ'de bulunan ilk enzim olan kompleks 1'in NADH dehidrogenaz mitokondriyal membranının alt birimidir. Bu protein, bir tek-geçişli bir membran proteini olarak mitokondri iç membranında lokalize olur. Bu gendeki mutasyonlar mitokondriyal kompleks 1 eksikliğine sebep olur [81].
NDUFB4	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 4, 15 kDa	Bu gen kompleks 1'i mitokondriyal elektron zincirinde bulunan ilk enzim kompleksi olan NADH: ubikinon oksidoredüktaz çoklu alt birimlerin bir katalitik olamayan alt birimidir. NADH'tan ubikinona elektronları transfer eder [82, 83].
NDUFB5	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 5, 16 kDa	Kompleks 1'in NADH: ubikinon oksidoredüktaz çoklu alt birimlerinin bir alt birimidir. Mitokondrinin iç membranında lokalize olur. Bu protein, NADH dehidrogenaz aktivitesi ve oksidoredüktaz aktivitesine sahiptir. NADH'tan solunum zincirine elektronları transfer eder. Enzim için elektron alıcısının ubikinon olduğuna inanılmaktadır [84].
NDUFB6	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 6, 17 kDa	Kompleks 1'in NADH: ubikinon oksidoredüktaz çoklu alt birimlerinin bir alt birimidir ve direk olarak katalizde yer

		almaz. Mitokondrinin iç membranında lokalize olur. Bu protein, NADH dehidrogenaz aktivitesi ve oksidoredüktaz aktivitesine sahiptir. NADH'tan solunum zincirine elektronları transfer eder [80, 85].
NDUFB7	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 7, 18 kDa	Kompleks 1'in NADH: ubikinon oksidoredüktaz çoklu alt birimlerinin bir alt birimidir. Mitokondrinin iç membranında lokalize olur. Bu protein, NADH dehidrogenaz aktivitesi ve oksidoredüktaz aktivitesine sahiptir. NADH'tan solunum zincirine elektronları transfer eder. Enzim için acil elektron alıcısı ubikinon olduğuna inanılmaktadır [80, 86].
NDUFB8	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 8, 19 kDa	Mitokondriyal fonksiyonel proteinlerinden olan kompleks 1'in alt birimi NDUFB8'in tirozin fosforilasyonunun azalması septik farelerde belirlenmiştir [87].
NDUFB9	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1 beta alt kompleks, 9, 22 kDa	Nükleer olarak kodlanmış solunum elektron transport zincirinde mitokondriyal bir proteindir. NDUFB9, BOR sendromunun sebebinde yer almaktadır [88].
NDUFC1	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1, alt kompleks bilinmeyen, 1, 6 kDa	Bu kodlanmış protein ,NADH ubikinon oksidoredüktaz kompleks 1'in alt birimidir. Elektron transport zincirinde iç mitokondriyal membranda lokalize olan ilk enzim kompleksidir [72].
NDUFC2	NADH dehidrogenaz (ubikinon) 1, alt kompleks bilinmeyen, 2, 14.5 kDa	NDUFC2 geni mitokondriyal solunum zincirinde ilk ve en büyük kompleks olan kompleks 1'in alt birimlerinden birini kodlar [71].
NDUFS1	NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 1, 75 kDa (NADH-koenzim Q redüktaz)	Mitokondrinin iç membranında bulunur. Bu proteinin NADH dehidrogenaz ve oksidoredüktaz aktivitesi vardır. NADH'tan solunum zincirine elektronları transfer eder. Enzim için acil

		elektron alıcısı ubikinon olduğuna inanılır. Bu protein kompleks 1 in en büyük alt birimidir ve enzimin demir-sülfür parçasının bir bileşenidir [89].
NDUFS2	NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 2, 49 kDa (NADH-koenzim Q redüktaz)	Mitokondriden proton atılması ve ubikinonun redüksiyonu ile birlikte NADH oksidasyonunu katalizler [90, 91].
NDUFS3	NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 3, 30 kDa (NADH-koenzim Q redüktaz)	NADH:ubikinon oksidoredüktaz çoklu alt birimlerinden olan mitokondrinin elektron transport zincirinde bulunan ilk enzim kompleksidir. 7 alt biriminin olduğu kompleks 1'in demir – sülfür protein parçasıdır [80].
NDUFS4	NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 4, 18 kDa (NADH-koenzim Q redüktaz)	Hücrel ATP üretiminde önemli bir rolü vardır. Canlı hücrelerde birçok önemli prosesler için birincil enerji kaynağıdır. NADH'tan elektronları taşır ve farklı protein çiftleri redoksnin merkezlerine elektron alıcısı ubikinon alıcısı için bir dizi iletir [92].
NDUFS5	NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 5, 15 kDa (NADH-koenzim Q redüktaz)	NADH dehidrogenaz ubikinon demir-sülfür protein 5, insanlarda NDUFS5 geni tarafından kodlanan bir enzimdir [80].
NDUFS6	NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 6, 13 kDa (NADH-koenzim Q redüktaz)	Mitokondrinin elektron transport zincirinde bulunan ilk enzim kompleksindedir. NADH'tan solunum zincirine elektronları transfer eder. Bu gendeki mutasyonlar mitokondriyal kompleks 1 eksikliğine neden olur [80].
NDUFS7	NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 7, 20 kDa (NADH-koenzim Q redüktaz)	NADH'tan solunum zincirine elektronları transfer eder. Enzim için acil elektron alıcısı ubikinon olduğuna inanılır. Bu gendeki mutasyonlar kompleks 1 eksikliğinden dolayı Leigh sendromuna ve ağır nörolojik hastalıklara

		sebeb olur [93].
NDUFS8	NADH dehidrogenaz (ubikinon) Fe-S protein 8, 23 kDa (NADH-koenzim Q redüktaz)	NADH dehidrogenaz (ubikinon) demir -sulfur protein 8 veya NADH ubikinon oksidoredüktaz 23 kDa alt birim olarak bilinen NDUFS8 geni tarafından kodlanan mitokondriden proton atılımı, ubikinon redüksiyonu, NADH oksidasyonu için solunum zincirinde bulunan bir enzimdir. Elektron transferi prosesinde yer alır ve Leigh sendromu ile ilişkilidir [94].
NDUFV1	NADH dehidrogenaz (ubikinon) flavoprotein 1, 51kDa	NADH ve kanallarından ubikinona elektronları serbest bırakır. Bu alt birim NADH bağlama bölgesi, flavin mononükleotid (FMN) ve FE-S bağlama bölgelerini taşır. Kompleks 1 eksikliği mitokondrinin disfonksiyonu için yaygın bir nedendir. Parkinson hastalığı, Leigh sendromu gibi hastalıklar ile ilişkilidir [95].
NDUFV2	NADH dehidrogenaz (ubikinon) flavoprotein 2, 24 kDa	NADH'tan ubikinona elektronların transferini katalizler. Mitokondrinin iç membrabnında lokalize olur. Bu gendeki mutasyonlar Parkinson hastalığını, bipolar hastalığını, şizofreni gibi hastalıkları kapsar [80, 96].
NDUFV3	NADH dehidrogenaz (ubikinon) flavoprotein 3, 10 kDa	Bu kompleks mitokondriyal solunum zincirinin bir kısmıdır ve NADH oksidasyonunun rotanon – duyarlılığını ve ubikinona redüksiyonunu katalizler. Kompleksin flavoprotein parçasında bulunan 3 proteinden birini bu protein kodlar [97].

KOMPLEKS II (SÜKSİNAT-KOENZİM Q REDÜKTAZ) GENLERİ		
GEN SEMBOLÜ	GEN İSMİ	AÇIKLAMA
SDHA	Süksinat dehidrogenaz kompleks, alt birim A, flavoprotein	SDH protein kompleksi, süksinatın oksidasyonunu katalizler. SDHA alt birimi SDHB alt birimine hidrofilik olarak kompleksin sonuna katalitik olarak bağlanır. Elektronları süksinattan SDHA'ya transfer eder. SDH kompleksi mitokondrinin iç membranında lokalize olur ve sitrik asit ile solunum zincirine katılır. SDHA temel SDH enzimi aktivitesinde ara üründür. SDHA sitrik asit döngüsünün bir kısmında süksinatı fumarata çevirir. Bu reaksiyon ayrıca FAD'ı FADH ₂ 'ye çevirir. Elektronlar FADH ₂ 'den SDHB alt birimi demir kümelerine transfer olur. Bu solunum zinciri kısmının fonksiyonudur [98, 99].
SDHB	Süksinat dehidrogenaz kompleks, alt birim B, demir sülfür	SDHB süksinat dehidrogenaz oluşumunda 4 protein alt biriminden biridir. Süksinat oksidasyonunu katalizler. Bu alt birim 3 demir –sülfür kümesi ile demir-sülfür proteindir. SDH kompleksi mitokondrinin iç membranında lokalize olur ve sitrik asit ile solunum zincirine katılır. SDHA temel SDH enzimi aktivitesinde ara üründür. SDHA sitrik asit döngüsünün bir kısmında süksinatı fumarata çevirir. Bu reaksiyon ayrıca FAD'ı FADH ₂ 'ye çevirir. Elektronlar FADH ₂ 'den SDHB alt birimi demir kümelerine transfer olur. Bu solunum zinciri kısmının fonksiyonudur. Son olarak elektronlar ubikinona SDHC / SDHD alt birimleri aracılığı ile transfer olur. Bu solunum zincirinin bir fonksiyonudur [100-102].
SDHC	Süksinat dehidrogenaz kompleks, alt birim C, integral membran	Mitokondrinin iç membranında lokalize olur. İnsanlarda bu genin lokalizasyonu q21 kromozomundadır. Kompleks II'de aerobik solunum zinciri ve sitrik asit

	protein, 15kDa	döngüsü kompleksinin anahtar enzimidir. Bu kodlanmış protein 2 integral membran proteininden bir tanesidir. Mitokondrinin iç membranında katalitik merkez oluşturur. Bu protein kompleksi süksinat oksidasyonunu katalizler. Elektronlar ubikinona SDHC / SDHD alt birimleri aracılığı ile transfer olur. Bu da solunum zincirinin bir fonksiyonudur [103, 104].
SDHD	Süksinat dehidrogenaz kompleks, alt birim D, integral membrane protein	SDHD, mitokondrinin iç membra- nında süksinat dehidrogenaz protein kompleksinin 4 alt biriminin 2 transmembran alt birimlerinden bir tanesidir. Sitrik asit döngüsünde ve elektron transport zincirinde önemli bir enzimidir [103, 105, 106].

KOMPLEKS III (KOENZİM Q – SİTOKROM C REDÜKTAZ) GENLERİ		
GEN SEMBOLÜ	GEN İSMİ	AÇIKLAMA
BCS1L	BC1 (ubikinol-sitokrom c redüktaz) sentez- benzeri	BCS1'in N-ucundaki korunmuş bölge intramitokondriyal sıralamasında ve içine aktarılmasında sorumludur. Bu genin mutasyonları mitokondriyal kompleks III eksikliği ve Grasil sendromu ile ilişkilidir [107-109].
CYC1	Sitokrom c-1	Sitokrom c 1, insanlarda CYC1 geni tarafından kodlanan bir proteindir [110].
UQCR11	Ubikinol - sitokrom c redüktaz, kompleks III alt birim XI	Bu gen insan hücrelerinde ubikitöz ve mitokondriyal solunum zincirinin bir kısmından oluşan ubikinol sitokrom c redüktaz kompleksinin en küçük bileşenini kodlar. Bu kodlanmış protein komplekste demir-sülfür proteini için bağlanma faktörü olarak fonksiyon gösterebilir [111].

UQCRC1	Ubikinol-sitokrom c redüktaz çekirdek protein I	Sitokrom b-c 1 kompleks alt birim 1 insanlarda UQCRC1 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bunun gen ürünleri solunum zinciri proteini ubikinol sitokrom c redüktazın alt birimidir [112].
UQCRC2	Ubikinol - sitokrom c redüktaz çekirdek protein II	Sitokrom b-c 1 kompleks alt birim 2, insanlarda UQCRC2 geni tarafından kodlanan bir proteindir [113].
UQCRFS1	Ubikinol-sitokrom c redüktaz, Rieske demir-sülfür polipeptit 1	Ubikinol sitokrom c redüktaz, demir-sülfür polipeptit 1 ve ayrıca UQCRFS1 olarak bilinen insanlarda UQCRFS1 geni tarafından kodlanan bir proteindir. UQCRFS1 ubikinon sitokrom c redüktaz solunum zinciri proteininin alt birimidir [114].
UQCRH	Ubikinol-sitokrom c redüktaz bağlı protein	Sitokrom b- c 1 kompleks alt birim 6, insanlarda UQCRH geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bu genin (E.C. 1.10.2.2) ürünleri ubikinol sitokrom c redüktaz solunum zinciri proten alt birimlerindedir [115].
UQCRQ	Ubikinol-sitokrom c redüktaz, kompleks III alt birim VII, 9.5kDa	Bu gen, düşük molekül kütlesi olan ubikinon bağlama proteinini kodlar. Bu protein mitokondriyal solunum zincirinin bir bölümü olan kompleks III ubikinol sitokrom c redüktaz alt birimini ve küçük çekirdekli protein ile ilişkilidir [116].

KOMPLEKS IV (SİTOKROM C OKSİDAZ) GENLERİ		
GEN SEMBOLÜ	GEN İSMİ	AÇIKLAMA
COX411	Sitokrom c oksidaz alt birim IV izoform 1	COX mitokondriyal solunum zincirinde terminat bir enzimdir. Bu çok alt birimli enzim kompleksidir ve çiftlerin elektronlarını sitokrom c'den moleküler oksijene transfer eder ve iç mitokondriyal membranda

		elektrokimyasal proton gradiyentlerine katkıda bulunur. Elektron transferi ve proton pompası aktivitelerinde bulunur [117, 118].
COX4I2	Sitokrom c oksidaz alt birim IV izoform 2	COX mitokondriyal solunum zincirinde terminal bir enzimdir sitokrom c redüklenmesinden oksijene elektron transfer eder. Kompleksin birleştirilmesinde ve regülasyonunda mitokondriyel olarak kodlanmış alt birimlerden olan COX4I2 yer alır. Bu nükleer gen alt birim IV'ün 1. izoformunu kodlar. En büyük nükleer kodlanmış bu alt birim, COX regülasyonunda önemli bir rol oynar [119-121]
COX5A	Sitokrom c oksidaz alt birim Va	COX çoklu alt birim enzim kompleksi olup iç mitokondriyal membran genelinde protonun elektrokimyasal gradiyentlerine katkıda bulunur. Bu kompleks 13 mitokondriyal ve nükleer kodlu alt birimden oluşur. Mitokondriyal kodlu alt birimler proton pompası aktivitesi ile elektron transferini gerçekleştirir. Nükleer kodlu alt birimlerin fonksiyonları ise bilinmemektedir fakat bunlar komplekslerin birleştirilmesinde ve düzenlenmesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir [122].
COX5B	Sitokrom c oksidaz alt birim Vb	COX çoklu alt birim enzim kompleksi olup iç mitokondriyal membran genelinde protonun elektrokimyasal gradiyentlerine katkıda bulunur. Bu kompleks 13 mitokondriyal ve nükleer kodlu alt birimden oluşur. Mitokondriyal kodlu alt birimler proton pompası aktivitesi ile elektron transferini gerçekleştirir. Nükleer kodlu alt birimlerin fonksiyonları ise bilinmemektedir fakat bunlar komplekslerin birleştirilmesinde ve düzenlenmesinde rol oynayabileceği

		düşünülmektedir. Bu gen mitokondriyal solunum zincirinin nükleer kodlanmış alt birimi Vb' yi kodlar [123].
COX6A1	Sitokrom c oksidaz alt birim VIa polipeptit 1	Sitokrom c oksidaz mitokondriyal solunum zincirinde terminal bir enzimdir ve redüklenmiş sitokrom c den oksijene elektron transfer eder. Mitokondriyal kodlanmış alt birimlerin fonksiyonu elektron transferi ve nükleer kodlanmış alt birimlerin fonksiyonu kompleksin birleştirilmesi ve regülasyonu olabilir. Bu nükleer gen VIa alt biriminin polipeptit 1 karaciğer izoformunu kodlar [124].
COX6A2	Sitokrom c oksidaz alt birim VIa polipeptit 2	Elektronların redüklenmiş sitokrom c'den oksijene transferini sağlar. Mitokondriyal kodlanmış alt birimlerin fonksiyonu elektron transferi ve nükleer kodlanmış alt birimlerin fonksiyonu kompleksin birleştirilmesi ve regülasyonu olabilir Bu nükleer gen polipeptit 2'nin VIa alt birimini kodlar [125].
COX6B1	Sitokrom c oksidaz alt birim VIb polipeptit 1	Elektronların redüklenmiş sitokrom c'den oksijene transferini sağlar. Mitokondriyal kodlanmış alt birimlerin fonksiyonu elektron transferi ve nükleer kodlanmış alt birimlerin fonksiyonu kompleksin birleştirilmesi ve regülasyonu olabilir. Bu nükleer gen alt birim VIb'yi kodlar [126].
COX6B2	Sitokrom c oksidaz alt birim VIb polipeptit 2	Sitokrom c oksidaz alt birim VIb polipeptit 2, insanlarda COX6B2 tarafından kodlanmış bir enzimdir. Elektronların redüklenmiş sitokrom c'den oksijene transferini sağlar [127].
COX6C	Sitokrom c oksidaz alt birim VIc	Redüklenmiş sitokrom c'den oksijene elektronları transferi katalizler. Mitokondriyal kodlanmış alt birimlerin fonksiyonu elektron transferi ve nükleer kodlanmış alt birimlerin fonksiyonu kompleksin birleştirilmesi ve

		regülasyonu olabilir. Bu nükleer gen, alt birim VIc'yi kodlar. Bu gen, prostat kanser hücrelerinde upregüledir [128, 129].
COX7A2	Sitokrom c oksidaz alt birim VIIa polipeptit 2 (karaciğer)	Sitokrom c oksidaz mitokondriyal solunum zincirinin terminal bir bileşenidir. Redüklenmiş sitokrom c'den oksijene elektron transferini katalizler. Mitokondriyal kodlanmış alt birimlerin fonksiyonu elektron transferi ve nükleer kodlanmış alt birimlerin fonksiyonu kompleksin birleştirilmesi ve regülasyonu olabilir. COX7A2 mitokondride lokalize olur fakat bu lokasyon Ras'in ekspresyonu tarafından değiştirilir. Ras sinyal yolağında kısmı ile ilişkili testesteron üretimine aracılık eder [130, 131].
COX7A2L	Sitokrom c oksidaz alt birim VIIa polipeptit 2 benzeri	COX mitokondriyal solunum zincirinin terminal bir bileşenidir. Bu gen bütün dokularda eksprese olur ve östrojen tedavisinden sonra meme kanseri hücre hattında upregüledir. Östrojen tarafından hedef hücrelerde enerji üretimi seviyesinin yükselmesine aracılık etmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir [132].
COX7B	Sitokrom c oksidaz alt birim VIIb	Redüklenmiş sitokrom c'den oksijene elektron transferini katalizler. Mitokondriyal kodlanmış alt birimlerin fonksiyonu elektron transferi ve nükleer kodlanmış alt birimlerin fonksiyonu kompleksin birleştirilmesi ve regülasyonu olabilir. Bu nükleer gen, bütün dokularda bulunan alt birim VIIb'yi kodlar [133, 134].
COX8A	Sitokrom c oksidaz alt birim VIIIA (ubikuitöz)	İç elektron membran boyunca elektrokimyasal proton gradientlerinin üretimi yardımı ile redüklenmiş sitokrom c'den moleküler oksijene elektronların transferini sağlar. Nükleer kodlanmış alt birimler katalitik fonksiyonun

		düzenlenmesinde yer alabilir. Bu gen nükleer kodlanmış olan alt birimlerden birini kodlar [135].
COX8C	Sitokrom c oksidaz alt birim VIII C	Mitokondriyal solunum zincirinin terminal bir enzimi olan COX, 3 mitokondriyal ve 10 nükleer alt birim içerir. Alt birim VIII en küçük nükleer kodlanmış COX polipeptitidir, insanlarda tanımlanmış COX8-3 bulundu. COX VIII-3 proteini mitokondriyal hedeflidir. Bunun sekans konservasyonu COX holoenziminin bir kısmı COXVIII-3 fonksiyonları olduğu ve dokuya spesifik rolü olduğu ileri sürülmektedir. Korunmuş bir gen yapısı, COX VIII-3'ün eksprese bir gen olduğunu işaret etmektedir [136].

KOMPLEKS V (ATP SENTAZ) GENLERİ		
GEN SEMBOLÜ	GEN İSMİ	AÇIKLAMA
ATP12A	ATPaz, H ⁺ /K ⁺ taşıması, gastrik olmayan, alfa polipeptit	Bu gen ouabain duyarlı katalitik alt birimleri kodlar ve plazma membranı boyunca H ⁺ ve K ⁺ iyonlarının değişimi ile ATP çiftlerinin hidrolizini katalizler. Ayrıca çeşitli dokularda potasyum absorpsiyonundan sorumludur [137, 138].
ATP4A	ATPaz, H ⁺ /K ⁺ değişimi, gastrik, alfa polipeptit	Bu kodlanmış protein P-tipi katyon taşıma ATPaz ailesine aittir. Bu enzim bir proton pompasıdır ve plazma membranı boyunca H ⁺ ve K ⁺ iyonlarının değişimi ile ATP çiftlerinin hidrolizini katalizler. Bu gen ayrıca gastrik asit salgılanmasından sorumludur. Bu gen gastrik H ⁺ , K ⁺ , ATPaz katalitik alfa alt birimini kodlar [139].

ATP4B	ATPaz, H ⁺ /K ⁺ taşınması, beta polipeptit	Bu gen tarafından kodlanan protein P-tipi katyon taşınması ATPaz ailesine aittir. Bu enzim bir proton pompasıdır ve plazma membranı boyunca H ⁺ ve K ⁺ iyonlarının değişimi ile ATP çiftlerinin hidrolizini katalizler. Bu gen ayrıca gastrik asit salgılanmasından sorumludur. Bu gen gastrik H ⁺ , K ⁺ , ATPaz katalitik beta alt birimini kodlar.
ATP5A1	ATP sentaz, H ⁺ taşınması, mitokondriyal F1 kompleks, alfa alt birim 1, kardiyak kasi	ATP sentaz alt birim alfa, insanlarda ATP5A1 geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Mitokondriyal ATP sentaz, oksidatif fosforilasyon boyunca iç membranda protonların elektrokimyasal gradiyentlerini kullanılarak ATP sentezini katalizler. Bu gen katalitik çekirdeğin alfa alt birimini katalizler [140].
ATP5B	ATP sentaz, H ⁺ taşınması, mitokondriyal F1 kompleks, beta polipeptit	Bir transmembran enzimi olan ATP sentaz tümör gibi organ dokularının enerji metabolizmasında önemli bir rol oynar. ATP sentaz alt birim beta, insanlarda ATP5B geni tarafından kodlanmış bir enzimdir. Bu gen mitokondriyal ATP sentazın alt birimini kodlar. Mitokondriyal ATP sentaz oksidatif fosforilasyon boyunca iç membranda protonların elektrokimyasal gradiyentlerini kullanılarak ATP sentezini katalizler. Bu gen katalitik çekirdeğin beta alt birimini kodlar [141].
ATP5C1	ATP sentaz, H ⁺ taşınması, mitokondriyal F1 kompleks, gama polipeptit 1	ATP sentaz alt birim gama, insanlarda ATP5C1 geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Mitokondriyal ATP sentaz oksidatif fosforilasyon boyunca iç membranda protonların elektrokimyasal gradiyentlerini kullanılarak ATP sentezini katalizler. Bu gen katalitik çekirdeğin gama alt birimini kodlar. Bu genin ekspresyonu insanlarda bulunan karaciğer yağı içeriği ile oldukça ters ilişkilidir [142, 143].

ATP5F1	ATP sentaz, H ⁺ taşınması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim B1	Mitokondriyal ATP sentaz, oksidatif fosforilasyon boyunca iç membranda protonların elektrokimyasal gradiyentlerini kullanılarak ATP sentezini katalizler. Bu gen proton kanalının b alt birimini kodlar. Bu b alt birimleri, F1 ve F0 kompleksleri birlikte bağlandığı periferel sapın bir parçasıdır. Periferel sap mitokondriyal, kloroplast ve bakteriyel F-ATPaz arasındaki alt birim bileşenlerinde farklıdır [144, 145].
ATP5G1	ATP sentaz, H ⁺ taşınması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim C1 (alt birim 9)	Mitokondriyal ATP sentaz, oksidatif fosforilasyon boyunca iç membranda protonların elektrokimyasal gradiyentlerini kullanılarak ATP sentezini katalizler. Bu gen proton kanalının kodlanmış c alt biriminin 3 geninden biridir [146, 147].
ATP5G2	ATP sentaz, H ⁺ taşınması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim C2 (alt birim 9)	ATP sentaz lipid bağlama proteini insanlarda ATP5G2 geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Bu gen mitokondriyal ATP sentazın alt birimini kodlar. Mitokondriyal ATP sentaz oksidatif fosforilasyon boyunca iç membranda protonların elektrokimyasal gradiyentlerini kullanılarak ATP sentezini katalizler. Proton pompasında alt birim c yi kodlayan 3 gen vardır. Alt birim c' nin 3 prekürserinden biri olan bu gen tarafından protein kodlanır [146, 148].
ATP5G3	ATP sentaz, H ⁺ taşınması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim C3 (alt birim 9)	ATP sentaz lipid bağlama proteini, insanlarda ATP5G3 geni tarafından kodlanmış bir enzimdir. Bu gen mitokondriyal ATP sentazın alt birimini kodlar. Mitokondriyal ATP sentaz oksidatif fosforilasyon boyunca iç membranda protonların elektrokimyasal gradiyentlerini kullanılarak ATP sentezini katalizler. Proton kanalının alt birim c'yi kodlayan 3 geninden biridir. 3 genin her biri mitokondri içine sekansları ayırır fakat tanımlanmış olgun proteinleri

		kodlar [149, 150].
ATP5H	ATP sentaz, H ⁺ taşınması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim d	Mitokondriyal ATP sentaz oksidatif fosforilasyon boyunca iç membranda protonların elektrokimyasal gradiyentlerini kullanılarak ATP sentezini katalizler [151].
ATP5I	ATP sentaz, H ⁺ taşınması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim E	Mitokondriyal ATP sentaz oksidatif fosforilasyon boyunca iç membranda protonların elektrokimyasal gradiyentlerini kullanılarak ATP sentezini katalizler [152, 153].
ATP5J	ATP sentaz, H ⁺ taşınması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim F6	ATP sentaz çiftleri faktör 6, insanlarda ATP5J geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Mitokondriyal ATP sentaz oksidatif fosforilasyon boyunca iç membranda protonların elektrokimyasal gradiyentlerini kullanılarak ATP sentezini katalizler. Bu gen F0 kompleksinin, F0 ve F1 etkileşimlerinin ihtiyaç duyduğu F6 alt birimini kodlar. F6 alt birimi F0 ve F1 komplekslerinin birlikte bağlandığı periferik sapın bir parçasıdır [154, 155].
ATP5J2	ATP sentaz, H ⁺ taşınması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim F2	ATP5J2 geni insanlarda mitokondriyal bir enzim olan ATP sentaz alt birim f'yi kodlar. Mitokondriyal ATP sentaz oksidatif fosforilasyon boyunca iç membranda protonların elektrokimyasal gradiyentlerini kullanılarak ATP sentezini katalizler. [156, 157].
ATP5L	ATP sentaz, H ⁺ taşınması, mitokondriyal Fo kompleks, alt birim G	ATP sentaz alt birim g, insanlarda ATP5L geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Mitokondriyal ATP sentaz oksidatif fosforilasyon boyunca iç membranda protonların elektrokimyasal gradiyentlerini kullanılarak ATP sentezini katalizler. [151, 158].
ATP5O	ATP sentaz, H ⁺ taşınması, mitokondriyal F1	Bu gen tarafından kodlanan protein mitokondriyal matrikste F-tipinin ATPaz bileşenidir. F-tipi ATPaz katalitik

	kompleks, O alt birim	çekirdek ve proton kanalı membranından oluşur. Kodlanmış protein bu 2 bileşenin ara bağlanmasının bir kısmı olarak görünür ve proton iletkenliğinde veya konformasyonel değişikliklerin iletilmesinde yer alabilir. Bu gen ile ilgili doku ekspresyonları bildirilmiştir [159].
ATP6V0A2	ATPaz, H ⁺ taşıması, lizozomal V ₀ alt birim a ₂	Heteromultimerik enzim olan ATPaz 116 kDa alt birim a izoform 2, hücre içi veziküller içinde mevcuttur ve çeşitli hücrel bileşenlerin asitleştirilmesi için gerekli olan özelleşmiş hücrelerin membran plazmasındadır. V- ATPaz, ATP hidrolizi için periferel V membran etki alanı içerir ve proton translokasyonu için integral membran etki alanı içerir. Bu gen tarafından kodlanan alt birim V ₀ domaininin bileşenidir [160].
ATP6V0D2	ATPaz, H ⁺ taşıması, lizozomal 38kDa, V ₀ alt birim d ₂	ATP6V0D2 alt birim d'nin yakın ilişkili izoformlarından biridir ve çeşitli memeli dokularında eksprese olarak bulunur. ATP6V0D1 izoform formundan daha fazla spesifik ekspresyonlar gösterir [161].
ATP6V1C2	ATPaz, H ⁺ transporting, lysosomal 42kDa, V ₁ alt birim C ₂	Bu gen çoklu alt birim enzimi ökaryotik intrasellüler organellerin asidifikasyonuna aracılık eder. V-ATPaz sitozolik V ₁ etki alanından ve transmembran V ₀ etki alanından oluşur. Bu gen farklı VI domainin C alt birimi izoformlarını kodlar. Vakuolar – tip H ⁺ ATPaz bir multimerik proton pompasıdır ve çeşitli psikolojik süreçlerde geniş olarak yer alır [162].
ATP6V1E2	ATPaz, H ⁺ taşıması, lizozomal 31kDa, V ₁ alt birim E ₂	Basit bir genomik organizasyonu vardır. ATP6E özellikle testiste transkribe olur [163].
ATP6V1G3	ATPaz, H ⁺ taşıması, lizozomal 13kDa, V ₁ alt birim G ₃	Bu gen vakuolar ATPaz bileşenini kodlar ve bu çoklu alt birim enzimi ökaryotik intrasellüler organellerin asidifikasyonuna aracılık eder. Bu gen 3

		G alt birimi proteinlerinin bir tanesini kodlar [164].
LHPP	Fosfolizin fosfohistidin inorganik pirofosfat fosfataz	İnorganik pirofosfataz olarak tanımlanan bu gen fosfolizin fosfohistidin inorganik pirofosfat fosfataz olarak adlandırılır. İnorganik pirofosfata sadece oksijen bağlarını değil ayrıca fosfolizin, fosfohistidin ve imidodifosfata nitrojen bağlarını in vitro olarak katalizleyen bir enzimdir [165].
OXA1L	Oksidaz (sitokrom c) birleştirilmiş 1- benzeri	Bu gen mitokondriyal solunum zincirinin çeşitli komplekslerinin birleşmesinde yer alır. Memelilerin mitokondriyal iç membranında bulunan bu protein, iç membranda mitokondri translyasyon ürünlerinin sayısına katılmada yer alır. Bu proses boyunca, OXA1L'nin C terminal kuyruğu mitokondriyal ribozomlara bağlanır ve membran içinde açığa çıkan zincirlerin membrana eklenmesine ve sentezi kordine ettiğine inanılmaktadır [166].
PPA1	Pirofosfataz (inorganik) 1	İnorganik pirofosfataz ailesinin üyesi olan bu gen tarafından protein kodlanır. Pirofosfataz fosfatın, inorganik fosfata hidrolizini katalizler. Bu da hücrelerin fosfat metabolizması için önemlidir. İnorganik PPaz gastrik tümör gelişiminde yer alır ve insandaki gastrik kanserlerin yetersiz prognozu için kullanışlı bir marker olabileceği bildirilmiştir [167].
PPA2	Pirofosfataz (inorganik) 2	Bu gen mitokondrionda lokalize olur. İnorganik PPaz ailesinin bir üyesidir ve katalitik PPaz aktivitesi için önemli bir dizi temeli içermektedir. PPaz hücrelerin fosfat metabolizması için önemli olan pirofosfatın inorganik fosfata hidrolizi ile katalizlenir [168].

Real-Time PCR analizi aşağıdaki protokole göre uygulandı.

- Reaksiyonların olduğu tüpler buz üzerine yerleştirildi.
- cDNA sentezi yapıldıktan sonra her bir reaksiyona 91 µL RNaz içermeyen su pipetaj yapılarak eklendi.
- Ardından 3000-4000 rpm'e kadar spin yapıldı.
- PCR bileşenlerinin karışımı RT² Profiler PCR Array formatına göre aşağıdaki Tablo 8'de belirtildiği gibi yükleme rezervuarı içerisinde hazırlandı.

Tablo 8. PCR Bileşenleri Karışımı

Bileşenler	Hacim
(2x) RT ² SYBR Green Mastermix	1350 µL
cDNA Sentez Reaksiyon	102 µL
RNaz İçermeyen Su	1248 µL
Toplam Hacim	2700 µL

NOT: Performansın arttırılması için cDNA örneklerine RT² SYBR Green Mastermix eklendi.

Hazırlanan karışımdan her bir kuyucuğa 25 µL gelecek şekilde 96 kuyucuklu *Human Mitochondrial Energy Metabolism PCR Array*'e yükleme yapıldı.

(96- well plate'deki kuyucukların diplerinde enerji metabolizmasında görevli olan genlerin özel bölgelerine spesifik olan ileri ve geri primerler bulunmaktadır.)

- Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra, kuyucuklardaki hava kabarcıklarının gitmesi için oda sıcaklığında Eppendorf 5810R santrifüjünde 10,000 rpm’de 1 dakika spin yapılarak hava kabarcıkları giderildi.
- Plağın alt tarafına bakılarak kuyucuk içinde baloncuk olmadığı kontrol edildi.
- PCR döngü programı kurulurken, RT² Profiler PCR Array buz üzerinde bekletildi.
- 96 kuyucuklu mikropolağa yüklenen örnekler termal döngünün gerçekleştirilmesi için 7900 HT Real Time PCR cihazına yerleştirildi.
- Real-Time döngüsü programlandı. (Tablo 9)

Tablo 9. PCR Çalışma Protokolü

Döngüler	Süre	Sıcaklık	Açıklama
1	10dk	95°C	Bu ısıtma adımıyla HotStart DNA Taq Polimeraz aktive olur.
40	15 s 1 dk	95°C 60°C	Floresans veri toplamının gerçekleştirilmesi sağlanır.

- 1,5 saatlik bekleme sonrasında bilgisayarda SDS 2.3 programı kullanılarak amplifikasyon grafikleri ve C_T değerleri elde edildi.

3.2.4. Verilerin Data Analizi ve Yorumlanması

SDS 2.3 programında yapılan analiz sonuçları doğrultusunda tüm örnekler için elde edilen amlifikasyon grafiklerine ve Ct değerlerine uygun olacak *threshold* ayarlaması için yapılan adımlar aşağıdaki gibidir.

- 35'ten büyük olan Ct değerleri, cut-off değeri 35 olduğundan dolayı 35'e sabitlendi.
- Genomik DNA kontrol (GDC) kuyularının C_T değerleri incelendi. (C_T^{GDC} hesaplandı.)
- PCR pozitif kontrol (PPC) değerleri kullanılarak, reverse transkripsiyon kontrol (RTC) C_T değerleri incelendi.

$$\Delta C_T = ORTC_T^{RTC} - ORTC_T^{PPC}$$

- Pozitif PCR kontrol (PPC) kuyularının C_T değerleri incelendi. (C_T^{PPC} hesaplandı.)

Tüm örneklerin kontrol kuyularının Ct değerleri aşağıda verilen değerlere uygun olacak şekilde ayarlama yapıp en uygun *threshold* değeri seçildi. H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12 kuyucukları kontrol kuyucuklarıdır.

$$H6 \rightarrow GDC \rightarrow C_T^{GDC} \geq 35$$

$$H7, H8, H9 \rightarrow RTC$$

$$H10, H11, H12 \rightarrow PPC \rightarrow C_T^{PPC} = 20 \pm 2$$

$$ORTC_T^{RTC} - ORTC_T^{PPC} < 5$$

- Yukarıdaki parametrelere göre farklı *threshold* değerleri denendi ve 0,6 değerine karar verildi.

- Tüm örnekler için uygun olan treshhold değeri seçildikten sonra elde edilen sonuçlar Sabioscience'taki Standard RT² PCR Array programına (<http://www.sabiosciences.com/dataanalysis.php>) yüklenip tüm örneklerin data analizleri yapıldı. Programdaki data analizi sonucunda;
- Normalizasyon yapmak amacıyla, yolak odaklı genler için her bir plakta C_T değerlerini kullanarak ilgili genler ve housekeeping genler (HKG) için ΔC_T değerleri hesaplandı.
- Biyolojik ve/veya teknik tekrarlar gerçekleştirildikten sonra her bir hasta grubu için tekrarlanan diziler arasında her bir genin ortalama ΔC_T değeri hesaplandı.
- İki RT² Profiler PCR Array arasında her bir gen için ΔΔC_T değerleri hesaplandı.

Formül:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{grup 2}) - \Delta C_T(\text{grup 1})$$

Grup1: Kontrol örneklerin grubu

Grup2: Hasta örneklerin grubu

- Hasta örnek grubunda (grup 1) kontrole göre $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ gibi kaç kat değişim olduğu bulundu.

ΔΔC_T Data Analiz Metodunun Matematiksel Açıklaması

Eşik döngüsü (C_T) ve orijinal gen ekspresyon düzeyi arasındaki ilişki ters orantılı olmasından ve her döngüde ürün miktarının 2 katına çıkarılmasından dolayı, ilgili her bir gen için orijinal gen ekspresyon düzeyi (L) ;

L= 2^{-C_t} formülü ile bulunur.

İlgili genin (GOI) ekspresyon düzeyi, housekeeping genin (HKG) ekspresyon düzeyine bölünerek normalizasyon yapılır.

$$\frac{2^{-Ct(GOI)}}{2^{-Ct(HKG)}} = 2^{-[Ct(GOI)-Ct(HKG)]} = 2^{-\Delta Ct}$$

Gen ekspresyonları içindeki katlanma değişikliklerinin belirlenmesi için, eksperimental örnekteki normalize edilmiş GOI ekspresyonunun, kontrol örneğindeki normalize edilmiş aynı GOI'nın ekspresyonuna bölünmesi gerekir.

$$\frac{2^{-\Delta Ct(expt)}}{2^{-\Delta Ct(kontrol)}} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Hesaplamanın tamamı aşağıda verilmektedir.

$$\frac{2^{-\Delta Ct(GOI) \text{ expt}}}{2^{-\Delta Ct(HKG) \text{ expt}}} = \frac{2^{-[Ct(GOI)-Ct(HKG)] \text{ expt}}}{2^{-[Ct(GOI)-Ct(HKG)] \text{ kontrol}}} = \frac{2^{-\Delta Ct \text{ expt}}}{2^{-\Delta Ct \text{ kontrol}}} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

$$\frac{2^{-\Delta Ct(GOI) \text{ kontrol}}}{2^{-\Delta Ct(HKG) \text{ kontrol}}}$$

Data Analizinin Yorumlanması

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{grup 1}) - \Delta C_t (\text{kontrol})$$

$1 < \Delta\Delta C_t < 2$ ise ilgili gen grup 1'de upregüledir (ihmal edilebilir).

$2 < \Delta\Delta C_t$ ise ilgili gen grup 1'de upregüledir (ekspresyon artmış).

$0,5 < \Delta\Delta C_t < 1$ ise ilgili gen grup 1'de downregüledir (ihmal edilebilir).

$\Delta\Delta C_t < 0,5$ ise ilgili gen grup 1'de downregüledir (ekspresyon azalmış).

Fold Değişim > 1 iken Fold Regülasyon = Fold Değişim

Fold Değişim < 1 iken Fold Regülasyon = $-1/\text{Fold Değişim}$

BÖLÜM III

4. BULGULAR

Bu çalışmanın amacı elektron transport zincirinde görevli genlerin ekspresyon düzeylerinin uterus myomlu kadınlardan elde edilen myom dokularında araştırılmasıdır. Çalışma grubu Ege Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.'nda uterus myom tanısı konulmuş kişilerden oluşmaktadır. Çalışmamıza, 16 hastadan RNA kalitesi ile miktarı uygun olan ve yeterli cDNA sentez edilen 6 hastanın doku örneği dahil edilmiştir. Hasta grubu olarak hastaların opere myom dokusu, kontrol grubu olarak ise normal uterus dokusu kullanılmıştır. Bu doku örneklerinde elektron transport zincirinde görevli 84 genin ekspresyon profilleri kantitatif Real Time PCR yöntemiyle oluşturularak elde edilen sonuçlar PCR Array Data Analysis SDS 2.3 programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi.

4.1. Demografik Bulgular

Çalışmanın ilk evresini oluşturan E.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.'na başvuran 22-64 yaş aralığında reproduktif çağıdaki 16 hastanın demografik bulguları Tablo.10'da verilmiştir.

Tablo 10. Hastaların Demografik Bulguları

Hasta Numarası	Hasta Yaşı	Dokunun Alındığı Yer
1	49	Uterus, (+/- Adneksler), TM ve Prolapsus Hariç
2	46	Uterus, (+/- Adneksler), TM ve Prolapsus Hariç
3	22	Myom(LAR), Myomektomi, Uterus hariç
4	47	Uterus, (+/- Adneksler), TM ve Prolapsus Hariç
5	64	Uterus, (+/- Adneksler), TM ve Prolapsus Hariç
6	53	Myom(LAR), Myomektomi, Uterus hariç
7	45	Uterus, Prolapsus için (+/- Tube ve Overler)
8	48	Uterus, (+/- Adneksler), TM ve Prolapsus Hariç
9	42	Uterus, (+/- Adneksler), TM ve Prolapsus Hariç, Tuba Uterina

10	41	Myom(LAR), Myomektomi, Uterus hariç
11	42	Myom(LAR), Myomektomi, Uterus hariç
12	42	Uterus, (+/- Adneksler), TM ve Prolapsus Hariç
13	43	Uterus, (+/- Adneksler), TM ve Prolapsus Hariç
14	39	Uterus, (+/- Adneksler), TM ve Prolapsus Hariç
15	40	Uterus, (+/- Adneksler), TM ve Prolapsus Hariç
16	34	Uterus, (+/- Adneksler), TM ve Prolapsus Hariç

4.2. Doku Homojenizasyonu ve RNA İzolasyonu Sonuçları

Hastalardan, 23-35,5 mg ağırlığında uterus myom dokusu ve komşu dokudan normal doku alındı. Çalışmanın ilk evresinde 16 hastadan alınan myom ve sağlıklı doku örneklerine homojenizasyon ve RNA izolasyonu işlemi uygulandı. Gerçekleştirilen doku homojenizasyonu işlemi için tartılan doku ağırlıkları aşağıdaki Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 11. E.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.’na Başvuran Hastalardan Elde Edilen Dokuların Ağırlıkları

Hasta Numarası	Myom Doku Ağırlığı	Kontrol Doku Ağırlığı
1	24,0 mg	30,0 mg
2	35,5 mg	30,0 mg
3	31,0 mg	30,0 mg
4	28,0 mg	31,0 mg
5	29,0 mg	27,0 mg
6	31,0 mg	29,0 mg
7	25,0 mg	28,4 mg
8	23,0 mg	25,0 mg
9	30,0 mg	25,0 mg
10	29,0 mg	25,0 mg
11	27,0 mg	28,0 mg
12	24,0 mg	25,0 mg
13	28,0 mg	26,6 mg
14	30,0 mg	29,0 mg
15	30,0 mg	29,0 mg
16	29,0 mg	28,0 mg

Elde edilen RNA'nın saflığının ve miktarının hesaplanabilmesi için ND-1000 UV-Vis (Nanodrop) spektrofotometre kullanılarak 260 ve 280 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Yapılan ölçüm sonuçları aşağıdaki Tablo 12' de gösterilmiştir.

Tablo 12. Homojenizasyon ve Total RNA İzolasyonu Sonuçları

Hasta Numaraları	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
1H	364,94	9,124	4,659	1,96	1,43
1K	436,55	10,914	5,597	1,95	1,54
2H	373	9,325	4,702	1,98	2,09
2K	499,54	12,489	6,23	2	1,88
3H	381,68	9,542	4,796	1,99	1,98
3K	204,46	5,112	2,507	2,04	0,7
4H	369,72	9,243	4,627	2	2,2
4K	174,07	4,352	2,156	2,02	0,53
5H	242,3	6,057	2,974	2,04	0,53
5K	513,69	12,842	6,266	2,05	2,27
6H	247,6	6,19	3,087	2,01	1,57
6K	228,85	5,721	2,831	2,02	0,76
7H	451,94	11,298	5,695	1,98	1,89
7K	774,74	19,368	9,557	2,03	2,09
8H	293,16	7,329	3,697	1,98	2,16
8K	411	10,275	5,221	1,97	2,04
9H	581,98	14,549	7,253	2,01	1,44
9K	442,11	11,053	5,623	1,97	1,89
10H	639,72	15,993	8,081	1,98	1,94
10K	-0,53	-0,013	0,01	-1,32	-0,02
11H	653,45	16,336	8,351	1,96	2,03
11K	672,66	16,817	8,363	2,01	2,22
12H	-1,59	-0,04	-0,034	1,18	0,64
12K	680,73	17,018	8,423	2,02	2,1
13H	452,9	11,323	5,719	1,98	1,84
13K	365,25	9,131	4,556	2	1,92
14H	986,5	24,663	12,281	2,01	2,17
14K	584,18	14,604	7,314	2	2,23
15H	474,9	11,872	6,077	1,95	2,11
15K	955,34	23,884	12,108	1,97	2,2
16H	1886,23	47,156	23,427	2,01	2,21
16K	417,39	10,435	5,306	1,97	2,15

Her bir doku örneğinden izole edilen total RNA'ların miktarları ölçüldükten sonra bu sonuçlar doğrultusunda RNA saflığı ve konsantrasyonu (250 ng/μL ve üzeri), absorbans oranları A260/A280 (1,8-2,0), A260/A230 (2-2,2) seçme kriteri

olarak belirlendi. Konsantrasyonu yüksek olan RNA örnekleri seyreltildi. 2, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16 numaralı örnekler RNA bütünlüğüne bakılmak üzere seçildi. RNA bütünlüğüne bakılan örnekler Tablo 12’de kırmızı ile işaretlenmiştir.

RNA’nın Bütünlüğünün Ölçülmesi Sonuçları

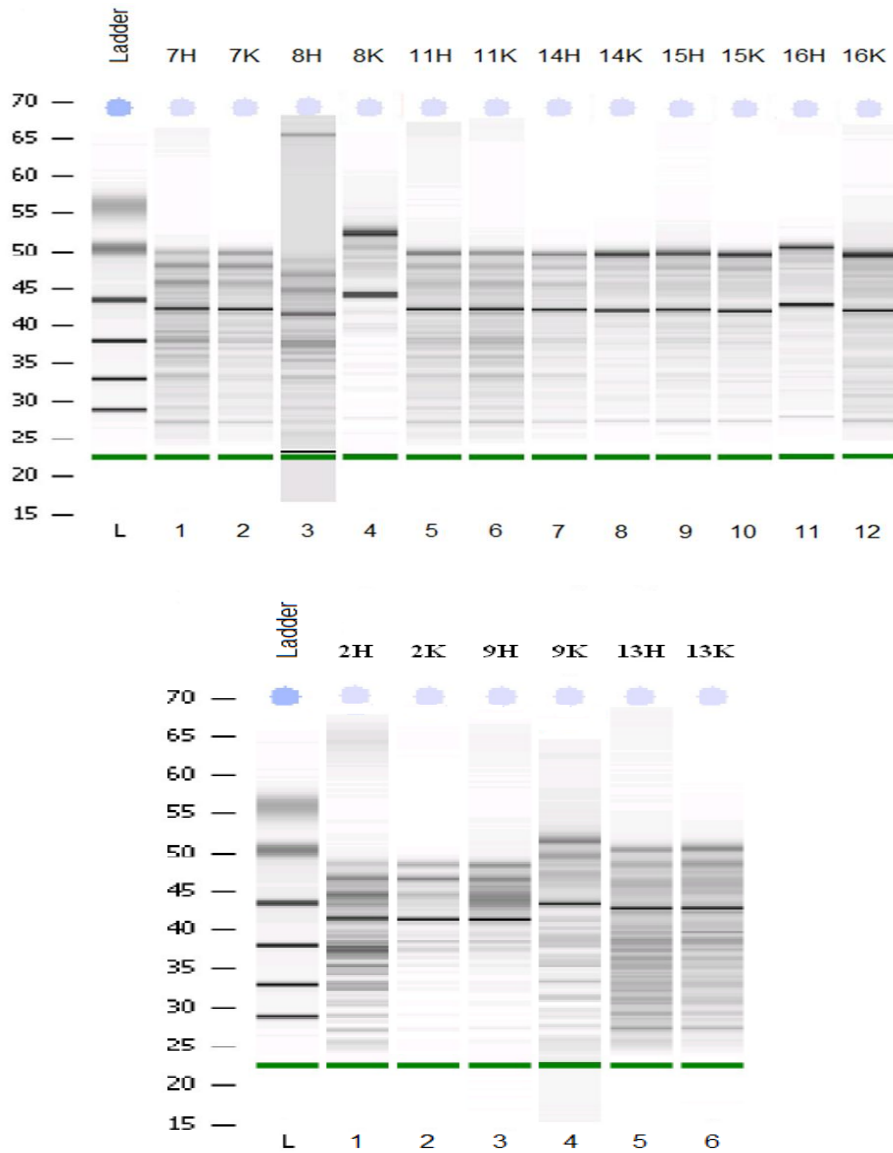
RNA bütünlüğü analizi öncesi çipe yükleme için 2, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16 numaralı örneklere seyreltme işlemi uygulandı. Yapılan seyreltme işlemleri Tablo 13’te gösterilmiştir.

Tablo 13. RNA Bütünlüğüne için Yapılan Seyreltme İşlemleri

Hasta Numara	RNA Konsantrasyonu	Seyreltme Faktörü
2. Hasta	373 ng/uL	(-)
2. Kontrol	499,54 ng/uL	(x2)
7. Hasta	451,94 ng/uL	(x2)
7. Kontrol	774,74 ng/uL	(x2)
8. Hasta	293,16 ng/uL	(-)
8. Kontrol	411 ng/uL	(x2)
9. Hasta	581,98 ng/uL	(x2)
9. Kontrol	442,11 ng/uL	(x2)
11. Hasta	653,45 ng/uL	(x2)
11. Kontrol	672,66 ng/uL	(x2)
13. Hasta	452,9 ng/uL	(x2)
13. Kontrol	365,25 ng/uL	(x2)
14. Hasta	986,5 ng/uL	(x3)
14. Kontrol	584,18 ng/uL	(x2)
15. Hasta	474,9 ng/uL	(x2)
15. Kontrol	955,34 ng/uL	(x3)
16. Hasta	1,886.23 ng/uL	(x4)
16. Kontrol	417,39 ng/uL	(x2)

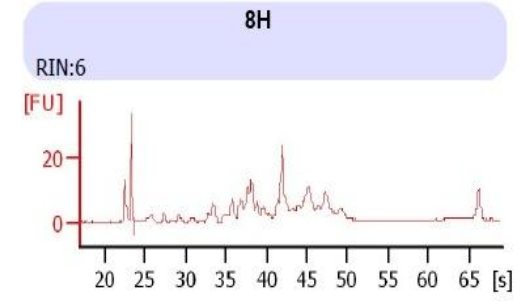
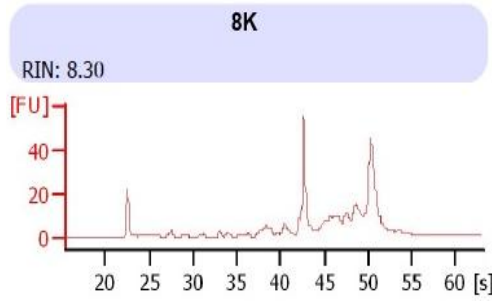
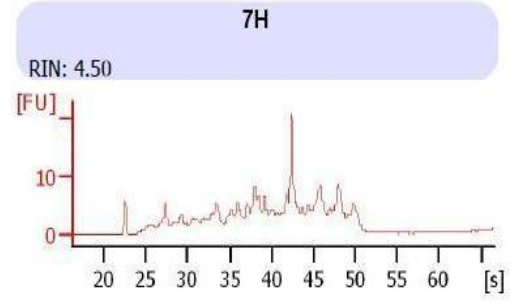
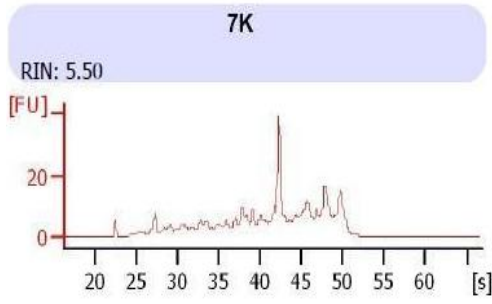
‘(-)’ ile gösterilen seyreltme yapılmadı anlamındadır.

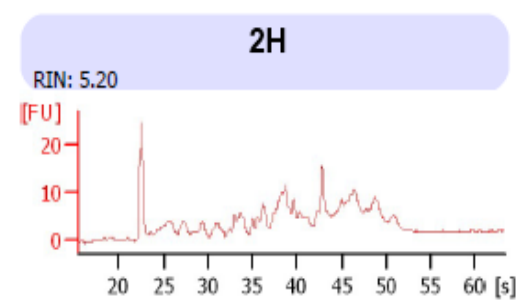
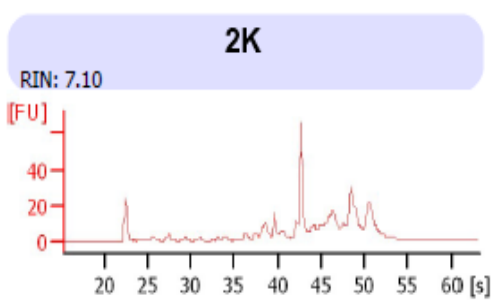
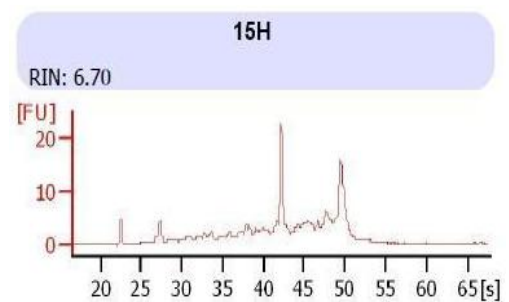
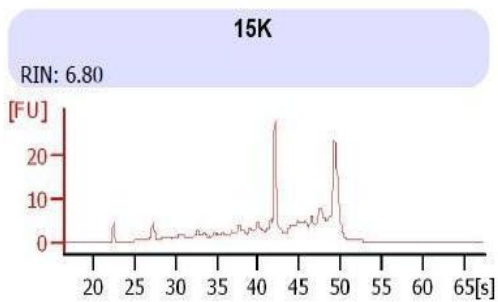
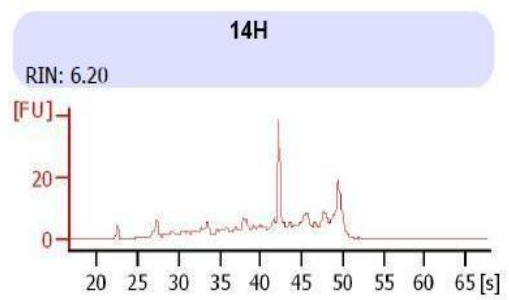
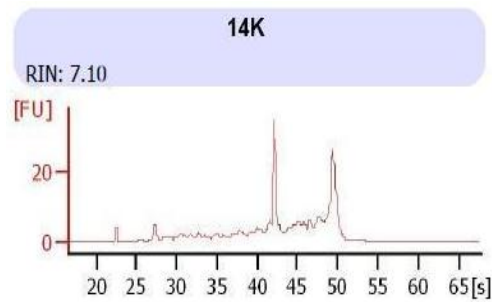
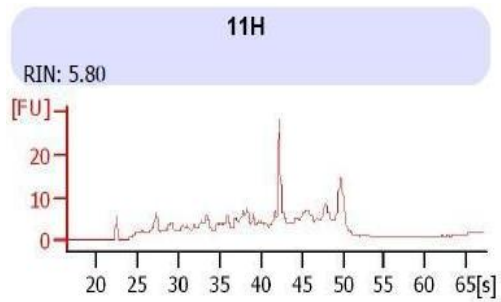
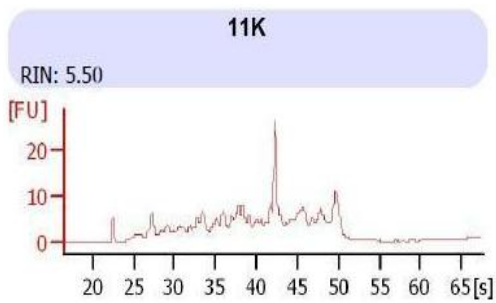
Seyreltme işleminin ardından Agilent 2100 Biyoanalizör cihazı ile RNA bütünlüğüne bakıldı. Elektroforetik analiz sonucunda rRNA'nın 2 altbirimi olan 18S (aşağıdaki bant) ve 28S (yukarıdaki bant)'in 2 ayrı bant şeklinde belirmesi beklenir. Hastalardan izole edilen RNA'larda elektroforetik analiz sonucunda birbirinden ayrılmış 2 belirgin bant hepsinde gözlenmedi. En iyi sonuç aldıklarımız 7, 8, 11, 14, 15, 16 numaralı örneklerdir. Bu durum bize izole edilen total RNA'nın degradasyona uğradığını düşündürmektedir. Elektroforetik analiz sonuçları Şekil 9'da gösterilmektedir.

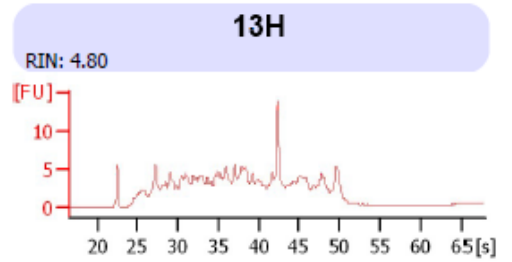
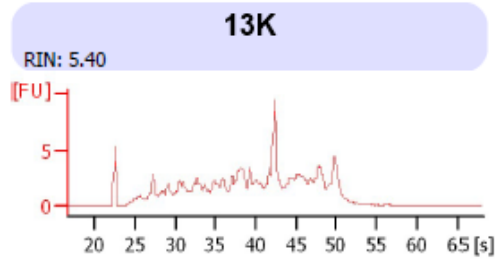
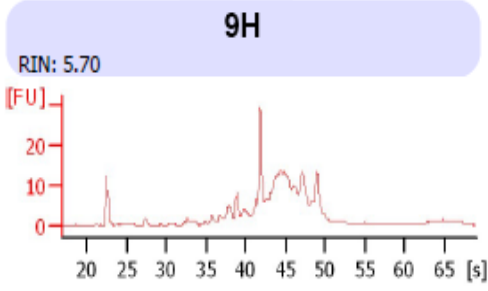
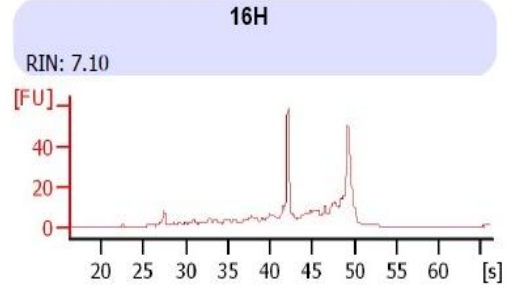
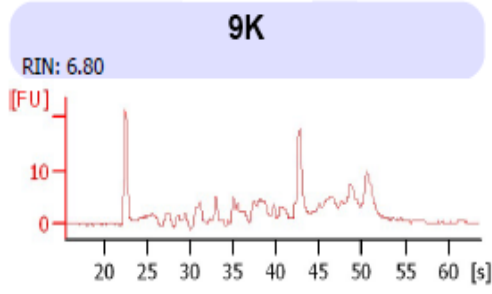
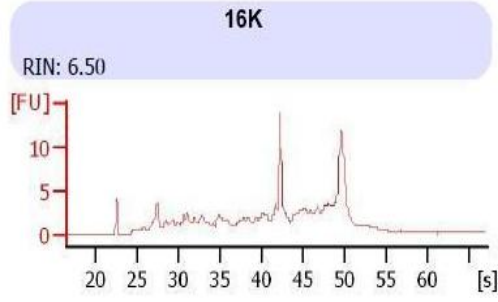


Şekil 9. Elektroforez Sonucu Elde Edilen Bantlar

Elektroferogramda rRNA'nın 2 altbirimi olan 18S (sol) ve 28S (sağ)'in 2 ayrı belirgin pik vermesi beklenir. 7, 8, 11, 14, 15, 16 numaralı örneklerden izole edilen RNA'lar hem örnek grubunda hem kontrol grubunda belirgin olarak 2 ayrı pik verdi. Örneklere ait RNA elektroferogram pik grafikleri Şekil 10'da gösterilmektedir.







Şekil 10. Örneklere ait RNA Elektroferogram Pik Grafikleri

Bunlardan en yüksek elde ettiğimiz RIN değerleri seçildi. Tablo 14’te analiz sonucu elde edilen RIN değerleri gösterilmiştir.

Tablo 14. RNA Bütünlüğü Analizi Sonucu Elde Edilen RIN Değerleri

Hasta Numara	RIN Değeri
2. Hasta	5,2
2. Kontrol	7,1
7. Hasta	4,5
7. Kontrol	5,5
8. Hasta	6
8. Kontrol	6,83
9. Hasta	5,7
9. Kontrol	6,8
11. Hasta	5,8
11. Kontrol	5,5
13. Hasta	4,8
13. Kontrol	5,4
14. Hasta	6,2
14. Kontrol	7,1
15. Hasta	6,7
15. Kontrol	6,8
16. Hasta	7,1
16. Kontrol	7,5

Seçilen RIN değerleri kırmızı ile işaretlenmiştir.

4.3. Real Time PCR Analizi Sonuçları

İzole Edilmiş Total RNA'dan cDNA Sentezi Sonuçları

RNA bütünlüğü analizi sonucunda elde edilen RIN değerleri doğrultusunda cDNA sentezi yapılması için 7, 8, 11, 14, 15, 16 numaralı örnekler seçildi. Kalitesi ve miktarı yeterli görülen, izole edilen RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. Tablo 15'te yapılan cDNA sentez sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 15. cDNA Sentez Sonuçları

	NG / UL	A260	A280	260 / 280	260/230
7K cDNA	1,319.07	26,310	15,613	1,69	1,94
7H cDNA	1,087.45	21,749	12,630	1,72	2,02
8K cDNA	1,286.95	25,739	15,636	1,65	2,03
8H cDNA	1,345.24	26,905	16,252	1,66	2,06
11K cDNA	1,337.88	26,758	15,845	1,69	1,93
11H cDNA	1,303.64	26,073	15,433	1,69	1,95
14K cDNA	1,270.32	25,406	15,025	1,69	1,95
14H cDNA	1,254,04	25,081	14,758	1,70	1,95
15K cDNA	1,285.95	25,719	15,140	1,70	1,94
15H cDNA	1,280.34	25,607	15,108	1,69	1,95
16K cDNA	1,124.63	22,493	13,240	1,70	2,00
16H cDNA	1,286.81	25,736	15,292	1,68	1,96

PCR işlemi için en az 1000 ng/ μ L cDNA gerekmektedir. Elde edilen sonuçlara göre tüm örneklere ait RNA'lar, başarılı bir şekilde cDNA'ya çevrildi.

Threshold'un Belirlenmesi

Uygun *threshold* değerini bulabilmek için 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8, 0,9 değerleri tüm hasta ve kontrol doku örneklerinde son 7 kuyucuktaki kontrol genler için bakıldı. Aralarından uygun olan Ct değerini veren en küçük *threshold* değerinin 0,6 olduğuna karar verildi.

Threshold değeri 0,2 iken elde edilen Ct değerleri Tablo 16'da, threshold değeri 0,4 iken elde edilen Ct değerleri Tablo 17'de, threshold değeri 0,5 iken elde edilen Ct

değerleri Tablo 18’de, threshold değerleri 0,6 iken elde edilen Ct değerleri Tablo 19’da, threshold değerleri 0,8 iken elde edilen Ct değerleri Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 16. Threshold Değeri 0,2 iken Elde Edilen Ct Değerleri

0,2	7K	7H	8K	8H	11K	11H	14K	14H	15K	15H	16K	16H
PPC	18,556	18,793	18,287	18,944	18,690	18,863	18,702	18,958	18,713	18,514	18,645	18,801
	18,530	18,790	18,473	19,014	18,527	18,914	18,794	18,820	18,742	18,797	18,950	18,758
	19,117	19,257	18,790	19,383	19,308	19,109	19,360	19,254	18,869	19,316	19,240	18,947
RTC	22,139	24,252	21,810	22,245	22,416	22,583	22,775	22,478	22,607	22,693	23,489	22,654
	22,318	24,325	21,771	22,137	21,932	22,887	22,740	22,424	22,544	22,538	23,643	22,702
	22,248	24,262	21,679	22,191	22,844	22,614	22,681	22,385	22,571	22,698	23,250	22,556
GDC	36,416	X	34,099	35,235	35,818	X	36,491	35,618	37,029	35,845	33,689	37,029
PPC ORT	18,734	18,947	18,517	19,114	18,842	18,962	18,952	19,011	18,775	18,876	18,945	18,835
RTC ORT	22,235	24,280	21,753	22,191	22,397	22,695	22,732	22,429	22,574	22,643	23,461	22,637
PPC-RTC	3,501	5,333	3,237	3,077	3,556	3,733	3,780	3,418	3,799	3,767	4,516	3,802

Kırmızı ile işaretli değerler $GDC \rightarrow C_T^{GDC} \geq 35$, $ORTC_T^{RTC} - ORT C_T^{PPC} < 5$

koşulunu sağlamadığından dolayı *treshold* 0,2 değeri seçilmedi.

Tablo 17. Threshold Değeri 0,4 iken Elde Edilen Ct Değerleri

0,4	7K	7H	8K	8H	11K	11H	14K	14H	15K	15H	16K	16H
PPC	19,642	19,836	19,344	19,934	19,662	19,842	19,710	19,914	19,698	19,442	19,676	19,795
PPC	19,544	19,820	19,398	19,984	19,522	19,942	19,848	19,793	19,714	19,829	19,942	19,751
PCC	20,063	20,248	19,772	20,375	20,264	20,072	20,317	20,169	19,893	20,257	20,209	19,998
RTC	23,230	25,217	22,903	23,204	23,412	23,602	23,769	23,461	23,569	23,654	24,485	23,644
RTC	23,373	25,278	22,820	23,123	23,078	23,839	23,750	23,448	23,495	23,543	24,618	23,717
RTC	23,338	25,249	22,767	23,145	23,899	23,601	23,686	23,357	23,528	23,728	24,207	23,571
GDC	37,211	X	35,134	36,222	36,878	X	37,492	36,678	38,044	36,919	34,697	37,126
PPC ORT	19,750	19,968	19,505	20,098	19,816	19,952	19,958	19,959	19,768	19,843	19,942	19,848
RTC ORT	23,314	25,248	22,830	23,157	23,463	23,681	23,735	23,422	23,531	23,642	24,437	23,644
PPC-RTC	3,564	5,280	3,325	3,060	3,647	3,729	3,777	3,463	3,762	3,799	4,494	3,796

$$\text{Kırmızı ile işaretli değerler GDC} \rightarrow C_T^{\text{GDC}} \geq 35, \text{ORTC}_T^{\text{RTC}} - \text{ORT } C_T^{\text{PPC}} < 5$$

koşulunu sağlamadığından dolayı *threshold* 0,4 değeri seçilmedi.

Tablo 18. Threshold Değeri 0,5 iken Elde Edilen Ct Değerleri

0,5	7K	7H	8K	8H	11K	11H	14K	14H	15K	15H	16K	16H
PPC	19,983	20,180	19,677	20,272	18,341	20,177	20,053	20,237	20,023	19,754	20,014	20,098
PPC	19,872	20,165	19,706	20,292	18,154	20,275	20,207	20,131	20,049	20,169	20,268	20,075
PPC	20,388	20,584	20,057	20,709	18,873	20,402	20,650	20,492	20,231	20,578	20,540	20,346
RTC	23,578	25,547	23,248	23,529	21,959	23,921	24,076	23,781	23,889	23,968	24,806	23,960
RTC	23,708	25,604	23,172	23,454	21,521	24,140	24,061	23,772	23,808	23,858	24,937	24,040
RTC	23,684	25,576	23,115	23,475	22,457	23,910	23,985	23,681	23,839	24,019	24,520	23,895
GDC	37,508	X	35,513	36,559	35,409	X	37,853	37,063	38,338	37,302	34,976	38,458
PPC ORT	20,081	20,310	19,813	20,424	18,456	20,285	20,303	20,287	20,101	20,167	20,274	20,173
RTC ORT	23,657	25,576	23,178	23,486	21,979	23,990	24,041	23,745	23,845	23,948	24,754	23,965
RTC-PPC	3,576	5,266	3,365	3,062	3,523	3,706	3,737	3,458	3,744	3,781	4,480	3,792

$$\text{Kırmızı ile işaretli değerler GDC} \rightarrow C_T^{\text{GDC}} \geq 35, \text{ORTC}_T^{\text{RTC}} - \text{ORT } C_T^{\text{PPC}} < 5$$

koşulunu sağlamadığından dolayı *threshold* 0,5 değeri seçilmedi.

Tablo 19. Threshold Değeri 0,6 iken Elde Edilen Ct Değerleri

0,6	7K	7H	8K	8H	11K	11H	14K	14H	15K	15H	16K	16H
PPC	20,280	20,460	19,952	20,546	20,252	20,439	20,326	20,499	20,288	20,005	20,291	20,365
PPC	20,141	20,442	19,964	20,556	20,106	20,545	20,484	20,398	20,316	20,445	20,537	20,347
PPC	20,661	20,866	20,337	20,991	20,869	20,679	20,932	20,764	20,508	20,847	20,816	20,630
RTC	23,865	25,823	23,533	23,801	23,983	24,176	24,345	24,014	24,160	24,248	25,052	24,212
RTC	23,986	25,878	23,457	23,730	23,718	24,404	24,335	24,017	24,049	24,111	25,192	24,320
RTC	23,970	25,850	23,410	23,744	24,545	24,156	24,255	23,951	24,076	24,291	24,781	24,155
GDC	37,761	X	35,843	36,842	37,594	X	38,153	37,388	38,632	37,619	35,259	38,789
PPC ORT	20,361	20,589	20,084	20,698	20,409	20,554	20,581	20,554	20,371	20,432	20,548	20,447
RTC ORT	23,940	25,850	23,467	23,758	24,082	24,245	24,312	23,994	24,095	24,217	25,008	24,229
RTC-PPC	3,580	5,261	3,382	3,061	3,673	3,691	3,731	3,440	3,724	3,784	4,460	3,782

Kırmızı ile işaretli değer $ORTC_T^{RTC} - ORT C_T^{PPC} < 5$ koşulunu sağlamadı ama denenen *threshold* değerleri arasından en çok uygun olan 0,6 değeri olduğundan dolayı bu değer seçildi.

Tablo 20. Threshold Değeri 0,8 iken Elde Edilen Ct Değerleri

0,8	7K	7H	8K	8H	11K	11H	14K	14H	15K	15H	16K	16H
PPC	20,746	20,915	20,382	20,975	20,697	20,863	20,766	20,929	20,716	20,445	20,735	20,804
PPC	20,595	20,892	20,364	20,957	20,559	20,925	20,932	20,829	20,749	20,891	20,978	20,79
PPC	21,047	21,291	20,807	21,423	21,282	21,071	21,339	21,155	20,961	21,247	21,229	21,032
RTC	24,296	26,235	23,936	24,204	24,436	24,619	24,789	24,456	24,607	24,686	25,5	24,657
RTC	24,401	26,288	23,918	24,141	24,133	24,845	24,785	24,458	24,491	24,551	25,64	24,777
RTC	24,421	26,267	23,886	24,145	24,997	24,589	24,698	24,383	24,515	24,738	25,16	24,608
GDC	38,159	X	36,381	37,237	38,154	X	38,613	37,93	39,139	38,126	35,739	39,34
PPC ORT	20,796	21,033	20,518	21,118	20,846	20,953	21,012	20,971	20,809	20,861	20,981	20,875
RTC ORT	24,373	26,263	23,913	24,163	24,522	24,684	24,757	24,432	24,538	24,658	25,433	24,681
RTC-PPC	3,577	5,231	3,396	3,045	3,676	3,731	3,745	3,461	3,729	3,797	4,453	3,805

Kırmızı ile işaretli değer $ORTC_T^{RTC} - ORT C_T^{PPC} < 5$ koşulunu sağlamadı. Fakat bundan önce denenen 0,6 *threshold* değeri daha küçük olduğundan dolayı bu değer seçilmedi.

$$GDC \rightarrow C_T^{GDC} \geq 35$$

$$PPC \rightarrow C_T^{PPC} = 20 \pm 2$$

$$ORTC_T^{RTC} - ORT C_T^{PPC} < 5$$

Yukarıdaki parametrelerde göre en uygun *threshold* değerinin 0,6 olduğuna karar verildikten sonra tüm hasta ve kontrol örneklerine *threshold* 0,6 değeri uygulandı. Örneklerin Ct değerleri *threshold* 0,6 değerine göre elde edildi.

Real Time PCR cihazından elde edilen 7, 8, 11, 14, 15, 16 numaralı hasta ve kontrol örnekleri için Ct değerleri aşağıdaki Tablo 21’de verilmiştir.

Tablo 21. Tüm Hasta ve Kontrol Örneklerinin Ct Değerleri

Genler	7K	7H	8K	8H	11K	11H	14K	14H	15K	15H	16K	16H
ATP12A	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000
ATP4A	35,000	35,000	34,772	35,000	34,981	33,680	34,991	33,540	34,044	35,000	35,000	34,619
ATP4B	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	34,528	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000
ATP5A1	26,154	28,901	23,669	27,484	24,880	24,647	23,701	24,188	23,812	24,341	23,730	23,356
ATP5B	25,958	28,931	23,570	27,153	25,483	24,108	23,632	23,993	23,517	24,352	23,934	23,373
ATP5C1	25,281	27,947	23,965	26,381	25,788	24,630	24,126	24,494	24,242	24,579	24,560	23,953
ATP5F1	28,367	30,709	26,064	29,695	27,957	27,078	25,977	26,778	26,009	26,428	25,963	25,894
ATP5G1	27,483	29,536	25,806	28,620	26,329	25,988	25,533	25,441	24,986	25,865	26,116	25,345
ATP5G2	29,465	31,528	28,630	29,237	29,499	28,695	28,735	29,169	30,506	30,140	31,377	28,314
ATP5G3	27,717	29,669	24,876	28,479	26,292	26,039	24,512	25,300	24,588	25,137	25,117	24,553
ATP5H	26,658	29,413	25,107	27,740	26,051	26,459	24,553	25,378	24,951	25,925	26,021	25,032
ATP5I	24,920	26,204	23,712	25,604	24,368	24,861	23,814	24,150	23,637	24,102	23,992	23,680
ATP5J	26,141	29,353	23,954	27,385	24,925	35,000	24,211	24,666	24,234	24,563	24,316	23,970
ATP5J2	32,634	35,000	31,245	33,666	30,865	29,792	31,157	30,599	31,719	31,624	31,600	29,757
ATP5L	33,206	35,000	32,475	33,509	32,510	31,931	32,951	31,621	31,683	32,983	32,859	31,616
ATP5O	25,290	27,624	23,585	26,346	24,657	24,113	23,773	23,935	23,884	24,247	23,737	23,724
ATP6V0A2	30,971	33,186	29,063	32,561	30,411	28,591	29,152	30,183	28,504	29,139	29,610	28,578
ATP6V0D2	35,000	35,000	32,470	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000
ATP6V1C2	35,000	35,000	34,751	35,000	34,494	32,149	35,000	34,925	34,711	34,977	35,000	34,661
ATP6V1E2	31,278	34,210	30,403	31,030	30,205	29,753	30,508	30,890	30,155	30,249	31,706	29,853
ATP6V1G3	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000
BCS1L	29,866	32,448	28,530	29,989	28,599	28,296	28,655	28,901	28,602	28,700	29,997	27,998
COX4I1	24,872	27,170	23,145	26,056	24,151	25,103	23,169	23,418	23,155	23,794	23,325	22,850
COX4I2	29,302	33,610	28,961	30,970	29,150	30,699	28,517	28,697	28,069	28,254	29,100	28,566
COX5A	27,511	30,804	25,998	28,741	26,411	35,000	25,819	25,679	25,615	26,289	26,339	25,566

COX5B	26,527	29,464	24,774	27,980	25,674	25,109	24,653	24,487	24,656	25,344	24,963	24,504
COX6A1	27,279	30,007	25,755	27,673	25,553	23,940	25,318	25,415	25,085	25,747	25,922	25,251
COX6A2	33,747	35,000	30,804	33,905	32,965	35,000	32,398	32,318	31,311	32,295	32,417	32,884
COX6B1	27,900	30,961	26,826	28,736	28,467	27,371	26,818	26,560	26,533	26,977	27,706	26,377
COX6B2	35,000	35,000	33,724	35,000	35,000	35,000	34,482	35,000	34,142	34,538	34,395	35,000
COX6C	35,000	35,000	35,000	35,000	38,662	34,686	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000	35,000
COX7A2	27,793	29,865	24,913	28,473	26,408	26,475	24,891	25,974	24,714	25,058	25,079	24,586
COX7A2L	26,647	30,802	25,098	27,916	26,427	26,639	25,242	25,323	25,497	25,960	26,259	24,952
COX7B	26,247	28,795	24,578	26,511	25,230	24,970	24,766	24,580	24,297	24,975	24,793	24,528
COX8A	26,818	30,267	24,970	27,902	25,864	25,682	24,943	25,746	24,294	25,573	25,950	24,731
COX8C	33,587	35,000	32,505	34,885	32,702	33,330	32,834	32,219	32,370	32,005	33,056	33,117
CYC1	31,371	35,000	28,921	32,218	29,372	35,000	29,012	29,112	28,811	29,311	31,332	29,195
LHPP	29,408	32,980	28,511	30,693	27,867	27,333	27,977	27,553	27,029	28,466	28,979	28,850
NDUFA1	31,655	34,667	29,437	32,029	29,558	29,707	29,349	29,416	28,805	29,303	29,509	28,939
NDUFA10	27,395	30,007	26,505	27,910	26,410	26,185	26,449	26,631	26,695	26,797	27,843	26,275
NDUFA11	26,136	28,468	25,348	26,659	27,444	25,494	25,500	25,390	25,057	25,661	25,834	25,132
NDUFA2	27,940	30,739	26,096	28,721	27,516	27,305	26,153	26,578	26,016	26,726	26,432	25,800
NDUFA3	26,794	29,246	25,950	27,058	27,387	26,138	25,644	25,934	25,123	25,876	26,923	25,605
NDUFA4	27,298	30,223	25,167	28,788	26,236	25,822	25,042	26,660	24,954	25,479	25,651	25,006
NDUFA5	34,288	35,000	31,556	35,000	33,818	32,117	31,794	32,129	31,128	32,351	32,290	30,784
NDUFA6	31,034	33,917	28,764	32,353	29,932	29,136	29,127	29,005	28,542	28,640	28,664	27,840
NDUFA7	30,766	33,043	28,123	31,932	29,342	28,962	27,958	28,632	27,647	28,404	28,085	27,646
NDUFA8	29,909	33,941	27,898	30,961	31,514	29,178	27,870	27,954	27,655	28,346	28,544	27,459
NDUFAB1	28,230	30,394	25,984	27,978	26,475	35,000	26,135	26,021	26,146	26,484	26,242	25,971
NDUFB10	26,963	29,707	24,858	27,957	26,287	26,081	25,397	25,749	25,307	25,790	25,227	24,857
NDUFB2	27,760	30,128	25,832	28,337	26,657	26,168	25,672	26,288	25,154	25,970	25,659	25,610

NDUFB3	27,595	30,075	25,500	28,545	26,626	26,280	25,413	25,580	25,471	25,956	25,393	25,521
NDUFB4	26,981	29,695	24,819	27,704	27,488	25,614	25,120	25,141	25,010	25,422	25,763	24,319
NDUFB5	28,406	31,007	25,772	29,350	28,140	27,325	25,960	27,410	26,138	26,408	26,338	25,546
NDUFB6	31,762	32,934	27,726	31,900	29,159	29,686	27,842	29,263	27,906	28,003	27,754	27,684
NDUFB7	26,845	29,949	25,455	27,754	27,460	25,936	25,764	26,450	25,507	26,241	26,917	26,064
NDUFB8	26,913	29,473	24,484	28,168	25,525	25,604	24,732	25,824	24,857	25,157	24,698	24,347
NDUFB9	25,826	28,797	24,356	26,732	25,039	24,882	24,513	24,964	24,324	25,126	25,175	22,412
NDUFC1	27,671	30,418	25,434	28,999	27,217	26,934	25,453	26,443	25,977	25,923	25,981	25,311
NDUFC2	31,452	35,000	29,751	33,370	31,272	30,057	29,582	30,548	29,575	29,675	30,731	28,628
NDUFS1	27,671	31,031	26,157	28,640	26,723	35,000	26,165	26,218	26,167	26,635	27,254	26,100
NDUFS2	27,229	30,503	26,274	28,121	26,463	25,900	26,018	25,986	25,932	26,637	27,548	25,862
NDUFS3	28,189	30,406	26,488	28,740	27,063	26,111	26,548	26,380	26,632	27,053	26,494	26,054
NDUFS4	27,034	30,163	25,733	28,127	26,599	26,493	25,955	26,165	25,930	26,410	26,128	25,505
NDUFS5	25,128	27,744	23,219	25,425	25,916	23,605	23,188	23,793	22,905	23,286	23,597	22,678
NDUFS6	26,951	28,622	25,029	27,963	27,803	25,908	24,895	25,173	24,556	25,549	24,751	24,858
NDUFS7	30,042	32,718	28,949	30,661	28,875	28,458	28,472	28,376	27,850	28,950	30,537	28,214
NDUFS8	26,219	27,712	25,253	27,011	25,720	25,419	25,180	25,034	24,572	25,666	25,428	24,831
NDUFV1	27,407	30,582	25,759	28,111	26,847	26,016	25,840	26,280	25,678	26,155	27,004	25,401
NDUFV2	26,756	29,654	25,965	27,922	25,974	25,888	25,300	25,519	25,220	25,843	26,166	25,151
NDUFV3	28,092	30,591	26,555	28,931	27,780	27,160	26,891	27,133	26,405	27,054	27,502	26,321
OXA1L	26,031	28,850	25,082	27,036	26,372	25,943	25,360	26,085	25,560	25,747	25,946	24,975
PPA1	26,934	31,001	25,961	28,494	26,190	35,000	25,609	25,909	25,079	26,159	25,923	26,557
PPA2	26,957	30,097	26,351	28,362	26,422	26,340	26,366	25,802	26,580	26,863	27,425	26,076
SDHA	27,462	31,844	25,907	28,485	26,844	26,668	26,191	26,015	25,831	26,430	26,991	25,746
SDHB	26,551	30,368	25,341	27,626	26,484	25,843	25,467	25,717	25,362	25,902	26,171	25,380
SDHC	27,973	32,629	26,297	29,682	27,657	27,308	26,638	26,712	26,653	26,876	26,995	26,585

SDHD	30,043	34,856	28,212	31,174	29,852	28,072	28,212	28,754	28,192	28,347	29,412	27,849
UQCR11	30,248	33,125	28,318	31,120	29,491	28,827	28,330	28,658	28,140	28,186	29,166	27,927
UQCRC1	28,004	31,874	26,436	29,105	27,132	26,677	26,259	26,700	25,941	26,884	27,504	26,423
UQCRC2	26,215	29,190	24,939	27,201	25,774	25,265	25,186	25,576	25,403	25,464	26,143	24,442
UQCRES1	28,148	31,293	25,439	28,867	27,323	27,012	25,732	26,495	25,421	25,973	26,483	25,178
UQCRH	27,102	29,229	24,576	27,938	25,996	25,802	24,847	25,444	24,814	25,043	25,613	24,492
UQCRQ	27,988	29,988	25,885	28,616	27,552	27,534	26,025	26,617	25,784	26,203	26,202	25,646

4.4. Sonuçların Analizi ve Yorumlanması

Çalışmanın sonuçları, PCR Array Data Analysis SDS 2.3 programı kullanılarak analiz edildi. Her bir gen için hasta ve kontrollerdeki Ct değerlerinin ortalamaları alındı ve standart sapmaları hesaplandı. Ortalama Ct ve standart sapma değerleri Tablo 22’de gösterilmektedir.

Tablo 22. Tüm Örneklerin Ortalama Ct Değerleri ve Standart Sapması

Gen Sembolü	ORTALAMA Ct		STANDART SAPMA	
	Kontrol Grup	Grup 1	Kontrol Grup	Grup 1
ATP12A	35,000	35,000	0,000	0,000
ATP4A	34,800	34,470	0,380	0,686
ATP4B	35,000	34,920	0,000	0,193
ATP5A1	24,320	25,490	1,009	2,186
ATP5B	24,350	25,320	1,083	2,207
ATP5C1	24,660	25,330	0,723	1,524
ATP5F1	26,720	27,760	1,123	1,956
ATP5G1	26,040	26,800	0,848	1,805
ATP5G2	29,700	29,510	1,061	1,162
ATP5G3	25,520	26,530	1,256	2,062
ATP5H	25,560	26,660	0,806	1,651

ATP5I	24,070	24,770	0,490	0,978
ATP5J	24,630	27,490	0,807	4,215
ATP5J2	31,540	31,740	0,620	2,162
ATP5L	32,610	32,780	0,533	1,336
ATP5O	24,150	25,000	0,672	1,601
ATP6V0A2	29,620	30,370	0,919	2,032
ATP6V0D2	34,580	35,000	1,033	0,000
ATP6V1C2	34,830	34,450	0,210	1,136
ATP6V1E2	30,710	31,000	0,634	1,658
ATP6V1G3	35,000	35,000	0,000	0,000
BCS1L	29,040	29,390	0,692	1,647
COX4I1	23,640	24,730	0,718	1,672
COX4I2	28,850	30,130	0,467	2,057
COX5A	26,280	28,680	0,674	3,712
COX5B	25,210	26,150	0,751	2,075
COX6A1	25,820	26,340	0,776	2,163
COX6A2	32,270	33,570	1,074	1,254
COX6B1	27,370	27,830	0,761	1,749
COX6B2	34,460	34,920	0,496	0,189
COX6C	35,000	34,950	0,000	0,128
COX7A2	25,630	26,740	1,224	2,044
COX7A2L	25,860	26,930	0,662	2,168
COX7B	24,990	25,730	0,689	1,669
COX8A	25,470	26,650	0,907	2,061
COX8C	32,840	33,430	0,437	1,280
	ORTALAMA Ct		STANDART SAPMA	
Gen Sembolü	Kontrol Grup	Grup 1	Kontrol Grup	Grup 1
CYC1	29,800	31,640	1,214	2,853
LHPP	28,300	29,310	0,853	2,159
NDUFA1	29,720	30,680	0,987	2,244
NDUFA10	26,880	27,300	0,596	1,462
NDUFA11	25,890	26,130	0,851	1,258
NDUFA2	26,690	27,640	0,825	1,802
NDUFA3	26,300	26,640	0,866	1,369
NDUFA4	25,720	27,000	0,907	2,068
NDUFA5	32,480	32,900	1,284	1,721
NDUFA6	29,340	30,150	0,969	2,408
NDUFA7	28,650	29,770	1,186	2,178
NDUFA8	28,900	29,640	1,522	2,439

NDUFAB1	26,540	28,640	0,846	3,538
NDUFB10	25,670	26,690	0,789	1,796
NDUFB2	26,120	27,080	0,939	1,773
NDUFB3	26,000	26,990	0,914	1,879
NDUFB4	25,860	26,320	1,120	2,000
NDUFB5	26,790	27,840	1,165	2,004
NDUFB6	28,690	29,910	1,600	2,106
NDUFB7	26,320	27,070	0,854	1,557
NDUFB8	25,200	26,430	0,910	1,964
NDUFB9	24,870	25,490	0,587	2,132
NDUFC1	26,290	27,340	0,938	1,966
NDUFC2	30,390	31,210	0,866	2,442
NDUFS1	26,690	28,940	0,650	3,521
NDUFS2	26,580	27,170	0,663	1,845
NDUFS3	26,900	27,460	0,666	1,758
NDUFS4	26,230	27,140	0,491	1,714
NDUFS5	23,990	24,420	1,231	1,867
NDUFS6	25,660	26,350	1,363	1,563
NDUFS7	29,120	29,560	0,998	1,788
NDUFS8	25,400	25,950	0,553	1,156
NDUFV1	26,420	27,090	0,751	1,938
NDUFV2	25,900	26,660	0,572	1,755
NDUFV3	27,200	27,870	0,688	1,590
OXA1L	25,730	26,440	0,477	1,354
PPA1	25,950	28,850	0,617	3,570
	ORTALAMA Ct		STANDART SAPMA	
Gen Sembolü	Kontrol Grup	Grup 1	Kontrol Grup	Grup 1
PPA2	26,680	27,260	0,428	1,661
SDHA	26,540	27,530	0,659	2,322
SDHB	25,900	26,810	0,570	1,914
SDHC	27,040	28,300	0,651	2,414
SDHD	28,990	29,840	0,881	2,736
UQCR11	28,950	29,640	0,832	2,050
UQCRC1	26,880	27,940	0,797	2,163
UQCRC2	25,610	26,190	0,520	1,723
UQCRFS1	26,420	27,470	1,117	2,246
UQCRH	25,490	26,320	0,957	1,849
UQCRQ	26,570	27,430	0,948	1,631

Ct değerlerine bakılarak grup 1’de kontrol grubuna göre ekspresyonun kaç kat değiştiğini ifade eden kat değişim değerleri (2-Avg Δ Ct) bulundu. Kat değişim değerleri Tablo 23’te gösterilmektedir. Tablo 23’teki yorum olarak belirtilen;

A: Örneğin kabul edilebilir olması için örnek sayısının azlığı

B: Genin hem örnekte hem de kontroldeki ekspresyonunun çok düşük olması

C: Genin ne örnekte ne de kontrolde eksprese ediliyor olması anlamına gelmektedir.

Tablo 23. Tüm Örneklerin Kontrol Grup ile Karşılaştırılmış Kat Değişim Değerleri

	Kat Değişim Değerleri (Kontrol grup ile karşılaştırılan)		
	Grup 1		
Gen Sembolü	Kat Değişim Değeri	% 95 CI	Yorum
ATP12A	2,343	(0.00001, 5.51)	C
ATP4A	2,935	(0.00001, 6.36)	B
ATP4B	2,475	(0.00001, 5.78)	B
ATP5A1	1,047	(0.73, 1.36)	Kabul edilebilir
	Kat Değişim Değerleri (Kontrol grup ile karşılaştırılan)		
	Grup 1		
Gen Sembolü	Kat Değişim Değeri	% 95 CI	Yorum
ATP5B	1,197	(0.90, 1.49)	Kabul edilebilir
ATP5C1	1,472	(0.72, 2.23)	Kabul edilebilir
ATP5F1	1,139	(0.73, 1.55)	Kabul edilebilir
ATP5G1	1,387	(0.95, 1.82)	Kabul edilebilir
ATP5G2	2,669	(0.00001, 5.90)	Kabul edilebilir
ATP5G3	1,162	(0.79, 1.54)	Kabul edilebilir
ATP5H	1,092	(0.59, 1.59)	Kabul edilebilir
ATP5I	1,449	(0.30, 2.60)	Kabul edilebilir
ATP5J	0,323	(0.00001, 1.07)	Kabul edilebilir
ATP5J2	2,036	(0.69, 3.38)	B
ATP5L	2,093	(0.50, 3.69)	B

ATP50	1,306	(0.72, 1.90)	Kabul edilebilir
ATP6V0A2	1,389	(0.73, 2.05)	A
ATP6V0D2	1,749	(0.00001, 4.21)	B
ATP6V1C2	3,036	(0.00001, 7.12)	B
ATP6V1E2	1,919	(0.36, 3.48)	B
ATP6V1G3	2,343	(0.00001, 5.51)	C
BCS1L	1,842	(0.61, 3.07)	Kabul edilebilir
COX4I1	1,096	(0.51, 1.69)	Kabul edilebilir
COX4I2	0,963	(0.39, 1.54)	A
COX5A	0,444	(0.00001, 1.33)	Kabul edilebilir
COX5B	1,221	(0.92, 1.52)	Kabul edilebilir
COX6A1	1,634	(0.70, 2.57)	Kabul edilebilir
COX6A2	0,956	(0.01, 1.90)	B
COX6B1	1,709	(0.96, 2.46)	Kabul edilebilir
COX6B2	1,697	(0.00001, 3.84)	B
COX6C	2,429	(0.00001, 5.68)	B
COX7A2	1,089	(0.63, 1.55)	Kabul edilebilir
COX7A2L	1,116	(0.64, 1.59)	Kabul edilebilir
COX7B	1,402	(0.77, 2.03)	Kabul edilebilir
COX8A	1,036	(0.70, 1.37)	Kabul edilebilir
COX8C	1,563	(0.38, 2.74)	B
CYC1	0,656	(0.00001, 1.50)	A
LHPP	1,158	(0.47, 1.84)	Kabul edilebilir
NDUFA1	1,206	(0.78, 1.64)	A
NDUFA10	1,754	(0.46, 3.05)	Kabul edilebilir
NDUFA11	1,974	(0.59, 3.36)	Kabul edilebilir
NDUFA2	1,210	(0.75, 1.68)	Kabul edilebilir
NDUFA3	1,852	(0.67, 3.03)	Kabul edilebilir
NDUFA4	0,971	(0.61, 1.34)	Kabul edilebilir
	Kat Değişim Değerleri (Kontrol grup ile karşılaştırılan)		
	Grup 1		
Gen Sembolü	Kat Değişim Değeri	% 95 CI	Yorum
NDUFA5	1,754	(0.78, 2.73)	B
NDUFA6	1,341	(0.89, 1.79)	A
NDUFA7	1,081	(0.74, 1.42)	Kabul edilebilir
NDUFA8	1,401	(0.59, 2.22)	Kabul edilebilir
NDUFAB1	0,544	(0.00001, 1.66)	Kabul edilebilir
NDUFB10	1,158	(0.68, 1.64)	Kabul edilebilir
NDUFB2	1,204	(0.77, 1.64)	Kabul edilebilir
NDUFB3	1,177	(0.82, 1.53)	Kabul edilebilir
NDUFB4	1,713	(1.08, 2.35)	Kabul edilebilir
NDUFB5	1,133	(0.60, 1.66)	Kabul edilebilir
NDUFB6	1,006	(0.37, 1.65)	Kabul edilebilir

NDUFB7	1,402	(0.60, 2.20)	Kabul edilebilir
NDUFB8	1,001	(0.58, 1.42)	Kabul edilebilir
NDUFB9	1,532	(0.57, 2.50)	Kabul edilebilir
NDUFC1	1,132	(0.71, 1.55)	Kabul edilebilir
NDUFC2	1,328	(0.82, 1.84)	B
NDUFS1	0,493	(0.00001, 1.46)	Kabul edilebilir
NDUFS2	1,556	(0.71, 2.40)	Kabul edilebilir
NDUFS3	1,595	(0.83, 2.36)	Kabul edilebilir
NDUFS4	1,244	(0.65, 1.83)	Kabul edilebilir
NDUFS5	1,740	(0.90, 2.58)	Kabul edilebilir
NDUFS6	1,461	(0.60, 2.32)	Kabul edilebilir
NDUFS7	1,725	(0.74, 2.71)	Kabul edilebilir
NDUFS8	1,600	(0.51, 2.69)	Kabul edilebilir
NDUFV1	1,474	(0.89, 2.06)	Kabul edilebilir
NDUFV2	1,378	(0.79, 1.96)	Kabul edilebilir
NDUFV3	1,482	(0.79, 2.17)	Kabul edilebilir
OXA1L	1,428	(0.43, 2.43)	Kabul edilebilir
PPA1	0,313	(0.00001, 0.93)	Kabul edilebilir
PPA2	1,575	(0.57, 2.58)	Kabul edilebilir
SDHA	1,177	(0.71, 1.64)	Kabul edilebilir
SDHB	1,247	(0.72, 1.77)	Kabul edilebilir
SDHC	0,976	(0.67, 1.29)	Kabul edilebilir
SDHD	1,295	(0.67, 1.92)	Kabul edilebilir
UQCR11	1,451	(1.11, 1.79)	Kabul edilebilir
UQCRC1	1,120	(0.75, 1.49)	Kabul edilebilir
UQCRC2	1,568	(0.70, 2.43)	Kabul edilebilir
UQCRFS1	1,135	(0.75, 1.52)	Kabul edilebilir
UQCRH	1,315	(0.87, 1.77)	Kabul edilebilir
UQCRO	1,289	(0.65, 1.93)	Kabul edilebilir

Anlamli ekspresyon değişimi gosteren genlerle gosterdikleri ekspresyon değişimini grafik yapmak için kat regulasyon ve p-anlamlılık değerlerine bakıldı.

Kat Değişim > 1 iken Kat regulasyon = Kat değişim

Kat Değişim < 1 iken Kat regulasyon = -1/Kat değişim

Genlerin kat regulasyon ve p-anlamlılık değerleri Tablo 24.'te gosterilmektedir.

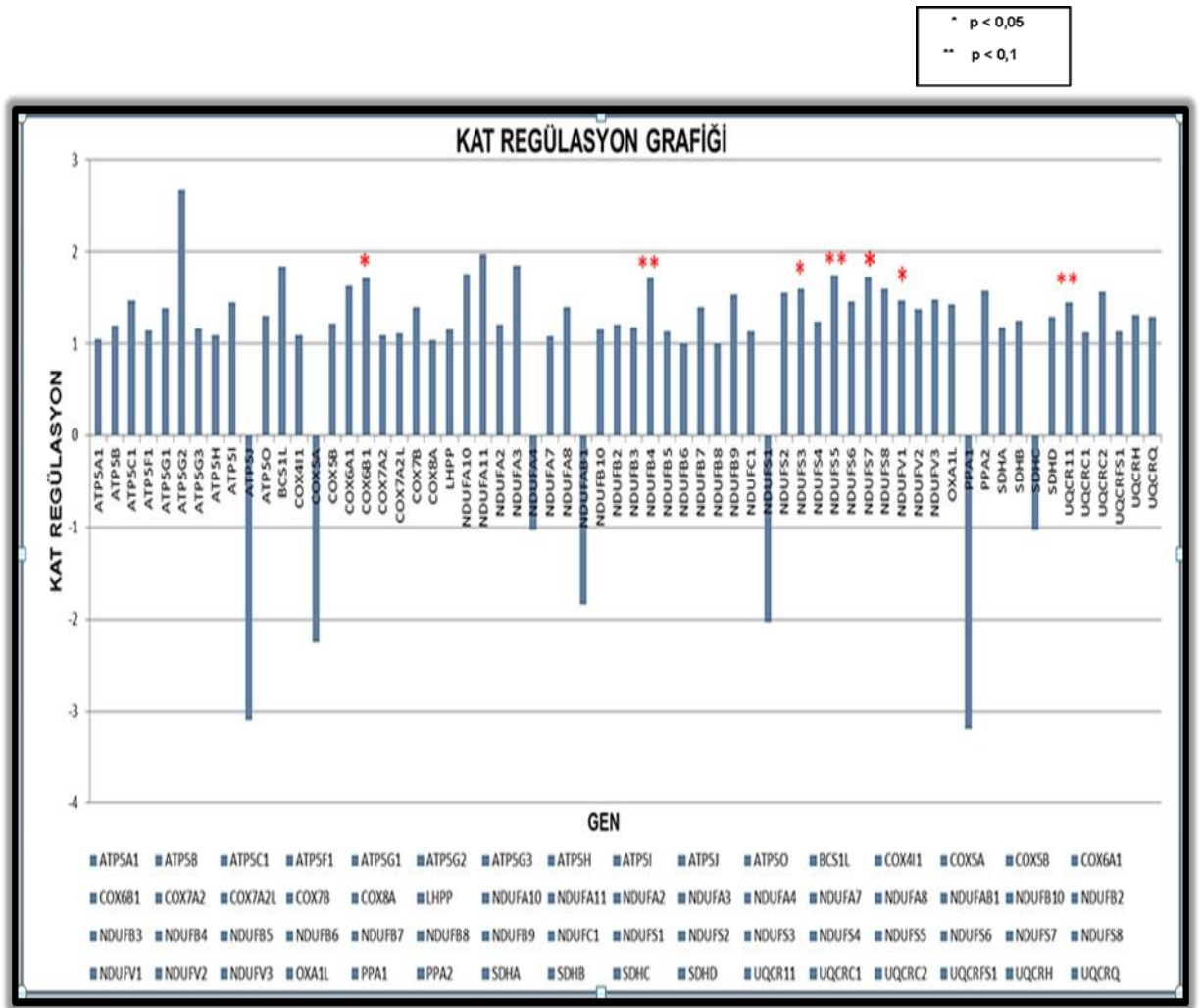
Tablo 24. Genlerin Kat Regulasyon ve P-anlamlılık Değerleri (Genler içinde sadece kabul edilebilir olanlar seçildi. A, B ve C kategorisindeki genler çıkarıldı.)

KAT REGÜLASYON (Kontrol grubuna göre)		
Gen Sembolü	Fold Regulation	p-Değeri
ATP5A1	1,047	0,829665
ATP5B	1,197	0,176594
ATP5C1	1,472	0,170285
ATP5F1	1,139	0,518307
ATP5G1	1,387	0,111206
ATP5G2	2,669	0,1538
ATP5G3	1,162	0,357267
ATP5H	1,093	0,495973
ATP5I	1,449	0,276665
ATP5J	-3,097	0,55434
ATP5O	1,306	0,24323
BCS1L	1,842	0,138223
COX4I1	1,096	0,445165
COX5A	-2,249	0,976911
COX5B	1,221	0,112358
COX6A1	1,634	0,171149
COX6B1	1,709	0,077603
COX7A2	1,089	0,545823
COX7A2L	1,116	0,55415
COX7B	1,402	0,184853
COX8A	1,036	0,686811
LHPP	1,158	0,67172
KAT REGÜLASYON (Kontrol grubuna göre)		
Gen Sembolü	Fold Regulation	p-Değeri
NDUFA10	1,754	0,193149
NDUFA11	1,974	0,124674
NDUFA2	1,211	0,25111
NDUFA3	1,852	0,12993
NDUFA4	-1,030	0,832307
NDUFA7	1,081	0,643988
NDUFA8	1,401	0,228176
NDUFAB1	-1,837	0,486379
NDUFB10	1,158	0,407767
NDUFB2	1,204	0,269507
NDUFB3	1,177	0,343005
NDUFB4	1,713	0,018085
NDUFB5	1,133	0,429371

NDUFB6	1,006	0,917583
NDUFB7	1,402	0,237472
NDUFB8	1,001	0,915745
NDUFB9	1,532	0,175818
NDUFC1	1,132	0,40607
NDUFS1	-2,027	0,784746
NDUFS2	1,556	0,167299
NDUFS3	1,595	0,070284
NDUFS4	1,243	0,33258
NDUFS5	1,740	0,045546
NDUFS6	1,461	0,27062
NDUFS7	1,724	0,098599
NDUFS8	1,600	0,213025
NDUFV1	1,474	0,091353
NDUFV2	1,377	0,189913
NDUFV3	1,482	0,120636
OXA1L	1,428	0,26565
PPA1	-3,194	0,253511
PPA2	1,575	0,258255
SDHA	1,177	0,416624
SDHB	1,247	0,354154
SDHC	-1,024	0,872882
SDHD	1,295	0,154716
UQCR11	1,451	0,011376
KAT REGÜLASYON (Kontrol grubuna göre)		
Gen Sembolü	Fold Regulation	p-Değeri
UQCRC1	1,120	0,503263
UQCRC2	1,568	0,130893
UQCRFS1	1,135	0,363162
UQCRH	1,315	0,125418
UQCRQ	1,289	0,207886

Tablo 24'ün p-değerinde bulunan kırmızı ile işaretlenmiş değerler $P < 0,05$ anlamlılık düzeyiyle ekspresyon değişimi gösteren genlerdir.

Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda kat regülasyon grafiği oluşturuldu. Şekil 11'de Kat Regülasyon grafiği gösterilmiştir.

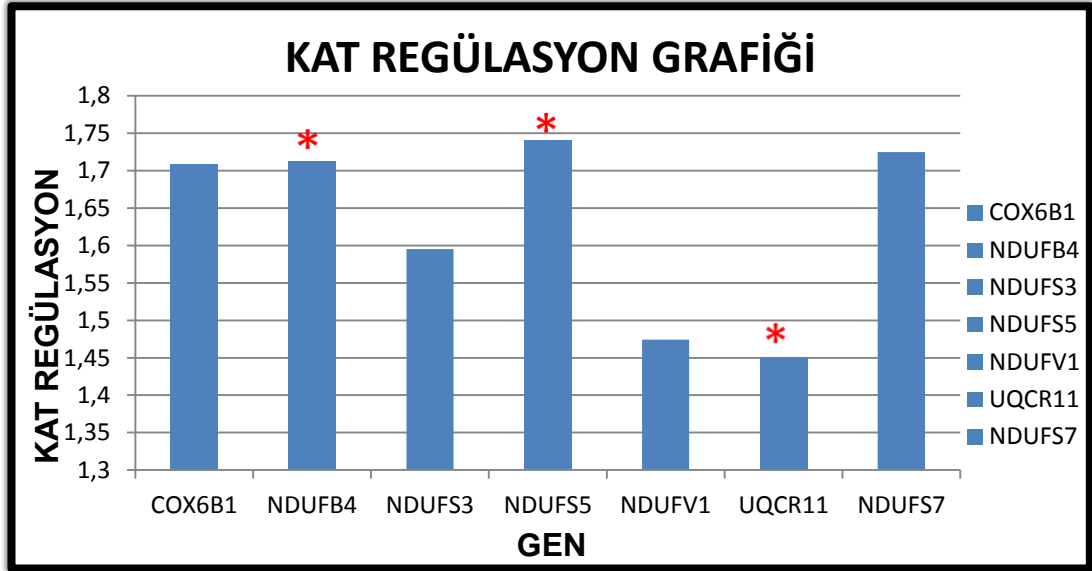


Şekil 11. Analiz Sonucu Anlamlı Çıkan Gen Listesi

2 yıldız ile işaretlenmiş olan genlerin anlamlılık değeri $p < 0,05$, bir yıldız ile işaretlenmiş olanların ise $p < 0,1$ anlamlılık değerinde olduğu ifade edilmektedir.

Grafiğe bakıldığı zaman elde edilen tüm anlamlı genlerin elektron transport zincirinde ekspresyonlarının arttığı görülmüştür. Bunlardan 4 genin istatistiksel olarak $p < 0,1$ anlamlılık değerinde ve 3 genin $p < 0,05$ anlamlılık değerinde ekspresyonlarında artış görülmüştür.

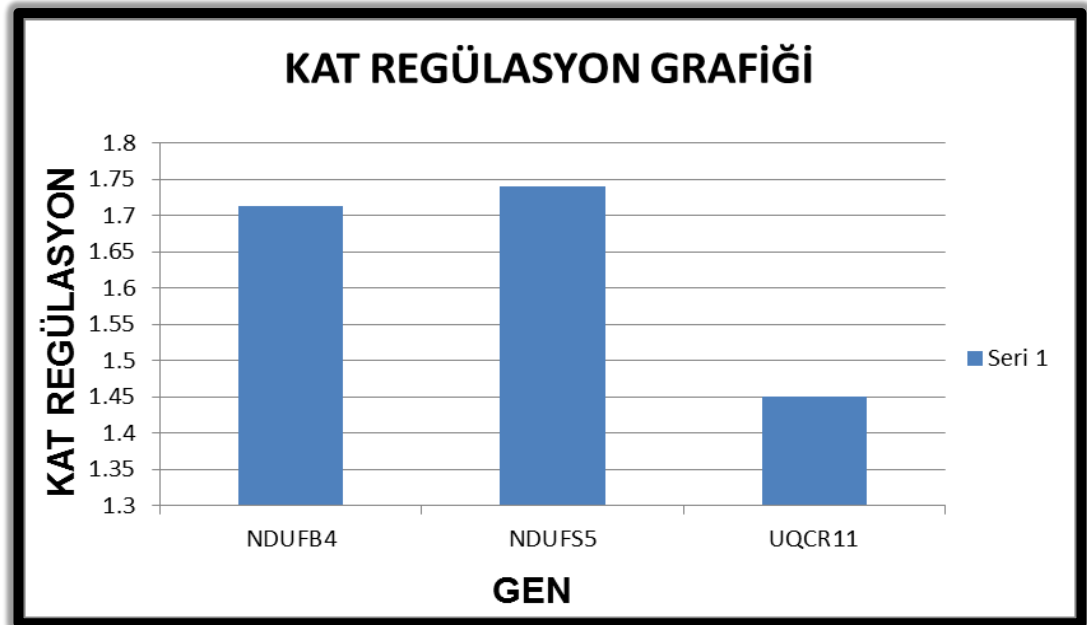
Şekil 12’de $p < 0,05$ ile $p < 0,1$ anlamlılık düzeyiyle ekspresyon değişimi gösteren genlerin grafiği ve şekil 13’te $p < 0,05$ anlamlılık düzeyiyle ekspresyon değişimi gösteren genlerin grafiği gösterilmiştir.



$p < 0,05 \rightarrow (*)$

Şekil 12. $P < 0,1$ ve $P < 0,05$ Anlamlılık Düzeyiyle Ekspresyon Değişimi

Gösteren Genlerin Grafığı



Şekil 13. P < 0,05 Anlamlılık Düzeyiyle Ekspresyon Değişimi Gösteren Genlerin Grafiği

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

Fibroid veya leiomyom olarak bilinen uterus myomları, uterusun iyi huylu tümörleridir [1]. Myom başlıca myometriumun düz kas hücrelerinden oluşmasına rağmen, çeşitli miktarda fibröz konnektif doku da içermektedir. Myomların oluşum sebebi kesin olarak anlaşılamamıştır [169].

Yapılan bu çalışmada reproduktif çağındaki uterus myom tanısı alan 6 hastadan alınan myom materyali ve myom materyaline komşu olan dokudan alınan sağlıklı

materyal, elektron transport zincirinde görevli genlerin gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması amacıyla çalışma materyali olarak kullanılmıştır.

Son zamanlarda yapılan sitogenetik, moleküler ve epidemiyolojik çalışmalar myomların patogenez ve patofizyolojisinde genetik eğilimin rolü olduğu bildirilmektedir. Myom gelişiminde genetik değişikliklerin önemli bir role sahip olduğu kanıtlanmaktadır [170]. Genetik yatkınlıklar, prenatal hormon maruziyeti ve hormonlar, büyüme faktörleri myom gelişimine neden olmaktadır [42]. Uterus myomlarının % 40 ve üzeri bazı kromozomal anormalliklere dayandırılmaktadır. En yaygın olarak bilinen kromozom 6, 7, 12, 14'deki anormalliklerdir [170]. Tekrarlayan kromozomal değişiklikler tüm myomların yaklaşık % 20'sinde bulunur. Ancak çoğunlukla sitogenetik değişiklikleri eksiktir. Son zamanlarda, gen mediator alt kompleks 12 (MED12) mutasyonları myomların birçoğunda tespit edilmiştir [171]. Ayrıca enerji metabolizması ile ilgili TCA döngüsünde görevli *fumarat hidrataz* enzimini kodlayan germline mutasyonların uterus myomlarının gelişimde yüksek bir riski olduğunu destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. [172].

Mitokondriyal enerji metabolizması hücrel ATP üretir. Mitokondriyal solunum zinciri, oksidatif fosforilasyon yoluyla hücreler için enerji sağlamaktadır. Elektron transport protein kompleksleri (I-IV) ve ATP sentetaz (kompleks V)'dan oluşur. Kompleks I bozukluğu, mitokondriyal disfonksiyonun yaygın bir nedeni olup canlı doğumda yaklaşık 10,000'de 1 meydana gelen bir sendromdur. Mitokondriyal kompleks I eksikliği myopati, ensefalomiyelopati ve Parkinson hastalığı ile Leigh sendromu gibi nörodejeneratif bozukluklar ile bağlantılıdır.

Çalışma sonuçları doğrultusunda, uterus myom dokusunun sağlıklı uterus düz kas dokusu grubuna göre karşılaştırıldığı zaman elektron transport zincirinden sorumlu olan genlerin ekspresyonlarının arttığı görülmüştür. Bunlardan 4 genin $p <$

0,1 ve 3 genin $p < 0,05$ değerinde ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış görölmüştür.

$P < 0,05$ anlamlılık değerine sahip genler elektron transport zincirinin 1. kompleksinde de bulunan NDUFB4, NDUFS5 geni ve 3. komplekste bulunan UQCR11 genidir. Kompleks I, 7 mitokondriyal ve 38 nükleer gen tarafından kodlanır [173]. NDUFB4 geni, kompleks 1'in mitokondriyal elektron transport zincirinde bulunan ilk enzim kompleksi olan NADH: ubikinon oksidoredüktaz çoklu alt birimlerin bir katalitik olmayan alt birimidir. NADH'dan ubikinona elektronları transfer eder [82, 83]. NADH dehidrogenaz ubikinon demir-sülfür protein 5, insanlarda NDUFS5 geni tarafından kodlanan bir enzimdir. Bu gen NADH dehidrogenaz (ubikinon) demir – sülfür protein ailesinin bir üyesidir. Kodlanan protein NADH'ın alt birimidir. *Ubikinon oksidoredüktaz*, elektron transport zincirinde iç mitokondriyal membranda bulunan ilk enzim kompleksidir. Alternatif olarak birbirine eklenmesi, birçok transkript varyantlarla sonuçlanır ve yalancı genleri 1, 4 ve 7 kromozomları olarak tespit edilmiştir [80, 174]. UQCR11 geni, mitokondriyal solunum zincirinin bir bölümünden oluşan *ubikinol sitokrom c redüktaz* kompleksinin en küçük olarak bilinen bileşenini kodlar. Kodlanan protein, bu komplekste demir- sülfür için bağlayıcı bir etken olarak da işlev görebilir [111].

Ekspresyonları $p < 0,1$ anlamlılık değerine sahip olan genler COX6B1, NDUFS3, NDUFS7 NDUFV1 genleridir. COX6B1, sitokrom c oksidaz (COX) mitokondriyal solunum zincirinde terminal bir enzim olup indirgenmiş sitokrom c' den oksijene elektron transferini katalizler. COX6B1 bir heteromerik komplekstir. Nükleer genler tarafından kodlanan birden fazla yapısal alt birimden ve mitokondriyal genler tarafından kodlanan 3 katalitik alt biriminden oluşur. Mitokondriyi kodlayan alt birimler, elektron transferinde fonksiyon gösterir. Nükleer

kodlu alt birimler ise kompleksin birleştirilmesiyle ve düzenlenmesiyle ilgili olabilir. Bu nükleer gen VIb alt birimini kodlar. Bu gendeki mutasyonlar şiddetli infantil ensefalomiyopati ile ilişkilidir [126]. NDUFS3, mitokondriyal NADH ubikinon oksidoredüktaz (kompleks I) demir-sülfür protein bileşenlerinden birini kodlar. Bu gende meydana gelen mutasyonlar mitokondriyal kompleks I eksikliği sonucunda Leigh sendromu ile ilişkilidir [80]. NDUFS7, kodlanmış bir protein olup mitokondriyal solunum zinciri bölgelerindeki komplekslerin bir tanesinin alt birimidir. Bu protein NADH ubikinon oksidoredüktaz kompleks I'de 40'ın üzerinde alt birimi bulunan bir proteindir. Bu kompleksin fonksiyonu NADH 'tan solunum zincirine elektronları transfer etmesidir. Enzim için acil elektron alıcısı ubikinon olduğuna inanılır. Kompleks I eksikliğinden dolayı bu gende meydana gelen mutasyonlar, Leigh sendromu, subkortikal beyin bölgelerinde bilateral simetrik nekrotik lezyonlar gibi ciddi nörolojik bozukluklar ile sonuçlanır [93]. NDUFV1, NADH ubikinon oksidoredüktaz kompleks I'in alt birimi olan 51 kDa proteini kodlar. Bu alt birim NADH bağlama bölgesinden yanısıra FMN (flavin mononükleotid) ve Fe-S bağlama bölgelerini de taşır. Birçok transkript varyantların alternatif olarak birbirine eklenmesi farklı izoformların kodlanması sonucunu doğurur [95].

Yapılan bir çalışmada uterus myom gelişiminin düzenlenmesinde yer alan sinyal yollarının daha iyi anlaşılması hedeflenmiş ve sonuç olarak myom hücrelerinde yer alan ROS, EGF ve PDGF sinyal yollarında önemli bileşenler olduğu desteklenmiştir [58]. Özellikle PDGF sinyal yolağıyla ilgili olarak, MAPK1/MAPK3'ün aktivasyonu, PDGF'nin indüklenmesiyle ROS üretimini takip eden önemli bir adım olduğunu desteklemektedir. Bu bulgular, ROS'un myom hücrelerinin proliferasyonunda ikincil haberci olduğunu ve myom hücrelerindeki fagositik olmayan NADPH oksidaz kompleksi olduğunu düşündürür. Bu çalışma

NADH oksidaz sisteminin varlığını düşündüren ve myom hücrelerindeki mitojenik sinyal yollarının önemini düşündüren ilk rapordur [58].

Mitokondriyal enerji metabolizmasında bulunan komplekslerin düzensizliği kanser gelişiminin önemli bir patolojik sonucudur [68]. Metabolizmasının çok net bilinmemesine rağmen birçok tümör mitokondriyal solunum zinciri bileşenlerini az miktarda içerir. Ancak son çalışmalar sitokrom c oksidaz fonksiyonu için önemli bir bileşen olan, COX₂ ekspresyonunu uyararak p53 tümör supresör geninin önemini göstermektedir [68].

Östrojenler myom bünyesinde önemli bir role sahip görünüyorsa da tek başlarına tümör gelişimine yol açmazlar. Moleküler çalışmalarda normal myometriyum ile karşılaştırıldığında myomlarda östrojen ve progesteron reseptörlerinde artış olduğu bildirilmiştir [39, 40].

Östrojen, spesifik nükleer reseptörlerine bağlanarak hedef hücrede fizyolojik etkilerini gösterir. Bu reseptörler östrojen reseptör α (ER α) ve östrojen reseptör β (ER β)'dir [41]. ER α ve ER β mRNA, myometriyum ve myomda eksprese edilmektedir [41, 42]. ER β 'nin aktivasyon derecesi ER α 'dan düşük olmasına rağmen, her iki reseptör hedef genlerde transkripsiyonu uyarır [43]. ER α ve ER β mRNA düzeyi myometriyumla karşılaştırıldığında myomlarda daha yüksektir. Myomlar, normal endometriyumla karşılaştırıldığında pek çok östrojen regüle eden genin (konnesin 43 gap- junction protein, tip I ve tip III kollajen, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), paratiroid hormon benzeri peptit ve progesteron reseptör genleri) ekspresyonunun arttığı görülmüştür [44]. Östrojen, mitojen-aktive eden protein kinaz yolunu ve hücre içi proteinlerin (büyüme ile ilişkili protein, fosfatidilinozitol 3-kinaz, fosfolipaz C, trombosit-derive büyüme faktörü) protein kinaz fosforilasyonu ile myom hücrelerinde mitojenik etki yapar. Bununla birlikte östrojen aktivasyonu ile

epidermal büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü ve trombosit-derive büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerinin salınımına aracılık eder [45, 46].

Elektron transport zincirinde görevli olan 84 genin gen ekspresyon düzeylerinin uterus myom hastalığında araştırıldığı ilk özgün çalışmadır. Elde edilen veriler doğrultusunda bu çalışma, uterus myomunun fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Özellikle NDUFB4, NDUFS5, UQCR11 genlerindeki ekspresyon artışı, uterus myomunda I. ve III. komplekslerdeki ekspresyon değişikliklerinin mitokondriyal metabolitlerin konsantrasyonlarında değişikliklere yol açabileceğini düşündürmektedir. Bu konuda ileri araştırmaların yapılması, myom patofizyolojisinde ETZ'nin rolünün daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

BÖLÜM V

ÖZET

Uterus Myomunda Elektron Transport Zincirinden Sorumlu Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması

Uterus myomları, uterusunun düz kas hücrelerinden köken alan benign tümörlerdir. Yaşam kalitesini ve sağlığı şiddetli bir şekilde tehdit eden myomlar, etkilenen kadınlarda historektemi sebebidir. Pelvik ağrı, kanama, kısırlık ve cinsel verimsizlik gibi semptomlar göstermektedir. Böylece uterus myomları etkilenen kadınlarda iş, aile ve cinsel yaşamlarında sınırlılıklara neden olmaktadır.

Ailesel ve epidemiyolojik çalışmalar, genetik değişikliklerin myom gelişiminde önemli bir rol oynadığına kanıt sağlar. Ancak, uterus myomlarının etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Bizim çalışmamızın amacı, elektron transport zincirinden sorumlu genlerin ekspresyon profillerinin uterus myomlarında ve sağlıklı uterus düz kas dokularında araştırılmasıdır.

Bu araştırma için, Ege Üniversitesi Kadın Doğum Polikliniğine başvuran, myom tanısı alan 6 olgunun uterus myom örnekleri ve komşu dokunun sağlıklı uterus düz kas örnekleri kullanılmıştır. Uterus myomunda, elektron transport zincirinden sorumlu 84 genin ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Araştırmada Kantitatif Real - Time PCR yöntemi kullanılmıştır.

PCR sonuçları, sağlıklı uterus düz kas dokularının ekspresyonu ile karşılaştırıldığında uterus myom olgularında genel olarak ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. NDUFB4, NDUFS5, UQCR11 genlerinin ekspresyonları sağlıklı uterus düz kas dokularına göre uterus myom olgularında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlara göre NDUFB4, NDUFS5, UQCR11 genleri uterus myomu patolojisinde önemli bir rol oynayabilir. Yapılan bu çalışma uterus myomunun tanı ve tedavisinde kullanılabilir yeni stratejilerin gelişimine ve ilerlemesine öncülük edecektir.

ABSTRACT

Investigating Expression Levels of Genes Responsible for Electron

Transport Chain in Uterine Fibroid

Uterine myomas are benign tumors arising from the smooth muscle cells of the uterus. Uterine myomas, which severely threaten the health and quality of life of affected women, are reason for hysterectomy. Uterine myomas cause symptoms such as; pelvic pain, bleeding, infertility and sterility. Therefore women affected by uterine myoma suffer from limitations in their work, family and sexual lives.

Familial and epidemiological studies provide significant evidence that genetic alterations play an important role in myoma development. However, effective mechanisms of uterine myoma has not been fully understood. Our study aimed to investigate the expression profiles of genes response for electron transport chain in uterine myomas and healthy uterine smooth muscle.

For this research, uterine myoma samples and their paired adjacent healthy uterine smooth muscle samples from 6 cases of uterine myomas applied to Ege Gynecology Polyclinic and received myoma diagnosis. Expression levels of 84 electron transport chain related gene were investigated in uterus myoma. Quantitative Real-Time PCR method has been used in this research.

PCR results showed that genes were generally upregulated in uterine myoma cases compared to uterine smooth muscle tissues. We were detected the expressions of NDUFB4, NDUFS5, UQCR11 were significantly higher in uterine myoma cases compared to uterine smooth muscle tissues. These results suggest that NDUFB4, NDUFS5, UQCR11 genes might play an important role in pathogenesis of uterine myomas. This study will lead to the development of new strategies for diagnosis and treatment of uterine myoma.

BÖLÜM VI

KAYNAKLAR

1. Islam MS, Protic O, Giannubilo SR, Toti P, Tranquilli AL, Petraglia F, Castellucci M, Ciarmela P: Uterine leiomyoma: available medical treatments and new possible therapeutic options. *J Clin Endocrinol Metab* 2013, 98(3):921-934.
2. Leppert PC, Baginski T, Prupas C, Catherino WH, Pletcher S, Segars JH: Comparative ultrastructure of collagen fibrils in uterine leiomyomas and normal myometrium. *Fertil Steril* 2004, 82 Suppl 3:1182-1187.

3. Csatlós E, Rigó J, Szabó I, Nagy Z, Joó JG: [Uterine leiomyoma]. *Orv Hetil* 2010, 151(42):1734-1741.
4. Maruo T, Matsuo H, Shimomura Y, Kurachi O, Gao Z, Nakago S, Yamada T, Chen W, Wang J: Effects of progesterone on growth factor expression in human uterine leiomyoma. *Steroids* 2003, 68(10-13):817-824.
5. Stewart EA: Uterine fibroids. *Lancet* 2001, 357(9252):293-298.
6. Ono M, Qiang W, Serna VA, Yin P, Coon JS, Navarro A, Monsivais D, Kakinuma T, Dyson M, Druschitz S *et al*: Role of stem cells in human uterine leiomyoma growth. *PLoS One* 2012, 7(5):e36935.
7. Benda JA: Pathology of smooth muscle tumors of the uterine corpus. *Clin Obstet Gynecol* 2001, 44(2):350-363.
8. Takai H, Tani H, Matsushita H: Rupture of a degenerated uterine fibroid as a cause of acute abdomen: a case report. *J Reprod Med* 2013, 58(1-2):72-74.
9. Giraudet G, Niro J, Lucot JP, Panel P: [Management of myoma: What is the place for hysterectomy and how to perform it?]. *Presse Med* 2013.
10. Marshall LM, Spiegelman D, Barbieri RL, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ: Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet Gynecol* 1997, 90(6):967-973.
11. Borgfeldt C, Andolf E: Transvaginal ultrasonographic findings in the uterus and the endometrium: low prevalence of leiomyoma in a random sample of women age 25-40 years. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000, 79(3):202-207.
12. Okolo S: Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2008, 22(4):571-588.

13. Van Voorhis BJ, Romitti PA, Jones MP: Family history as a risk factor for development of uterine leiomyomas. Results of a pilot study. *J Reprod Med* 2002, 47(8):663-669.
14. He Y, Zeng Q, Dong S, Qin L, Li G, Wang P: Associations between uterine fibroids and lifestyles including diet, physical activity and stress: a case-control study in China. *Asia Pac J Clin Nutr* 2013, 22(1):109-117.
15. Faerstein E, Szklo M, Rosenshein N: Risk factors for uterine leiomyoma: a practice-based case-control study. I. African-American heritage, reproductive history, body size, and smoking. *Am J Epidemiol* 2001, 153(1):1-10.
16. Marshall LM, Spiegelman D, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, Barbieri RL, Stampfer MJ, Hunter DJ: A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 1998, 70(3):432-439.
17. Marshall LM, Spiegelman D, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, Barbieri RL, Stampfer MJ, Hunter DJ: A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 1998, 70(3):432-439.
18. Ikomi AA, Singer A: Protective effect of depot-medroxyprogesterone acetate on surgically treated uterine leiomyomas: a multicentre case-control study. *Br J Obstet Gynaecol* 1997, 104(3):385-386.
19. Faerstein E, Szklo M, Rosenshein NB: Risk factors for uterine leiomyoma: a practice-based case-control study. II. Atherogenic risk factors and potential sources of uterine irritation. *Am J Epidemiol* 2001, 153(1):11-19.
20. Bosteels J, Kasius J, Weyers S, Broekmans FJ, Mol BW, D'Hooghe TM: Hysteroscopy for treating subfertility associated with suspected major uterine cavity abnormalities. *Cochrane Database Syst Rev* 2013, 1:CD009461.

21. Palomba S, Sena T, Noia R, Di Carlo C, Zullo F, Mastrantonio P: Transdermal hormone replacement therapy in postmenopausal women with uterine leiomyomas. *Obstet Gynecol* 2001, 98(6):1053-1058.
22. Schwartz SM: Epidemiology of uterine leiomyomata. *Clin Obstet Gynecol* 2001, 44(2):316-326.
23. Chiaffarino F, Parazzini F, La Vecchia C, Chatenoud L, Di Cintio E, Marsico S: Diet and uterine myomas. *Obstet Gynecol* 1999, 94(3):395-398.
24. Sato F, Mori M, Nishi M, Kudo R, Miyake H: Familial aggregation of uterine myomas in Japanese women. *J Epidemiol* 2002, 12(3):249-253.
25. Wallach EE, Vlahos NF: Uterine myomas: an overview of development, clinical features, and management. *Obstet Gynecol* 2004, 104(2):393-406.
26. FG. SJSJHLHBBKC: Willams Jinekoloji. Nobel Kitabevleri, İstanbul; 2010.
27. Guarnaccia MM, Rein MS: Traditional surgical approaches to uterine fibroids: abdominal myomectomy and hysterectomy. *Clin Obstet Gynecol* 2001, 44(2):385-400.
28. Buttram VC, Reiter RC: Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management. *Fertil Steril* 1981, 36(4):433-445.
29. Stewart EA, Nowak RA: Leiomyoma-related bleeding: a classic hypothesis updated for the molecular era. *Hum Reprod Update* 1996, 2(4):295-306.
30. WH. RAJ: Linde's Operative Gynecology; 2003.
31. Knapp P, Chabowski A: [Molecular and cytogenetic evidence for the development of fibroids]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2012, 66:23-32.
32. Islam MS, Protic O, Stortoni P, Grechi G, Lamanna P, Petraglia F, Castellucci M, Ciarmela P: Complex networks of multiple factors in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Fertil Steril* 2013, 100(1):178-193.

33. Parker WH: Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril* 2007, 87(4):725-736.
34. Alam NA, Rowan AJ, Wortham NC, Pollard PJ, Mitchell M, Tyrer JP, Barclay E, Calonje E, Manek S, Adams SJ *et al*: Genetic and functional analyses of FH mutations in multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis, hereditary leiomyomatosis and renal cancer, and fumarate hydratase deficiency. *Hum Mol Genet* 2003, 12(11):1241-1252.
35. Markowski DN, Huhle S, Nimzyk R, Stenman G, Löning T, Bullerdiek J: MED12 mutations occurring in benign and malignant mammalian smooth muscle tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2013, 52(3):297-304.
36. Mäkinen N, Mehine M, Tolvanen J, Kaasinen E, Li Y, Lehtonen HJ, Gentile M, Yan J, Enge M, Taipale M *et al*: MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Science* 2011, 334(6053):252-255.
37. Neiger R, Sonek JD, Croom CS, Ventolini G: Pregnancy-related changes in the size of uterine leiomyomas. *J Reprod Med* 2006, 51(9):671-674.
38. Cesen-Cummings K, Houston KD, Copland JA, Moorman VJ, Walker CL, Davis BJ: Uterine leiomyomas express myometrial contractile-associated proteins involved in pregnancy-related hormone signaling. *J Soc Gynecol Investig* 2003, 10(1):11-20.
39. Chavez NF, Stewart EA: Medical treatment of uterine fibroids. *Clin Obstet Gynecol* 2001, 44(2):372-384.
40. Nowak RA: Identification of new therapies for leiomyomas: what in vitro studies can tell us. *Clin Obstet Gynecol* 2001, 44(2):327-334.

41. Grings AO, Lora V, Ferreira GD, Brum IS, Corleta H, Capp E: Protein expression of estrogen receptors α and β and aromatase in myometrium and uterine leiomyoma. *Gynecol Obstet Invest* 2012, 73(2):113-117.
42. Kovács KA, Oszter A, Göcze PM, Környei JL, Szabó I: Comparative analysis of cyclin D1 and oestrogen receptor (alpha and beta) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium. *Mol Hum Reprod* 2001, 7(11):1085-1091.
43. Sakaguchi H, Fujimoto J, Aoki I, Tamaya T: Expression of estrogen receptor alpha and beta in myometrium of premenopausal and postmenopausal women. *Steroids* 2003, 68(1):11-19.
44. Enmark E, Gustafsson JA: Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* 1999, 246(2):133-138.
45. Andersen J, DyReyes VM, Barbieri RL, Coachman DM, Miksicek RJ: Leiomyoma primary cultures have elevated transcriptional response to estrogen compared with autologous myometrial cultures. *J Soc Gynecol Investig* 1995, 2(3):542-551.
46. Barbarisi A, Petillo O, Di Lieto A, Melone MA, Margarucci S, Cannas M, Peluso G: 17-beta estradiol elicits an autocrine leiomyoma cell proliferation: evidence for a stimulation of protein kinase-dependent pathway. *J Cell Physiol* 2001, 186(3):414-424.
47. De Leo V, Morgante G, La Marca A, Musacchio MC, Sorace M, Cavicchioli C, Petraglia F: A benefit-risk assessment of medical treatment for uterine leiomyomas. *Drug Saf* 2002, 25(11):759-779.
48. Rein MS: Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis. *Environ Health Perspect* 2000, 108 Suppl 5:791-793.

49. Gillespie V, Baer K, Farrelly J, Craft D, Luong R: Canine gastrointestinal stromal tumors: immunohistochemical expression of CD34 and examination of prognostic indicators including proliferation markers Ki67 and AgNOR. *Vet Pathol* 2011, 48(1):283-291.
50. Brandon DD, Bethea CL, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Harrington MS, Erickson TE, Warner C, Keenan EJ, Clinton GM: Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are overexpressed in human uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1993, 169(1):78-85.
51. Tiltman AJ: The effect of progestins on the mitotic activity of uterine fibromyomas. *Int J Gynecol Pathol* 1985, 4(2):89-96.
52. Friedman AJ, Barbieri RL, Doubilet PM, Fine C, Schiff I: A randomized, double-blind trial of a gonadotropin releasing-hormone agonist (leuprolide) with or without medroxyprogesterone acetate in the treatment of leiomyomata uteri. *Fertil Steril* 1988, 49(3):404-409.
53. Carr BR, Marshburn PB, Weatherall PT, Bradshaw KD, Breslau NA, Byrd W, Roark M, Steinkampf MP: An evaluation of the effect of gonadotropin-releasing hormone analogs and medroxyprogesterone acetate on uterine leiomyomata volume by magnetic resonance imaging: a prospective, randomized, double blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 76(5):1217-1223.
54. Maruo T, Ohara N, Wang J, Matsuo H: Sex steroidal regulation of uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Hum Reprod Update* 2004, 10(3):207-220.
55. Van der Ven LT, Roholl PJ, Gludemans T, Van Buul-Offers SC, Welters MJ, Bladergroen BA, Faber JA, Sussenbach JS, Den Otter W: Expression of insulin-like growth factors (IGFs), their receptors and IGF binding protein-3

- in normal, benign and malignant smooth muscle tissues. *Br J Cancer* 1997, 75(11):1631-1640.
56. Zhu Y, Xie Sw, Zhang Jf, Zhang Tt, Zhou Jy, Cao Y, Cao L: Involvement of Bcl-2, Src, and ER α in gossypol-mediated growth inhibition and apoptosis in human uterine leiomyoma and myometrial cells. *Acta Pharmacol Sin* 2010, 31(12):1593-1603.
57. Wang J, Ohara N, Wang Z, Chen W, Morikawa A, Sasaki H, DeManno DA, Chwalisz K, Maruo T: A novel selective progesterone receptor modulator asoprisnil (J867) down-regulates the expression of EGF, IGF-I, TGFbeta3 and their receptors in cultured uterine leiomyoma cells. *Hum Reprod* 2006, 21(7):1869-1877.
58. Mesquita FS, Dyer SN, Heinrich DA, Bulun SE, Marsh EE, Nowak RA: Reactive oxygen species mediate mitogenic growth factor signaling pathways in human leiomyoma smooth muscle cells. *Biol Reprod* 2010, 82(2):341-351.
59. Chegini N, Kornberg L: Gonadotropin releasing hormone analogue therapy alters signal transduction pathways involving mitogen-activated protein and focal adhesion kinases in leiomyoma. *J Soc Gynecol Investig* 2003, 10(1):21-26.
60. Grigoriadis C, Papaconstantinou E, Mellou A, Hassiakos D, Liapis A, Kondi-Pafiti A: Clinicopathological changes of uterine leiomyomas after GnRH agonist therapy. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2012, 39(2):191-194.
61. Rheinboldt M, Ibrahim S: Atypical presentation of a large interstitial pregnancy. *Emerg Radiol* 2012.
62. Report ASfRMaPC: Myomas and Reproductive Function. In.; 2001.

63. Rice JP, Kay HH, Mahony BS: The clinical significance of uterine leiomyomas in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1989, 160(5 Pt 1):1212-1216.
64. De Vivo A, Mancuso A, Giacobbe A, Savasta LM, De Dominicis R, Dugo N, Dugo C, Vaiarelli A: Uterine myomas during pregnancy: a longitudinal sonographic study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011, 37(3):361-365.
65. Li TC, Mortimer R, Cooke ID: Myomectomy: a retrospective study to examine reproductive performance before and after surgery. *Hum Reprod* 1999, 14(7):1735-1740.
66. Guo XC, Segars JH: The impact and management of fibroids for fertility: an evidence-based approach. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2012, 39(4):521-533.
67. Arslan AA, Gold LI, Mittal K, Suen TC, Belitskaya-Levy I, Tang MS, Toniolo P: Gene expression studies provide clues to the pathogenesis of uterine leiomyoma: new evidence and a systematic review. *Hum Reprod* 2005, 20(4):852-863.
68. Suzuki A, Kariya M, Matsumura N, Baba T, Yagi H, Mandai M, Konishi I, Fujii S: Expression of p53 and p21(WAF-1), apoptosis, and proliferation of smooth muscle cells in normal myometrium during the menstrual cycle: implication of DNA damage and repair for leiomyoma development. *Med Mol Morphol* 2012, 45(4):214-221.
69. Biyoenerjetik ve Oksidatif Fosforilasyon; 2007.
70. Zhuchenko O, Wehnert M, Bailey J, Sun ZS, Lee CC: Isolation, mapping, and genomic structure of an X-linked gene for a subunit of human mitochondrial complex I. *Genomics* 1996, 37(3):281-288.

71. Loeffen JL, Triepels RH, van den Heuvel LP, Schuelke M, Buskens CA, Smeets RJ, Trijbels JM, Smeitink JA: cDNA of eight nuclear encoded subunits of NADH:ubiquinone oxidoreductase: human complex I cDNA characterization completed. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 253(2):415-422.
72. Ton C, Hwang DM, Dempsey AA, Liew CC: Identification and primary structure of five human NADH-ubiquinone oxidoreductase subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 241(2):589-594.
73. Emahazion T, Brookes AJ: Mapping of the NDUFA2, NDUFA6, NDUFA7, NDUF8, and NDUF8S electron transport chain genes by intron based radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* 1998, 82(1-2):114.
74. Balsa E, Marco R, Perales-Clemente E, Szklarczyk R, Calvo E, Landázuri MO, Enríquez JA: NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metab* 2012, 16(3):378-386.
75. Marui T, Funatogawa I, Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Hashimoto O, Jinde S, Nishida H, Sugiyama T, Kasai K *et al*: The NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 alpha subcomplex 5 (NDUFA5) gene variants are associated with autism. *Acta Psychiatr Scand* 2011, 123(2):118-124.
76. Palmisano G, Sardanelli AM, Signorile A, Papa S, Larsen MR: The phosphorylation pattern of bovine heart complex I subunits. *Proteomics* 2007, 7(10):1575-1583.
77. Szklarczyk R, Wanschers BF, Nabuurs SB, Nouws J, Nijtmans LG, Huynen MA: NDUF8 and NDUFA8 are located at the intermembrane surface of complex I. *FEBS Lett* 2011, 585(5):737-743.
78. Triepels R, Smeitink J, Loeffen J, Smeets R, Buskens C, Trijbels F, van den Heuvel L: The human nuclear-encoded acyl carrier subunit (NDUFAB1) of

- the mitochondrial complex I in human pathology. *J Inherit Metab Dis* 1999, 22(2):163-173.
79. Hebert-Chatelain E, Jose C, Gutierrez Cortes N, Dupuy JW, Rocher C, Dachary-Prigent J, Letellier T: Preservation of NADH ubiquinone-oxidoreductase activity by Src kinase-mediated phosphorylation of NDUFB10. *Biochim Biophys Acta* 2012, 1817(5):718-725.
80. Emahazion T, Beskow A, Gyllensten U, Brookes AJ: Intron based radiation hybrid mapping of 15 complex I genes of the human electron transport chain. *Cytogenet Cell Genet* 1998, 82(1-2):115-119.
81. Jensen LL, Nielsen MM, Justesen J, Hansen LL: Assignment of human NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 3 (NDUFB3) and of its four pseudogenes to human chromosomes 2q31.3, 1p13.3-->p13.1, 9q32-->q34.1, 14q22.3-->q23.1 and 14q32.2 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* 2001, 93(1-2):147-150.
82. Murray J, Taylor SW, Zhang B, Ghosh SS, Capaldi RA: Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *J Biol Chem* 2003, 278(39):37223-37230.
83. Parikh H, Nilsson E, Ling C, Poulsen P, Almgren P, Nittby H, Eriksson KF, Vaag A, Groop LC: Molecular correlates for maximal oxygen uptake and type 1 fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008, 294(6):E1152-1159.
84. Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, Smith SR: A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 2005, 54(7):1926-1933.
85. Smeitink J, Loeffen J, Smeets R, Triepels R, Ruitenbeek W, Trijbels F, van den Heuvel L: Molecular characterization and mutational analysis of the

- human B17 subunit of the mitochondrial respiratory chain complex I. *Hum Genet* 1998, 103(2):245-250.
86. Triepels R, Smeitink J, Loeffen J, Smeets R, Trijbels F, van den Heuvel L: Characterization of the human complex I NDUF7 and 17.2-kDa cDNAs and mutational analysis of 19 genes of the HP fraction in complex I-deficient patients. *Hum Genet* 2000, 106(4):385-391.
87. Zang QS, Martinez B, Yao X, Maass DL, Ma L, Wolf SE, Minei JP: Sepsis-induced cardiac mitochondrial dysfunction involves altered mitochondrial-localization of tyrosine kinase Src and tyrosine phosphatase SHP2. *PLoS One* 2012, 7(8):e43424.
88. Lin X, Wells DE, Kimberling WJ, Kumar S: Human NDUF9 gene: genomic organization and a possible candidate gene associated with deafness disorder mapped to chromosome 8q13. *Hum Hered* 1999, 49(2):75-80.
89. Chow W, Ragan I, Robinson BH: Determination of the cDNA sequence for the human mitochondrial 75-kDa Fe-S protein of NADH-coenzyme Q reductase. *Eur J Biochem* 1991, 201(3):547-550.
90. Fearnley IM, Finel M, Skehel JM, Walker JE: NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. cDNA sequences of the import precursors of the nuclear-encoded 39 kDa and 42 kDa subunits. *Biochem J* 1991, 278 (Pt 3):821-829.
91. Procaccio V, de Sury R, Martinez P, Depetris D, Rabilloud T, Soularue P, Lunardi J, Issartel J: Mapping to 1q23 of the human gene (NDUFS2) encoding the 49-kDa subunit of the mitochondrial respiratory Complex I and immunodetection of the mature protein in mitochondria. *Mamm Genome* 1998, 9(6):482-484.

92. van den Heuvel L, Ruitenbeek W, Smeets R, Gelman-Kohan Z, Elpeleg O, Loeffen J, Trijbels F, Mariman E, de Bruijn D, Smeitink J: Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-kD (AQDQ) subunit. *Am J Hum Genet* 1998, 62(2):262-268.
93. Hyslop SJ, Duncan AM, Pitkänen S, Robinson BH: Assignment of the PSST subunit gene of human mitochondrial complex I to chromosome 19p13. *Genomics* 1996, 37(3):375-380.
94. de Sury R, Martinez P, Procaccio V, Lunardi J, Issartel JP: Genomic structure of the human NDUFS8 gene coding for the iron-sulfur TYKY subunit of the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase. *Gene* 1998, 215(1):1-10.
95. Spencer SR, Taylor JB, Cowell IG, Xia CL, Pemble SE, Ketterer B: The human mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase 51-kDa subunit maps adjacent to the glutathione S-transferase P1-1 gene on chromosome 11q13. *Genomics* 1992, 14(4):1116-1118.
96. de Coo R, Buddiger P, Smeets H, Geurts van Kessel A, Morgan-Hughes J, Weghuis DO, Overhauser J, van Oost B: Molecular cloning and characterization of the active human mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase 24-kDa gene (NDUFV2) and its pseudogene. *Genomics* 1995, 26(3):461-466.
97. de Coo RF, Buddiger P, Smeets HJ, van Oost BA: Molecular cloning and characterization of the human mitochondrial NADH:oxidoreductase 10-kDa gene (NDUFV3). *Genomics* 1997, 45(2):434-437.
98. Hirawake H, Wang H, Kuramochi T, Kojima S, Kita K: Human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of the flavoprotein (Fp) subunit of liver mitochondria. *J Biochem* 1994, 116(1):221-227.

99. Brière JJ, Favier J, Bénit P, El Ghouzzi V, Lorenzato A, Rabier D, Di Renzo MF, Gimenez-Roqueplo AP, Rustin P: Mitochondrial succinate is instrumental for HIF1alpha nuclear translocation in SDHA-mutant fibroblasts under normoxic conditions. *Hum Mol Genet* 2005, 14(21):3263-3269.
100. Kita K, Oya H, Gennis RB, Ackrell BA, Kasahara M: Human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of iron sulfur (Ip) subunit of liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 166(1):101-108.
101. Au HC, Ream-Robinson D, Bellew LA, Broomfield PL, Saghbini M, Scheffler IE: Structural organization of the gene encoding the human iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase. *Gene* 1995, 159(2):249-253.
102. Neumann HP, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, Buchta M, Franke G, Klisch J, Bley TA *et al*: Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA* 2004, 292(8):943-951.
103. Hirawake H, Taniwaki M, Tamura A, Kojima S, Kita K: Cytochrome b in human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of the components in liver mitochondria and chromosome assignment of the genes for the large (SDHC) and small (SDHD) subunits to 1q21 and 11q23. *Cytogenet Cell Genet* 1997, 79(1-2):132-138.
104. Niemann S, Müller U, Engelhardt D, Lohse P: Autosomal dominant malignant and catecholamine-producing paraganglioma caused by a splice donor site mutation in SDHC. *Hum Genet* 2003, 113(1):92-94.
105. Heutink P, van der Mey AG, Sandkuijl LA, van Gils AP, Bardoel A, Breedveld GJ, van Vliet M, van Ommen GJ, Cornelisse CJ, Oostra BA: A gene subject to genomic imprinting and responsible for hereditary

- paragangliomas maps to chromosome 11q23-qter. *Hum Mol Genet* 1992, 1(1):7-10.
106. Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN *et al*: Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 2000, 287(5454):848-851.
 107. Petruzzella V, Tiranti V, Fernandez P, Ianna P, Carrozzo R, Zeviani M: Identification and characterization of human cDNAs specific to BCS1, PET112, SCO1, COX15, and COX11, five genes involved in the formation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Genomics* 1998, 54(3):494-504.
 108. Hinson JT, Fantin VR, Schönberger J, Breivik N, Siem G, McDonough B, Sharma P, Keogh I, Godinho R, Santos F *et al*: Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Björnstad syndrome. *N Engl J Med* 2007, 356(8):809-819.
 109. Stan T, Brix J, Schneider-Mergener J, Pfanner N, Neupert W, Rapaport D: Mitochondrial protein import: recognition of internal import signals of BCS1 by the TOM complex. *Mol Cell Biol* 2003, 23(7):2239-2250.
 110. Bandi S, Bowler BE: Probing the dynamics of a His73-heme alkaline transition in a destabilized variant of yeast iso-1-cytochrome c with conformationally gated electron transfer methods. *Biochemistry* 2011, 50(46):10027-10040.
 111. Eisenberg E, Levanon EY: Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet* 2003, 19(7):362-365.
 112. Hoffman GG, Lee S, Christiano AM, Chung-Honet LC, Cheng W, Katchman S, Uitto J, Greenspan DS: Complete coding sequence, intron/exon

- organization, and chromosomal location of the gene for the core I protein of human ubiquinol-cytochrome c reductase. *J Biol Chem* 1993, 268(28):21113-21119.
113. Duncan AM, Ozawa T, Suzuki H, Rozen R: Assignment of the gene for the core protein II (UQCRC2) subunit of the mitochondrial cytochrome bc₁ complex to human chromosome 16p12. *Genomics* 1993, 18(2):455-456.
114. Sánchez E, Lobo T, Fox JL, Zeviani M, Winge DR, Fernández-Vizarra E: LYRM7/MZM1L is a UQCRFS1 chaperone involved in the last steps of mitochondrial Complex III assembly in human cells. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1827(3):285-293.
115. Ohta S, Goto K, Arai H, Kagawa Y: An extremely acidic amino-terminal presequence of the precursor for the human mitochondrial hinge protein. *FEBS Lett* 1987, 226(1):171-175.
116. Barel O, Shorer Z, Flusser H, Ofir R, Narkis G, Finer G, Shalev H, Nasasra A, Saada A, Birk OS: Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ. *Am J Hum Genet* 2008, 82(5):1211-1216.
117. Zeviani M, Nakagawa M, Herbert J, Lomax MI, Grossman LI, Sherbany AA, Miranda AF, DiMauro S, Schon EA: Isolation of a cDNA clone encoding subunit IV of human cytochrome c oxidase. *Gene* 1987, 55(2-3):205-217.
118. Lomax MI, Welch MD, Darras BT, Francke U, Grossman LI: Novel use of a chimpanzee pseudogene for chromosomal mapping of human cytochrome c oxidase subunit IV. *Gene* 1990, 86(2):209-216.
119. Hüttemann M, Kadenbach B, Grossman LI: Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene* 2001, 267(1):111-123.

120. Hüttemann M, Lee I, Liu J, Grossman LI: Transcription of mammalian cytochrome c oxidase subunit IV-2 is controlled by a novel conserved oxygen responsive element. *FEBS J* 2007, 274(21):5737-5748.
121. Wiedemann FR, Vielhaber S, Schröder R, Elger CE, Kunz WS: Evaluation of methods for the determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in human skeletal muscle samples. *Anal Biochem* 2000, 279(1):55-60.
122. Chen WL, Kuo KT, Chou TY, Chen CL, Wang CH, Wei YH, Wang LS: The role of cytochrome c oxidase subunit Va in non-small cell lung carcinoma cells: association with migration, invasion and prediction of distant metastasis. *BMC Cancer* 2012, 12:273.
123. Beauchemin AM, Gottlieb B, Beitel LK, Elhaji YA, Pinsky L, Trifiro MA: Cytochrome c oxidase subunit Vb interacts with human androgen receptor: a potential mechanism for neurotoxicity in spinobulbar muscular atrophy. *Brain Res Bull* 2001, 56(3-4):285-297.
124. Hey Y, Hoggard N, Burt E, James LA, Varley JM: Assignment of COX6A1 to 6p21 and a pseudogene (COX6A1P) to 1p31.1 by in situ hybridization and somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet* 1997, 77(3-4):167-168.
125. Bachman NJ, Riggs PK, Siddiqui N, Makris GJ, Womack JE, Lomax MI: Structure of the human gene (COX6A2) for the heart/muscle isoform of cytochrome c oxidase subunit VIa and its chromosomal location in humans, mice, and cattle. *Genomics* 1997, 42(1):146-151.
126. Massa V, Fernandez-Vizarra E, Alshahwan S, Bakhsh E, Goffrini P, Ferrero I, Mereghetti P, D'Adamo P, Gasparini P, Zeviani M: Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome c oxidase. *Am J Hum Genet* 2008, 82(6):1281-1289.

127. Masha RT, Houreld NN, Abrahamse H: Low-intensity laser irradiation at 660 nm stimulates transcription of genes involved in the electron transport chain. *Photomed Laser Surg* 2013, 31(2):47-53.
128. Hofmann S, Lichtner P, Schuffenhauer S, Gerbitz KD, Meitinger T: Assignment of the human genes coding for cytochrome c oxidase subunits Va (COX5A), VIc (COX6C) and VIIc (COX7C) to chromosome bands 15q25, 8q22-->q23 and 5q14 and of three pseudogenes (COX5AP1, COX6CP1, COX7CP1) to 14q22, 16p12 and 13q14-->q21 by FISH and radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* 1998, 83(3-4):226-227.
129. Lazarou M, Smith SM, Thorburn DR, Ryan MT, McKenzie M: Assembly of nuclear DNA-encoded subunits into mitochondrial complex IV, and their preferential integration into supercomplex forms in patient mitochondria. *FEBS J* 2009, 276(22):6701-6713.
130. Merante F, Duncan AM, Mitchell G, Duff C, Rommens J, Robinson BH: Chromosomal localization of the human liver form cytochrome c oxidase subunit VIIa gene. *Genome* 1997, 40(3):318-324.
131. Chen L, Xu Y, Zuo WL, Yang HX, Liao QP, Xin ZC, Guo YL: [Effect of Ras signal regulating Cox7a2 expression and its sub-cellular location in testicular interstitial cell]. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2012, 44(4):507-510.
132. Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M: Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol* 1998, 18(1):442-449.
133. Sadlock JE, Lightowers RN, Capaldi RA, Schon EA: Isolation of a cDNA specifying subunit VIIb of human cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1993, 1172(1-2):223-225.

134. Indrieri A, van Rahden VA, Tiranti V, Morleo M, Iaconis D, Tammaro R, D'Amato I, Conte I, Maystadt I, Demuth S *et al*: Mutations in COX7B cause microphthalmia with linear skin lesions, an unconventional mitochondrial disease. *Am J Hum Genet* 2012, 91(5):942-949.
135. Hendrickson SL, Lautenberger JA, Chinn LW, Malasky M, Sezgin E, Kingsley LA, Goedert JJ, Kirk GD, Gomperts ED, Buchbinder SP *et al*: Genetic variants in nuclear-encoded mitochondrial genes influence AIDS progression. *PLoS One* 2010, 5(9):e12862.
136. Hüttemann M, Schmidt TR, Grossman LI: A third isoform of cytochrome c oxidase subunit VIII is present in mammals. *Gene* 2003, 312:95-102.
137. Streif D, Iglseider E, Hauser-Kronberger C, Fink KG, Jakab M, Ritter M: Expression of the non-gastric H⁺/K⁺ ATPase ATP12A in normal and pathological human prostate tissue. *Cell Physiol Biochem* 2011, 28(6):1287-1294.
138. Sverdlov VE, Kostina MB, Modyanov NN: Genomic organization of the human ATP1AL1 gene encoding a ouabain-sensitive H,K-ATPase. *Genomics* 1996, 32(3):317-327.
139. Li ML, Li SG, Wu WG, Rao LH, Zhang L, Ding QC, Yang JH, Wu XS, Lu JH, Chen L *et al*: [Differential gene expression profiles of gastric cancer]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2012, 92(18):1249-1252.
140. Kataoka H, Biswas C: Nucleotide sequence of a cDNA for the alpha subunit of human mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1991, 1089(3):393-395.
141. Yuan J, Zhang C, Fang S, Zhuang Z, Ling S, Wang S: A monoclonal antibody against F1-F0 ATP synthase beta subunit. *Hybridoma (Larchmt)* 2012, 31(5):352-357.

142. Jabs EW, Thomas PJ, Bernstein M, Coss C, Ferreira GC, Pedersen PL: Chromosomal localization of genes required for the terminal steps of oxidative metabolism: alpha and gamma subunits of ATP synthase and the phosphate carrier. *Hum Genet* 1994, 93(5):600-602.
143. Pihlajamäki J, Boes T, Kim EY, Dearie F, Kim BW, Schroeder J, Mun E, Nasser I, Park PJ, Bianco AC *et al*: Thyroid hormone-related regulation of gene expression in human fatty liver. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94(9):3521-3529.
144. Higuti T, Tsurumi C, Osaka F, Kawamura Y, Tsujita H, Yoshihara Y, Tani I, Tanaka K, Ichihara A: Molecular cloning of cDNA for the import precursor of human subunit B of H(+)-ATP synthase in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 178(3):1014-1020.
145. Carbajo RJ, Kellas FA, Runswick MJ, Montgomery MG, Walker JE, Neuhaus D: Structure of the F1-binding domain of the stator of bovine F1Fo-ATPase and how it binds an alpha-subunit. *J Mol Biol* 2005, 351(4):824-838.
146. Dyer MR, Walker JE: Sequences of members of the human gene family for the c subunit of mitochondrial ATP synthase. *Biochem J* 1993, 293 (Pt 1):51-64.
147. Wang HL, Zhu ZM, Yerle M, Wu X, Wang H, Yang SL, Li K: Full-length coding sequences and mapping of porcine ATP6VOE and ATP5G1 genes. *Cytogenet Genome Res* 2005, 109(4):533.
148. Otsuki T, Ota T, Nishikawa T, Hayashi K, Suzuki Y, Yamamoto J, Wakamatsu A, Kimura K, Sakamoto K, Hatano N *et al*: Signal sequence and keyword trap in silico for selection of full-length human cDNAs encoding secretion or membrane proteins from oligo-capped cDNA libraries. *DNA Res* 2005, 12(2):117-126.

149. Yan WL, Lerner TJ, Haines JL, Gusella JF: Sequence analysis and mapping of a novel human mitochondrial ATP synthase subunit 9 cDNA (ATP5G3). *Genomics* 1994, 24(2):375-377.
150. Hillier LW, Graves TA, Fulton RS, Fulton LA, Pepin KH, Minx P, Wagner-McPherson C, Layman D, Wylie K, Sekhon M *et al*: Generation and annotation of the DNA sequences of human chromosomes 2 and 4. *Nature* 2005, 434(7034):724-731.
151. Zhang QH, Ye M, Wu XY, Ren SX, Zhao M, Zhao CJ, Fu G, Shen Y, Fan HY, Lu G *et al*: Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Genome Res* 2000, 10(10):1546-1560.
152. Swartz DA, Park EI, Visek WJ, Kaput J: The e subunit gene of murine F1F0-ATP synthase. Genomic sequence, chromosomal mapping, and diet regulation. *J Biol Chem* 1996, 271(34):20942-20948.
153. Maak S, Jaesert S, Neumann K, Yerle M, von Lengerken G: Isolation of expressed sequence tags of skeletal muscle of neonatal healthy and splay leg piglets and mapping by somatic cell hybrid analysis. *Anim Genet* 2001, 32(5):303-307.
154. Patton J, Block S, Coombs C, Martin ME: Identification of functional elements in the murine Gabp alpha/ATP synthase coupling factor 6 bi-directional promoter. *Gene* 2006, 369:35-44.
155. Higuti T, Tsurumi C, Kawamura Y, Tsujita H, Osaka F, Yoshihara Y, Tani I, Tanaka K, Ichihara A: Molecular cloning of cDNA for the import precursor of human coupling factor 6 of H(+)-ATP synthase in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 178(2):793-799.

156. Mao M, Fu G, Wu JS, Zhang QH, Zhou J, Kan LX, Huang QH, He KL, Gu BW, Han ZG *et al*: Identification of genes expressed in human CD34(+) hematopoietic stem/progenitor cells by expressed sequence tags and efficient full-length cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(14):8175-8180.
157. Saiki T, Kawai T, Morita K, Ohta M, Saito T, Rokutan K, Ban N: Identification of marker genes for differential diagnosis of chronic fatigue syndrome. *Mol Med* 2008, 14(9-10):599-607.
158. Wiemann S, Weil B, Wellenreuther R, Gassenhuber J, Glassl S, Ansorge W, Böcher M, Blöcker H, Bauersachs S, Blum H *et al*: Toward a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs. *Genome Res* 2001, 11(3):422-435.
159. Ye RS, Pan HB, Yin GF, Huang Y, Zhao SM, Gao SZ: Molecular characterization and tissue expression profile of three novel ovine genes: ATP5O, NDUFA12 and UQCRH from muscle full-length cDNA library of black-boned sheep. *Mol Biol Rep* 2012, 39(5):5767-5774.
160. Kornak U, Reynders E, Dimopoulou A, van Reeuwijk J, Fischer B, Rajab A, Budde B, Nürnberg P, Foulquier F, Lefeber D *et al*: Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2. *Nat Genet* 2008, 40(1):32-34.
161. Wu H, Xu G, Li YP: Atp6v0d2 is an essential component of the osteoclast-specific proton pump that mediates extracellular acidification in bone resorption. *J Bone Miner Res* 2009, 24(5):871-885.
162. Sun-Wada GH, Murata Y, Namba M, Yamamoto A, Wada Y, Futai M: Mouse proton pump ATPase C subunit isoforms (C2-a and C2-b) specifically expressed in kidney and lung. *J Biol Chem* 2003, 278(45):44843-44851.

163. Imai-Senga Y, Sun-Wada GH, Wada Y, Futai M: A human gene, ATP6E1, encoding a testis-specific isoform of H(+)-ATPase subunit E. *Gene* 2002, 289(1-2):7-12.
164. Smith AN, Borthwick KJ, Karet FE: Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H(+)-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene* 2002, 297(1-2):169-177.
165. Yokoi F, Hiraishi H, Izuhara K: Molecular cloning of a cDNA for the human phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase. *J Biochem* 2003, 133(5):607-614.
166. Haque ME, Spremulli LL, Fecko CJ: Identification of protein-protein and protein-ribosome interacting regions of the C-terminal tail of human mitochondrial inner membrane protein Oxa1L. *J Biol Chem* 2010, 285(45):34991-34998.
167. Jeong SH, Ko GH, Cho YH, Lee YJ, Cho BI, Ha WS, Choi SK, Kim JW, Lee CW, Heo YS *et al*: Pyrophosphatase overexpression is associated with cell migration, invasion, and poor prognosis in gastric cancer. *Tumour Biol* 2012, 33(6):1889-1898.
168. Kiss AL, Botos E: Ocadaic acid retains caveolae in multicaveolar clusters. *Pathol Oncol Res* 2009, 15(3):479-486.
169. Wegienka G, Day Baird D, Cooper T, Woodcroft KJ, Havstad S: Cytokine Patterns Differ Seasonally between Women with and without Uterine Leiomyomata. *Am J Reprod Immunol* 2013.
170. Kubínová K, Mára M, Horák P, Kuzel D: [Genetic factors in etiology of uterine fibroids]. *Ceska Gynekol* 2012, 77(1):58-60.

171. Markowski DN, Bartnitzke S, Löning T, Drieschner N, Helmke BM, Bullerdiek J: MED12 mutations in uterine fibroids--their relationship to cytogenetic subgroups. *Int J Cancer* 2012, 131(7):1528-1536.
172. Tolvanen J, Uimari O, Ryyänen M, Aaltonen LA, Vahteristo P: Strong family history of uterine leiomyomatosis warrants fumarate hydratase mutation screening. *Hum Reprod* 2012, 27(6):1865-1869.
173. Vyshkina T, Banisor I, Shugart YY, Leist TP, Kalman B: Genetic variants of Complex I in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2005, 228(1):55-64.
174. Loeffen J, Smeets R, Smeitink J, Triepels R, Sengers R, Trijbels F, van den Heuvel L: The human NADH: ubiquinone oxidoreductase NDUFS5 (15 kDa) subunit: cDNA cloning, chromosomal localization, tissue distribution and the absence of mutations in isolated complex I-deficient patients. *J Inherit Metab Dis* 1999, 22(1):19-28.

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: AKILE TUNCAL

TC Kimlik No / Pasaport No:	62467473346 / 186295
--	----------------------

Doğum Yılı:	11/12/1990
Doğum Yeri:	Güzelyurt, Kıbrıs
Yazışma Adresi :	Kazımdirik Mahallesi 169 Sokak Yönten Apartmanı Kat: 3 No: 4 Küçükpark Bornova İzmir
Telefon :	05396903329 / 03927144988
e-posta :	akile_tuncal@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyokimya	2011 - 2013

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyokimya (Biyokimyager opsiyonu)	2007 - 2011