

1. GİRİŞ

Son yıllarda, özellikle endüstri ülkelerinde, kalsiyum okzalat (CaOx) kristallerinin neden olduğu böbrek taşı hastalığının görülme sıklığı önemli derecede artmıştır (1). Böbrek taşı yaygın bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır (2). Dünya genelinde; 1992 yılı kayıtlarına göre, coğrafik bölgeye de bağlı olarak, populasyonun %1-14 kadarının bu rahatsızlığa sahip olduğu bilinmektedir (3).

Biyolojik mineralizasyon, canlı organizmalar için önemli bir biyolojik süreçtir (4). Kemik ve diş oluşumu mineralizasyonu sağlıklı bir işleyiş ile sonuçlanan normal durumlar iken, böbrek taşları patolojik bir sürecin ürünüdürler (4).

Böbrek taşı yaygın rastlanan bir hastalık olmasına rağmen gelişimi ve mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir (2). Bu durum; böbrek taşı oluşumunun çok sayıda faktörün rol aldığı karmaşık bir işleyiş olmasından kaynaklanmaktadır (2). Taş hastalığının birincil nedeni, idrarın kalsiyum tuzları açısından aşırı doymuş (supersaturation) olmasıdır (5,6). Ancak; tüm insanların idrarları bu tuzlarca aşırı doymuş olmasına rağmen, neden sadece bazılarında taş oluşumunun gözlenip bazılarında gözlenmediği bir bilinmezdir (2).

Kalsiyum okzalat taşlarının oluşumu; kristal çekirdekleşmesi, büyüme ve kümelenme, kristallerin renal tübüllerde tutulumu gibi karmaşık olaylar silsilesinin bir sonucudur (7). İdrar içerisinde; çeşitli iyonlar, makromoleküller, tuzlar ve metabolitler hakimdir (8). Bu üriner bileşenler, kristallerin oluşumundan renal tübüllerde tutulumuna kadar gelişen taş fizyolojisinin oluşumunda rol sahibidirler (8).

Ancak, idrarda taş oluşumunu yönlendiren faktörlerin yanı sıra engelleyen faktörler de mevcuttur (5). Bunlar arasında; bikunin, osteopontin, Tamm-Horsfall glikoproteini, matriks Gla proteini ve protrombin fragment-1 sayılabilir (8). Bikunin, CaOx kristal çekirdekleşmesinin ve kümelenmesinin kuvvetli bir önleyicisidir (9,10,11).

Bikunin 35 kDa ağırlığında küçük bir glikoprotein olup esas olarak hepatositlerde sentezlenmektedir (9). İki adet Kunitz tip serin proteaz önleyici bölgeye (domain) sahiptir (12). Bu bölgeleri N- ve C-uç uzantıları çevreler (12).

Bikunin, karaciğer kökenli inter- α (alfa)-önleyici (inhibitor) ailesinin bir üyesidir (4). İnter- α -önleyici ($\text{I}\alpha\text{I}$), plazmada serin proteaz önleyicisi olarak

görev yapmaktadır (11). Serin proteaz önleyici etkinlik $I\alpha I'$ ün hafif zinciri olarak bilinen bikunin sayesinde gerçekleşmektedir (1,11). Ailenin diğer üyeleri, birbirinin homoloğu olan 2 ayrı ağır zincirdir (heavy chain 1-2; H1, H2) (13,14). Ağır zincirler ile bikunin arasındaki etkileşim bikunine ait kondroitin sülfat zinciri sayesinde olmaktadır (11).

Bikunin, plazma ve idrarda serbest halde de bulunmaktadır (11). Bikunin idrara glomerular filtrasyonla geçebilmektedir (12).

Yapılan çalışmalar bikuninin; böbrek, testis, kalp, akciğer, beyin gibi çeşitli dokularda da sentezlendiğini ortaya çıkarmıştır (10,14). Bikunin çeşitli fizyolojik rollere sahip düzenleyici bir proteindir (12,14). Plazmadaki serin proteaz önleyici görevinin yanı sıra; kanser hücrelerinin metaztaz ve yayılımının önlenmesinde, hücre gelişiminde, bağışıklık cevabında ve hücrel kalsiyum alımının engellenmesinde etki sahibidir (12).

Canlı dışı (in vitro) ortamda yapılan çeşitli çalışmalarla; bikuninin CaOx kristal gelişiminin önlenmesinde önemli bir role sahip olduğu anlaşılmıştır. Deneyisel olarak taş geliştirilmiş sıçanlarda karaciğer ve böbrekteki bikunin gen ifadeleri (transkripsiyon) izlenmiş ve böbrek epitel hücrelerinde, CaOx'a cevap olarak, sentezin ciddi derecede arttığı görülmüştür (9). Aynı çalışmada karaciğerdeki sentezde kayda değer bir farklılık olmadığı rapor edilmiştir (9). Dolayısıyla; idrardaki artmış bikunin derişiminin kaynağının, karaciğerde sentezlenip glomerular filtrasyonla idrara salınmış bikunin değil; renal epitel hücrelerin CaOx'a karşı bir cevap olarak bizzat ürettiği bikunin olduğu düşünülmektedir (9).

Deneyisel olarak taş gelişen sıçanlarda yapılan RT-PCR (reverse transcription – polymerase chain reaction; ters-düz polimeraz zincir tepkimesi) deneyleri ile böbrek hücrelerinde sentezi artan ve azalan mRNA'lar tespit edilmiştir (7). Bu çalışma neticesinde; bikunin, osteopontin, matriks Gla proteini ve Tamm-Horsfall proteinin mRNA'larında artış olduğu doğrulanmıştır (7).

Bikuninin CaOx önleyici etkinliğinin, taş hastalarının idrarlarında sağlıklı bireylere nazaran zayıf olduğu tespit edilmiştir (3). Ayrıca; taş oluşturan bireylerin idrarlarındaki bikunin derişiminin sağlıklı bireylere oranla düşük olduğu da gözlenmiştir (4).

Farklı bir çalışmada, canlı dışı ortamda okzalat ve kalsiyum okzalat kristallerine maruz bırakılan renal hücrelerin bikunin genini ifade ettiği gözlenmiştir (6). İida ve ark. artan bikunin üretiminin; okzalatın zararlı etkilerine karşın, renal epitel hücrelerinin koruyucu bir cevabı şeklinde yorumlamışlardır (6).

Bikunin karbonhidrat zincirlere sahip bir moleküldür (12). Ancak bikuninin CaOx taş oluşumunu önleyici etkinliği için karbonhidrat zincirlere gereksinim yoktur (15). Önleyici etkinliğin ikinci Kunitz tip bölge ile gerçekleştiği düşünülmektedir ve Kunitz-2 bölgesinin varlığının CaOx kristallerini önlemede gerekli ve yeterli olduğuna inanılmaktadır (15,16).

Bikuninin CaOx oluşumunu nasıl önlediği hakkında çeşitli görüşler vardır. Bu etkiyi açıklayan ilk olası modele göre; bikunin ikinci Kunitz bölge içinde pozitif yüklü bir gruba sahiptir ve elektrostatik bir etkiyle kalsiyumun kristallere bağlanmasını engellemektedir (5,15). Proteinin bağlanışı kristallerin etrafındaki elektrostatik yüzeyi değiştirmektedir (15). Protein molekülünün pozitif yüzeyi katyonları itmekte ve düşük Ca iyon derişimine neden olmaktadır (15). İkinci olası modele göre ise; bikunin proteinin CaOx kristallerine bağlanması kristalleri ve kristal matris proteinlerini yapısal değişime sürüklemekte ve kalsiyumun bağlanma enerjisinde değişikliğe neden olmaktadır (15). Böylece bikunin, Ca iyonlarıyla etkileşerek birbirleriyle aralarındaki etkileşimin önüne geçmiş olmaktadır (15).

Bikunin, alfa1-mikroglobulin (α 1-m; A1M) proteiniyle aynı öncü gen (AMBP; alpha1-microglobulin/bikunin precursor) üzerinden sentezlenmektedir (13,14,16,17). Alfa1-mikroglobulin ve bikunin yapısal ve işlevsel açıdan birbirinden bağımsız iki ayrı aileye mensup proteinlerdir (17). Gen toplam 10 ekzon, 9 introndan oluşmaktadır (17,18,19,20). İlk altı ekzon α 1-m'i kodlarken son dört ekzon bikunini kodlamaktadır (17,18,19,20). Tek mRNA ürünü iki protein translasyon sonrasında golgi aygıtında kesilerek birbirinden ayrılır (21).

Bu çalışmada; böbrek taşı oluşturan bireylerin, bikunin yapısal ve özendirici (promoter) gen bölgelerinde çokyapılılık (polymorphism) taraması gerçekleştirilmiştir. Bikunin , taş oluşumunun engellenmesinde önemli bir role sahiptir (1,4,6,9,10). Dolayısıyla hasta bireylerde, bikuninin taş oluşumunu önleyici etkinliğindeki değişimin transkripsiyonel düzenlenmesinin iyi anlaşılması ile tedavi hizmetlerine yardımcı olunacağı düşünülmektedir. Böbrek taşı oluşumunun moleküler temellerinin araştırılması, ileride daha etkin sağlık hizmetleri verebilmemizi, moleküler anlamda bilgi ve tecrübe sahibi olmamızı sağlayacaktır. Bu çalışmada, taş oluşum mekanizmasında engelleyici etki sahibi bikuninin muhtemel allelik değişimi ile taş oluşumu arasında bir ilişkinin varlığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Taşı Oluşumu

İdrarda çeşitli iyonlar, tuzlar, makromoleküller ve metabolitler bulunur (8). Böbrek taşı oluşumu tüm bu bileşenlerin varlığında gerçekleşir (8). Proteinler, yağlar ve glikozaminoglikanlar yaygın üriner makromoleküllerdir. İdrarda baskın olarak bulunan kristaller ise kalsiyum okzalat (CaOx) ve kalsiyum fosfattır (CaP) (8).

İnsanlığın büyük bir kısmı için ciddi bir sağlık sorunu olan böbrek taşı (kalkuli), üriner sistemde CaOx ve CaP gibi katı maddelerin oluşumuyla tanımlanır (3). Dünya genelinde, coğrafik bölgeye de bağlı olarak, popülasyonun %1-14 kadarı taş hastalığından muzdariptir (3).

Böbrek taşı çok çeşitli organik veya inorganik bileşimlerin oluşumu neticesinde gözlenir. Ancak taş oluşumlarının %70'den fazlası birincil eleman olarak CaOx içerir (3). Taş oluşumunda iki ana basamak açıklıkla ayırt edilir (3). Birincisi; böbrekte tutulmuş katı fazdaki bir takım parçacıkların taş çekirdeği olarak görev yapması, ikincisi ise oluşan çekirdeğin üzerine devamlı olarak CaOx birikimi sonucunda böbrek taşının gelişimidir (3). Bu iki basamak; çekirdek oluşumu, kristalin gelişmesi ve kümelenme safhalarından oluşmaktadır (3,22).

2.1.1. Çekirdek Oluşumu

Okzaloalsik taş hastalarının idrarları CaOx açısından aşırı doygunudur (3). Aşırı doygunluk kristalleşmenin gerçekleşmesi için ön koşuldur (23). Ancak kristali oluşturacak parçacıkların homojen çekirdekleşmesi için yeterli değildir (3). Kalsiyum okzalat; kalsiyum fosfat, ürik asit, bazı mikropartiküller ve böbrek dokusu gibi çeşitli substratların da katılımı sonucu bir mekanizmayla karma yapılı (heterojen) çekirdekleşmeye gider (3). Bu çekirdek böbrekte kalabilmek için iç duvarlara tutunur (3). Böbrek duvarı glikozaminoglikan bir tabaka ile korunuyor olduğundan oluşan taş çekirdekleri koruyucu tabakanın hasarlı veya ince olduğu kısımlara tutunabilir (3). Kalsiyum okzalat kristallerinin renal epitellere tutunumu kristal tipine özgün bir durumdur ve idrarda bulunan glikozaminoglikanlar ve glikoproteinlerce önüne geçilebilir (24).

2.1.2. Kristal Gelişimi

Böbrekte hakim olan koşullar altında, CaOx kristal gelişimi, "yüzey tepkimesi" ile kontrol edilir (3). Taş gelişimine katkıda bulunan her bir kristal parçası, gelişmekte olan kristal gövdeye dahil olmak üzere kristal yüzey üzerine yerleşir (3). Yeni kristal parçacık gövde yüzeyinden geçirilir (3). Peşpeşe gerçekleşen kristal katılımı, taşın gelişimine neden olur, ancak; gelişim oranını belirlemede rol sahibi değildir (3). Bu şartlar altında kristal gelişimini önleyen moleküller (inhibitörler) çekirdek oluşumunu kayda değer ölçüde düşürür (3). Ancak bu süreç sürekli ve tam bir sonuç sağlamaz (3). Dolayısıyla böbrekte tutulan CaOx taş çekirdeği bir zaman sonra tam büyüklükte bir taşa dönüşür (3). Altını çizmek gerekir ki; bu gelişimin oranı aşırı doygunluk ve çeşitli bileşiklerin varlığı gibi böbrekteki mevcut şartların bir ürünüdür (3).

2.1.3. Kümelenme

Okzalokalsik renal taşların merkezleri, 5 µm genişlikteki sayısız parçacıktan oluşan, kümesel çoklu kristalin bir yapıya sahiptir (3). Taş çekirdeğini oluşturan 5 µm çaplı, çok sayıdaki kristalin düzenli gelişimi sonucu, az sayıda ve geniş çaptaki kristaller oluşur (3). Bu aşamalı işleyiş ve organizasyon, kümelenmenin taş gelişiminde önemli bir basamak olduğuna işaret etmektedir (3).

Bazı araştırmacılar kümelenmenin "ikincil yığılma mekanizması" denen bir yolla gerçekleştiğine inanmaktadırlar (3). Bu düşünceye göre; kümelenme, sıvı içindeki Brownian hareketi sergileyen bağımsız parçacıkların çarpışması neticesinde gerçekleşmektedir (3). Fakat; idrarda bulunan katı parçacıklar yukarı üriner sistemde de varlık göstermektedir (3). Burada ikincil yığılmanın ortaya çıkabilmesi için gerekli koşulları sağlayabilmektedir (3) Bu durumda parçacıkların taş oluşturan tüm bireylerin idrarlarında gözlenmesi ve bu kişilerin kristalüriyi sergilemesi beklenir (3). Ancak klinik araştırmalar neticesinde taş oluşturan bireylerin önemli bir kısmının gözlenebilir bir kristalüri sergilemedikleri bilinmektedir (3). Bu demek olur ki; ikincil yığılma mekanizmasının, sanılanın aksine, taş gelişiminde bir rolü yoktur (3).

Kümelenme için öne sürülen bir diğer mekanizma ise "birincil yığılma mekanizması"dır (3). Çeşitli sayıdaki, farklı orijinli kristallerin oluşturduğu çoklu-kristalin yapının taş oluşumuna neden oluşu ile açıklanır (3). Birincil yığılma; yeni kristallerin, düzensiz gelişmiş ana kristallerden koparak gelişip aynı büyüklüğe gelmesi ile açıklanabilecek bir tür kristal gelişim bozukluğudur (3). Bu mekanizma taş oluşumuna neden olacak kristallerin dereceli olarak artışına

neden olur (3). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; birincil yığılma mekanizması, kalsiyum okalat monohidrattan oluşan okzalkalsik taş çekirdeğinin oluşumundan sorumlu birincil baskın mekanizmadır (3).

2.1.4. Taş Oluşum Mekanizması

Kalsiyum okalat taşları, yukarı üriner sistem duvarlarına tutunmuş çözünmez katı parçacıkların oluşturduğu çekirdekten köken alarak oluşurlar (3). Bu parçacıklar ancak sıvı içerisinde meydana gelebilirler (3). Her iki durumda da işleyiş önleyicilerin (inhibitor) eksikliği veya özendiricilerin (promoter) varlığı ile desteklenir (3). Taş oluşumu için gerekli koşul böbreğin iç duvarlarını kaplayan tutunmayı engelleyici tabakanın hasarlı veya incelmış olmasıdır (3).

Oluşan her bir taş çekirdeği böbrekten yıkanıp atılamadığı takdirde gelişmiş bir taşa dönüşür (3). Bir taşı oluşturan kristallerin sayısı, birincil yığılma ve yeni kristallerin karma yapılı (heterojen) çekirdeklemesi ile artar (3).

Taş oluşumunda, önleyici etkinliğin azalması ve çekirdeklemeye yön veren özendiricilerin varlığı önemli derecede etki sahibidir (3). Ancak böbreğin iç yüzü tutunmayı engelleyici tabaka ile çok iyi korunuyorsa bu faktörlerin varlığı taş oluşumu için yeterli değildir (3). Koruyucu glikozaminoglikan tabaka hasar gördüğünde veya incelendiğinde önleyici eksikliği ve özendirici varlığı taş oluşumunu destekler (3). Bu halde renal taş oluşumunun belirleyici basamağı taş çekirdeğinin oluşumudur (3). Dolayısıyla bu basamak baskılanırsa taşlaşma da engellenebilecektir (3). Taş oluşumunda, önleyici proteinlerin etkisi bu proteinleri şifreleyen genlerin çalışması ile netliğe kavuşacaktır (25).

2.2. Taş Oluşumunu Etkileyen Faktörler

2.2.1. Okalat

Okalat ($C_2O_4^{2-}$) küçük bir dikarboksilik asittir (26). Glomerulustan kolaylıkla süzülebilir (26). Pek çok taş oluşumu vakasında ortak olan idrarda aşırı doymun miktarda okalatın bulunmasıdır (27). Bu durum hiperokzalaüri olarak adlandırılmaktadır (27). Memelilerde beslenme yoluyla aşırı dozda alınmasına rağmen serumdaki okalat miktarı düşüktür (28). Glomerulustan süzülen okalatın derişimi ise % 50-80 gibi yüksek oranlardadır (28). Suyun geri emilimi ile tübüler sistemdeki okalat derişimi doymunluk noktasının üzerine çıkar (süpersaturasyon) ve idrara salınacak olan kalsiyum okalat kristallerinin oluşmasına neden olur (kristalüri) (27).

Hiperokzalaürinin CaOx taş hastalığında önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (26, 29). Üriner okzalatın, kalsiyumun aşırı doygunluk seviyesinden daha önemli bir belirleyici olduğuna inanılmaktadır (26).

İdrara salınan okzalat miktarı beslenme yoluyla alıma, vücut içi üretime, bağırsaklardaki emilime ve renal taşınımına bağlıdır (26, 29). Vücuttaki üretim glioksilat ve askorbat metabolizması sonucu gerçekleşir (26). Ancak taş hastalarında okzalat metabolizmasında bir düzensizlik gösterilememiştir (26).

2.2.2. *Sitrat*

Sitratın toplam salınımı ve idrardaki derişimi, sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubuna göre taş oluşturanlarda düşüktür (3). Sitrat kristal gelişiminin, yığılmanın ve heterojen çekirdekleşmenin etkin bir önleyicisidir (3). Kalsiyum iyonları ile etkileşime girerek kalsiyumun okzalat iyonlarıyla bir araya gelmesine engel olur (22).

2.2.3. *Magnezyum*

Normal şartlarda idrarda bulunan magnezyum, okzalat iyonlarına bağlanarak kalsiyum okzalat kristal oluşumunu engeller (22). Magnezyumun idrarda düşük derişimde bulunması hali hipomagnezüri olarak adlandırılır. Hipomagnezüri taş oluşumunda etkindir (22).

2.2.4. *Ürat*

Ürat, idrarda yüksek derişimde bulunduğu takdirde (hiperürikosüri) CaOx'ın çökmesini sağlar (22).

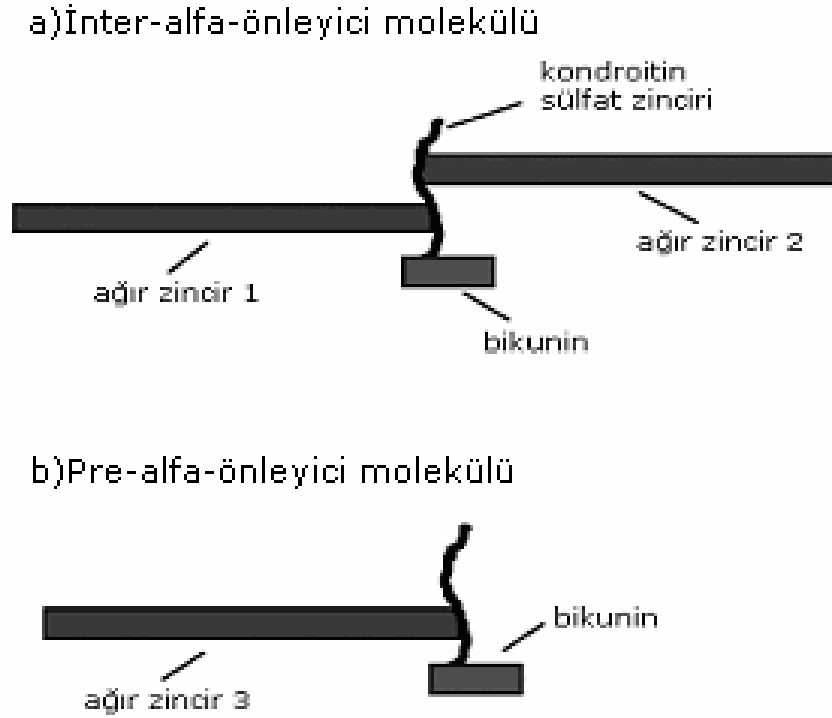
2.2.5. *pH*

Böbrek içerisinde hakim olan pH, CaOx'ın çözünürlüğü üzerinde etkilidir (22). CaOx taş hastaları ve sağlıklı bireylerin idrarlarında yapılan çalışmalar neticesinde kristalleşme riskinin en yüksek olduğu pH aralığı 4,5-5,5 olarak bulunmuştur (30). 4,5'tan düşük ve 6,0'dan yüksek pH değerleri de çalışılmış ve en az taş riskinin 4,5'tan düşük pH değerlerinde olduğu gözlenmiştir (30). Bu durum asidik pH'da CaOx'ın çözünürlüğünün artmasından dolayıdır (30).

2.3. İnter- α (Alpha)-Önleyici (Inhibitor) Ailesi Proteinleri

İnter- α -önleyici ($I\alpha I$) ailesi proteinleri karaciğer kökenli bir grup plazma proteaz önleyicisi olup dört farklı genden sentezlenirler (13). Bu polipeptitlerden üçü homolog ve 75-85 kDa moleküler ağırlıkta olup ağır zincir (heavy chain) 1, 2 ve 3 ($H1$, $H2$, $H3$) olarak adlandırılmaktadırlar (13,14,31). Dördüncü ise hafif zincir veya bikunin olarak isimlendirilmiş, 25 kDa ağırlığında ve proteaz önleyici etkinliğini taşıyan proteindir. Oluşan $I\alpha I$ 220 kDa moleküler ağırlığa sahip bir moleküldür (31).

Bikunin bir kondroitin sülfat zinciri taşır. Bu zincir yüksek moleküler ağırlıklı üyelerin (inter- α -önleyici ve pre- α -önleyici: $P\alpha I$) oluşumu için ağır zincirlerin bikunine bağlanmasında görev yapar (11). İnsanda; İnter- α -önleyici bileşiği, bikunin, $H1$ ve $H2$ 'nin birleşimiyle; pre- α -önleyici ($P\alpha I$) ise bikunin ve $H3$ 'ün birleşimiyle oluşmaktadır (Şekil 1) (11).



Şekil 1. $I\alpha I$ ve $P\alpha I$ 'nın şematik gösterimi. a) $I\alpha I$ molekülünün iki ağır zinciri bikuninin kondroitin sülfat zincirine kovalent olarak bağlanmaktadır. b) $P\alpha I$ 'yı oluşturan ağır zincir 3 ve bikunin, kondroitin sülfat zincir sayesinde kovalent olarak bağlanmaktadır. Her iki molekülde de bağlanma ağır zincirin C ucundaki amino asitin α karbonu ile kondroitin sülfat zincirinin sülfatlanmamış GalNAc kalıntısı arasında ester bağı oluşumu ile gerçekleşmektedir (37).

Diğer türlerde insandaki oluşumlardan farklı kombinasyonlar görülür. Örneğin sığır plazmasında bikunin ve $H2$ 'nin ya da bikunin $H2$ ve $H3$ 'ün oluşturduğu bileşimler görülür (14).

2.3.1. Bikunin

1909 yılında çeşitli patolojik durumlardan muzdarip hastaların idrarlarının tripsin etkinliğini engelleme özelliğine sahip olduğu ortaya atıldı (12). 1955'te antitriptik etkinliğe sahip molekül idrardan saflandırıldı ve UTI (urinary trypsin inhibitor) olarak adlandırıldı. Güçlü asitlere dayanıklı olduğu görülen proteine farklı araştırmacılarca ASTI (acid stable trypsin inhibitor) adı verildi (12). Serumda tespit edilmiş ve moleküler ağırlığından dolayı HI-30 (human inhibitor 30) adı verilmiş olan proteinin UTI ile aynı protein olduğu anlaşıldı (12). Aynı protein farklı kaynaklarda mingin, ürinastatin, ülinastatin gibi isimler de almıştır (1,12). 1990 yılında bir grup araştırmacı bir araya gelerek isim çeşitliliğinden kaynaklanan sorunu çözmek maksadıyla, sahip olduğu iki Kunitz bölgeden dolayı, bikunin isminin kullanılmasına karar vermişlerdir (12).

Bikunin; tripsin, kimotripsin, plazmin, lökosit elastaz, katepsin B ve H gibi çeşitli serin proteazların önleyicisidir (inhibitör) (16). Serumda, idrarda ve çeşitli dokularda yüksek miktarlarda bulunur (16). Serumda serbest ve bileşik halde bulunurken idrarda sadece serbest durumdadır (16).

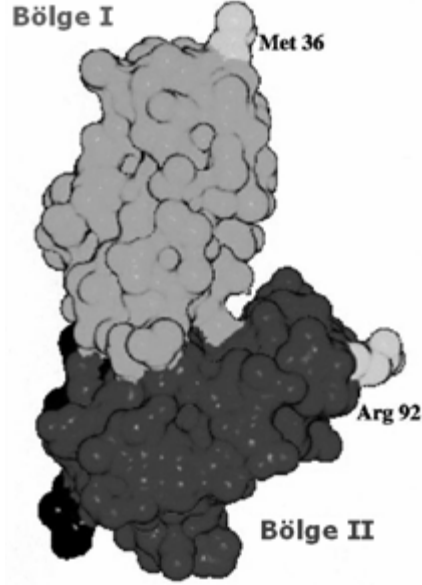
Bikunin hücre içi kalsiyum seviyesinin ayarlanmasında rol aldığı gibi hücre dışı matriks proteinlerinin düzenlenmesinde, inflamasyonda ve kanser hücrelerinin metastazı ve yayılımının etkin biçimde önlenmesinde de rol aldığı rapor edilmiştir (12,14). Bikunin hücre gelişiminin düzenlenmesinde iki fazlı bir etkiye sahiptir. Düşük derişimdeki bikunin gelişimi teşvik ederken, yüksek derişim hücre gelişimini engellemektedir (16).

Farklı çalışmalarda; insan, sıçan ve farelerde bikunini kodlayan cDNA klonlanmış ve bikuninle beraber α 1-mikroglobulinin (α 1-m) de kodlandığı ortaya çıkarılmıştır (17,18,19,20).

2.3.2. Bikunin Protein Yapısı

Bikunin polipeptit zinciri etkin Kunitz tip iki proteaz önleyici bölgeye (domain) sahiptir (Şekil 2) (2,16). Bu bölgeler aynı zamanda HI-14 ve HI-8 olarak da adlandırılmaktadırlar (2). Ortalama 50 amino asitten oluşan kunitz tip bölgeler isimlerinden de anlaşılacağı gibi 14 ve 8 kDa ağırlıktadırlar (2,16). Bu bölgeler içerdikleri üç disülfid köprü ile kendilerine özgü bir yapı oluştururlar (Şekil 2) (14). Farklı sayılarda Kunitz tip bölgeye sahip bilinen birçok protein mevcuttur (14). Bunlar BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor), TFPI (tissue factor pathway inhibitor), APP (Alzheimer amiloid β -protein precursor)'nin alternatif intron ayıklanması sonucu oluşan varyantı, yılan zehiri temel proteaz önleyicileri ile tip VI ve tip VII kollajenlerin C-uç kısımlarıdır (14,16).

Kristalografik alışmalar, aynı eksen üzerindeki iki kunitz tip bölgenin kısa bir peptitle birleştiğini ortaya çıkarmıştır (16). Proteazı tanımakla görevli kısımlar V biçimli her bir Kunitz bölgesinin birbirine zıt uçlarında bulunur (şekil 2) (14).



şekil 2. Bikuninin katlanmış protein yapısı ve Kunitz tip bölgeleri. Açık ve koyu gri bölgeler sırasıyla Kunitz bölge 1 ve 2'dir. Proteaza bağlanmakla görevli kısımlar Met 36 ve Arg 92 görölmektedir. Tripsinden daha büyük enzimlerin ikinci bölgeye bağlanması birinci bölge tarafından engellenir (12).

Kunitz tip bölgeleri 10-25 amino asit uzunluktaki N ve C uç uzantılar çevreler (14,16). N uç peptit Ser-10'a (peptit zincirinde 10. sırada bulunan serin amino asiti) bağlı bir kondroitin sülfat zinciri taşıır. Zincir protein saflandırılması sırasında Ser-10'un proteolitik kesimiyle peptitten uzaklaştırılabilmektedir (16).

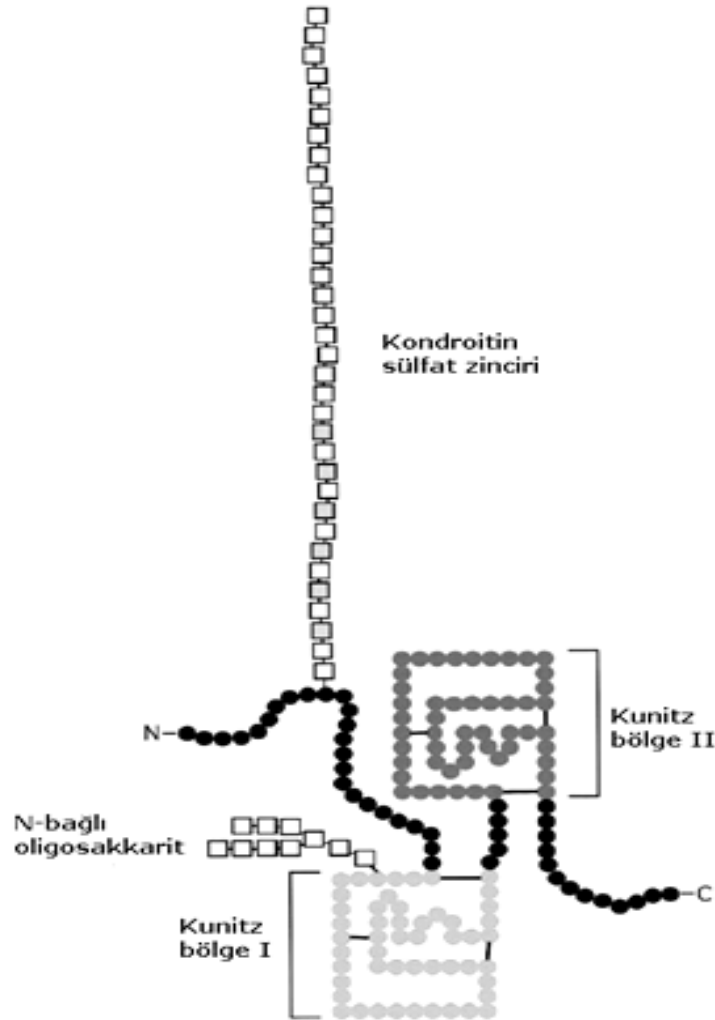
2.3.2.1. Bikunin Karbonhidratları

Bikunin 35 kDa ağırlıkta bir glikoprotein olup % 8,5 oranında karbonhidrat içerir (32).

Bikunin N-uç uzantısı üzerinde Ser10 (peptit zincirinde 10. sırada bulunan serin amino asiti) ve Kunitz bölge 1 içinde Asn45 (peptit zincirinde 45. sırada bulunan asparajin amino asiti) olmak üzere iki glikozilasyon bölgesi bulundurur (şekil 3) (14,16). Ser10'a bağlı kondroitin sülfat zinciri 7-8 kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve GlcA (glukuronik asit) ve GalNAc (N-asetil galaktoz amin)'in oluşturduğu 15±3 disakkarit birimden oluşur (16). H1, H2 ve H3 ile bikunin arasındaki bağlantı kondroitin sülfat zinciri aracılığıyla olmaktadır (12,13,16). Kunitz bölge 1 içindeki Asn45'e bağlı diğer karbonhidrat zincirinin elektron mikroskopisi ile sadece N-asetilglukozamin birimi anlaşılabilmektedir (16).

Kondroitin sülfat zincirindeki sülfatlanma polipeptite en yakın beş GalNAc birimden gerçekleşmektedir (12). Diğer glikozaminoglikan tiplerinde de görüldüğü gibi polipeptit bağlanma bölgesindeki şeker birimleri kondroitin sülfat zincirinde de Xyl-Gal-Gal-GlcA'dır (12,14). Bikunine bağlanan diğer karbonhidrat ise Kunitz bölge 1 içinde bulunan Asn45'e tutunan N-bağlı oligosakkarittir (16).

Karbonhidrat zincirleri bikunin molekülünün hidrodinamik özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (14). 25-26 kDa ağırlıktaki bikuninin SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi)'ndeki hareketliliği neticesinde gözlenen ağırlığı 35-45 kDa'dur (14,16). Kondroitin sülfat zincirinin uzunluğuna ve sülfatlanmanın derecesine bağlı olarak bikunin SDS-PAGE'de sıklıkla net olmayan yayılmış bir bant görüntüsü verir (14).



Şekil 3. Bikuninin şematik yapısı ve bağlı karbonhidratlar. Amino asitler daire, şeker birimleri kare ile gösterilmiştir. Protein, iki Kunitz tip bölge, N ve C uç uzantılarından oluşmaktadır. Kunitz bölgeler kısa bir peptit ile bağlanmışlardır (12).

2.3.3. Ağır Zincirler

Ağır zincirlerin (H1, H2, H3) genleri, atasal bir H geninden ikilenmeler (duplikasyon) neticesinde oluşmuştur (13). Proteinlerin cDNA dizileri birbirinin homologudur (13).

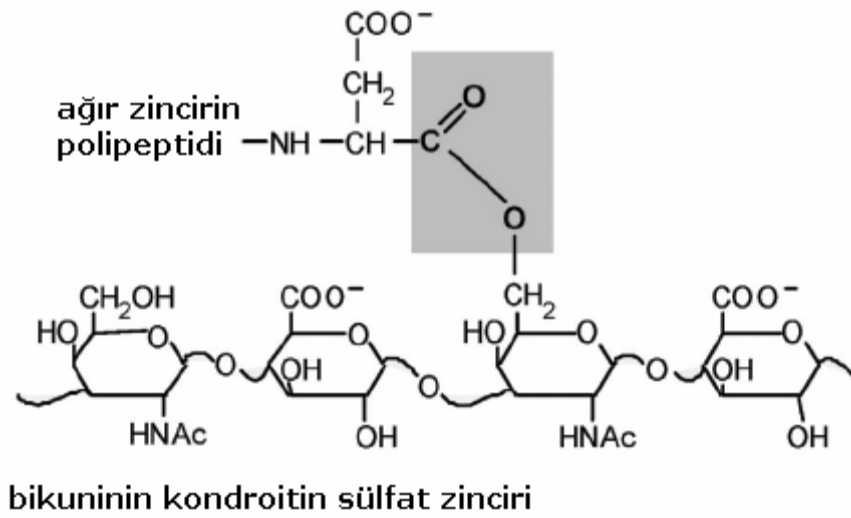
Ağır zincirlerin yapısal özellikleri hakkında şu an elde bulunan bilgiler biyokimyasal analizler ve diğer proteinlerle dizin karşılaştırmaları sonucu elde edilmiştir (14). İnsan I α I'den izole edilen ağır zincirler jel filtrasyonunda yayılımcı birer protein davranışı sergilemektedirler (14). Sınırlı proteolizis ve elektron mikroskopi deneyleri neticesinde polipeptit zincirlerinin N-uç kısımlarının globuler bölge oluşturduğu, kalan kısımların ise çubuksal ve düzensiz bir yapıya sahip olduğu anlaşılmıştır (14).

Ağır zincirler hem N- hem de O-glikozillenmiştir (14). Ağır zincir 1 çift anten gibi bir yapıyı andıran Asn251 ve Asn554'e tutunmuş iki oligosakkarit ve polipeptitin C-uc kısmındaki treonin amino asidine bağlı GalNac (N-asetil galaktoz amin)-Gal (galaktoz)-NeuA (nöraminik asit)'ten oluşan bir trisakkarit zincire sahiptir (14). Benzer şekilde H2 de N-ucunda anten biçimli oligosakkaritler ve C-ucunda 4 adet O-bağlı trisakkarit zincir taşımaktadır (14).

İnter- α -önleyici ailesine dahil her iki ağır zincir de disülfid köprüsü içerir (14). Ağır zincir 1'e ait iki disülfid köprüsünden sadece biri polipeptitin uzak kısımlarını bir araya getirirken diğer disülfid bağı ve H2'ye ait iki disülfid köprüsü peşpeşe veya iki amino asit uzaklıktaki sisteinleri bağlar (14).

2.3.4. Bikuninin Katıldığı Bileşikler

Bikunin ve ağır zincirler, bikunine ait kondroitin sülfat zinciriyle kovalent bağlanarak bileşik oluştururlar (Şekil 4) (12,13,14,16). Bu durum polipeptit zincirlerinin kondroitinaz muamelesi sonucu salınımıyla anlaşılmış, bağın yapısı daha sonra kütle spektrometresi ile ilk olarak P α I'da daha sonra I α I'da açıklığa kavuşturulmuştur (14). Bağ; ağır zincirin C ucundaki aspartik asitin α -karboksil grubu ile bikuninin kondroitin sülfat zincirindeki N-asetil galaktoz aminin C6 hidroksil grubunun ester bağıyla bağlanması neticesinde oluşur (16). Bu tip bağlanma I α I ailesinde görülür ve protein-glikozaminoglikan-protein (PGP) olarak da adlandırılır (14).



Şekil 4. Bikunin ile ağır zincirleri bağlayan kondroitin sülfat zinciri (37).

2.3.5. Vücuttaki Dağılım

İnter- α -önleyici ailesi proteinlerinin nerede sentezlendiğini bulmak amacıyla yapılan Northern bantlama deneyleri neticesinde tüm polipeptitlerin başlıca karaciğerde ifade edildiği görülmüştür (14). Karaciğere ek olarak H1-3 ve bikuninin diğer bazı organlarda da ancak daha az miktarlarda sentezlendiği ortaya çıkarılmıştır (14). Bunlar Tablo 1’de görülmektedir.

Tablo 1. Bikunin ve H1-3’ün Sentezlendiği Organlar (14).

	Bikunin	H1	H2	H3
Böbrek	+	+	+	
Testis	+	+		
Kalp	+	+		
Pankreas	+	+		
Adrenal Bez		+	+	
Akciğer	+	+	+	+
Uterus		+		
Periferal		+		
Lökositler		+		
Beyin			+	

Bikunin ayrıca vücut sıvılarında da gözlenebilmektedir (14). Plazmada 4-7 μ M olup %2-10 kadarı serbest haldedir (14). Bikunin plazmanın yanı sıra

idrarda, bronşiyal mukusta, seminal plazmada, lenfte ve safrada da bulunabilmektedir (14). Bu çalışmanın odak noktasını, diğer dokuların yanı sıra, böbrek epitel hücreleri tarafından sentezlenip idrara salınan bikunin proteini oluşturmaktadır.

2.3.6. Biyosentez

İnter- α -önleyici ailesine dahil tüm proteinler öncü polipeptitler olarak sentezlenirler (14). Bu öncü polipeptitler uyarı-ileti dizilerine ve ilave uzantılara sahiptirler (14). Olgunlaşma esnasında bu uzantılar proteolitik olarak uzaklaştırılır (14).

2.3.6.1. Bikunin Öncüsünün Proteolitik İşlenmesi ve Glikozillenmesi

İki ilişkisiz proteinin aynı genden sentezlenmesi ve aynı mRNA'dan tek polipeptit olarak üretimi sadece α 1-mikroglobulin/bikunin öncülünde görülen bir durumdur (14). Öncü polipeptitin N-uç kısmında bulunan α 1-mikroglobulin bikuninden Arg-X-Arg-Arg tetrapeptidiyle ayrılır (14). Bu tetrapeptit proprotein dönüştürücü enzimler (konvertaz) için tipik bir tanıma bölgesidir (14). Ancak α 1-mikroglobulin/bikunin öncüsünü canlı içinde kesen enzim henüz tanımlanmamıştır (14). Furin adlı enzimin benzeri bir enzim olduğu düşünülmektedir (13). Furin, canlı dışı çalışmalarda kesimi gerçekleştirirken, canlı içinde aynı etkinliği göstermemektedir (13).

Bikuninin kondroitin sülfat zinciri, polipeptidin N-ucunda yer alan Ser10 amino asiti üzerine sentezlenir (14). Ksiloziltransferaz (xylosyltransferase) enzimi bikunin üzerinde GAG (glikozaminoglikan) sentezini başlatır (14).

2.3.6.2. Ağır Zincir Öncüllerinin Proteolitik İşlenmesi

Ağır zincirler sinyal dizilere ek olarak N- ve C-uç uzantılar da içerirler. Bu uzantılar protein salınmadan evvel uzaklaştırılır (13). Ağır zincir 2 ve ağır zincir 3'te yer alan kısa N-uç propeptidin rolü bilinmemektedir (14).

Proteinin C-uç uzantısı (CTX: C-Terminal Extension) ise her üç ağır zincirde de mevcut olup 30 kDa ağırlıktadır (14). Bu uzantı Val-Asp/Glu-X-Asp-Pro-His-Phe-Ile-Ile uyuşum dizisinde Asp ve Pro arasından kesilir (14). Dizi içerisindeki X amino asiti; Thr (treonin), Gly (glisin) veya Asn (asparajin) amino asitlerinden herhangi birisidir (14). Dolayısıyla bu tip bir diziyi özgün olarak tanıyan bir enzim tanımlanamamıştır (14). Çeşitli deneyler neticesinde C-uç uzantısının doğruluk ve bütünlüğünün H3'ün salınımında önemli olduğu

görülmüştür (14). C-uç uzantısının kesimine asidik pH'ın neden olduğu ve kesimin otokatalitik olarak gerçekleşebileceği düşünülmektedir (14).

2.3.6.3. Ağır Zincirlerin Bikunine Bağlanması

Pre- α -önleyici ve inter- α -önleyicide ağır zincirler ile bikunin arasındaki bağ bikunine ait kondroitin sülfat zinciriyle ağır zincirlere ait C-uç aspartik asitin α -karboksil gruplarının bağlanmasıyla oluşur (14). Aspartik asit aynı zamanda CTX'in kesimi için tanıma bölgesidir ve kesim sonucu açığa çıkan Asp artık bağlanmada görev alacaktır (14).

Ağır zincir öncüllerinin işlenmesi ve bağlanması hepatositlerde tamamlanmaktadır (14). Dolayısıyla ağır zincir öncülleri işlenmeden salınamadıkları gibi olgunlaştıktan sonra da serbest halde salınamamaktadırlar (14). Yalnızca inter-alfa-önleyici ailesi bünyesinde yer alan ağır zincirlerden farklı olarak üretilen bikuninin yarıya yakını serbest halde de salınabilmektedir (14).

2.4. Alfa1-Mikroglobulin (α 1-m, A1M)

Bikunin ile ortak bir öncü gen (AMBP: Alpha1-Mikroglobulin/Bikunin Precursor) üzerinden sentezlenen Alfa1-Mikroglobulin sarı-kahverengi, 26 kDa ağırlıkta bir glikoproteindir (17,18,19,20,27). Alfa1-mikroglobulin, lipokalin ailesine ait ve gerek yapısal gerekse işlevsel olarak bikuninle tamamen ilişkisiz bir proteindir (17,18,19,20).

Alfa1-mikroglobulin hepatositlerde bikuninle beraber değil, tek başına sentezlenir (33). Bu; aynı gen bölgesinden farklı gen ifade mekanizması ile iki farklı gen ürününün sentezlenmesi işlemidir. Alfa1-mikroglobulin polipeptidi 182-184 amino asitten oluşmaktadır (33). İki N-bağlı, bir O-bağlı oligosakkarit taşır (33).

Alfa1-mikroglobulin glikoproteini gelişimin düzenlenmesinde, hücre gelişiminde, metabolizmada, bağışıklık cevabında ve davranış bozukluklarında rol sahibidir (27). Plazmada küçük hidrofobik molekülleri taşımakla görevlidir (27). Alfa1-mikroglobulin diğer plazma proteinleriyle yüksek moleküler ağırlıklı protein bileşenlerin oluşmasında görev alır (27).

Plazmada bulunan A1M'in yaklaşık yarısı serbest halde bulunurken diğer yarısı immünoglobulin A, protrombin ve albumin gibi farklı makromoleküllerle bileşikler halinde bulunur (27).

Alfa1-mikroglobulin/bikunin öncü gen ürünü proteinlerin her ikisi de tüm memelilerin idrarlarında ve böbrek taşlarının organik matriksinde bulunmaktadır.

Üriner A1M'in de kalsiyum okzalat kristal oluşumunun engellenmesinde rol sahibi olduğu düşünülmektedir (27,33,34).

2.5. Bikuninin Böbrek Taşının Önlenmesindeki Rolü

Makromoleküller ve taş kristalleri arasındaki etkileşimin kristalleşme ve taş oluşumu üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğunu anlamak amacıyla pek çok teknik denenmiştir (8). Bunlar arasında; canlı dışı çalışmalarda makromoleküllerin varlığı ve yokluğunda kristallerin incelenmesi, hayvan modeller üzerinde deneysel olarak taş geliştirilmesi, canlı dışı ortamda taş ve renal epiteller arasındaki ilişkinin araştırılması, böbrek taşlarının ışık ve elektron mikroskopları yardımıyla incelenmesi ile taş ve kristallerin biyokimyasal analizleri gibi çeşitli yaklaşımlar sayılabilir (8).

Proteinler idrarda en yaygın bulunan moleküller ve taş matriksinin önemli bileşenleridir (8,27). Böbrek taşlarının organik matriksinde yirmiden fazla farklı protein bulunmaktadır (27). Bu proteinlerin biyo-mineralizasyondaki gerçek rolleri hakkındaki bilgi henüz yeterli değildir (27).

İdrar içerisinde kristallerin epitel hücrelere tutunmasını azaltan makromoleküller de mevcuttur (35). Bunlardan dört proteinin öncelikli olarak taş hastalığının önlenmesinde rol oynadığı gözlenmiştir (35). Bunlar bikunin, osteopontin, protrombin fragment 1 ve Tamm-Horsfall glikoproteinidir (35). Bu proteinler asidik amino asitlere sahip anyonik moleküller olup fosforilasyon, glikolizasyon gibi translasyon sonrası işlemlerden geçmişlerdir (27). Etkilerini CaOx'ın yüzeyine bağlanarak göstermektedirler (27).

İnter- α -önleyici glikoprotein ailesine dahil proteinler taş oluşumu üzerinde önemli rollere sahiptirler (10). Bikunin CaOx kristalleşmesini engelleyen bir moleküldür (10). Bikuninin rolünü anlayabilmek amacıyla normal ve deneysel olarak taş oluşturulmuş sıçanlarda I α I dağılımı ve bikunin gen ifadesi çalışılmıştır (10). Yapılan bağışıklık cevabı çalışmalarında bikunin proteini, normal sıçanlarda proksimal tübüllerde gözlenirken taş geliştirilmiş sıçanlarda proksimal tübüllere ek olarak kortikomedüller birleşme yerinde de gözlenmiştir (10). Alfa1-mikroglobulin/bikunin öncüsüne ait mRNA'nın karaciğer ve böbrekte yüksek miktarlarda, beyin ve testiste ise düşük miktarlarda sentezlendiği ortaya çıkarılmıştır (10). Bikuninin çeşitli dokularda sentezleniyor oluşu farklı fizyolojik rollere sahip olduğunu göstermektedir (14).

Normal sıçanlara nazaran taş geliştirilmiş sıçanlarda bikunin gen ifadesinde (transkripsiyon) artış görülmüştür (10). Bu durum böbreğin bikunini

CaOx'a cevap olarak sentezlediğini, hiperokzaloürinin bikunin gen ifadesini tetiklediğini ortaya koymaktadır (10).

İçme sularına etilen glikol katılarak taş oluşturulmuş sıçanlarla yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda da bikunin gen ifadesinde artış gözlenmiştir (7).

Serbest haldeki bikunin hem plazmada ve hem de idrarda bulunur (6). İdrardaki bikunin glomerular filtrasyonla salınmaktadır (12). Ancak; deneysel olarak kalsiyum okzalat taşı geliştirilmiş sıçanların, böbrek ve karaciğerlerinde, gen ifadesindeki değişimlerin kıyaslamalı olarak izlendiği bir çalışmada, normal sıçanlar ile taş oluşturulmuş sıçanların karaciğerdeki bikunin sentezleri arasında önemli bir farklılık olmadığı ortaya çıkarılmıştır (9). Bu durum bikuninin üriner salınımdaki artışın karaciğerdeki üretimin artışından kaynaklanmadığına işaret etmektedir (9). O halde hiperokzaloürinin artışı ile bikuninin böbrekteki sentezinin artışı arasında ilişki vardır (9). Kalsiyum okzalata maruz kalan renal epitel hücreler bikunini artan kristal değişimine cevap olarak sentezlemektedirler (9).

İdrarda iki farklı bikuninin bulunduğu düşünülmektedir (36). Bunların kristalleşmeyi önleyici etkinlikleri ve moleküler ağırlıkları birbirinden farklıdır (36). İki bikunin arasındaki farklılık köken aldıkları dokudan kaynaklanmaktadır (36). Bu düşünceye göre; idrarda bulunan bikuninlerden biri karaciğer, diğeri böbrek kaynaklıdır (36). Aynı zamanda CaOx taşların matriksinde I α I ailesine ait H1 ve H2'ye de rastlanmıştır (36). Bu demek olur ki; normal koşullarda glomerular filtrasyonla idrara geçebilen I α I-ilişkili proteinler, böbrek tarafından da sentezlenip idrara salınabilmektedir (36).

Bikunin CaOx kristalleşmesini derişimine bağlı bir davranışla kuvvetle engeller (1). Bikunin derişimi sağlıklı bireylerle taş hastaları arasında dikkate değer bir farklılık göstermektedir (1). Proteinin derişimi üretilen miktarına bağlı olarak değişir (4). Taş hastalarında bikunin derişiminin normal bireylere oranla düşük olduğu tespit edilmiştir (4).

Sağlıklı bireylerde bikunin ve beraber sentezlendiği A1M'in üriner salınımlarında doğrusal bir ilişki vardır (1). Ancak taş hastalarında bu ilişki gözlenememektedir (1). Bikunin ve A1M'in üriner derişimlerindeki doğrusal ilişkinin ortadan kaybolma nedeni ve önemi net olarak bilinmemektedir (1).

Farklı bir çalışmada; canlı dışı ortamda okzalata maruz bırakılan renal epitel hücrelerde bikunin sentezinin arttığı görülmüştür (6). Artmış bir sentez ile üretilen bikunin, okzalat değişiminin zararlı etkilerine karşı verilmiş, renal epitel hücrelerin koruyucu bir cevabıdır (6). Fakat bu cevabın nasıl bir mekanizmayla oluştuğu hakkında bilgi yoktur (6).

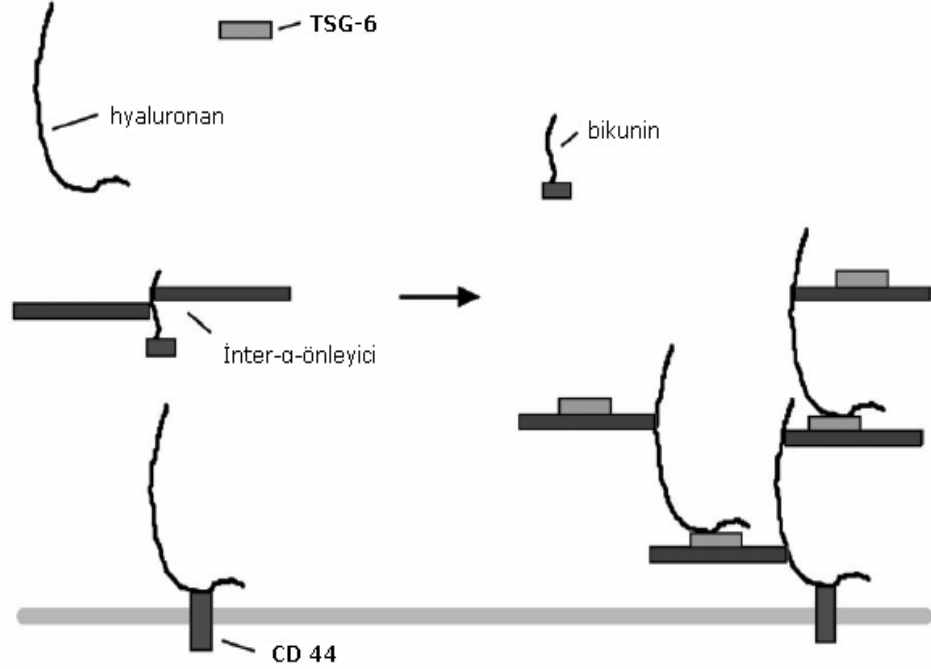
Bikunin karbonhidrat zincirlere sahip bir moleküldür (12). Ancak bikuninin CaOx taş oluşumunu önleyici etkinliği üzerinde karbonhidrat zincirlerin etkisinin olmadığı düşünülmektedir (15). Bilindiği gibi bikunin iki Kunitz tip bölgeye sahiptir (12). Bunlardan Kunitz bölge 2'nin (HI-8) varlığının CaOx kristallerini önlemede gerekli ve yeterli olduğuna inanılmaktadır (15,16).

Bikuninin CaOx'a bağlanarak kristalleşmenin önüne nasıl geçtiği hakkında farklı görüşler vardır. Bu etkiyi açıklayan birinci olası modele göre; bikunin Kunitz bölge 2 içinde pozitif yüklü bir gruba sahiptir ve elektrostatik bir etkiyle kalsiyumun kristallere bağlanmasını engellemektedir (5,15). Proteinin bağlanışı kristallerin etrafındaki elektrostatik yüzeyi değiştirmektedir (15). Protein molekülünün pozitif yüzeyi katyonları itmekte ve düşük Ca iyon derişimine neden olmaktadır (15). İkinci olası modele göre ise; bir önleyici proteinin CaOx kristallerine bağlanması kristalleri ve kristal matriks proteinlerini yapısal değişime sürüklemekte, böylece kalsiyumun bağlanma enerjisinde değişikliğe neden olmaktadır (15). Yani bikunin Ca iyonlarıyla etkileşime girerek kendi aralarındaki olası etkileşimin önüne geçmektedir (15). Sonuç olarak; kristallerin renal hücrelere tutunması engellenmiş olmaktadır (15).

Taş oluşumunun hastalık şeklinde gelişimi diğer patolojik mineralizasyon olaylarında olduğu gibi inflamasyonun önemli role sahip olduğu bir işleyiş olabilir (9). İnter-alfa-önleyici, TSG-6 (tumour necrosis factor-stimulated gene-6) tarafından etkin hale getirilen bir anti-inflamatuar ajandır (37). Tümör nekrozis faktör ve interlökin 1 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin düzenlemesiyle çeşitli hücre tiplerinden sentezlenen TSG-6, 35 kDa ağırlıklı bir proteindir (37). Tahriş olmuş doku; hyaluronan, TSG-6 ve $I\alpha I$ 'nın katılımıyla onarılır (37). Hyaluronan molekülüleri hücre yüzey reseptörü CD44'e bağlı veya serbest halde bulunurlar (Şekil 5) (37). İnter- α -önleyiciye dahil ağır zincirler bu hyaluronan molekülüne bağlanır (Şekil 5) (37). TSG-6 türü bilinmeyen bir bağla ağır zincirlere bağlanır (37). Hyaluronan ve TSG-6 kovalent olmayan bir etkileşimle bir arada tutulmaktadır (37). Ağır zincirlerin hyaluronan molekülüne bağlanması ile bikunin serbest kalmaktadır (Şekil 5) (37).

Böbrek taşına sahip bireyler ile sağlıklı kontrollerden alınan idrarlar üzerinde yapılan deneyler; taş hastalarının idrarlarındaki bikunin proteininin kontrollere oranla daha düşük önleyici etkinlik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (4). Etkinlikteki bu azalma, bikunin geni üzerinde meydana gelmiş ve protein yapısını etkilemiş olan bir değişmeden kaynaklanabilir (4). Bunun yanı sıra taş hastalarının idrarlarında normal bireylerdekinden daha düşük derişimde bikunin varlığı gözlenmiştir (4,12). Bikunin derişiminin düşük olması gen ifadesini düzenleyen özendirici bölge üzerinde meydana gelmiş olası bir farklılaşmaya

dikkat çekmektedir. Bikuninin idrardaki taşlaşmayı önleyici etkinliğindeki değişim bu çalışmanın çıkış noktasıdır. Genetik analizler ile bikunin yapısal gen bölgesi ve düzenleyici gen bölgesi incelenerek taş hastalarında gen çokyapılılığının (polimorfizm) araştırılması planlanmıştır.



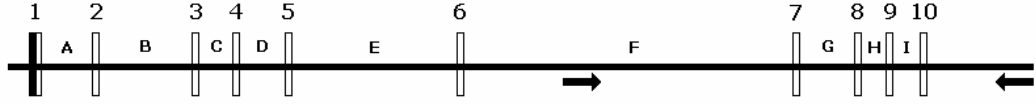
Şekil 5. IαI'nin inflamasyondaki rolü. IαI ve TSG-6 hücre dışı matris onarımında rol alır. IαI'nın ağır zincirleri, hücre yüzey reseptörü CD 44'e bağlı veya serbest halde bulunan hyaluronan moleküllerine kovalent olarak bağlanırlar. Bu esnada bikunin serbest kalır. Türü bilinmeyen bir bağla TSG-6 ağır zincirlere bağlanır ve TSG-6'nın ayrıca hyaluronana bağlanmasıyla dayanıklı bir yapı oluşur (37).

2.6. Bikunin Geni

Bikunin 9q.32-33 kromozomal bölgede yerleşik olan α 1-mikroglobulin/bikunin öncü geni AMBP (Alpha1-Mikroglobulin/Bikunin Precursor) tarafından sentezlenir (17,18,19,20). AMBP gen ürünlerinden α 1-mikroglobulin (A1M) ve bikunin birbiriyle yapısal ve işlevsel olarak herhangi bir ilişkiye sahip değildirler (17,18,19,20).

Gen toplam 1,3 kb büyüklüğünde 10 ekzon ve 16,5 kb büyüklükte 9 intron içermektedir (17,18,19,20). Bikunin mRNA'sı 7nci, 8inci, 9uncu ve 10uncu ekzonlar tarafından şifrelenmektedir (17,18,19,20). En büyük intron olan intron 6, 6.5 kb uzunlukta olup uyarı-ileti peptidi ve alfa1-mikroglobulini şifreleyen 1-6nci ekzonlar ile bağlayıcı peptid ve bikunini şifreleyen 7-10uncu ekzonları birbirinden ayırır (Şekil 6) (17,18,19,20).

Ekzon 7, alfa1-mikroglobulin ile bikunin arasındaki bağlantıyı sağlayan bağlayıcı peptid ve bikunin proteininin N ucunu; ekzon 8, Kunitz tip bölge 1'i; ekzon 9 Kunitz tip bölge 2'yi ve ekzon 10 da bikunin proteininin 10 amino asitten oluşan C ucunu şifrelemektedir (Şekil 6) (20).



Şekil 6. AMBP geninin şematik gösterimi. Ekzonlar rakamla, intronlar harfle gösterilmiştir. İki ok arasında kalan kısım bikunin gen bölgesidir (17).

AMBP genine ait ekzon ve intron büyüklükleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. AMBP Genine Ait Ekzon-İntron Büyüklükleri (19).

<i>Ekzon</i>		<i>İntron</i>	
No.	Bç	No.	Bç
1	249	1	1349
2	143	2	1561
3	77	3	806
4	117	4	1004
5	102	5	3100
6	47	6	6500
7	82	7	1085
8	168	8	325
9	174	9	652
10	144		

Alfa1-mikroglobulin ve bikunin kodlayan bölgeler arasında bulunan intron 6'nın diğer intronlara oranla oldukça büyük oluşu dikkat çekicidir (Tablo 2). İnsan, balık ve farede yapılan gen analizleri bu intron içinde A/Tce zengin bölgeler olduğunu ortaya koymuştur (17). Bu durum 6ncı intronun kararsız ve rekombinasyonel olaylar için sıcak bir bölge olduğuna işaret etmektedir (17,19).

İki gen bölgesinin evrimsel süreç içerisinde birleştikleri düşünülmektedir (17,19).

Alfa1-mikroglobulin ve bikunin aynı özendirici bölge üzerinden ifade edilirler (13,21). Transkripsiyonda rol alan çeşitli faktörler bu özendirici bölge üzerindeki kendilerine özgü çeşitli nükleotid dizilerine bağlanarak görev yaparlar (17,18,19,20). Yani bikunin gen bölgesinin 5' tarafında kendine özgün tipik bir özendirici bölgesi bulunmamaktadır (19,20). Ancak bikuninin ilk ekzonundan önce gelen intron 6 içinde CAAT dizisi ve TATA kutusuna eşdeğer, anlamlı ve karşıt anlamlı ipliklerde, sırasıyla, TATATAT (konum 15744) ve AATATAT (konum 15743) dizileri yer almaktadır (Şekil 7) (17,20). Ek olarak konum 5629'da poliadenilasyon bölgesine benzer A1M'e ait GATAAA dizisi bulunmaktadır (Şekil 7) (20). Bu durum iki genin birbirinden bağımsız atasal genler olduğunu düşündürmektedir (20). İki genin nasıl kaynaşmış olabileceği hakkında bilgi yoktur (20).

Transkripsiyonel faktör CTF'nin bağlanma bölgesi olarak bilinen CAAT kutusu, mRNA işlenmesi esnasında guanin kapağın takıldığı şapka (cap) bölgesinin 162 nükleotid 5' tarafında (konum -162) bulunmaktadır (Şekil 7) (20). Transkripsiyonel faktör SP1'in bağlanma bölgesi olan GC kutusu konum -207'de yer alırken Jun/Fos heterodimerinin bağlanma bölgesi konum -267'de yer almaktadır (Şekil 7) (20).

Nükleotid dizi analizleri gende en sık rastlanan cis etkili, transkripsiyonel faktör bağlanma bölgesinin glukokortikoid cevap elementleri olduğunu göstermiştir (Şekil 7) (17). Glukokortikoid cevap elementleri ayrıca 6ncı intron içerisinde de bulunmaktadır (Şekil 7) (17).

C TTA ATC CCG GTGAGTGCCTCATCCCCGACCCCATCCCACCCCATCCCACCCCACTCTGCCCAGGCACGCTGCACACTTGATCCTGCTCGGGGGGAGGCAGAGT..... 9065
e Ileu Pro

...(5.8kb).....TTTTTGTGTTTTTTGGATGCATGTCATCTTGAATTCAGGGAAGGTTAAGTGTCTCTGTTTCTACTGCCATCAACCTGAATTCAGGAAGATCCAGAAT 14970
 ATCTCCCATTTAGTAAGGGTATTTCTTCACTCCCAACCAATTTCTGGCAGCTGCAGATTTAACTGTGCCAGGATTTTATCCATTTCTATCTCTATCAAGGAAGCCTATATGCCAC 15090
 CAGCTTAAGACTGGTCTGGAAGCAATGAAAGCCCTGACAGTTTTCACAGTGTGTTTGTGCCCTGAAAGAGAGATGGGAAATTTGAGATTACTACAGCTACCTTCTCAAGTCCAGG 15210
 TCTCAGCTGTGGGAGGGGCTGCTCATCTTCTATAATAGCCCTGGGATCCTGCCTCAGGACTCTACACCCAGAGGCCCTCTTGGCAGCTTTGGCAGCTGCCTGCTGAGCCCA 15330
 CCACCACGCAAGGAGTAGGATCAGTTTCAGGGTCCCTTCTTCTCTGATTTTTTTTTTCTGCAAGCAGCTAATGATGATCTGGTCAGCCCTCTCTGTAACAGCTGACCT 15450
 GTGCTGTGTTGTGCAACAATGCCCTTACATCTTTAGTGTAGGGGCTGCTCTCCCTGGTTCCTCAACTCTGGGAGGTACCTTTTCATTACTATATCTTCTTAGGCACTTCACTGGGAG 15570
 TTGGATATGGGGCTATTGTCATACCTCATGTTTAAATTTCAATTCAGACCAGAAATCTGCTCTGATGCCCTGTCAGGAATTCAGGTGACAGTTTGTCCCACTCTCTTTAAAC 15690
 AGTCTAAGAGCTGTGTTCTTACCTACCTGATTCCTCAAGCAAGTGTTCATTTATATATTTCCAGGGGTACAGGAAGCAATAGCGGCAAGGAGTGCACACTGCTCTCTCTTTCTCT 15810

CCCCCGCAG AGA GTC CGG AGG GCT GTG CTA CCC CAA GAA GAG GAA GGA TCA GGG GGT GGG CAA CTG GTA ACT GAA GTC ACC AAG AAA GAA G 15901
 Ekzon 7 Arg Val Arg Arg Ala Val Leu Pro Gln Glu Glu Glu Gly Ser Gly Gly Gly Gln Leu Val Thr Glu Val Thr Lys Lys Glu A

GTAATGAACACCTGCCCTTTTCAACCCCTCTGCCACTCTCAGAAAGGAAGGGCCACAGTTGGCTCACCTGGCTACTCTTATCAGTGCAGTCTTTTATCTGTTAGAGCTCAAGGGCT 16021
 GGACTGAGAAAAGCAATCAAGTACTCTGCATCTGCCAGGGGTGTGGGGGCAGAGAGAAGAGCTAGAGGATCGTCTGGGCTTGAGAAGTGCACCTGATGAGAAGCTGGTT 16141
 CTGCCCCTGTCTATGACTGTGGCTCCTAGCTTGGTTTCTCTCATCCATATTATGGGAATAAGCCTGTGGGCTAAACATCAGGGCTCTGTAGGAGGAAGTCGGGAGGGACA 16261
 TGTGAATGCTTTGTGTAGTGCAGTGCATGACATAACACTTCTCTCCAACCTGATCAGCAAAACAACTGAACCTCGTCCGCCAGGGCTGTGCTGGGCACTAGGGTCA 16381
 CAGACCCTGTGTCTATTTTGAAGCTTCTGTCTAGTGGGAAGGATCCAAGGAGTAGGTGATGGGCCCAAGGAAGGGTACAGTAAAGGGCAGGGGAGCTGAGACGTTGGAGGGG 16501
 TGAGGGATCAGGAGGACTCATGGATAAAGGGGAATTCACACTGTGTCAGGATCCAGGTAAGTTTATGGAGGTGGCATTCAGGAGCAAGGAACAATGGGAGCAAGGCAAGG 16621
 TGGGTGGGACTTGTGTAAGGTCAGGCTGGCCAGTGTGGTGTGATACATGTCACTACTATTACAGAGTTTGGGCAAGGCAAGCAATACAGGGGACAGTGGGCTGTG 16741
 GTTCACTGTAACCTCCCATGACATGGGAGTGAATGGGCTATTGGTTTGGAGACAGGGTTTGAATCTTAGCTCTATGTACCCGGCCAGGTACTTACCCCTCTCTGAGAGTCAGTT 16861
 GCTTATCGAAAAAGAAATGATAATCCTTTTAGTGAATAATAGATGGGCATATCAAGTGCCAGCCTGATAATGGGTACAGCTCAACACTTGGTCAGTGTCTGTCTGCCCC 16981

TCCCTAG AT TCC TGC CAG CTG GGC TAC TCG GCC GGT CCC TGC ATG GGA ATG ACC AGC AGG TAT TTC TAT AAT GGT ACA TCC ATG GCC TGT G 17072
 Ekzon 8 sp Ser Cys Gln Leu Gly Tyr Ser Ala Gly Pro Cys Met Gly Met Thr Ser Arg Tyr Phe Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Cys G

AG ACT TTC CAG TAC GGC GGC TGC ATG GGC AAC GGT AAC AAC TTC GTC ACA GAA AAG GAG TGT CTG CAG ACC TGC CGA ACT GTG G GTGAGTG 17163
 lu Thr Phe Gln Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr Glu Lys Glu Cys Leu Gln Thr Cys Arg Thr Val A

CGGGTCCCCACCCCTGTGGCTCTGCACCTCAAGACCTGTCCCTCCAGTAACACCTGCAATTTGAAAGGTAGCTAACAGAGGGCATTCCAGTGGTAGAAGTCCAGGGGTTTCT 17283
 GAAATCTTAGGAATTCACCTTTGGATGTGGAGGACCTCGGCAATCATTTCTCTCTGGGCCAGGTTTCCCATCTGTCACAGAGGGATGAGGTGTTCTAGATGAGCAGGGCCCT 17403

CTGGCTCAGCAGTCTCATGTATGTCTGATCAGCAGTCACAAGGTTTCTCAAGTTCATGCTCTCTCCACTCCACAG CG GCC TGC AAT CTC CCC ATA GTC CGG GGC CC 17512
 Ekzon 9 la Ala Cys Asn Leu Pro Ile Val Arg Gly Pr

C TGC CGA GCC TTC ATC CAG CTC TGG GCA TTT GAT GCT GTC AAG GGG AAG TGC GTC CTC TTC CCC TAC GGG GGC TGC CAG GGC AAC GGG AA 17602
 o Cys Arg Ala Phe Ile Gln Leu Trp Ala Phe Asp Ala Val Lys Gly Lys Cys Val Leu Phe Pro Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Gly As

C AAG TTC TAC TCA GAG AAG GAG TGC AGA GAG TAC TGC GGT GTC CCT GGT GAT G GTAGGCAGCTGCAGGGTGCCAGGCTGGCCAGGGGCTGTTGGAGTCG 17703
 n Lys Phe Tyr Ser Glu Lys Glu Cys Arg Glu Tyr Cys Gly Val Pro Gly Asp G

AGGTGGGAGAGCCCTGGGAGGATAGGGGCTGGAGAGCTGAGTTCTGGACTCTGTACTGTAAGCAGCCATCTACTCTGAAATGGGGCTGAGCCTGGGGCTTACCCAGCTGGA 17823
 ATTGGGCTTGGGAGTATTAGCCAGGCACTGGCAGAGGGTATGAGGGCTGACTGAGGAGTGGGCGAGAGCTGGGTCTAATTTTGCACTGCAAGCTTGAGCAAGTGCATCTGAG 17943
 TGTCAATTTCTCTGTGAAATGGGACAAAGCACTGCCCTCCAGCCTTCCAGTACCTGACGGGAGTTAGTACTCAGTAACAGCACTGCTCTAATAATAACAGCAAGTACAT 18063
 GGTAAACAGTATAGCATTCAGGGAAGCAACCAATGAAGATGTCTGCTGATTTTCCACTGGAAATGGCACCTGCGGTAACCAAGAGGAAAAAATATCTGATCATTTCA 18183
 TGGAAATACCTTTGGAGATAAATGTTTCAGCAAGCAGAGGTTTCTGGCCCAAGTGACAGCTGCTTCCCTTCCCTGAGTGTCCCTGCTACGAGCCCTTCCCTGAGTCTCTGTGTGC 18303

Ekzon 10
 ACAG GT GAT GAG GAG CTG CTG CGC TTC TCC AAC TGA CAACTGGCCGGTCTGCAAGTCAGAGGATGGCCAGTGTCTGTCCCGGGTCTGTGGCAGGCAGGCCAAGCA 18411
 ly Asp Glu Glu Leu Leu Arg Phe Ser Asn

ACCTGGGTCAAATAAACTAAATGTAACCTCTGAAA TTCTGTGCTCTCATTGTTTCATGTATCACAAGTGAACAAAGGTTGGCGAGGGGAGAAAAAGCCAGGGTGGGGCC 18530

ATATGCAACCCAGCTTTCCCAAGAGTGAAGCAATATAGAATCTTTCAGTACATGACGTTGGCTATGCAATTTTGAACAAATCAAAGTCTATTACAATAG 18650
 TGTAAAATGGGATTTTGTGTTGTTAATAGGCTAGGAAGAAAGGAAGACACTCTGGGACTGTCTCTGGGAGGTTTGGTGGTCATCAGTGACCCAGGCTCAGAAGAAATGA 18770
 TTGATTTGCCCTGCTGTGCCAAGGAGCTCAGGGCAGACAGCCCAAAATGCCGAAATAATTTCCCTGTCTTGTGTACAAAACATCTCCCAAGGTTTACTTCAGCTGCAGCA 18890
 TATCCCAAGAACAGCTGACCGAGCTGGAAGCCTTCACTGTTTCTGATGGCCCTGGGAGCCATCCCTGGGACCTTCCCTGGGCTTGTCTGGAAGGAGAGTCTCACT 19010
 GGGCTTACATTTGTGTCAGTGAAGTCTGGGCTGGCCAGGCAAGCCCTGATTGGGCTGGCTTCTCCTCACCTTGGGAAGGGAGTAGTGGCTGTCTAGAGCAGCTCAG 19130
 GACAACCTTGGCCAAAGAACAACTCCAGGATCTCCAGTGTAGACACAGGCTTTACAACGCTGATTTATAAATATCTTGTCTAAGTGCATCCACCAAGCCCGATGGCTGC 19250
 TGTGGCTGTGGAGGATTGGAGGCCAGCTTTGTGTCTGAAGTGGAGAGCTGACGCTGGCAGAAGAACCCAGGAGGGCCCTACCTCTCTCTGTGGTGACCAAGCTCCTA 19370
 AGGGCCGGTGTGATGTCAGTCTGGGTTGGCCCTTGGCCCTTGTGCTTGTGGTGGAGGACAGGCAAGGAGGAGGATTCATCTTCTGTTGAGGGATGAACCTGGAG 19490
 ACAAGGATTTGAGGATTGAAGCTTTGAGTCCCTGGGTGAGACATCAAGACCTCCCTTGTCTCCCAACATCCAAAGTGTGGGCTTACAGGTTCCAACAGAGAGAGTCCCC 19610
 TGAGGGACAGCATCTGTGGTCAAGGCTGGACTTTCTGGGCAAGCAGGTGGGTCAGGTGACGGGAGACAGGCAATTTGTCAGGAGAGTGAAGCTCCGGCTGGGACTAACAAG 19730
 GTCTTCCCATCTGTGTGTCACATCTGTTTCTTCCACAGTGCCTCCATACAGGGCCAGGCAAGGAGTTTGAAGGGCCATGTTGAAGAGTGATATTTGAAGTGACTTGAAC 19850
 TGAAGAGAAAATGTTAAATTTGAGGGGTGAGCTGACAGGTGTACAGCCAGCTTCACTGGTGAAGGAAACGTTGCTCAGGAGTATTTTAAATTTTATTTTGTGAGACAAG 19970
 GTCTCGCTCTGTACCCAGGCTGAGTGCAGTGCATGATCTTGGCTCCCTGAATCCTTGTCTTCTGGGCTCAAGCATCTCCCACTCGGCTCTGAGTGTGGGACTACAGGCG 20090
 CGTGCCACCATGCTGGCTAATTTTGTATTTTGTGTTGAGAGGGGTTTACCATTGTGCTGGGCTGTGTTGAATCTGAGCTTAAGCGATCCTCCATCTTGGCTTACAAG 20210
 TCTTGGGATTACAGACATGAGCCACAGCCTGGCCGAGGTATTTTTCACAGCTCT 20267

Şekil 7. AMBP gen dizini. TATA ve CAT kutuları kutu içerisinde görülmektedir. AP-1 bölgesi ve SP1 bağlanma bölgesinin altı tek çizgi ile glukokortikoid reseptör bağlanma bölgesinin ise çift çizgi ile çizilmiştir. Üç yıldız işareti transkripsiyon dur kodonunu göstermektedir. Doğrudan tekrarlar kesik çizgilerle, ters dönmüş tekrarlar ise dalgalı çizgilerle gösterilmiştir (20).

Genin tüm ekzon-intron birleşim noktaları GT (3' verici) - AG (5' alıcı) kuralına uyumludur (17,19,20). İntron ayıklanma bölgeleri ve intron fazları da Tablo 3'te görüldüğü gibidir. Bikunin ve α 1-mikroglobulini birbirinden ayıran 6ncı intronun faz 0 bir intron oluşu dikkat çekicidir (Tablo 3) (12). İntron fazları 0, 1 ve 2 olmak üzere 3 tiptir (38). Her bir ekzon içinde üçlü nükleotit gruplarının oluşturduğu çeşitli sayıda kodonlar vardır (38). Ekzon bitip intron başlarken kodon yarım kalır ve devamı bir sonraki ekzonla tamamlanırsa o kodonun geride bıraktığı nükleotit sayısı intron fazı numarasını tanımlar (38). Faz 0 intron iki ekzonun bir kodonu paylaşmadığı anlamına gelir (Tablo 3) (38). Alfa1-mikroglobulin bikunin öncü geninde iki geni ayıran intron 6, genin diğer intronlarından farklı olarak faz 0 bir introndur (Tablo 3) (19).

Tablo 2. AMBP genine ait intron ayıklanma bölgeleri ve intron fazları (19).

<i>Ekzon</i>	<i>İntron</i>	<i>Ekzon</i>	<i>İntron Fazı</i>
1 TCTGG	GT...1... AG	ATC TAT 2	0
2 TGG G	GT...2...AG	G AAA 3	2
3 TCC A	GT...3...AG	AA TGG 4	1
4 TAC G	GT...4...AG	GG CGG 5	1
5 CGAG	GT...5...AG	GT GAA 6	1
6 ATCCCG	GT...6...AG	AGA GTC7	0
7 GAA G	GT...7...AG	AT TCC 8	1
8 GTG G	GT...8...AG	CG GCC 9	1
9 GAT G	GT...9...AG	GT GAT 10	1

Bilgisayar analizleri gen içinde pek çok tekrar dizilerinin olduğunu ortaya çıkarmıştır (20). Ekzon 1'de (konum 98-124), ekzon 2'de (konum 1572-1599) ve bikunini kodlayan ekzonlardan ekzon 8 (konum 17078-17133) ve ekzon 9 içinde (konum 17571-17626) tekrar dizilerine rastlanmaktadır (Şekil 7) (20). Doğrudan tekrarlar ayrıca kodlayıcı olmayan dizi içerisinde de görülür (Şekil 7) (20). Genin 5' kodlanmayan bölgesinde (konum -685/-652 ve -385/-356) ve 7nci intron içerisinde (konum 16372-16397, konum 16936-16963) tekrar dizileri bulunmaktadır (20). Benzer diziler birinci, üçüncü, dördüncü, altıncı ve sekizinci intronlarda ve yapısal gen bölgesinin 3' tarafında da görülmektedir (20). Ayrıca DNA içine dağılmış olarak bulunan Alu ailesine mensup tekrar dizileri bikunini kodlayan gen bölgesinin her iki tarafında yer almaktadır. İlk Alu tip tekrar dizisi

intron 6 içinde, ekzon 6'dan 2,2 kbç ilerisinde olup Alu uyuşum dizileriyle %88 benzerliğe sahiptir (20). İkinci Alu üyesi dizi ise bikunin geninin 3' ucunda ve karşıt iplikte (konum 19956-20246) yer alıp %82 benzerlik göstermektedir (20). Ayrıca intron 4 içinde de Alu tekrarlar görülmektedir (19). Bikunin geni içinde yer alan Alu elementlerinin biyolojik rolünün ne olduğu henüz açıklığa kavuşmuş değildir (19). Alu elementlerinin içerdiği GGAGGC dizili kısa motif rekombinasyon için sıcak bir bölgedir ve Alu dizileri yoluyla rekombinasyonun bu bütünleşik genin oluşumundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (17,19).

Ekzon 8 ve 9 içinde bulunan tekrar dizileri korunmuş amino asit dizilerini oluşturmaktadır (20). Bu diziler sırasıyla FQYGGCMGNGNMFVTEKEC ve FPYGGCQGNNGKFYSEKEC'dir (20). Altı çizilmiş olan amino asitler iki dizi arasında uyuşmayan amino asitlerdir (20). Bu diziler her iki reaktif bölgenin de 17 amino asit aşağı 3' tarafındadır ve proteaz önleyici (inhibitor) bölgenin kararlılığında görevli olduğu düşünülmektedir (20).

Ortak bir özendirici bölge (promoter) tarafından sentezlenmelerine rağmen bu iki protein fizyolojik ve yapısal olarak tamamen birbirinden bağımsız iki aileye mensupturlar (17,18,19,20). Sentez aşamasından hemen sonra golgi aygıtında kesilerek ayrılan proteinlerden α 1-mikroglobulin lipocalin ailesine dahil olurken bikunin serbest halde bulunabildiği gibi inter- α -önleyici (I α I: Inter-alpha-Inhibitor) ailesi içinde de görev alır (4,10).

Alfa1-mikroglobulin 31 kDa ağırlığında olup 183 amino asitten, 35 kDa ağırlığındaki bikunin ise 147 amino asitten oluşmaktadır (19). Birlikte sentezlenmiş olan birincil translasyon ürününün olgunlaşması sırasında golgi aygıtında proteolitik işlem gerçekleşir. Bu esnada yalnızca α 1-mikroglobulin ve bikuninin birbirinden ayrılmasını sağlayacak sinyal peptidden değil daha içerlek olan Arg-183 ve Arg-186 bölgelerinden de kesim yapılır (19). Dolayısıyla son üründe 184-186ncı amino asitler kaybedilmiştir (16). A1M ve bikunin cDNA'ları, 9 nükleotid uzunlukta bir dizi ile bağlıdır (14). Bu 9 nükleotidlik dizi bir tripeptidi (X-K/R-R) şifrelemektedir (14). Tripeptit, A1M'in uç arjinin amino asiti ile, golgi aygıtında iki proteinin kesimini gerçekleştirecek olan furin benzeri enzimin tanıma bölgesi olan tetrapeptidi (R-X-K/R-R) oluşturur (13,14).

Her iki protein de kendi yolunu çizmek üzere hücreden taşınmadan önce glikolizasyona uğrar (14) .

Alfa1-mikroglobulin/bikunin öncü geni esas olarak karaciğerde, A1M (α 1-mikroglobulin)'e özgü cis etkili elementler ve transkripsiyon faktörlerinin düzenlemesiyle ifade edilir (21).

Olgun α 1-mikroglobulin ve bikunin proteinleri serum ve idrarda bulunabilirler (5,6,9). Bikunin geninin böbrek hücreleri tarafından da yüksek

miktarda ifade edildiği yapılan çalışmalar neticesinde ortaya çıkarılmıştır (1,2,4-7,9-11,15,23,32,36,39-41).

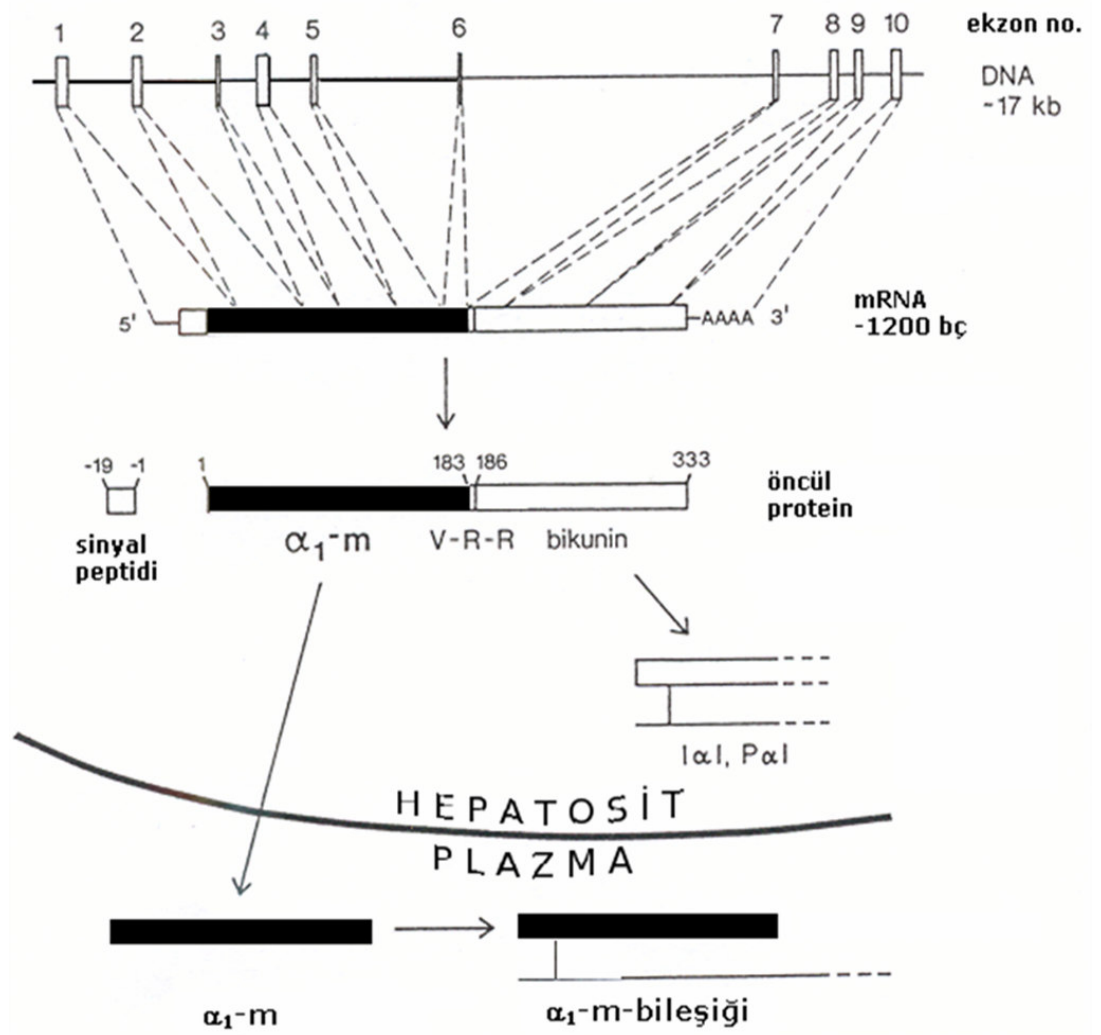
Bikunin geninin, çokyapılılık (polimorfizm) yönünden, tümüyle veya kısmen analiz edildiği bir çalışma mevcut olmayıp tüm genin (yapısal ve düzenleyici gen bölgeleri dahil olmak üzere) incelendiği ilk moleküler çalışma bu tezde tarafımızca gerçekleştirilmiştir.

2.7. Bikunin Gen İfadesinin Düzenlenmesi

Bikunin geni 9q.32-33 kromozomal bölgede α 1-mikroglobulin ile birlikte AMBP geninden aynı düzenleyici bölge üzerinden sentezlenir (11,13,17,18,19,20,21). Alfa1-mikroglobulin/bikunin öncü geninin esas olarak sentezlendiği ve ilk tespit edildiği organ karaciğerdir (21). Ancak; böbrek, testis, kalp, pankreas, adrenal bez, akciğer, uterus, beyin gibi pek çok dokuda sentez edildiği sonraları ortaya çıkarılmıştır (14). Bikuninin farklı dokularda, farklı durumlarda üretilmesi düzenleyici bir protein olduğunu ve değişik fizyolojik rollere sahip olduğunu göstermektedir (14). Kanseri, inflamasyon, taş oluşumu gibi patolojik durumlarda gösterdiği etki, genin ifadesindeki dolayısıyla protein üretimindeki artış neticesinde gerçekleşmektedir (12,37).

Bikunin ve α 1-mikroglobulin tek bir mRNA olarak sentezlenirler (Şekil 8) (39). Gene ait özendirici bölge, genin α 1-m'i kodlayan ilk ekzonunun 5' tarafında yer almaktadır (Şekil 8) (17,18,19,20). Bikunin ve α 1-mikroglobulini ayıran intron 6 içerisinde de özendirici bölge elemanlarına rastlanmaktadır (Şekil 8) (19,20). Fakat bu bölgenin rekombinasyonel olaylara açık olduğu ve bu sayede değiştiği, dolayısıyla iki genin evrimsel süreçte kaynaştığı düşünülmektedir (17,18,19,20).

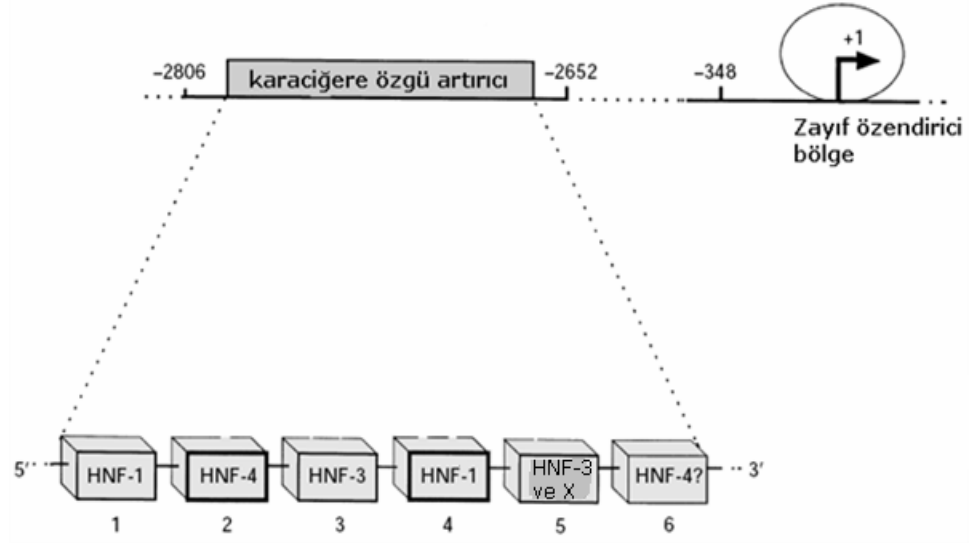
Tek gen ürünü iki proteine ait mRNA işlendikten sonra polipeptitin sentezi tamamlanır (Şekil 8) (16). Üretilen polipeptit golgi aygıtında henüz tanımlanamamış furin benzeri enzim ile kesilir ve ayrılır (14).



Şekil 8. AMBP geni ve ifadesinin şematik gösterimi. AMBP geni 10 ekzondan oluşur. İlk 6 ekzon alfa1-mikroglobulini, kalan 4 ekzon bikunini kodlar. İki ayrı genin ürünleri olan proteinler V-R-R (valin, arjinin, arjinin) amino asitleri ile birbirlerinden ayrılırlar. Bikunin I α I veya P α I'ya dahil olurken, alfa1-mikroglobulin diğer plazma proteinleriyle kovalent olarak bağlanır (33).

Alfa1-mikroglobulin/bikunin öncü geninin ifadesi karaciğere özgün hepatosit nükleer faktör olarak bilinen trans-etkili 3 farklı transkripsiyon faktörü (HNF 1-4) ile düzenlenir (Şekil 9) (21,27). Bu faktörler karaciğerde farklı pek çok genin ifadesinde rol sahibidirler (13). Alfa1-mikroglobulin/bikunin öncü geni özendirici gen bölgesinin -2600 ile -2800 konumları arasında kalan kısım karaciğere özgün artırıcı (enhancer) bölgedir (21). Hepatosit çekirdek faktörleri (HNF) bu bölgeye bağlanarak gen ifadesinde artışa neden olurlar (Şekil 9) (21). Artırıcı bölge içinde 5'-3' yönünde HNF'lerin bağlandığı 6 cis-etkili eleman (kutu 1-6) bulunmaktadır (Şekil 9) (21). Hepatosit çekirdek faktörleri bu işlevsel bağlanma bölgelerine HNF-1, HNF-4, HNF-3, HNF-1, HNF-3, HNF-4 sırasını oluşturacak şekilde bağlanırlar (Şekil 9) (21). Bu grup, özendirici etkinliği

konum ve uzaklıktan bağımsız bir davranışla artırmaktadır (21). Alfa1-mikroglobulin/bikunin öncü geninin ifadesi zayıf bir özendirici bölge, kuvvetli bir artırıcı ile düzenlenmektedir (Şekil 9) (21).



Şekil 9. AMBP geni özendirici bölgesinde konum -2600/-2800'de artırıcı bölge yer almaktadır. Hepatosit çekirdek faktörleri artırıcı bölge üzerine görülen sıra ile bağlanırlar ve gen ifadesinin artışında rol alırlar. Koyu renkli ok ile gösterilen bölge transkripsiyon başlangıç bölgesidir (13).

Daha önce değinildiği gibi; böbrek epitel hücrelerinde, CaOx kristallerine cevap olarak, bikunin üretimi tetiklenmektedir (7,9).

Yapılan canlı dışı çalışmalarda, okzalit ve kalsiyum okzalit kristallerine maruz bırakılan renal epitel hücrelerde ifade edilen genler araştırılmıştır (6,44). Kalsiyum okzalit kristalleri üç sınıf proteinin ifadesinde değişikliğe neden olmaktadır. Bunlar; gen ifadesini etkinleştirenler (transkripsiyonel aktivatörler), hücre dışı matriks düzenleyicileri ve büyüme faktörleridir (44).

Kalsiyum okzalit kristalleri hücrelere hasar vermektedirler (44). Hücre hasarının ardından c-fos, c-jun, Nur-77 ve c-myc gibi erken cevap genlerinin ifadesi gerçekleşmektedir (6,44). Jun/Fos heterodimeri çeşitli genlerin özendirici bölgesine bağlanarak gen ifadesini etkinleştiren bir moleküldür (45). Alfa1-mikroglobulin/bikunin öncü geninin özendirici bölgesi üzerinde Jun/Fos heterodimerinin bağlanma bölgesi mevcuttur. TGACTCA dizisinden oluşan bölgenin AMBP geni üzerinde varlığı tarafımızca bilgisayar analizi sonucu tespit edilmiş ve bu bölge çalışmaya dahil edilmiştir.

Alfa1-mikroglobulin/bikunin öncü geni özendirici bölgesi içerisinde; transkripsiyon faktörlerinin bağlanarak gen ifadesini başlattığı bölge, karaciğere özgün artırıcı bölge ve rekombinasyona sebebiyet vermelerinden dolayı iki Alu dizisi çalışmanın kapsamına dahil edilmişlerdir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Grupların oluşturulması ve kan örneklerinin eldesi

Bu çalışmada; klinik olarak CaOx taşı oluşturduğu tespit edilmiş, yaş ortalaması 25,24 ($\pm 17,1$) olan 110 hasta birey ile böbrek taşı rahatsızlığı olmayan, yaş ortalaması 18,8 ($\pm 1,05$) olan 101 sağlıklı bireyden alınan kanlar kullanıldı. Hasta bireylerin 75'i ailesel böbrek taşı hikayesine sahip iken 35'i ailesel bir taş hikayesi olmayan kendiliğinden taş oluşumu gösteren kişilerdir.

Her üç gruptaki bireylerden, DNA eldesi için kullanılmak üzere EDTA'lı tüpe 5'er mL kan alındı. EDTA'lı tüplere alınan kanlar DNA eldesine kadar geçen süre içerisinde -20 °C'de saklandı.

3.2. Taş Hastalarında Yapılan Radyolojik Taramalar

Üroloji kliniği tarafından çalışmaya dahil edilen böbrek taşı hastalarında radyolojik taramalar gerçekleştirilmiştir. Ailesel böbrek taşı hikayesi olan iki bireyde ve kendiliğinden taş oluşumu gösteren iki bireyde üriner sistem anatomisinde bozukluğa rastlanmıştır. Bunlar; üreterosel, üreteropelvik darlık ve at nalı böbrek anomalileridir. Bu tanılar; hasta bireylerin üriner sistemlerinin, intravenöz pyelografi ve ardından diüretik renogram ve sistoskopi tetkikleri ile incelenmesi neticesinde konulmuştur.

3.3. Gereçler

Santrifüj (Eppendorf, Hamburg, Almanya), mikropipet (Eppendorf, Hamburg, Almanya), derin dondurucu (Bosch, İstanbul, Türkiye), manyetik karıştırıcı (Velp, Scientifica, İtalya), vorteks (Nüve, İstanbul, Türkiye), biyolojik emniyet kabini (Bilser, İstanbul, Türkiye), inkübatör (Uniequip, Martinsried, Almanya), düşük basınçlı kurutucu (El yapımı), mikrosantrifüj (Eppendorf, Hamburg, Almanya), PCR aleti (MJ research, Boston, Amerika), güç kaynağı (Bio Rad, Kaliforniya, Amerika), mikrodalga fırın (Arçelik, İstanbul, Türkiye), elektroforez tankı (EC apparatus, New York, Amerika), elektroforez tankı (Hoefer, San Fransisko, Amerika), hassas terazi (Shimadzu, Kyoto, Japonya)

3.3.1. Kimyasal maddeler

NaCl (Merck, Darmstadt, Almanya), KCl (Merck, Darmstadt, Almanya), Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Almanya), Üre (Merck, Darmstadt, Almanya), Proteinaz K (Sigma, St Louis, Amerika), sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma, St Louis, Amerika), Etil alkol (Tekel, İstanbul, Türkiye), mono bazik sodyum fosfat (NaHPO₄) (Merck, Darmstadt, Almanya), Tris-HCl (Merck, Darmstadt, Almanya), Kloroform (Merck, Darmstadt, Almanya), Akrilamid (Sigma, St Louis, Amerika; Applichem, Darmstadt, Almanya), Bisakrilamid (Sigma, St Louis, Amerika; Applichem, Darmstadt, Almanya), Amonyum persülfat (Sigma, St Louis, Amerika), Asetik asit (Carlo Erba, Nord, İtalya), Agaroz (Prona, Madrid, İspanya), EDTA (Merck, Darmstadt, Almanya), Formaldehit (Sigma, St Louis, Amerika), Sigma cote (Sigma, St Louis, Amerika), Borik asit (Carlo Erba, Nord, İtalya), dNTP (Fermentas, Vilnius, Litvanya), Taq DNA polimeraz (Fermentas, Vilnius, Litvanya), Binding Silane (Promega, Mannheim, Almanya), 10X Amonyum sülfatlı PCR tamponu (Fermentas, Vilnius, Litvanya), Na₂CO₃ (Merck, Darmstadt, Almanya), Sodyum tiyosülfat (Merck, Darmstadt, Almanya), MgCl₂ (Fermentas, Vilnius, Litvanya), TEMED (Sigma, St Louis, Amerika), Ksilen Siyanol (Sigma, St Louis, Amerika), Bromofenol Mavisi (Merck, Darmstadt, Almanya).

3.3.2. Çözeltiler

10X TBE (108 g tris, 55 g borik asit, 8,3 EDTA), parçalama çözeltisi (300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl), üreli parçalama çözeltisi (4,2 g üre, 10 mL su, 1 mL parçalama çözeltisi), 49:1 %50'lik akrilamid çözeltisi (49 g akrilamid, 1 g bisakrilamid, 50 mL saf su), SSCP yükleme tamponu (8 mL formamid, 2 mL saf su, 0,025 g bromofenol mavisi, 0,025 g ksilen siyanol), gümüş nitrat çözeltisi (2 g gümüş nitrat, 2,5 mL %37'lik formaldehit, 2 litre saf su), sodyum karbonat çözeltisi (60 g sodyum karbonat, 420 µl 10 mg/mL sodyum tiyosülfat, 2 L saf su) (46).

3.4 DNA Eldesi

I. gün

EDTA'lı tüpe alınan kanların oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra üzerlerine hacimleri kadar saf su eklendi. İyice altüst edildikten sonra 4000 devir/dakika'da 20 dakika santrifüj edildi ve üstteki sıvı kısım atıldı. Bu işlem üç

kez tekrar edildi. Üçüncü santrifüjün ardından, atılan sıvı kısmın yerine her bir tüpe 3 mL üreli parçalama çözeltisi eklendi ve çökeleğin iyice çözünmesi sağlandı. Ardından 400 µL %20'lik SDS ve 100 µL 10mg/mL proteinaz K eklenerek 37 °C'de 1 gece için inkübasyona bırakıldı (46).

II. gün

İnkübasyondan çıkarılan örnekler 2 mL 5M NaCl eklendi ve 10-15 dakika altüst edildi. Ardından, üzerlerine 8 mL kloroform konularak 4000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan 3 kısımdan üstteki kısım temiz bir tüpe alınarak, üzerine hacmi kadar soğuk %96'lık etil alkol eklendi. Alkol ilavesi ile çöken DNA'lar pipet ucu ile 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne alınarak üzerlerine 1000 µL %70'lik etil alkol eklendi. Tüpler 13000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edilerek DNA'ların tüpün dibine yapışması sağlandı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. En son santrifüj işleminden sonra, alkol dikkatli bir şekilde döküldü. Tüplerin dibine yapışması sağlanan DNA'lar vakumlu kurutucuda yarım saat bekletildi ve üzerlerine gerekli miktarlarda deiyonize steril su eklendi. Bir gün +4°C'de bekletilerek çözünmesi sağlanan DNA'lar saklanmak üzere -20°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı (46).

3.5. DNA analiz yöntemi

Bu çalışmada DNA analizi için kullanılan PCR (Polymerase Chain Reaction) tekniği, ilgilenilen gen bölgesinin canlı dışı ortamda çoğaltılmasına dayanan, pratikliği ve güvenilirliği ile günümüzde moleküler biyolojik çalışmalarda en sık kullanılan tekniklerden biridir (47).

Bikunin yapısal ve özendirici (promoter) gen bölgelerinin çoğaltılması işlemi in-house türü MJ Research PTC-200 PCR cihazı ile yapıldı. PCR tepkimesi için gerekli karışımların tümü otoklavlanmış malzemeler kullanılarak steril kabinde hazırlandı.

3.5.1. Primer tasarımı ve kullanılan primerler

Bu tezde kullanılan primerleri tasarlamak maksadıyla referans dizilim olarak NCBI veritabanındaki; bikunin yapısal gen bölgesi için NT_08470.17 kontig numaralı bölge içerisindeki gi:51467683 numaralı dizilim, özendirici gen bölgesi için ise X_67082.1 erişim numaralı bölge içerisindeki gi:28673 no'lu dizilim esas alındı. Bikunin geni ve özendirici gen bölgesine ait primerler <http://workbench.sdsc.edu> adresindeki online primer tasarım programı

kullanılarak tasarlandı. Bu çalışmada bikunin yapısal gen bölgesine ait 4, bikunin özendirici gen bölgesine ait ise 5 çift primer takımı kullanıldı (Tablo 4, 5).

Tablo 3. Bikunin yapısal gen bölgesine ait kullanılan primerler ve PCR ürünü büyüklükleri.

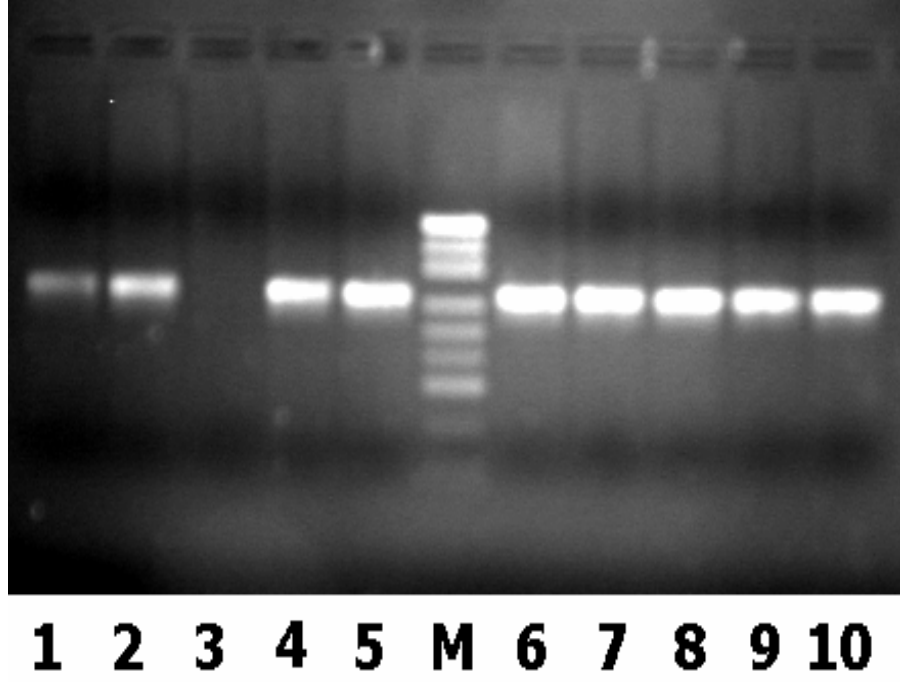
	5' → 3'
Ekzon 1	307 bç
Bkn1-F	CAGAAATCTGTCCTCTGATGC
Bkn1-R	GGGTGAAAAGGCAGGTGTT
Ekzon 2	277 bç
Bkn2-F	ACACTTGGTCAGTGCTGCTG
Bkn2-R	ATTCGCAGGTGGTTTACTGG
Ekzon 3	255 bç
Bkn3-F	ATGCCTCTCTCCACTCCACA
Bkn3-R	TCTCCACCTCGACTCCAAC
Ekzon 4	209 bç
Bkn4-F	TGTGTCCACAGGTGATGAGG
Bkn4-R	TCCGCCACCCTGTTAGTTAC

Tablo 4. Bikunin özendirici gen bölgesine ait kullanılan primerler ve PCR ürünü büyüklükleri.

	5' → 3'
Alu tekrar-1	300 bç.
Alu1-F	TGTTGCCCAGACTGGAGTG
Alu1-R	GAGCATGTCGTTCTAAATCCTCT
Alu tekrar-2	330 bç.
Alu2-F	GACAACGGACCTGGGTTTTTA
Alu2-R	GACGGAGTTTCACTCTTGTCG
Artırıcı bölge	205 bç.
Enh-F	TGGTCTTGCAACTTGTGTCC
Enh-R	TCATTCAAGTTGCACAGCCTC
Başlangıç-1	280 bç.
Init1-F	GGAAGCTCGTAACAGTCATCA
Init1-R	GAGGATGGGGAGCGACCT
Başlangıç-2	256 bç.
Init2-F	ATCCTCGCATGCCCTCTG
Init2-R	ACAGGGCAGCTGTGAAGT

3.5.2. PCR karışımının hazırlanması ve PCR şartlarının primerlere göre uyumlandırılması

PCR tepkimesinde kullanılan primer çiftlerinin en verimli çalışabilecekleri erime sıcaklıklarının tespit edilmesi ve tepkime koşullarının iyileştirilmesi amacı ile ilk başta 110 örnek içerisinde 1 örnek DNA seçildi ve 9 çift primer takımı için iyileştirme ve gradient PCR yapıldı (Şekil 10). İyileştirme yapılan örnekler için toplam karışım hacmi 6 µL olarak ayarlandı (Tablo 6). Bu işlem neticesinde elde edilen erime sıcaklıkları Tablo 7 ve Tablo 8' de verilmiştir.



Şekil 10. Tepkime koşullarının iyileştirilmesi amacıyla yapılan gradient PCR jel görüntüsü. 1. ve 2. kuyulardaki PCR ürünü zayıf; 3. kuyuda ise örnek gözlenememektedir. 4-10 numaralı kuyulardaki PCR ürünleri istenen düzeydedir. Bunlar içerisinde 8 numaralı kuyudaki ürünün çoğaltıldığı sıcaklık tüm tepkimeler için tercih edilmiştir.

Tablo 5. Seçilen örnek için toplam hacim 6 µL olacak şekilde tepkime karışım oranları.

Eklenen Kimyasal Madde	Miktar (µL)
Kalıp DNA	0,5
Steril deiyonize su	4,135
10X Amonyum sülfatlı PCR tamponu	0,5
25 mM MgCl ₂	0,3
2 mM dNTP karışımı	0,4
100 mM F primeri	0,07
100 mM R primeri	0,07
5 U/µL Taq DNA polimeraz	0,025

Tablo 6. Bikunin yapısal gen bölgesi için deneysel olarak elde edilen primer erime sıcaklıkları.

Yapısal Gen Bölgesi	
Ekzon ismi	Erime sıcaklığı °C
Bkn 1	57,1
Bkn 2	59,8
Bkn 3	62,3
Bkn 4	61,3

Tablo 7. Bikunin özendirici gen bölgesi için deneysel olarak elde edilen primer erime sıcaklıkları.

Özendirici Gen Bölgesi	
Bölge ismi	Erime sıcaklığı °C
Alu 1	60,6
Alu 2	58,7
Enh	62,6
Init 1	62,1
Init 2	62,1

Bütün primer çiftlerinin tepkime koşullarının iyileştirilmesi bittikten sonra kalan diğer örnekler için toplam karışım hacmi, baştaki oran korunarak 6µL olarak hazırlandı ve malzemenin ekonomik şekilde kullanımı sağlandı.

Tepkime koşullarına ait değişkenler primerlere ait erime sıcaklıkları haricinde tüm tepkimelerde aynı tutulmuştur (Tablo 9). Elde edilen ürünler SSCP (single strand conformation polymorphisms) yöntemi ile çökyapılılık yönünden araştırıldı.

Tablo 8. PCR tepkime koşulları.

Basamak	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	95 °C	5 dakika
Denatürasyon	95 °C	15 saniye
Bağlanma	Tablo 7 ve 8' deki değerler	30 saniye
Uzama	72 °C	30 saniye
	35 tekrar	
Son uzama	72 °C	2 dakika

3.6. Elektroforez

Elektroforez, yüklü moleküllerin doğrusal elektrik akımı yardımı ile birbirinden ayrılması için kullanılan bir fiziksel ayırım yöntemidir (47). Elektroforetik tekniklerden, bu çalışmada agaroz jel elektroforezi ve SSCP yöntemi kullanılmıştır.

3.6.1. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi PCR tepkimelerinin verimli çalışıp çalışmadığının kontrolünde kullanıldı. Örnekler, yüzde 1 oranında hazırlanmış olan agaroz jelde 90 voltta 40 dakika kadar (100-1500 bç aralığında) pUC19 HaeIII kesimi DNA belirleyici eşliğinde yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak UV ışık altında görüntülendi.

3.6.2. SSCP yöntemi

SSCP, DNA üzerindeki farklılıkları tesbit amacıyla geliştirilen yöntemler içerisinde çok çaba ve kimyasal gerektirmemesiyle ve pratik oluşuyla en çok kullanılan yöntemlerden biridir (47). Nokta mutasyonları, ekleme/çıkarma tipi mutasyonlar, yeniden düzenlenme tipi mutasyonlar gibi durumların tespiti için çok uygundur (48). Bunun yanında, tek bir baz çiftinde olan değişiklikleri bile SSCP ile yakalamak mümkündür (48).

Yöntem, denatüre edilerek tek sarmal haline getirilen DNA parçacıklarının denatüre edici kimyasal içermeyen poliakrilamid jelde yürütülmesi esasına dayanmaktadır (47). Nükleotit diziliminden kaynaklanan ikincil yapının kendi üzerine katlanarak molekül ağırlığından bağımsız, dizilime özel bir şekilde elektromanyetik alanda hareket etmesi SSCP'nin diğer metotlardan farkını oluşturmaktadır (47). SSCP, kıyasa dayalı bir metottur. Bu nedenle sağlıklı analiz yapabilmek için örnek sayısı mümkün olduğunca fazla tutulmalıdır. SSCP jelinde varyasyon/mutasyon içeren yapılar jel görüntüsünde örnek başına iki, üç veya dört tane bant verebilirler. İki bant ve kıyaslanan örneklerden farklı konumda bant yerleşimi farklı dizilime; üç bant mozaik yapıya; dört bant ise her iki sarmalda da farklı dizilime işaret etmektedir (46).

Bu yöntemin en büyük avantajı hızlı bir şekilde çok sayıda örneğin taranabilmesine imkan vermesidir. Ancak, SSCP kullanılarak %100 oranında mutasyon/varyasyon tespit etmek mümkün değildir. Bunun sebebi dış etkenlerden çok fazla etkilenmesidir (48). Jele yüklenen örnek büyüklüğünün belli bir aralıkta olması gereği de bu yöntem kullanılarak yapılan araştırmaları sınırlandıran diğer bir faktördür. Genellikle, SSCP'de en sağlıklı sonuca ulaştıracak ürün büyüklüğü 150-400 bp aralığıdır (46).

3.6.3. SSCP'nin yapılışı

Camların hazırlanması¹

Kullanılacak olan, U şekilli ve dikdörtgen şekilli her iki cam da ilk önce %70'lik ardından da %96'lık etil alkol ile iyice temizlendi. Jelin bağlanması istenen U cama 1000 µL jel bağlama çözeltisi (3 µL gamma-metakriloksipropil-trimetoksi silane, 5 µL asetik asit, 1000 µL %96'lık etil alkol) hav bırakmayan peçete ile dikkatlice yayıldı ve 10 dakika kuruması için beklendi. Dikdörtgen cama ise 650 µL kayganlaştırıcı çözelti (sigmacote) hav bırakmayan peçete ile

¹ Prof. Dr. Ahmet Arslan, yayınlanmamış laboratuvar notları.

yayıldı ve 10 dakika kuruması için beklendi. Yanlara aralık çubukları, üste ve alta da ters olarak birer tarak yerleştirildikten sonra camlar birbiri üzerine kapatılıp mandalla birbirine tutturuldu (46).

Jelin hazırlanması¹

Jel karışımı, 250 mL'lik beher içerisine 49:1 akrilamid:bisakrilamid oranında hazırlandı. Jel karışımı, 14 mL %50'lik stok akrilamid çözeltisi, 6 mL 10X TBE ve 80 mL saf su şeklinde hazırlandı ve iyice çözünmesi sağlandı. Manyetik karıştırıcı üzerine alınan karışıma burada 450 µL %10 APS ve 45 µL TEMED eklendi. 4-5 saniye karışması beklendikten sonra beher yardımıyla yavaşça ve hava kabarcığı bırakmamaya özen göstererek iki cam arasına döküldü ve köpek balığı dişli tarak ters olarak jelin üst kısmına yerleştirildi. Jelin donması için en az 45 dakika beklendi.

Örneklerin hazırlanması¹

Örnekler, 0,2 mL lik tüplere 20 µL'lik toplam hacmin 6 µL'si PCR ürünü ve 14 µL'si SSCP tamponu olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan örnekler 95,5°C'de 3 dakika denatürasyonun hemen ardından buz üzerine alındı ve buz üzerinde en az 5 dakika bekletildi.

Örneklerin yüklenmesi¹

Jel donduktan sonra alttaki ve üstteki taraklar ile mandallar çıkarıldı. Camlar U cam arkada kalacak şekilde ve elektroforez tankında sızmaya meydan vermeyecek şekilde yerleştirildi. Tankın üst ve alt kısımlarına 1X TBE dolduruldu. İki cam arasındaki jel artıkları temizlendikten sonra köpek balığı dişli tarak bu sefer düz olarak yerleştirildi. Güç kaynağı ile bağlantılar yapılarak 450 Volt'ta 30 dakika boş olarak pH dengesinin sağlanması amacıyla ön yürütme yapıldı. Ön yürütmenin ardından, hazırlanan örnekler kuyucuklara 3'er µL hacimde yüklendi ve 430 Volt'ta +15°C'de 16,5 saat yürütüldü.

Örneklerin görüntülenmesi²

Yürütmenin ardından tanktan alınan camlar birbirinden ayrıldı. Üzerinde jel olan U cam, çalkalayıcı üzerinde %10'luk 2 litre asetik asit içinde 15 dakika bekletildi. Ardından, 10 dakika 2 litre saf su içinde bekletildi. Gümüş nitrat çözeltisi içerisinde 45 dakika bekletildikten sonra soğuk sodyum karbonat çözeltisi içine alındı. Bantların görünmesiyle zemin kararmadan hemen önce

tekrar %10'luk asetik asit çözeltisine alınarak bantların sabitlenmesi sağlandı. Beş dakika bekletildikten sonra tekrar saf suya alınarak ortamdan fazla asetik asitin uzaklaştırılması sağlandı. Bunun ardından cam kurumaya bırakıldı. Kurumanın ardından, jelin görüntüsü 1200 dpi tarayıcı kullanılarak bilgisayara aktarıldı.

3.7. Sonuçların İstatistikî Yöntemlerle Analizi

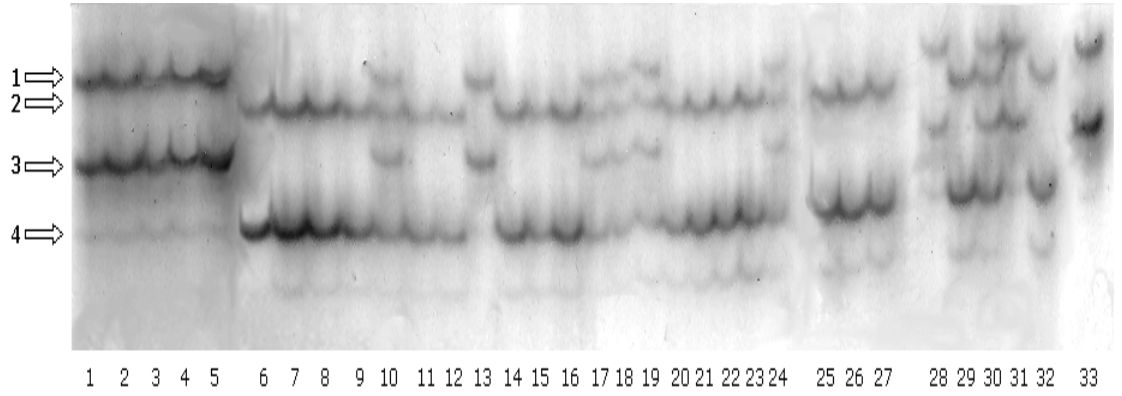
Elde edilen bulgular ki-kare testi ile değerlendirmeye tabi tutuldu.

² Prof Dr Ahmet Arslan, yayınlanmamış laboratuvar notları.

4.BULGULAR VE SONUÇLAR

4.1. SSCP sonuçlarının istatistiki olarak değerlendirilmesi

Bu çalışmada; ailesel geçiş gözlenen böbrek taşı hastalarının bulunduğu 4 farklı ailenin toplam 75 bireyinden, ailesel hikayeye sahip olmayıp kendiliğinden taş oluşumu gösteren 35 böbrek taşı hastasından ve 110 sağlıklı bireyden alınan kanlardan izole edilen DNA'lar kullanılmıştır. Bikunin yapısal gen bölgesine ait 4 ekzon ve özendirici gen bölgesine ait 5 kısım çokyapılılık açısından SSCP yöntemi ile taranmıştır. Sonuç olarak; bikunin özendirici gen bölgesinde, İnit-2 olarak adlandırdığımız ve gen ifadesini düzenleyen faktörlerin bağlanma bölgesi olan bölge içerisinde, çalışmaya dahil edilen tüm gruplarda dağınık olarak 3 farklı genotipe rastlanmıştır.



Şekil 11. SSCP neticesinde gözlenen farklı 1,2,3,4 numaralı bantların jel üzerindeki görüntüleri. 1-5,13,28,31 ve 33 numaralı kuyularda 1 ve 3 numaralı bantlar; 6-9,11,12,14-16,20-23,25-27,29 ve 32 numaralı kuyularda 2 ve 4 numaralı bantlar; 10,17-19,24 ve 30 numaralı kuyularda 1,2,3,4 numaralı bantlar görülmektedir. İlk 5 örnek aynı çekirdek ailenin üyeleridir. 6-33 numaralı örnekler sağlıklı bireylere aittir.

Bu bölgede rastlanan 1,3; 2,4 ve 1,2,3,4 bantlarının gruplar arasındaki dağılımı Tablo 10' da gösterilmiştir.

Tablo 9. Bikunin özendirici gen bölgesi içinde yer alan İnit-2 bölgesinde SSCP sonucu gözlenen bantların hasta grupları arasındaki dağılımı.

Genotip	Ailesel olan		Ailesel olmayan		Kontrol	
	Adet	%	Adet	%	Adet	%
1,3	15	20,0	5	14,3	16	15,84
2,4	40	53,3	21	60,0	66	65,35
1,2,3,4	20	26,7	9	25,7	19	18,81
TOPLAM	75	%100	35	%100	101	%100

İnit-2 bölgesinde; çalışmaya katılan toplam birey sayısı içinde, %17,06 oranında 1,3; %60,19 oranında 2,4 ve %22,75 oranında 1,2,3,4 olmak üzere farklı SSCP bantlarından oluşan 3 farklı genotip tespit edilmiştir (Tablo 10). Bu üç genotipin toplam birey sayısı içindeki dağılımı incelenirken dikkat edilmesi gereken iki nokta vardır. İlk olarak; her bir genotipin gözlemlendiği tüm bireyler arasındaki gruplara özel dağılımının, ikinci olarak ise bir genotipin diğerlerine oranla ne sıklıkla gözlemlendiğinin incelenmesi gerekmektedir. Örneğin; 1,3 bantlarının temsil ettiği genotip toplam 36 kişide gözlenmekte ve bunlar arasında, 15 ailesel hikayesi olan, 5 ailesel hikayesi olmayan ve 16 kontrol bulunmaktadır. Sayısal değerler birbirine çok yakın olup 1,3 genotipi herhangi bir gruba özel bir dağılım göstermemektedir (Tablo 10). Aynı zamanda her bir grup içinde 1,3 genotipi gözlenen bireylerin gözlenmeyen bireylere oranı incelendiğinde ailesel hikayesi olan bireylerde bulunma oranı $15/75 = 1/5$, ailesel hikayesi olmayanlarda $5/35 = 1/7$, kontrollerde ise $16/101 \approx 4/25$ olduğu görülmektedir (Tablo 10). Benzer biçimde 2,4 genotipi toplam 127 kişide gözlenmekte ve bu bireyler arasında 40 ailesel, 21 ailesel olmayan ve 66 kontrol şeklinde bir dağılım göstermektedir. Sağlıklı bireyler göz önüne alındığında 2,4 genotipinin hasta kişilerde gözlenme oranının düşük olduğu dikkat çekmektedir (Tablo 10). Ayrıca 2,4 genotipi ailesel hikayeli bireyler arasında $40/35 = 8/7$ oranıyla, ailesel hikayesi olmayan bireyler arasında $21/14 = 3/2$ ve kontrol bireyler arasında $66/35 \approx 13/7$ oranıyla gözlenmektedir. Toplam 48 kişide gözlenen 1,2,3,4 genotipi 20, 9 ve 19 kişi şeklinde dağılım göstermektedir. Grup içi dağılımı ise ailesel hikayesi olan bireyler arasında $20/55 = 4/11$, ailesel hikayesi olmayan bireyler arasında $9/26 \approx 1/3$, sağlıklı bireyler arasında ise $19/82 \approx 1/4$ oranında görülmektedir (Tablo 10).

Elde edilen bulgular istatistiki ki-kare testi ile değerlendirilmiş ve böbrek taşı oluşumu ile bulunan çokyapılılık arasında istatistiki olarak anlam tespit edilememiştir (Tablo 11). Her üç genotipin de p anlamlılık değeri 0,05'ten büyük bulunmuştur (Tablo 11).

Tablo 10. Üç grupta gözlenen 3 farklı genotipin ki-kare testi ile ortaya çıkan anlamlılık dereceleri.

Genotip	X ² değeri	p değeri	Serbestlik derecesi
1, 3	0,754	0,685	2
2, 4	2,592	0,273	2
1, 2, 3, 4	1,721	0,422	2

Gözlenen 1,3 genotipinin bulunan p anlamlılık değeri 0,685; 2,4 genotipinin 0,273; 1,2,3,4 genotipinin ise 0,422'dir. Bu hesaplama, Tablo 10'da görüldüğü gibi çalışmaya dahil edilen bireylerin 3 grup olarak kabul edilmesi ile yapılmıştır. Ailesel hikayesi olan hastalarla beraber ailesel hikayeye sahip olmayan, kendiliğinden taş oluşumu gösteren hastalar tek bir grup olarak kabul edilmiş ve bulgular ikinci kez ki-kare testine tabi tutulmuşlardır. Üç genotipin p anlamlılık değeri 0,05'ten büyük bulunmuştur. Ortaya çıkan sonuçlar Tablo 12 ve 13'de görüldüğü gibidir.

Tablo 11. Gözlenen SSCP bantlarının çalışmaya dahil edilen bireylerin iki grup olarak kabulüyle ortaya çıkan dağılımı.

Genotip	Hasta sayısı	Kontrol sayısı
1,3	20	16
2,4	61	66
1,2,3,4	29	19
Toplam	110	101

Tablo 12. Çalışmaya katılan bireylerin hasta ve sağlıklı olarak iki gruba ayrılıp hesaplanan istatistiki değerleri.

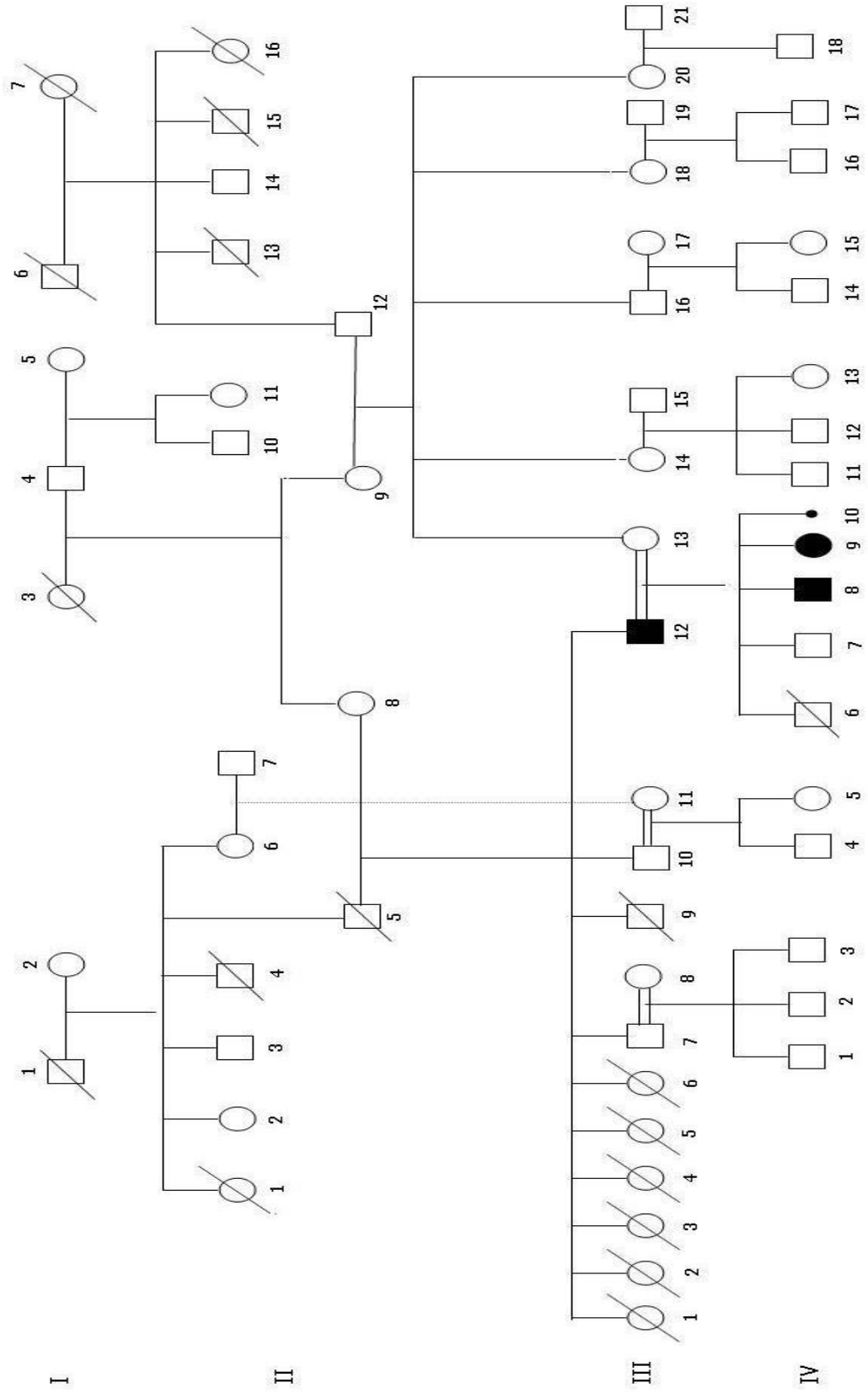
Genotip	X ² değeri	P değeri	Serbestlik derecesi
1,3	0,203	0,651	1
2,4	2,150	0,142	1
1,2,3,4	1,708	0,191	1

İkinci kez tekrarlanan ki-kare testi ile p anlamlılık değerleri 1,3 genotipi için 0,651; 2,4 için 0,142; 1,2,3,4 için ise 0,191 bulunmuştur (Tablo 13). Elde edilen bulgular böbrek taşı oluşumu ile ilişki içerisinde değildir. İniz-2 gen bölgesinde bulunan çokyapılılık taş oluşumu ile doğrudan ilişki göstermiyorsa da

bu bölgenin oldukça polimorfik bir bölge olduğunu göstermektedir. Bu çalışmanın bikunin geni ve özendirici bölgesinin analiz edildiği ilk çalışma olması ve literatüre ciddi bir katkı yapacak olması nedeniyle elde edilen sonuçlar oldukça önemlidir. Bulunan genotipler ile taş hastalığı arasında ilişki gözlenememesinde gen ifadesinden sonra gerçekleşen işlemlerin veya taş oluşumunu önleyici diğer proteinlerin varlığının önemi muhtemeldir.

4.2. Sonuçların aile ağaçları ile birlikte değerlendirilmesi

Çalışmaya 4 aile dahil edilmiştir. Bu ailelere ait aile ağaçları ve böbrek taşı hastalığına sahip üyeleri Şekil 12, 13, 14 ve 15'te gösterilmiştir.



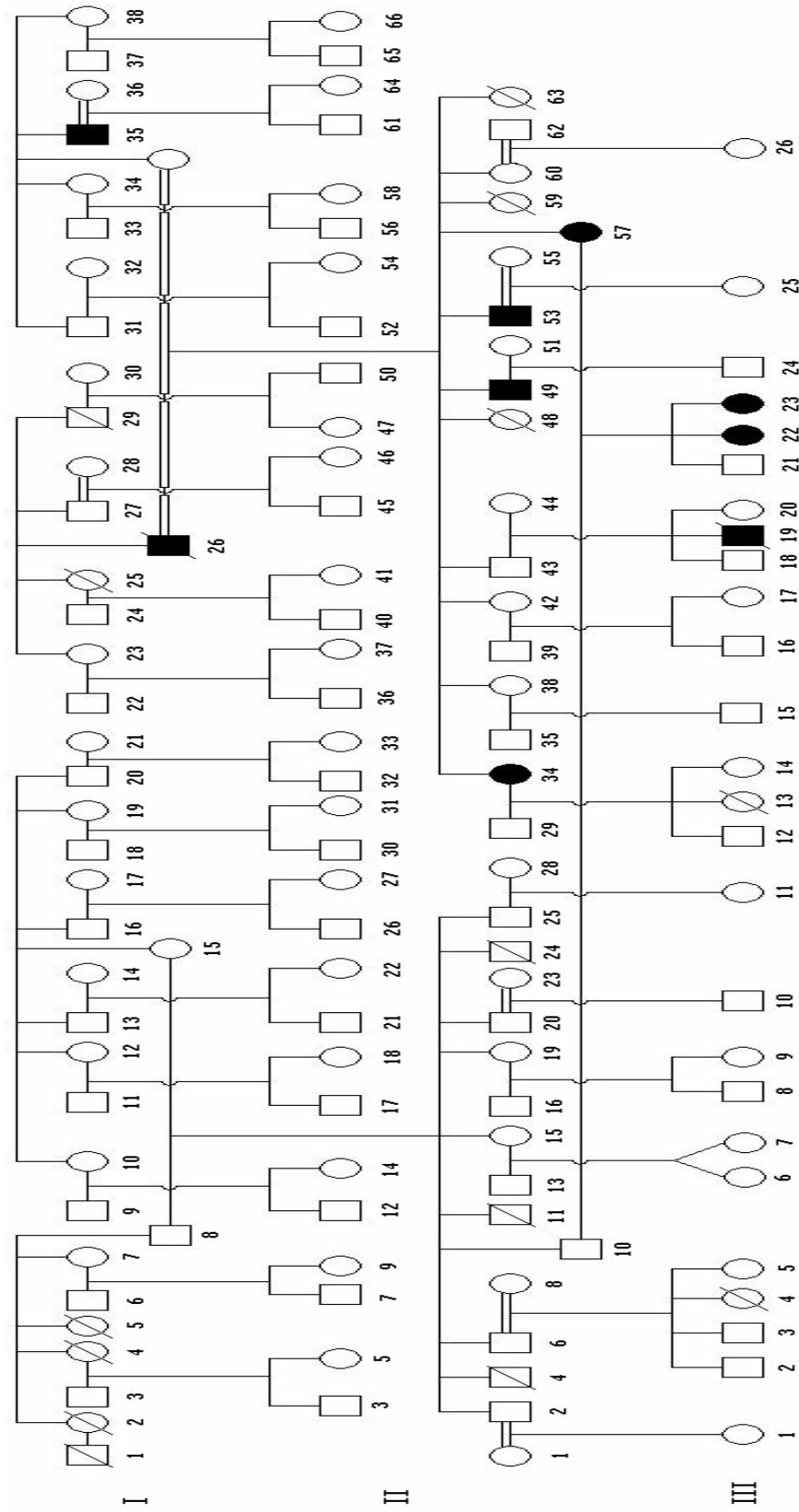
Şekil 12. Birinci aileye ait aile ağacı

Birinci ailenin çalışmaya katılan bireylerine ait genotipler Tablo 14'te gösterilmektedir.

Tablo 13. Birinci ailenin çalışmaya katılan bireylerine ait genotipler.

Kişi No	Genotip
II-6	1,3
II-8	1,2,3,4
II-9	2,4
II-12	1,2,3,4
III-7	1,3
III-8	1,2,3,4
III-10	1,2,3,4
III-11	1,2,3,4
III-12	1,2,3,4
III-13	2,4
III-14	1,3
III-16	1,3
IV-1	1,2,3,4
IV-2	1,2,3,4
IV-3	2,4
IV-4	1,2,3,4
IV-5	1,2,3,4
IV-7	2,4
IV-8	2,4
IV-9	1,2,3,4

İlk aileye ait aile ağacı gözlenen genotiplerle beraber incelendiğinde 1,2,3,4 genotipinin aile bireyleri arasında yaygın bulunduğu dikkat çekmektedir (Tablo 14). Ailenin 11 bireyi 1,2,3,4 genotipine sahiptir. Ancak bu bireylerden sadece ikisi (III-12, IV-9) hastadır. Benzer biçimde 2,4 genotipi de 1 hasta (IV-8) bireyde gözlemlendiği gibi sağlıklı bireylerde de ortaya çıkmıştır. Ancak 1,3 genotipi bu ailenin sadece sağlıklı fertlerinde mevcuttur. Fakat bu genotipin hastalık riski taşımayan bir genotip olduğunu düşünmek için erkendir. Bu aileye ait aile ağacında üç bireyde (III-14, III-16, IV-3) beklenmeyen bantlar görülmektedir (Tablo 14). Bu kişiler anne babalarından aktarılabilecek bantlardan farklı bantlara sahiptirler. Bu durum, ancak; bu bireylerde sonradan meydana gelmiş bir farklılaşmayla açıklanabilir. Aynı zamanda bu bölgenin ciddi derecede polimorfik bir bölge oluşunun da kanıtıdır.

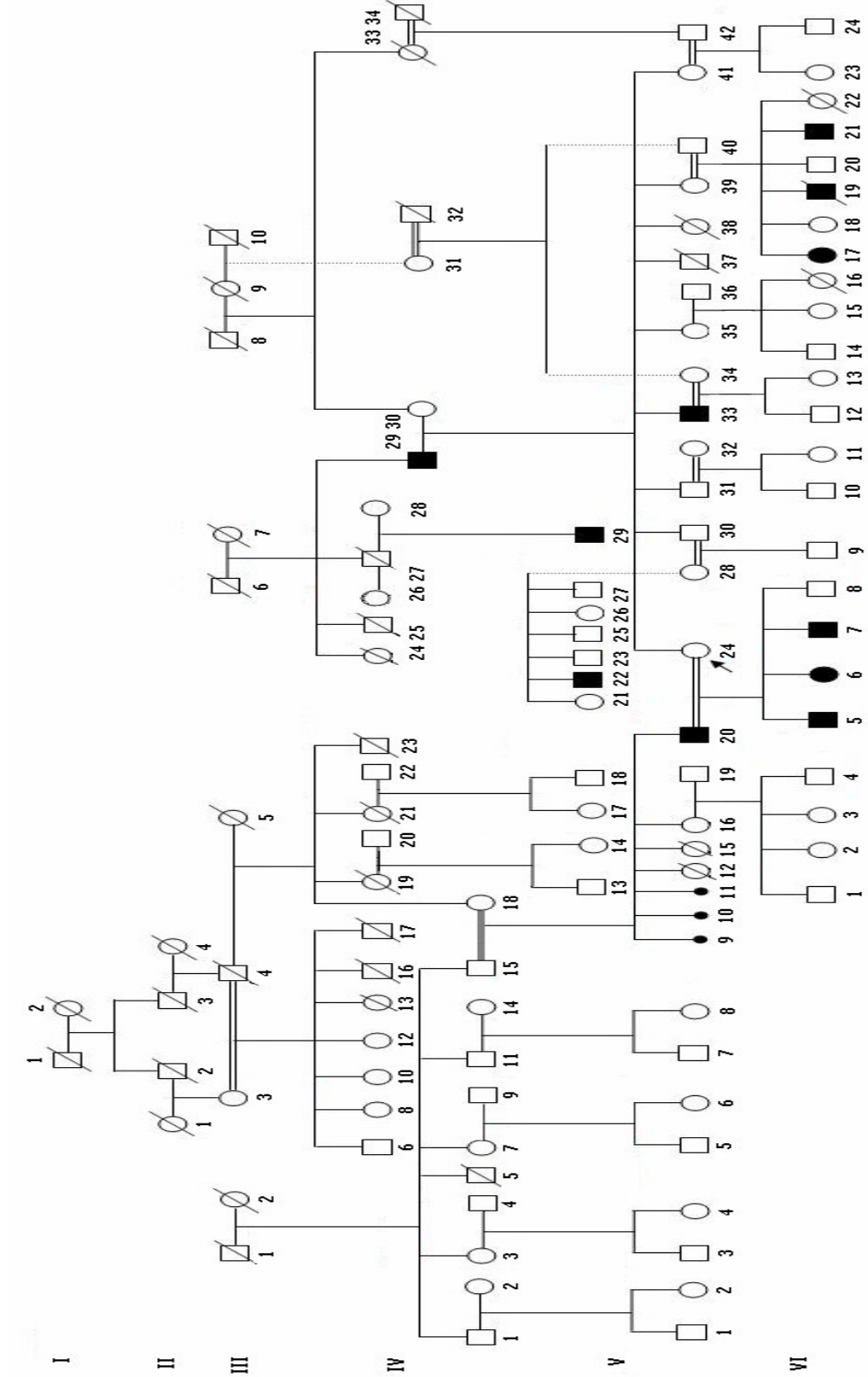


Şekil 13. İkinci aileye ait aile ağacı

Tablo 14. İkinci ailenin çalışmaya katılan bireylerine ait genotipler.

Kişi No	genotip
II-10	1,3
II-57	1,3
III-21	1,3
III-22	1,3
III-23	1,3

İkinci aile ağacında görülen bireylerden Tablo 15'te numaraları verilen bireylerin oluşturduğu çekirdek aile çalışmaya katılmıştır. Bu ailenin 3 ferdi (II-57, III-22, III-23) taş hastalığından muzdariptir. Ancak ailenin tüm bireyleri 1,3 genotipine sahiptir. Bu durumda 1,3 genotipini hastalıkla ilişkilendirmek güçtür. İlk ailede 1,3 genotipi yalnızca sağlıklı bireylerde gözlenirken bu ailede sağlıklı ve hasta bireyler arasında yaklaşık olarak eşit dağılım göstermektedir.

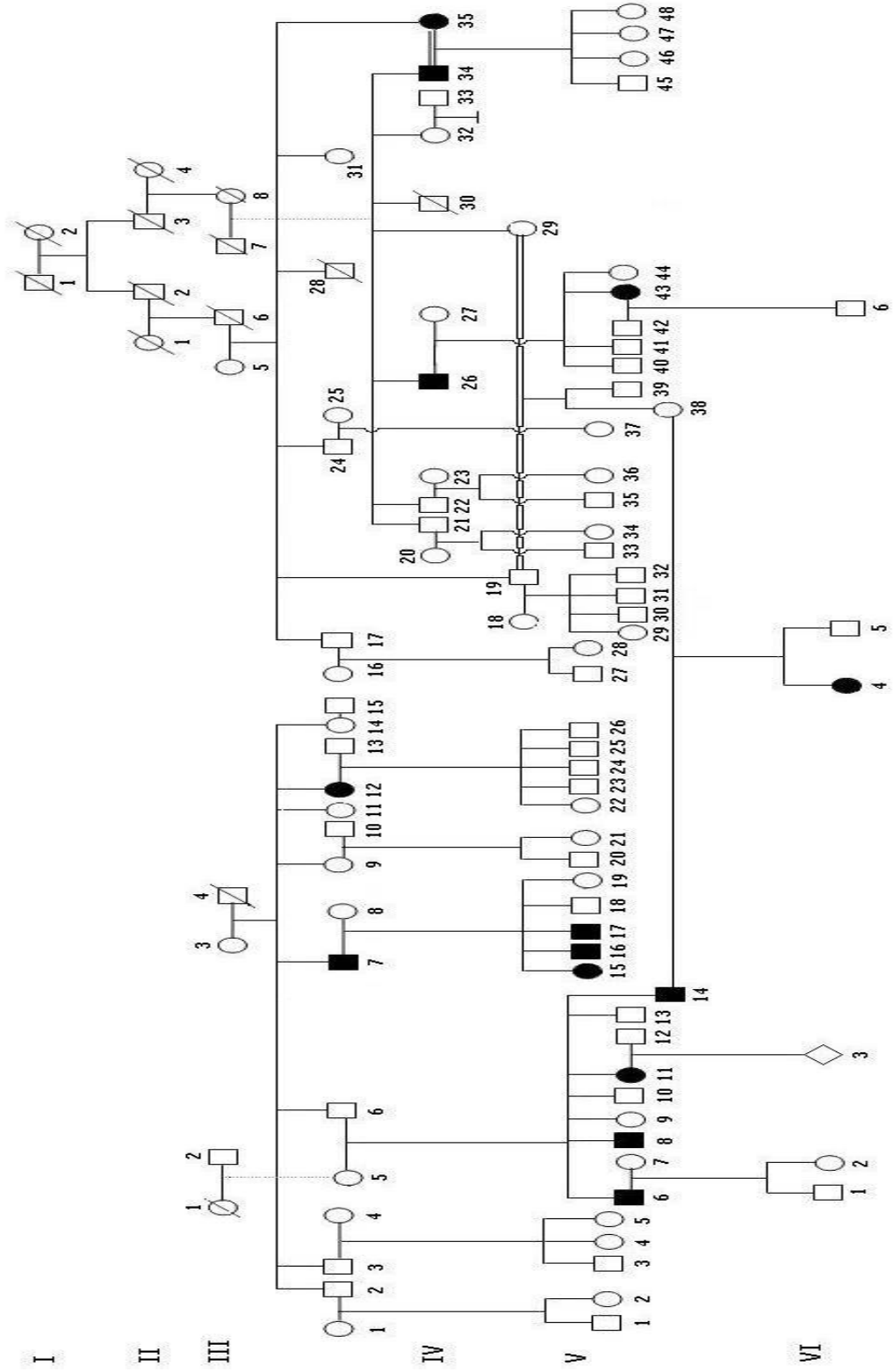


Şekil 14. Üçüncü aileye ait aile ağacı

Tablo 15. Üçüncü ailenin çalışmaya katılan bireylerine ait genotipler.

Kişi No	Genotip
IV-18	2,4
IV-30	2,4
V-16	2,4
V-20	2,4
V-24	2,4
V-28	2,4
V-30	2,4
V-31	2,4
V-32	1,3
V-33	1,2,3,4
V-34	1,2,3,4
V-39	2,4
V-40	1,2,3,4
V-41	2,4
V-42	2,4
VI-5	2,4
VI-6	2,4
VI-8	2,4
VI-9	2,4
VI-11	1,2,3,4
VI-12	2,4
VI-17	2,4
VI-21	1,2,3,4
VI-23	2,4

Üçüncü aile 24 ferdiyle çalışmaya katılmıştır. Bu kişilere ait genotipler Tablo 16'da gösterilmiştir. Bu ailede de 2,4 genotipi yaygın gözlenmektedir. Ailenin 13 sağlıklı bireyi 2,4 genotipine sahipken 4 hasta bireyi de (V-20, VI-5, VI-6, VI-17) 2,4 genotipine sahiptir. Benzer biçimde 1,2,3,4 genotipi 3 sağlıklı ve 2 hasta bireyde kendini göstermektedir.



Şekil 15. Dördüncü aileye ait aile ağacı

Tablo 16. Dördüncü ailenin çalışmaya katılan bireylerine ait genotipler.

Kişi No	Genotip
III-3	1,2,3,4
III-5	2,4
IV-2	1,2,3,4
IV-5	1,3
IV-6	1,3
IV-9	2,4
IV-12	2,4
IV-19	2,4
IV-24	2,4
IV-26	2,4
IV-27	2,4
IV-29	2,4
IV-34	2,4
IV-35	2,4
V-9	1,3
V-11	1,3
V-13	1,3
V-14	1,2,3,4
V-15	2,4
V-16	2,4
V-38	1,2,3,4
V-42	1,2,3,4
V-43	2,4
VI-4	2,4
VI-5	2,4
VI-6	2,4

Son ailenin 16 ferdi Tablo 17’de de görüldüğü gibi 2,4 genotipine sahiptir. Ancak bu bireylerden sadece 7’si (IV-12, IV-26, IV-34, IV-35, V-16, V-43, VI-4) taş hastasıdır. Diğer ailelerle birlikte incelendiğinde, 2,4 genotipinin, sağlıklı bireyler arasında daha yaygın olduğu dikkat çekmektedir.

İlk ailede olduğu gibi bu ailede de beklenmeyen bantlar gözlenmiştir. Bu genotiplere sahip bireyler V-14, V-38 ve V-42 numaralı bireyler olup ebeveynlerinden aktarılamayacak 1,2,3,4 genotipine sahiptirler. Daha önce de değinildiği gibi bu durumun açıklaması bu bölgenin değişime yatkın, polimorfik

bir bölge oluşunda yatmaktadır ya da tam tersi olarak bu sonuçların bu düşünceyi doğruduğu söylenebilir. Bu kimseler sonradan oluşmuş bir farklılığı taşımaktadırlar. Ancak bu bireylerden yalnızca biri (V-14) böbrek taşı hastasıdır. Bu şekilde sonradan ve kendiliğinden gelişmiş bir çokyapılılığın da taş olumuyla doğrudan ilişkili olduğu söylenememektedir.

4.3. İlişki-eşlik (association) değerlendirmesi

Çalışmaya 4 farklı aile dahil edilmiştir. Doğal olarak, her bir ailenin fertleri diğerlerinden farklı fenotipik özelliklere sahiptirler. Görülen bu fenotiplerin taş oluşumuna eşlik edip etmediğinin bilinmesi araştırmacılar için önemlidir.

İlk aile içinde ölüm sebebi bilinmeyen 6 birey (III-1, III-2, III-3, III-4, III-5, III-6) bulunmaktadır. Peşpeşe ve kız çocuklarda görülen bu ölümlerin nedeni bilinmemekte ve 1,5-2,0 yaşları arasında hayatını kaybeden bu çocukların böbrek taşına sahip olup olmadıkları hakkında da bilgi bulunmamaktadır. Aynı ailenin IV-12 numaralı bireyi kalp rahatsızlığına sahiptir ve böbrek taşı oluşumu göstermemektedir. Bu bireyin DNA'sı çalışmada kullanılmamıştır. Bu aileye mensup diğer fertlerin bilinen bir hastalığı yoktur. Dolayısıyla taş olumunu ilişkilendirebileceğimiz herhangi bir fenotip bu ailede gözlenememiştir. Ailenin hasta bireyleri akraba evliliği yapmış baba ve çocuklarıdır. Böbrek taşı oluşumunun kalıtsal bir hastalık olduğu varsayılırsa akraba evliliğinin riski artıracağı bir gerçektir.

Aynı zamanda birinci ailenin I-5 numaralı bireyinde üreterosel olarak bilinen üriner sistem anomalisi gözlenmiştir. Bu bireyde, İnit-2 bölgesinde 2,4 genotipi tespit edilmiştir.

İkinci aile diğer ailelerin yanı sıra mineralizasyon ve renal bozukluklar açısından sorun yaşayan bireylere sahip bir ailedir. Bu ailede böbrek ağrısı yaşayan ve böbrek kumu döken bireyler (II-38, II_42, II-43, II-53, III-24, III-26) bulunmaktadır. Ayrıca osteoporoz ve kemik erimesi gözlenen bireyler de (I-2, I-4, I-15) mevcuttur. Bu kişilerden sadece II-53 numaralı kişi taş oluşumu göstermektedir. Ancak bu kişi ailenin çalışmaya dahil edilen bireyleri arasında değildir. Fakat ailenin yukarıda ifade edilen bireylerinde gözlenen rahatsızlıklar böbrek işlevini ve mineralizasyonu ilgilendiren hastalıklar olması nedeniyle bikunin geni çok yapıllılığı ile veya ileride gerçekleşecek çalışmalarla bulunacak, taş oluşumunda rol alan farklı etkenler ile ilişkilendirilebilecek durumdadırlar. Bikunin proteininin bu anlamda da etkin rol oynayabileceği düşünülebilir.

Üçüncü aile akraba evliliklerinin sık görüldüğü bir aile olarak dikkat çekmekte ve taş oluşturan bireylerin (VI-5, VI-6, VI-7, VI-17, VI-19, VI-21) bu

evliliklerden dünyaya gelmiş bireyler olduğu görülmektedir. Ayrıca bu ailede böbrek taşı gözlenen bireyler haricindeki bir kişide böbrek iltihabı (IV-18) görülmektedir. Bu birey İnit-2 gen bölgesi açısından 2,4 genotipine sahiptir.

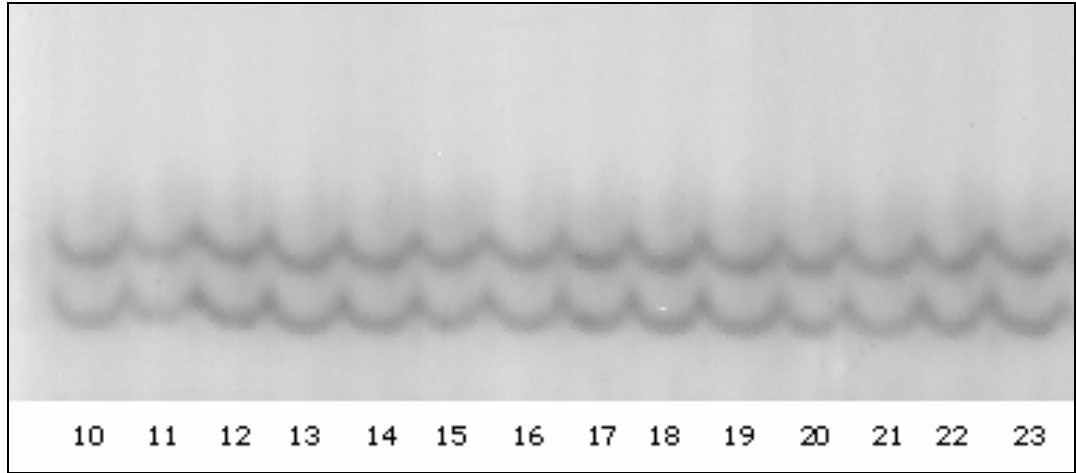
Dördüncü aile bireyleri, ilk aile gibi böbrek taşı yanı sıra tarafımızca bilinen bir hastalığa sahip değildirler. Taş oluşumu ile beraber yürüyen bir hastalık bu ailede gözlenememiştir. Bu aile içinde de ilk ailede olduğu gibi üriner sistem anomalisine sahip bir hasta birey bulunmaktadır. Aile ağacında III-23 olarak numaralandırılmış bu bireyde üreteropelvik darlık gözlenmiştir ve çalışmalarımız neticesinde 1,3 genotipine sahip olduğu görülmüştür.

Ailesel böbrek taşı hikayesine sahip bu bireylerin yanı sıra ailesel hikayesi olmayan, kendiliğinden taş oluşumu gösteren bireyler arasında da üriner sistem anomalisine sahip iki birey bulunmaktadır. Bu bireyler at nalı böbrek ve üreteropelvik darlık olarak bilinen anomalilere sahiptirler.

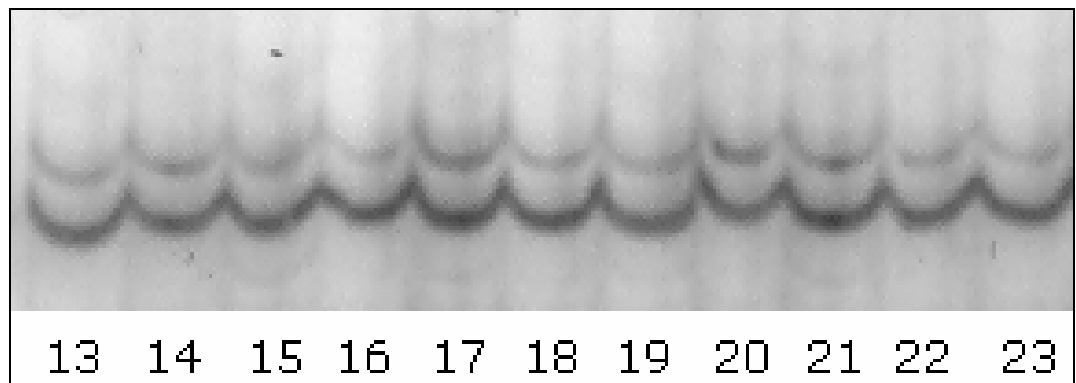
Çalışmada bikuninin yapısal ve özendirici gen bölgeleri inceleme altına alınmış ve İnit-2 bölgesinde 3 farklı genotipe rastlanmıştır. Ancak gerek aile ağaçlarının incelenmesi gerekse istatistiki ki-kare testinin sonuçlara uygulanması neticesinde bu çeşitliliği fenotiple ilişkilendirebilmek mümkün olmamıştır. Her üç genotip de hem sağlıklı hem hasta bireylerde görülebilmektedir. Önemle üzerinde durulması gereken bir diğer nokta şudur ki; bikunin geninin incelendiği ve çokyapılılığın ortaya çıkarıldığı ilk çalışma bu tez kapsamında gerçekleşmiş bulunmaktadır. Bu bulgular literatüre önemli bir katkı sağlayacak ve konuyla ilgilenen başka araştırmacılara kaynaklık edecektir. Bu çalışma böbrek taşı önleyen proteinlerin genetik yapılarının incelenmesi gereğine inanılarak başlatılmış bir çalışmadır. Bikunin gibi diğer önleyici proteinlerin de genleri incelenmeli ve kapsamlı bir sonuca ulaşılmalıdır. Zira bikunin ile taş oluşumu arasında ilişki bulunamamasında diğer önleyici proteinlerin genetik yapılarında meydana gelmiş bir değişiklik sonucu gerçekleşen işlev kaybı veya zayıflığı söz konusu olabilir. Bu durumda normal şartlarda yetersiz veya bozuk bikuninin açığını kapatması beklenen proteinlerin, moleküler yapılarındaki düzensizlik nedeniyle taş oluşumunun önlenmesinde tamamıyla yetersiz kalmaları mümkün olabilecektir. Bu çalışma sayesinde böbrek taşı oluşumunun engellenmesinde pay sahibi olan bikunin proteininin tanı amaçlı kullanılabilecek belirleyicilerden olmadığı sonucuna varılmıştır. Fakat bikuninin düzenleyici bir protein olduğu ve çeşitli dokularda farklı görevleri yerine getirdiği unutulmamalıdır. Bulunan bu çokyapılılığın, bikuninin farklı dokulara özgü görevlerinde etkili olabileceği düşünülebilir. Bu açıdan bu bulgular öneme sahiptirler.

Bikunine ait dört ekzon ve özendirici bölge içerisinde yapılan SSCP deneyleri neticesinde İnit-2 bölgesi haricindeki bölgelerde gen çokyapılılığına

rastlanmamıştır. Çalışmaya başlarken bu bölgelerden artırıcı bölge içinde farklılık gözlenmemesi beklenmekteydi. Çünkü artırıcı bölge karaciğere özgün çekirdek faktörleri tarafından etkinleştirilmektedir. Halbuki biz idrarda gözlenen bikunin artışının böbrekte sentezlenen bikuninden kaynaklandığı düşüncesinden yola çıkarak bu çalışmayı planladık. Beklenildiği üzere karaciğere özgü artırıcıda farklılık gözlenmemiştir. Dolayısıyla bu bulgu çok sayıda araştırmacı tarafından desteklenen düşünceyi doğrular durumdadır. Karaciğere özgü artırıcıda farklılık bulunamaması, taş hastalarında görülmesi muhtemel bikunin eksikliğinin karaciğerin bikunin sentezinde yetersiz kalması nedeniyle gerçekleşmediği düşüncesini kuvvetlendirmektedir. İdrara salınan eksik veya bozuk bikunin proteininin kaynağının renal epitel hücreler olması muhtemeldir. Bu durum böbreğin CaOx kristallerine maruz kaldıktan sonra bikunin proteinini ürettiği fikrini desteklemektedir. Artırıcı bölgeye ait jel resmi Şekil 16'da görülmektedir.

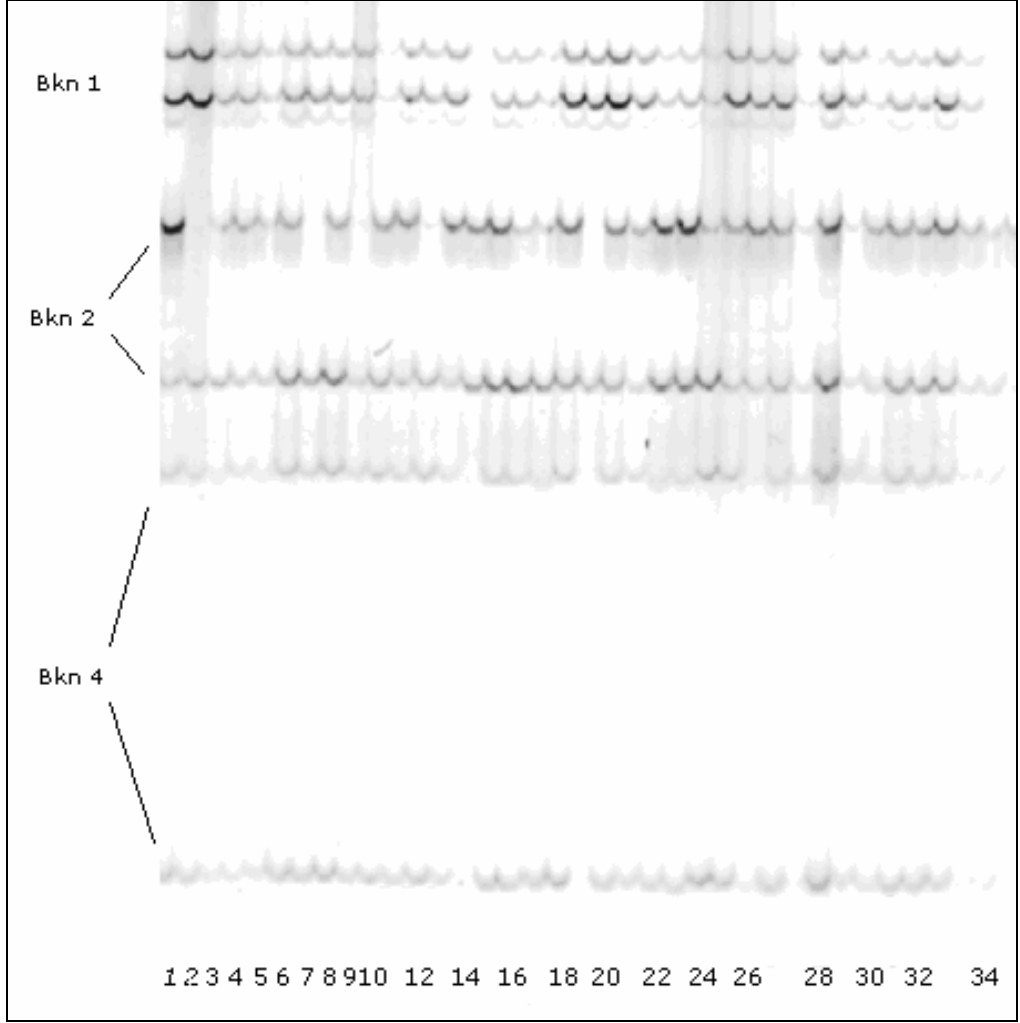


Şekil 16. Bikunin özendirici gen bölgesi içindeki artırıcıya (enhancer) ait jel görüntüsü. Görülen örnekler ilk ailenin 10-23 numaralı bireylerine aittir. Bu bölgede çalışmaya katılan tüm bireyler arasında genotipik farklılık gösteren banda rastlanmamıştır.



Şekil 17. Bikunin özendirici gen bölgesi içindeki Alu1 bölgesine ait jel görüntüsü. Görülen örnekler ilk ailenin 13-23 numaralı bireylerine aittir. Genotipik farklılık gösteren bant bulunmamaktadır.

Zamanı ve malzemeyi ekonomik kullanmak amacı ile aynı jele birden fazla sıra örnek yüklenebilmektedir (46). Bu çalışmada aynı jel üzerine beş sıraya kadar yükleme yapılmış ve sonuç alınmıştır. Bu şekilde zamandan ve malzemeden ciddi anlamda tasarruf sağlanmıştır. Aynı jel üzerine yüklenen 3 farklı büyüklükteki PCR ürünlerinin görüntüsü Şekil 18’de gösterilmiştir. Farklı büyüklükteki PCR ürünleri en küçük olandan başlayarak jele yüklenmiştir. Ürünlerin büyüklükleri arasında en az 15-20 nükleotidlik fark bulunmasına özen gösterilmiştir. Çalışmada planlanırken primer tasarımı aşamasında, bu nokta göz önünde bulundurularak, PCR ürün büyüklükleri tarafımızca bu yöntemeye uygun biçimde ayarlanmıştır. Küçükten büyüğe doğru sırayla yüklenen örneklerin yükleme işlemleri en az 10-15 dakika arayla yapılmıştır. Ayrıca ilk yüklenen örnekler 450 voltta yürütülmüş, sonuncu da yüklendikten sonra tüm yürütme işlemi 430 voltta yapılmıştır. Bu sayede farklı örneklerin üst üste gelmesi ve karışması önlenmiştir.



Şekil 18. Üç farklı ekzonun aynı jel üzerindeki görüntüleri. 1-24 numaralı örnekler ailesel hikayeli, 25-34 numaralı örnekler ise kendiliğinden gelişim gösteren taş hastalarına aittir. Verilen numaralar her ekzon için geçerlidir.

Şekil 18’de görülen Bkn 4 ekzonu 209 baz çifti, Bkn 2 ekzonu 277 baz çifti ve Bkn 1 ekzonu 307 baz çifti uzunluğundadır. Jele ilk yüklenen Bkn 4 PCR ürününün iki bandı arasındaki mesafe; hem küçük oluşu hem uzun süre yürümüş olması hem de kendinden menkul dizisel özellikleri nedeniyle oldukça açıktır (Şekil 18).

Bu yöntem güvenilir ve özgün bir yöntemdir (46). Her jele tek sıra örnek yükleyerek çalışmaya oranla; 5 sıra örnek yükleyerek çok daha kısa sürede çalışmanın araştırmacıya ve laboratuara katkısı büyüktür. Malzeme israfının önüne geçildiği gibi zamanı iyi değerlendirmek açısından da avantajlı bir yöntemdir (46).

5.TARTIŞMA

Böbrek taşı oluşumu patolojik bir mineralizasyon olayıdır (23). Böbrek taşlarının %70-80 kadarının birincil bileşeni kalsiyum okzalattır (CaOx) (3). Kalsiyum okzalattan taş oluşumu; çekirdekleşme, kristallerin büyümesi, kümelenmesi ve böbreklerde tutulumu ile gerçekleşir (22,23). Taş oluşum süreci, idrarın kalsiyum ve okzalat iyonlarınca aşırı doygunluğu (super-saturation) ile başlar (23). Fakat hem sağlıklı bireylerin hem de taş hastalarının idrarları benzer derecede doygunudur (23). İki grup arasındaki farklılığı, sağlıklı kişilerin idrarlarındaki, taş oluşumu ve kümelenmesini engelleyebilme özelliğine sahip faktörlerin varlığı açıklayabilmektedir (23).

Proteinler; böbrek taşlarında en fazla miktarda bulunan organik bileşenlerdir (49). Bu durum taş hastalığının oluşumunda önemli rollere sahip olabileceklerini düşündürmektedir (49). Son yıllarda; biyokimyasal, immunolojik ve fizikokimyasal gelişmelerin ışığında bu proteinlerin yapıları ve etkileri aydınlığa kavuşmaktadır (49). Böbrek taşlarında tanımlanmış proteinler arasında mukoproteinler, serum proteinleri ve kalsiyum bağlanma proteinleri gibi çeşitli proteinler yer alır (49). İdrar taş oluşumunda düzenleyici role sahip bir takım makromoleküller içerir (11). Bunlardan bazıları kristalizasyona fırsat verip kristallerin renal epitel hücrelere tutunmalarına imkan sağlarken bazıları engellemeye çalışmaktadır (11). Kalsiyum okzalat kristalizasyonunun etkin bir önleyicisi inter-alfa-önleyici ailesinin hafif zinciri olan bikunin glikoproteinidir (11).

Bu çalışmada; böbrek taşının engellenmesinde önemli bir role sahip bikunin proteininin yapısal ve özendirici gen bölgelerinde gen çokyapılılık (polymorphism) taraması yapılmıştır. Bu bölgelerde meydana gelmiş, genin ifadesinde veya gen ürününün yapısında bozukluğa neden olabilecek değişikliklerin taranması düşünülmüştür. Böyle bir durum mevcut ise, bikunin proteininin normalden az üretimi veya yeterli miktarda üretilen proteinin %100 etkinlik gösterememesi söz konusudur. Dolayısıyla; taş hastalarında, bikunin proteininin moleküler yapısının ve işlevinin iyi anlaşılması için bu çalışma önemlidir. Böbrek taşının oluşma mekanizması henüz açıklığa kavuşabilmiş değildir. Bikunin ve bikunin gibi başka önleyici proteinlerin genetik yapılarının ortaya çıkarılması taş oluşum mekanizması üzerinde bazı açıklanamayan noktaların izahına yardımcı olacaktır. Bikunin geninin çokyapılılık yönünden araştırıldığı bir çalışma, bilgilerimize göre, bugüne değin yapılmış değildir. Bu

açından, elde ettiğimiz bulgular literatüre önemli bir katkıda bulunacaktır. Gerek bikunin gerekse böbrek taşı oluşumunun önlenmesinde rol alan diğer proteinler için bu zamana kadar geliştirilmiş bir tanı yöntemi de yoktur. Bu çalışma ile bikunin proteininin işlevinin anlaşılmasına yardımcı olmanın yanında, bikunin eksikliğinin veya işlev kaybının tanısında faydalanılabilecek olası allelik belirleyicilerin tespiti amaçlanmıştır.

Bu tez kapsamında bikunin yapısal gen bölgesini oluşturan 4 ekzon ve özendirici gen bölgesi üzerinde önemli görülen bazı kısımlar çökyapılılık yönünden taranmıştır. Bunlar iki Alu tipi tekrar dizisi, karaciğere özgün artırıcı (enhancer) bölge ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgesi olan transkripsiyon başlangıç bölgesidir. Son olarak ifade edilen ve yaklaşık 530 bp büyüklüğündeki bölge iki çift primer takımı kullanılarak taranmıştır. Transkripsiyonun başladığı +1 noktası ile 256 bp yukarı (5') tarafını içine alacak şekilde dizayn edilen primer çiftiyle yapılan araştırmada bu bölgenin ciddi derecede polimorfik olduğu gözlenmiştir. Bu bölge içerisinde, gen ifadesinde cis-etkili olan TATA, CAAT ve GC kutuları yer almaktadır. CAAT; RNA Polimerazın gevşek, TATA ise sıkı bağlanma bölgesidir (38).

Ancak; taş hastaları ile sağlıklı bireylerin bikunin genlerinde kıyaslamalı olarak yapılan bu araştırmada, ortaya çıkan farklı genotiplerin istatistiki olarak taş oluşumu ile ilişkili olmadıkları gözlenmiştir.

Yapılan çeşitli çalışmalar, kalsiyum taşlarında inter-alfa-önleyici ailesine ait proteinlerin varlığına işaret etmektedir (49). Kunitz tip serin proteaz önleyici süper-ailesinin bir üyesi olan inter-alfa-önleyici, üç farklı peptidin birleşimiyle oluşmaktadır (49). İki ağır zincir ve onlara kovalent olarak, kondroitin sülfat zinciriyle bağlı bir hafif zincir (bikunin) içerir (49).

İnter-alfa-önleyici ailesine ait proteinlerin birincil sentez yeri karaciğerdir (13). Karaciğerde sentezlenen bikunin plazmada serbest halde bulunabildiği gibi idrara da salınabilmektedir (49). Ancak yapılan canlı dışı çalışmalarla, bikuninin böbrek, akciğer, beyin gibi organlarda da sentezlendiği ortaya çıkarılmıştır (39). Çeşitli hayvan deneyleri ve RT-PCR çalışmaları sonucu, böbrekteki bikunin sentezinin artan okzalat derişimine cevap olarak gerçekleştiği görülmüştür (6,7,10). Bu durum; idrarda gözlenen bikunin varlığının, karaciğerde sentezlenip idrara salınan bikunin ile açıklanamayacağını, aynı zamanda böbrekte de bikunin sentezlendiğini gösteren önemli bir kanıttır.

Bikunin geninin özendirici bölgesinde karaciğere özgün bir artırıcı (enhancer) bulunmaktadır (21). Bu bölge üzerine HNF1, HNF3, HNF4 gibi çeşitli hepatosit çekirdek faktörleri bağlanmakta ve gen ifadesi üzerinde etki göstermektedirler (21). Karaciğere özgün artırıcı bölge bu çalışmaya dahil

edilmiş ve yaptığımız çokyapılılık çalışması neticesinde, böbrek taşı hastaları ile sağlıklı bireyler arasında, artırıcı bölgede bir farklılığa rastlanmamıştır. Bu sonuç; taş hastaları göz önüne alındığında, idrarda CaOx kristalizasyonunu önlemede yetersiz kalan, düşük derişimdeki bikunin proteininin üretimindeki aksaklığın karaciğere özgün artırıcıdan kaynaklanmadığını göstermektedir. Böbreğin karaciğere özgün çekirdek faktörlerine sahip olması beklenemez. Böbrekte CaOx'a cevap olarak sentezlenen bikunin üretimindeki artış ne bu faktörlerin böbrekte var oluşuyla ne de karaciğerin bikunin sentezini tek başına yapıyor oluşuyla açıklanamaz. Dolayısıyla; elde ettiğimiz bu bulgu, böbreğin bikunin proteinini bizzat ürettiği düşüncesini kuvvetlendirmektedir.

Farklı bir çalışmada idrarın iki ayrı bikunin içerdiği tespit edilmiştir (25). Bunlar kristalizasyon önleyici etkinlik ve moleküler ağırlık bakımından birbirlerinden farklıdır (36). İki bikunin proteininden sadece biri CaOx kristalizasyonunun kuvvetli önleyicisidir (36). Ortaya çıkan bu farklılığın, bikunin proteinlerinin köken aldıkları dokudan kaynaklandığı düşünülmektedir (36). Bikuninlerden biri idrara plazmadan geçmiş, diğeri ise böbrek tarafından üretilmiştir (36). Ancak taş oluşumunu önleyici etkinlikteki değişiklik dikkat çekicidir. Aynı genden sentezlenen ve aynı olması beklenen iki proteininin nasıl olup da aynı işlevi yerine getiremediği açıklığa kavuşturulması gereken bir noktadır. Bu durumun izahı bikuninin bir glikoprotein oluşunda yatmaktadır. Bikunin ve Tamm-Horsfall proteini, osteopontin, protrombin fragment 1, kristal matriks proteini gibi diğer taş olumunu önleyici proteinlerin tümü fosforilasyon ve glikolizasyon gibi transasyon sonrası işlemlerden geçmektedirler (27). Bu halde, bu proteinlerin CaOx yüzeyine bağlanarak taş önleyici etki gösterebilmeleri için transasyon sonrası bu işlemlerin gerekli olduğu akla gelmektedir. Bikuninin sentezlendiği organa bağlı olarak transasyon sonrasında uğradığı işlemlerin farklı olabileceği düşünülmelidir. Bikunin %35 oranında karbonhidrat içermektedir (41). Bu karbonhidratlar daha öncede bahsedildiği gibi Ser-10 ve Asn-45'e tutunmuştur (14,41). Ser-10 bir glikozaminoglikan zincir taşımaktadır (14,41). Glikozaminoglikan zincirde sülfatlanmadaki farklılığa bağlı olarak üriner bikuninin elektromanyetik alandaki hareketine göre 4 ana izomere sahip olduğu gözlenmiştir (41). Bu glikozaminoglikan zincirin üriner bikuninin, canlı içinde ve dışında, fizikokimyasal, fizyolojik ve biyolojik özelliklerinin korunmasında önemli olduğu düşünülmektedir (41). Aynı zamanda bikuninin moleküler ağırlığı için farklı kaynaklarda farklı rakamlar verilmektedir. Yaklaşık ağırlığı 25-26 kDa olan bikuninin SDS-PAGE'deki (sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi) hareketliliği neticesinde gözlenen ağırlığı 35-45 kDa aralığındadır (14). Bu rakamsal farklılığın temelinde, karbonhidrat

zincirlerin bikunin proteinin SDS-PAGE'deki hareketliliğini güçleştirerek proteini farklı moleküler büyüklüklere denk gelecek şekilde bantlar vermeye zorlaması yatıyor olabilir. Ayrıca farklı bir çalışmada, idrarda, glikozil grubu uzaklaştırılmış olan 25 kDa'luk ve glikozil grubu bulunan 40 kDa'luk bikunin proteinlerinin varlığı gözlenmiş ve 25 kDa ağırlığındaki bikuninin hasta kişilerde daha yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir (42). Glikozil grubu uzaklaştırılmış olan 25 kDa'luk bikuninin renal taş hastalığına yatkınlığı doğurduğu düşünülmektedir (42). Dolayısıyla; bikuninin taşıdığı karbonhidrat yükünün, taş oluşumunun engellenmesinde herhangi bir role sahip olmadığı fikri yaygın kabul gören bir fikir olmasına rağmen çürütülebilir bir fikirdir. Taş oluşumunun engellenmesinde glikoprotein polipeptit yapısının yanı sıra sahip olduğu karbonhidrat yükünün de etkili olabileceği düşünülmelidir.

Bikunin alfa1-mikroglobulin (A1M) proteiniyle aynı gen üzerinden ve ortak bir özendirici bölge ile sentezlenmektedir (17,18,19,20). AMBP (alpha1-mikroglobulin/bikunin precursor) geni 10 ekzondan oluşmaktadır (17,18,19,20). İlk 6 ekzon A1M'i kodlarken son 4 ekzon bikunin kodlamaktadır (17,18,19,20). İki protein yapısal ve işlevsel olarak birbirinden bağımsız iki aileye mensupturlar (13). Bundan dolayı farklı atasal genlerin kaynaşmasıyla bir araya geldikleri düşünülmektedir (17,18,19,20). İki proteinin gen bölgelerini birbirinden ayıran 6ncı intron diğer intronlara nazaran oldukça büyük olup 6,5 kb uzunluğundadır (17,18,19,20). Bu intron içinde tipik özendirici bölge elemanları olan cis-etkili CAAT dizisi ve TATA kutusuna eşdeğer, anlamlı ve karşıt anlamlı ipliklerde, sırasıyla, TATATAT (konum 15744) ve AATATAT (konum 15743) dizileri yer almaktadır (17,20). Ek olarak konum 5629'da poliadenilasyon bölgesine benzer, A1M'e ait GATAAA dizisi bulunmaktadır (20). Aynı zamanda, intron 6 faz 0 grup intronlara dahildir (12). İtron fazları 0, 1 ve 2 olmak üzere 3 tiptir (38). İtron fazlarını belirleyen faktör, her bir ekzon içindeki üçlü nükleotit gruplarının oluşturduğu kodonlardır (38). Şayet bir ekzon biterken kodon yarım kalır ve devamı bir sonraki ekzonla tamamlanırsa o kodonun geride bıraktığı nükleotit sayısı intron fazının numarasını verir (38). Yani faz 0 intron iki ekzonun bir kodonu paylaşmadığı anlamına gelir (38). Alfa1-mikroglobulin bikunin öncü geninde iki geni ayıran intron 6, genin diğer intronlarından farklı olarak faz 0 bir introndur (19). İtron 6'nın bu özelliği, bikunin mRNA sentezinin hücredeki değişikliklerinin kontrol edildiği bir bölge olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca; sağlıklı bireylerde üriner bikunin ve A1M'in sentezi birbiriyle paralel gerçekleşirken taş hastalarında bu birliktelik gözlenememektedir (1). Bikunin sentezindeki artış A1M sentezinde görülmemektedir (1). Bu bilgiler ışığında bikunin geninin intron 6 içinde kendine has bir özendirici bölgeye sahip

olabileceği akla gelmektedir. Aşırı okzalatin zararlı etkilerine maruz kalan renal epitel hücreleri bikunin sentezini bu özendirici bölge üzerinden yapıyor olabilir. Bundan dolayı, 6ncı intron içinde bir özendirici bölge olup olmadığı moleküler tetkikler kullanılarak açıklığa kavuşturulmalıdır. Bu takdirde taş olumu ile muhtemel ilişkisini belirlemek mümkün olacaktır.

Böbrek taşlarında bikuninin yanı sıra inter-alfa-önleyici ailesine mensup ağır zincirler de gözlenmiştir (43,49,50,51). Taş olumunun önleyicisi olan bikunin idrarda serbest halde bulunabildiği gibi inter-alfa-önleyici dahilinde de bulunabilmektedir (49,50,51). Bu durumda inter-alfa-önleyicinin yapısının bozulması ile taş olumu arasında ilişki olduğu düşünülebilir. İnter-alfa-önleyici sentezinin olamaması yüzünden bikunin mRNA'sında artış gözlenmesi muhtemeldir.

Böbrek taşı oluşumunun patogenezi diğer biyolojik mineralizasyon olaylarında olduğu gibi, inflamasyonun önemli role sahip olduğu bir süreç olabilir (9). Bikuninin üyesi olduğu inter-alfa-önleyici, fizyolojik rolü yeni yeni açıklığa kavuşturulan bir proteindir. İnter-alfa-önleyicinin TSG-6 (tumour necrosis factor-stimulated gene-6) ile etkinleştirilen anti-inflamatuar bir ajan olduğu tespit edilmiştir (37). Hücre kültürü çalışmaları neticesinde hücrelerin jel benzeri bir kılıfla örtülü olduğu gözlenmiştir (37). Bu kılıf hyaluronan içermektedir (37). Hyaluronidaz ile muamale edilen hücrelerin kültür ortamına serum eklenip enzim uzaklaştırıldığında, kılıfın kendini yenilediği ortaya çıkarılmıştır (37). Serumda bulunan ve kılıf oluşumu için gerekli olan maddenin inter-alfa-önleyici olduğu tespit edilmiştir (37).

Tümör nekrozis faktör ve interlökin 1 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin düzenlemesiyle çeşitli hücre tiplerinden sentezlenen TSG-6; 35 kDa ağırlıklı bir proteindir (37). Tahriş olmuş doku; hyaluronan, TSG-6 ve inter-alfa-önleyicinin katılımıyla onarılmaktadır (37). Hyaluronan molekülleri hücre yüzey reseptörü olan CD44'e bağlı olarak veya serbest halde bulunurlar (37). İnter-alfa-önleyici ailesine dahil ağır zincirler transesterifikasyonla bu hyaluronan moleküllerine bağlanır (37). Türü bilinmeyen bir bağla TSG-6 da ağır zincirlere bağlanmaktadır (37). Aynı zamanda hyaluronan molekülleri ile TSG-6 kovalent olmayan bir etkileşimle bir arada tutulmaktadır (37). Ağır zincirlerin hyaluronan molekülüne bağlanması bikuninin serbest kalmasına neden olmaktadır (37). Kalsiyum okalat kristalleri renal epitel hücrelerde inflamasyona neden olacak bir hasar oluşturmaktadırlar. Hatta kristal çekirdeğinin büyüebilmek için öncelikle böbreğin iç duvarına tutunması gerekmektedir (3). Kristallerin epitel hücrelere zarar vermesi ve gelişebilmek için uygun ortamı sağlaması neticesinde taş oluşum süreci başlamaktadır. Hal bu iken; inter-alfa-önleyicinin sentezi

gerçekleşmekte ve epitel hasarı ağır zincirlerin katılımıyla onarılmaktadır. Ağır zincirlerden ayrılarak serbest hale geçen bikuninin idrardaki derişimi artacaktır. Bu durumda; taş hastalarının idrarlarında gözlenen bikunin artışının inflamasyon nedeniyle olduğu düşünölebilir. Taş oluşumu sırasında bikuninle birlikte inter-alfa-önleyicinin sentezi gerçekleşmektedir (49,50,51). Renal epitel hücrelerce sentezlenen bikuninin mRNA'sındaki artış inter-alfa-önleyiciye katılmak üzere sentezlenen bikunin nedeniyle olabilir. Ancak üzerinde düşünölmesi gereken bir nokta da şudur ki; hücre her zaman ekonomik davranır ve ürettiğı hiçbir molekülü boşa harcamaz. Dolayısıyla inter-alfa-önleyiciden kılıf onarımı esnasında serbest kalan bikunin proteininin, aynı zamanda, moleküler özellikleri sayesinde, kristalizasyonun önüne geçilmesinde de rol alması şaşırtıcı olmayacaktır. Bu, canlının mükemmeliyetine de yakışır bir durumdur.

Bikuninin CaOx kristalizasyonundaki etkisi çeşitli yöntemlerle araştırılmıştır (50). Yapılan çalışmalarla; bikuninin taş önleyici etkinliğı farklı derişimlerde test edilmiş ve farklı sonuçlar bulunmuştur (50). Bikuninin kristal oluşumunu, 286 nmol/L derişimde %72 oranında; 10 000 nmol/L derişimde %60 oranında engellediğı gözlenmiştir (15,50). Bu çalışmalarda kullanılan protein konsantrasyonu oldukça yüksektir. Ancak 16 nmol/L derişimdeki bikunin, kristalizasyonu sadece %1,1-3,1 oranında engelleyebilmiştir (50). Bu durum; bikuninin kristalizasyon sonucu koruyucu etki gösterebilmesi için, yüksek derişimlere ulaşması gerektiğinin göstergesidir. Renal epitel hücrelerde artan CaOx miktarına cevap olarak bikunin sentezi artmaktadır (1). Ancak bikunin derişiminin yeterli seviyeye ulaşp ulaşmadığı kesin olarak söylenemez. Beslenmenin de idrardaki makromoleküllerin derişimi üzerinde etkili olacağı unutulmamalıdır.

Çeşitli çalışmalarda idrardaki bikunin derişimleri değişik sayılarla ifade edilmektedir (50). Bunlar arasında; 500 nmol/L, 10,13±1,13 µg/mL (280,5 nmol/L), 6,72±0,93 µg/mL (186 nmol/L), 5,01±0,91 µg/mL (208 nmol/L), 4,82±2,46 mg/gün (138 nmol/L) ve 3,86±1,35 mg/gün (110 nmol/L) gibi değerler yer almaktadır (50). Bugüne değin gösterilmiş en düşük üriner bikunin derişimi, idrarda bol miktarda bulunan kreatininin 1 mg'ına karşın 0,25±0,11 µg bikunindir (50). Referans olarak 8-23 mmol/gün kreatinin salınımı alınır ve insanın günde yaklaşık 1 litre idrar ürettiğı varsayılırsa günlük bikunin salınımının ortalaması 0,225 µg/mL (6,42 nmol/L) ve 0,650 µg/mL (18,6 nmol/L) aralığında hesaplanmalıdır (50). Farklı bir çalışmada üriner bikunin derişimi 500 nmol/L olarak hesaplanmıştır (15). Ancak bu değer çok yüksek olup günde 17,5 mg bikunin salınımına eşdeğerdir (50). İdrarda en bol bulunan proteinlerden biri albumindir (50). Albumin idrarda yüksek miktarda

gözlenmesine rağmen 20 mg/L'den daha düşük derişime sahiptir (50). Bu durumda; idrarda albumine nazaran çok az miktarda bulunan bikunin için hesaplanan konsantrasyonun doğruluğu şüphe uyandırmaktadır.

Beslenme, cinsiyet gibi faktörlerin de böbrek taşının oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir (52,53,54). Cinsiyet hormonları taş oluşumunda önemli bir role sahiptir (52). Kadın ve erkek bireyler çocukluk çağındayken CaOx kaynaklı taş hastalığına eşit derecede yatkın olmalarına rağmen erkeklerde taş hastalığı kadınlara nazaran daha yaygındır (52). Bu durum hepatik glikolat oksidaz adlı enzimin testesteron çevrimindeki rolü ile açıklanmaktadır. Hepatik glikolat oksidaz serumdaki testesteron seviyesinde artışa neden olmaktadır (52). Artan testesteron miktarı ise karaciğerin okzalit üretiminde artışa sebep olmaktadır (52). Dolayısıyla, kadın ve çocuklarda düşük miktarda bulunan testesteronun hiperokzaloüriden korunmada etkin olduğu düşünülmektedir (52).

Hiperokzaloüri kalsiyum okzalit oluşumunda önemli bir risk faktörüdür (28). Bitkisel veya hayvansal proteinlerle beslenmeye dayalı olarak okzalit salınımı değişmektedir (53). Kalsiyum okzalit taşı oluşturan bireylere aşırı hayvansal protein alımından sakınmaları önerilmektedir (53). Bu proteinler okzalit metabolizmasına dahil olarak vücut içinde okzalata dönüştürölmektedirler (29). Hiperokzaloüri okzalatin bağırsaklardaki anormal derecede fazla emilimiyle de ortaya çıkar. Bu durumda böbrek tarafından büyük miktarda okzalit salınacaktır. Bu çalışmada kullanılan kanlar Gaziantep ağırlıklı olmak üzere Güneydoğu Anadolu bölgesinde yerleşik olan taş hastalarından toplanmıştır. Yöresel beslenme alışkanlığı ciddi miktarda hayvansal gıdaları içermektedir. Dolayısıyla taş oluşumu beslenmeyle yakından ilişkili olabilir.

C vitamininin fazla miktarda alımı da taş hastalığında etken olmaktadır. Bilindiğı üzere C vitamininin fazlası vücutta depo edilememektedir. Günde 200 mg'dan fazla alınan C vitamini okzalata dönüştürölmekte ve bağırsağı ve idrara salınmaktadır. Bu nedenle taş hastalarına aşırı miktardaki C vitamini alımından sakınmaları önerilmektedir.

Beslenmede kalsiyum sınırlaması ise sadece bazen olumlu sonuç vermektedir. Süt, yoğıurt gibi kalsiyumlu gıdalar nadiren taş oluşumuna neden olmaktadır. İdrardaki okzalit derişiminin kalsiyum derişimine oranla daha ciddi boyutta taş oluşum nedeni olduğu düşünülmektedir (26).

Sofra tuzlarıyla alınan aşırı miktardaki sodyum da taş oluşumunu yönlendirmektedir. Yalnız yaşayan üniversite öğrencileri ve özellikle bekar erkekler beslenmelerinde tuz ile korunan hazır gıdaları tercih etmektedirler. Bu durum bu bireylerin taş hastalığından şikayetçi olmalarına sebep olabilmektedir.

Anlaşıldığı üzere beslenme böbrek taşı oluşumu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu rahatsızlıktan muzdarip kimselerin beslenme alışkanlıkları bilinmeli ve uygulanan diyetin ne ölçüde taş olumunu engellediği gözlenmelidir. Böylelikle bu bireylerdeki taş oluşumunun ne derece kalıtsal olabileceği hakkında fikir sahibi olunup o yönde çalışmalar planlanabilecektir.

Terlemenin de taş oluşum fizyolojisi üzerine etkileri olabilir. Fazla hareket etmeyi gerektiren işlerde çalışan insanlar ve sporcular arasında taş oluşumunun daha yüksek oranlarda olduğu gözlenmiştir. Terlemeye bağlı olarak su kaybı idrarla atılacak su miktarının azalmasını sağlamakta ve idrardaki CaOx gibi katı parçacıkların derişiminde artışa neden olmaktadır. Burada önemli olan nokta şudur ki; CaOx'ın miktarı sabit kalırken derişimi artmaktadır. Bu durumda taş oluşumu; yalnızca, terlemeyle su kaybı sonucu ortaya çıkmış, ailesel veya genetik bir temeli olmayan geçici bir rahatsızlık olarak gelişmiş olabilir. Yaz mevsimi terlemenin yoğun olarak yaşandığı mevsim olması nedeniyle böbrek taşı mevsimi olarak da değerlendirilebilir. Ailesel böbrek taşı hikayesi olmayıp kendiliğinden taş oluşumu gösteren hastaların hangi mevsimde rahatsızlıktan şikayetçi oldukları bu açıdan önemlidir.

Bikunin böbrek taşı oluşumunu önlemede rol alan tek protein değildir. Yapılan çalışmalar osteopontin, Tamm-Horsfall proteini, matriks Gla proteini, nefrokalsin, protrombin fragment 1 ve renal litostatin gibi önleyici proteinlerin de etkin olarak taş oluşumunda rol aldıklarını göstermektedir (7,25). Laboratuvarımızda; bu tezde kullanılan hasta sayısından daha az sayıda hasta kullanılarak osteopontin gen çokyapılılığı üzerine bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir (55,56). Bu çalışma neticesinde, osteopontin yapısal gen bölgesinde, ekzon 7a (Ex7a) ve ekzon 7e'de (Ex7e) SSCP bantlarında farklılığa rastlanmıştır (55). Bu bulgular NCBI veri tabanında yer almayan yeni bulgulardır. Bu durum böbrek taşı oluşumunun engellenmesinde rol sahibi olan proteinlerin genetik yapılarında, işlevlerini etkileyebilecek önemli değişiklikler olabileceğinin göstergesidir. Bikunin ve osteopontin genlerinde yaptığımız çokyapılılık çalışması, böbrek taşı oluşumunun moleküler mekanizmasının anlaşılması için başlatılmış bir çalışmadır. Taş oluşumunu önleyen tüm proteinlerin genetik yapılarının araştırılması ve taş oluşumu üzerindeki etkilerinin gözlenmesi bu yolda önemli ilerlemeler kaydedilmesine neden olacaktır.

Böbrek taşı oluşumunda önemli etkenlerden biri de hastanın üriner sistem anomalisine sahip olmasıdır. Çalışmaya dahil ettiğimiz hastalar arasında üriner sistem anatomisi kusurlu dört birey vardır. Bu bireylerde gözlenen üreterosel, at nalı böbrek ve üreteropelvik darlık gibi anatomik bozukluklar

idrarın akışını güçleştirmekte ve CaOx kristallerinin yığılması neticesinde taş oluşumuna neden olmaktadır. Ancak bu bozukluklar, yapmış olduğumuz çalışmaya katılan 110 hasta bireyden sadece dördünde gözlenmiştir. Dolayısıyla taş oluşumunun anatomik bir temele bağlanması mümkün olmamaktadır. Bu durum; daha önce de değinildiği gibi, taş oluşumunu önlemede etkin rol sahibi tüm önleyici proteinlerin genetik yapılarının incelenmesi gerektiğini açık biçimde ortaya koymaktadır. Bu yolla taş oluşumunun moleküler temelleri büyük çapta açıklığa kavuşmuş olacaktır.

6.KAYNAKLAR

- 1 MEDETOGNON-BENISSAN, J., TARDIVEL, S., HENNEQUIN, C., DAUDON, M., DRÜCKE, T., LACOUR, B.: Inhibitory effect of bikunin on calcium oxalate crystallization in vitro and urinary bikunin decrease in renal stone formers. *Urol Res*, 27:69-75, 1999
- 2 EBISUNO, S., NISHIHATA, M., INAGAKI, T., UMEHARA, M., KOHJIMOTO, Y.: Bikunin prevents adhesion of calcium oxalate crystal to renal tubular cells in human urine. *J Am Soc Nephrol*, 10:S436-S440, 1999
- 3 GRASES, F., SÖHNEL, O.: Mechanism of oxalocalcic renal calculi generation. *International Urology and Nephrology*, 25(3):209-214, 1993
- 4 ATMANI, F.: Characterization of urinary bikunin and its role in urolithiasis. *Reviews in Biology and Biotechnology* 1(2):17-20, 2001
- 5 OKUYAMA, M., YAMAGUCHI, S., YACHIKU, S.: Identification of bikunin isolated from human urine inhibits calcium oxalate crystal growth and its localization in the kidneys. *International Journal of Urology*, 10:530-535, 2003
- 6 IIDA, S., PECK, AB., BYER, KJ., KHAN, SR.: Expression of bikunin mRNA in renal epithelial cells after oxalate exposure. *The Journal of Urology*, 162:1480-86, 1999
- 7 KATSUMA, S., SHIOJIMA, S., HIRASAWA, A., TAKAGAKI, K., KAMINISHI, Y., KOBAYASHI, M., HAGIDAI, Y., MURAI, M., OGHI, T., YANO, J., TSUJIMOTO G.: Global analysis of differentially expressed genes during progression of calcium oxalate nephrolithiasis. *Biochem Biophys Res Com*, 296:544-552, 2002
- 8 KHAN, SR.: Interactions between stone-forming calcific crystals and macromolecules. *Urol Int*, 59:59-71, 1997
- 9 IIDA, S., PECK, AB., JOHNSON-TARDIEU, J., MORIYAMA, M., GLENTON, PA., BYER, KJ., KHAN SR.: Temporal changes in mRNA expression for bikunin in

- the kidneys of rats during calcium oxalate nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol*, 10:986,996, 1999
- 10 ATMANI, F., GLENTON, PA., KHAN, SR.: Role of inter- α -inhibitor and its related proteins in experimentally induced calcium oxalate urolithiasis. Localization of proteins and expression of bikunin gene in the rat kidney. *Urol Res*, 27:63-67, 1999
- 11 MORIYAMA, MT., GLENTON, PA., KHAN, SR.: Expression of inter- α inhibitor related proteins in kidneys and urine of hyperoxaluric rats. *The Journal of Urology*, 165:1687-92, 2001
- 12 FRIES, E., BLOM, AM.: Bikunin-not just a plasma proteinase inhibitor. *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology*, 32:125-137, 2000
- 13 SALIER, JP., ROUET, P., RAGUENEZ, G., DAVEAU, M.: The inter- α -inhibitor family: from structure to regulation. *Biochem J*, 315:1-9, 1996
- 14 KACZMARCZYK, A.: Proteins of the inter- α -inhibitor family. PhD Thesis, Upsala University, 2003
- 15 KOBAYASHI, H., SHIBATA, K., FUJIE, M., SUGINO, D., TERAOKA, T.: Identification of structural domains in inter- α -trypsin inhibitor involved in calcium oxalate crystallization. *Kidney Int*, 53:1727-35, 1998
- 16 XU, Y., CARR, PD., GUSS, JM., OLLIS, DL.: The crystal structure of bikunin from the inter- α -inhibitor complex: A serine protease inhibitor with two kunitz domains. *J Mol Biol*, 276:955-966, 1998
- 17 LINDQVIST, A., ROUET, P., SALIER, JP., AKERSTRÖM, B.: The α 1-microglobulin/bikunin gene: characterization in mouse and evolution. *Gene*, 234:329-336, 1999
- 18 KAUMEYER, JF., POLAZZI, JO., KOTICK, MP.: The mRNA for a proteinase inhibitor related to the HI-30 domain of inter- α -trypsin inhibitor also encodes α 1-microglobulin (protein HC). *Nuc Ac Res*, 14(20):7839-7850, 1986
- 19 VETR, H., GEBHARD, W.: Structure of the human α 1-microglobulin-bikunin gene. *Biol Chem*, 371:1185-96, 1990

- 20 DIARRA-MEHPOUR, M., BOURGUIGNON, J., SESBOULE, R., SALIER, JP., LEVEILLARD, T., MARTIN, JP.: Structural analysis of the human inter- α -trypsin inhibitor light-chain gene. *Eur J Biochem*, 191:131-139, 1990
- 21 ROUET, P., RAGUENEZ, G., TRONCHE, F., YANIV, M., N'GUYEN, C. SALIER, JP.: A potent enhancer made of clustered liver-specific elements in the transcription control sequences of human α 1-Microglobulin/Bikunin gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(29):20765-773, 1992
- 22 RYALL, RL.: The scientific basis of calcium oxalate urolithiasis. *World J Urol*, 11:59-65, 1993
- 23 ATMANI, F., KHAN, S.: Role of Urinary bikunin in the inhibition of calcium oxalate crystalization. *J Am Soc Nephrol*, 10: S385-S388, 1999
- 24 LIESKE, JC., LEONARD, R., SWIFT, H., TOBACK, FG.: Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to anionic sites on the surface of renal epithelial cells. *Am J Physiol*, 270(39): F192-F199, 1996
- 25 DUSSOL, B., BERLAND, Y.: Urinary kidney stone inhibitors. Where are we?. *Nephrol Dial Transplant*, 11:1222-24, 1996
- 26 VERKOELEN, CF., ROMJIN, JC.: Oxalate transport and calcium oxalate renal stone disease. *Urol Res*, 24:183-191, 1996
- 27 WORCHESTER, E.: Inhibitors of stone formation. *Seminars in Nephrology*, 16(5): 474-486, 1996
- 28 KRISHNAMURTHY, MS., HRUSKA, KA., CHANDHOKE, PS.: The urinary response to an oral oxalate load in recurrent calcium stone formers. *The journal of Urology*, 169:2030-33, 2003
- 29 MENON, M., MAHLE, CJ.: Oxalate metabolism and renal calculi. *The Journal of Urology*, 127:148-150, 1981
- 30 BERG, C., TISELUS, HG.: The effect of pH on the risk of calcium oxalate crystallization in urine. *Eur Urol*, 12:59-61, 1986

- 31 BOST, F., DIARRA-MEHRPOUR, M., MARTIN, JP.: Inter- α -trypsin inhibitor proteoglycan family A group of proteins binding and stabilizing the extracellular matrix. *Eur J Biochem*, 252:339-346, 1998
- 32 ATMANI, F., LACOUR, B., STRECKER, G., PARVY, P., DRUEKE, T., DAUDON, M.: Molecular characteristics of uronic-acid-rich protein, a strong inhibitor of calcium oxalate crystallization in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 191(3):1158,1165, 1993
- 33 AKERSTRÖM, B.: Role of α 1-microglobulin in immune response and inflammation. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 30(4):183-186, 1992
- 34 GREVAL JS.: Oxalate inducible AMBP gene and its regulatory mechanism in renal tubular epithelial cells. PhD Thesis, University of Florida, 2004
- 35 KUMAR, V., FARELL, G., LIESKE, C.: Whole urinary proteins coat calcium oxalate monohydrate crystals to greatly decrease their adhesion to renal cells. *The Journal of Urology*, 170:221-25, 2003
- 36 ATMANI, F., KHAN, S.: Role of inter- α -inhibitor and its related proteins in urolithiasis. Purification of an inter- α -inhibitor related protein from the bovine kidney. *Urol Res*, 27:57-61, 1999
- 37 FRIES, E., KACZMARCZYK, A: Inter- α -inhibitor, hyaluronan and inflammation. *Acta Biochimica Polonica*, 50(3):735-742, 2003
- 38 LEVIN, B.: Part 1. In: *Genes VII*, (7th Ed)., Oxford, Oxford University Press, 2000.
- 39 SANCHEZ, D., MARTINEZ, S., LINDQVIST, A., AKERSTROM, B., FALKENBERG, C.: Expression of the AMBP gene transcript and its two protein products, α 1-microglobulin and bikunin, in mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development*, 117:293-298, 2002
- 40 MARENGO SR., RESNICK MI., YANG L., CHUNG JY.: Differential expression of urinary inter- α -trypsin inhibitor trimers and dimers in normal compared to active calcium oxalate stone forming men. *The Journal of Urology*, 159:1444-50, 1998

- 41 YUKI, Y., NOMURA, K., KIRIHARA, M., SHIMOMURA, M., HIRATANI, H., NISHIMURA, R., KATO, K.: Charge isomers of urinary bikunin (trypsin inhibitor). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1203:298-303, 1993
- 42 SUZUKI, M., KOBAYASHI, H., KAGEYAMA, S., SHIBATA, K., MICHIO, F., TERAOKA, T.: Excretion of bikunin and its fragments in the urine of patients with renal stones. *The Journal of Urology*, 166:268-274, 2001
- 43 ATMANI, F., MIZON, J., KHAN, SR.: Identification of uronic-acid-rich protein as urinary bikunin, the light chain of inter- α -inhibitor. *Eur J Biochem*, 236:984-990, 1996
- 44 HAMMES, MS., LIESKE JC., PAWAR S., SPARGO BH., TOBACK FG.: Calcium oxalate monhydrate crystals stimulate gene expression in renal epithelial cells. *Kidney International*, 48:501-509, 1995
- 45 DEVLIN, TM.: Transcription in eukaryotes. In: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, (5th Ed)., Philadelphia, Pennsylvania, 2002, 214-220
- 46 İĞCİ, YZ.: Gebelikte serum arginaz seviyesi ile arginaz gen çokyapılılığı arasındaki ilişkinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, 2004, 35-37.
- 47 SAMBROOK, J., RUSSEL, DW.: *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Vol.2, 2001.
- 48 HUMPHRIES, SE., GUDNASON, V., WHITTAL, R., IAN, NM.: Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clinical Chemistry* 43(3):427-435, 1997
- 49 DAWSON, CJ., GROVER, PK., RYALL, RL.: Inter- α -inhibitor in urine and calcium oxalate urinary crystals. *British Journal of Urology*, 81:20-26, 1998
- 50 DEAN, C., KANELLOS, J., PHAM, H., GOMES, M., OATES, A., GROVER, P., RYALL, R.: Effects of inter- α -inhibitor and several of its derivatives on calcium oxalate crystallization in vitro. *Clinical Science*, 98:471-480, 2000

- 51 DAWSON, CJ., GROVER, PK., KANELLOS, J., PHAM, H., KUPCZYK, G., OATES, A., RYALL, RL.: Inter- α -inhibitor in calcium stones. *Clinical Science*, 95:187-193, 1998
- 52 KHAN, SR.: Animal models of kidney stone formation: an analysis. *World J Urol*, 15:236-243, 1997
- 53 MARANGELLA, M., BIANCO, O., MARTINI, C., PETRARULO, M., VITALE, C., LINARI, F.: Effect of animal and vegetable protein intake on oxalate excretion in idiopathic calcium stone disease. *British Journal of Urology*, 63:348-351, 1989
- 54 RYALL, RL., HARNETT, RM., HIBBERD, CM., MAZZACHI, BC., MAZZCHI, RD., MARSHALL, VR.: Urinary risk factors in calcium oxalate stone disease: comparison of men and women. *British Journal of Urology*, 60:480-488, 1987
- 55 GOGEBAKAN B., ARSLAN A., SARICA K., CANTURK M., IGCI YZ., BUYUKBERBER N., YAGCI F., CAKMAK EA., YURTSEVEN C., GORUCU S.: Osteopontin gene mutation screening with urolithiasis. *European Human Genetic Conference, Munich, Germany*. p 140. 2004
- 56 ARSLAN A., SARICA K., GOGEBAKAN B., YURTSEVEN C., BUYUKBERBER N., YAGCI F., IGCI YZ., CAKMAK EA., BARLAS IO., GORUCU S., KARABEKIR T.: Osteopontin gene polymorphism in patients with familial and sporadic urolithiasis. 2nd Eurolithiasis Society (EULIS) Meeting (10th European Symposium), İstanbul, TURKEY. p 61-62. June 11-14, 2003

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Kilis'te doğdu. İlk ve orta öğrenimini Gaziantep'te tamamladıktan sonra 1998 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2002 yılında mezun oldu. 2002 yılında Ankara Üniversitesi'nde Eğitim Bilimleri alanında Yüksek Lisans eğitime başladı ve 2003 yılında mezun oldu. 2003 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı. İngilizce bilmektedir ve bekardır.