



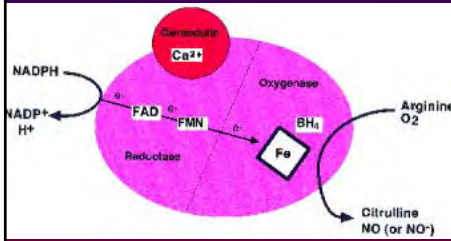
NOS gen polimorfizmleri ve Renal Hastalıklar

Dr.Belgin Alaşehirli
Gaziantep Üniversitesi Tıp
Fakültesi

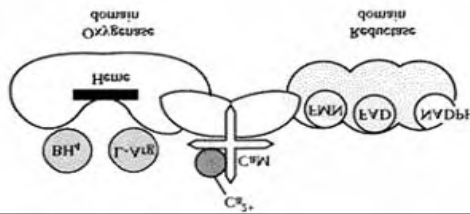


- ✓ NO'nun tanımlanması (*Furchgott, Zawadzki, 1980; Rapoport, Murad, 1983*)
- ✓ eNOS'u kodlayan cDNA izolasyonu (*Janssens, 1992*)
- ✓ eNOS klonlanması ve dizisinin belirlenmesi (*Marsden, 1992, 1993*)
- ✓ eNOS geni kristal yapısının tanımlanması (*Raman, 1998*)

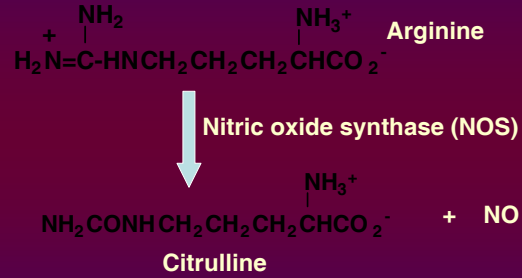
NOS enzimi



Aktif haldeyken 134kd 'luk iki monomerden oluşan dimerik yapıdadır. N terminal oksijenaz bölgesinde (oxygenase domain) hem, BH₄ ve L-arjinin bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. C terminal redüktaz bölgesinde (reductase domain) ise FAD, FMN ve NADPH için bağlanma bölgeleri vardır. Bu iki bölge Ca²⁺/kalmodulin tanıma sahası ile birbirine bağlanmıştır.



Nitrik Oksit sentezi



NOS enzimlerinin

- lokalizasyonları,
- regülasyonları, farklı olan
- katalitik özellikleri,
- inhibitör duyarlılıkları
- farklı genler tarafından kodlanan 3 izoformu vardır.
- Nöronal NOS (nNOS, NOS1)
- İndüklenebilir NOS (iNOS, NOS2)
- Endotelyal NOS (eNOS, NOS 3)

Renal NO

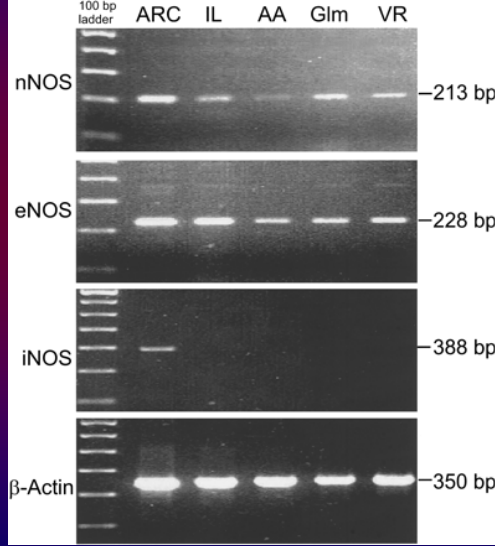
- İlk olarak Biondi ve ark. renal medullada vaza rektanin endotelial hücrelerinde EDRF varlığını göstermiş ve medullanın oksijenasyonunda rol oynadığını bildirmiştir.

Biondi ML, et al. 1990

NOS izoformlarının renal yapılardaki dağılımı

nNOS	iNOS	eNOS
Makula Densa	Medullar kalın çıkan kol	Glomerül
Glomerül	İç medulla toplayıcı tübül	Proksimal tübül
Bazı tübül segmentleri	Distal tübül	Henlenin kalın çıkan kolu
Toplayıcı tübüller	Mezengial hücreler	Korteks ve dış medulladaki toplayıcı tübüller
Perivasküler ve pelvik sinirler	Meduller interstisyel hücreler	

nNOS, eNOS ve iNOS RT-PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri



ARC:Arkuat arter,

IL:İnterlobüler arter

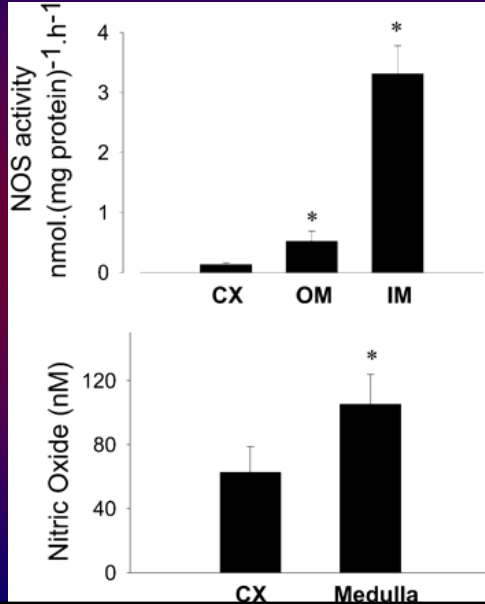
AA:Afferent arter

Gln:Glomerül

VR:Vaza rekta

Mattson,2000.

Renal Bölgesel NOS aktivitesi ve NO konsantrasyonları



CX:renal korteks

OM:dış medulla

IM:iç medulla

NOS aktivitesi renal kortekse göre iç medullada 26 kat,

dış medullada ise 4 kat daha yüksektir.

İn-vivo mikrodializ teknikleri kullanılarak interstiyel sıvı NO konsantrasyonları

renal medullada $105 \pm 18 \text{ nmol/L}$

ve renal kortekste $62 \pm 16 \text{ nmol/L}$

olarak bulunmuştur.

* $p < 0.05$

WuF, 1999

Zou AP, 1997

Renal NO

- **Renal kan akımı**, (Vasküler rezistansın düşük olmasına önemli katkıları bulunmaktadır)
- **Sodyum homeostazı**, (tüm tübüler segmentlerde Na^{+2} reabsorbsiyonunu azaltmaktadır)
- **Arteriyel kan basıncının** akut ve kronik regülasyonunda önemli rol oynamaktadır.

Renal NO

- Kronik L-NAME infüzyonu ile medullar kan akımının azaltılması Na^{+} ekskresyonunda hızlı azalma, Na^{+} retansiyonu ve HT gelişimi ile birlikte. Bu da gösteriyor ki medullada NO yapımının azalması tek başına medullar kan akımını azaltarak HT gelişmesine neden olabilmektedir

Renal NOS

- NOS izoformlarına spesifik inhibitörler kullanılarak yapılan çalışmalar NOS I ve/veya NOS II'den kaynaklanan NO'nun renal medullar kan akımı üzerinde minimal etki yaptığını göstermiştir. NOS III ise hem vaza rekta endotelyumunda hem de medullar kalın çıkan kol ve iç medulla toplayıcı tübüllerin epitelyal hücrelerinde bulunduğundan tübüler sodyum reabsorpsiyonu ve medullar kan akımının her ikisini de etkilemektedir.

Renal NOS

- Makula densada üretilen NO, nNOS'dan kaynaklanmakta ve tübüloglomerüler feed-back aracılığı ile afferent arteriyol direnci, renal kan akımı, GFR ve renin sekresyonunun otoregülasyonunu sağlamaktadır.

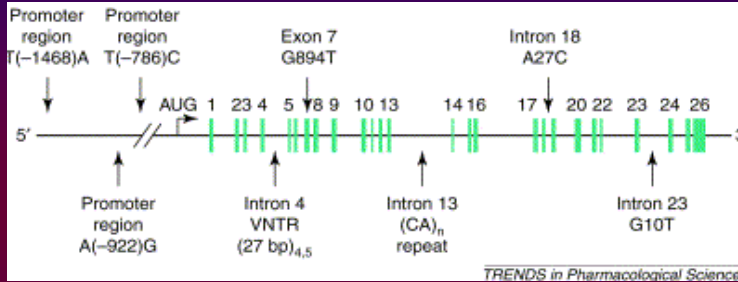
NOS Varyasyonları

- Tek nükleotid deęişimleri (SNP)
- VNTR (variable number of tandem repeats) 10 > nükleotid tekrarı
- STR (Short tandem repeat) 1-4 nükleotid tekrarı

NOS enzimlerinin, lokalizasyonları, regölasyonları, katalitik özellikleri, inhibitör duyarlılıkları farklı olan ve farklı genler tarafından kodlanan 3 izoformu vardır.

NOS izoformları	Gen yapısı ve büyüklüğü	Kromozomal yerleşim	Aa sayısı, protein büyüklüğü
Nöronal NOS (nNOS, NOS1)	29 ekzon, 28 intron, > 200kb	12q24.2- 12q 24.3	1434 aa, 161 kDa
İndüklenebilir NOS (iNOS, NOS2)	26 ekzon, 25 intron, 37 kb	17cen-q11.2	1153 aa, 131 kDa
Endotelial NOS (eNOS, NOS 3)	26 ekzon, 25 intron, 21-22 kb	7q35-7q36	1203aa, 133kDa

eNOS geni polimorfizmleri



-Promoter bölgesinde 3 tane SNP tanımlanmıştır.
Thr786Cys, Ala922Gly, Thr1468Ala

- İntron 4, 27 bp'lik VNTR (4b/4a)
- Ekson 7, missense Glu298Asp
- İntron 13, CA repeat
- İntron 18, Ala27Cys (A-C nukleotid değişimi, SNP)
- İntron 23, Gly10Thr (G-T nukleotid değişimi, SNP)

eNOS geninde fonksiyonel önemi olan ve renal hastalıklarla ilişkisi çalışılmış olan iki önemli polimorfizm

- ❖ **İntron 4 VNTR;**
 - a delesyon alleli, 4 repeat,
 - b insersiyon alleli, 5 repeat
- ❖ **Ekzon 7 Glu298Asp**
 - eNOS geni 7. ekzonunda guanin (G) nukleotidinin timin (T) ile yer değiştirmesi enzim yapısında 298 numaralı glutamat'ın (Glu) aspartat'a (Asp) dönüşmesine neden olmaktadır.
 - Bu polimorfizm ile eNOS geninde 100kDa ve 35 kDa ürünler oluşmaktadır. Sonuçta parçalanmaya eğilimli protein ürünleri oluşmaktadır. Yani bu polimorfizm eNOS proteininde fonksiyonel etki yapmaktadır.
 - Protein dizisinde değişiklik yapan tek polimorfizmdir.

NO veya NOx düzeyleri ve NOS polimorfizmleri arasındaki ilişki

- ✓ İtron 4 a alelline göre homozigot olanlarda NOx düzeyleri yaklaşık %20 daha düşüktür. Ayrıca a alleli taşıyanlarda a alleli taşımayanlara göre plazma NOx seviyeleri anlamlı olarak daha düşüktür. (Tsukada T, 1998)
- ✓ Sağlıklı Türk populasyonunda Glu298Asp polimorfizminin T alleli taşıyanlarda NO düzeyleri anlamlı olarak azalmaktadır (Babaoğlu M.)
- ✓ Glu298Asp polimorfizmi bazal NO salınımını azaltmaktadır (Veldman BA, 2002)

NO veya NOx düzeyleri ve NOS polimorfizmleri arasındaki ilişki

- ✓ Glu298Asp polimorfizmi T alleli taşıyanlarda Nox düzeyleri anlamlı olarak yüksektir (Yoon YM, 2000)
- ✓ Aynı çalışmada intron 4 VNTR ve intron 23 G10-T polimorfizmleri ile NOx düzeyleri arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır.
- ✓ Moon ve ark çalışmalarında ise sağlıklı Kore populasyonunda Glu298Asp polimorfizmi ile plazma NO seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

eNOS geni intron 4 VNTR polimorfizminin çeşitli popülasyonlarda hastalıklarla olan ilişkisi

Genetik Varyant	Hastalık/ popülasyon	İstatistiksel ilişki
VNTR (27bp) İntron 4	-HT, (Japon, Kafkas)	(-)
	-CAD, (Japon, Kafkas)	(+)
	-MI , (AfroAmerikan) (Japon), (Kore)	(+)
	-Primer GN, IgA nefropatisi (Japon, Kafkas)	(-)
	-ESRD (Japon)	(+)
	-Derin ven trombozu (Türk)	(-)
	-CVD, stroke (Türk)	(+)

eNOS geni glu298asp polimorfizminin çeşitli popülasyonlarda hastalıklarla olan ilişkisi

Genetik Varyant	Hastalık/ popülasyon	İstatistiksel ilişki
Glu298Asp (Ekzon 7)	-CAD (Kafkas)	(-)(+)
	Japon	(+)
	-HT (Kafkas)	(-)
	Japon	(+)
	-MI ((Kafkas)	(-)(+)
	Japon	(-)(+)
	-Preklampsi (Japon)	(+)
	-CVD (Türk)	(+)

eNOS gen 4a/b polimorfizmi ve renal hastalıklarla ilişkilerini araştıran alışmalar

Hasta grubu	Sonuç	Referans
Tip 1 diyabet + nefropati (n=)	(+)	<i>Asakimori Y, 2001</i>
Non-diyabetik ESRD (n=302)	(+) (p=0.02)	<i>Wang Y, 1999</i>
Membranöz GN n=117)	(-)	<i>(Stratta P, 2004)</i>
Tip 2 diyabet + nefropati (n=123)	(-)	<i>(Shimizu S, 2002)</i>
Tip 1 DM + nefropati (n=152)	(+) (p=0.004)	<i>(Zanchi A, 2000)</i>
DM+nefropati (n=102)	(-)	<i>Fujita H, 2000)</i>
Tip 2 DM+nefropati (n=133)	(+)(p=0.0423)	<i>(Neugebauer S, 2000)</i>
ESRD (diyabetik ve non-diyabetik) (n=706)	(+) (p=0.003)	<i>(Buraczynska P, 2004)</i>

eNOS gen glu298asp veT786C polimorfizmlerinin renal hastalıklarla ilişkilerini araştıran alışmalar

Varyant	Hasta grubu	Sonuç	Referans
Glu298asp GTgenotip	Tip 2 DM+nefropati ve kötü prognoz (n=177)	(+) p<0.005	<i>(Shin SY, 2004)</i>
	Diyabetik ve non-diyabetik ve KGN ESRD hastalarda (n=159)	(+) P=0.0001, 0.0019 ve 0.0021	<i>(Suzuki H, 2000)</i>
	Tip 2 DM+ESRD	(+) (p=0.002)	<i>(Noiri E, 2002)</i>
	Tip 1 DM+nefropati	(-)	<i>)(Zanchi A, 2000)</i>
T-786-C, C alleli	Diyabetik ve non-diyabetik ESRD (n=252)	(+)	<i>Asakimori Y, 2002</i>
	Tip 1 DM+nefropati	(+)	<i>Zanchi A, 2000)</i>

Amaçlar

- Minimal lezyon hastalığı nefrotik sendrom, akut proliferatif glomerulonefrit, Henoch Schonlein purpurası gibi renal patolojiler çocuklarda sıklıkla görülmektedir.
- Bu hastalıklarda L-arginin-NO yolağının rolü tam olarak açık değildir. Ancak, çeşitli çalışmalarda NS ve lupus nefrit'i olan hastalarda serum ve idrar NOx düzeyleri yüksek bulunmuştur.

Amaçlar

- Çalışma gruplarımızdan birisi NS'lu hastalardır.
- **Nefrotik Sendrom**, ağır proteinüri ($>40\text{mg}/\text{m}^2/\text{saat}$)
- Hipoproteinemi,
- Hiperlipidemi,
- Ödem'le karakterizedir.
- Çocuklarda en sık görülen MCNS'dir.
- Fokal segmental glomeruloskleroz,
- Proliferatif glomerulonefritler (membranoproliferatif, diffüz mezengial, kreşentik)
- Membranöz nefropatiler

Amaçlar

- Diğer çalışma grubumuz akut proliferatif glomerulonefrit ve akut nefritik sendromla seyredabilen Henoch Schonlein purpurası ve akut postenfeksiyöz glomerulonefritlerdir.

DNA izolasyonu, PCR

- Periferik kandan tuzla çöktürme yöntemi ile DNA analizi (Miller SA, 1988)
- PCR, DNA üzerinde incelenmesi istenen bölgenin oligonükleotid primerler kullanılarak çoğaltılmasıdır. Bu yöntemde,
- denatürasyon ile çift zincirin birbirinden ayrılması,
- primerlerin ayrılmış olan DNA zincirlerine bağlanması,
- hedef bölgenin DNA polimeraz enzimi tarafından sentezlenmesi
- gerçekleşmektedir.
- Bu aşamalar 30-35 kez tekrarlanmaktadır (Bottema CD, 1993).

eNOS PCR içeriđi

• <u>PCR</u>	<u>son konsantrasyon</u>
• 10X Buffer	1X (Fermentas)
• MgCl ₂	1.5mM (Fermentas)
• dNTPs	0.05mM (Sigma)
• Primer F	0,5 pmol
• Primer R	0,5 pmol
• Taq DNA Polimeraz	0,02 U(Fermentas)
• DNA	2 ng
• ddH ₂ O ile 25 µl 'ye tamamlandı	

eNOS PCR kořulları

94 °C	5'	
<hr/>		
94 °C	1'	
66 °C	1'	35 döngü
72 °C	45"	
<hr/>		
72 °C	7'	

Jel Elektroferez

- PCR ürünlerinin gözlenebilmesi için %2'lik agaroz jel hazırlandı:
- Agaroz.....2 gram
- TE (Tris-EDTA) Tampon.....100 mililitre
- Etidyum bromür.....2 mikrolitre

20 dk 120 V akım uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Örneklerin doğru büyüklükte olup olmadıklarını kontrol etmek için 100bp DNA marker (Fermentas) kullanıldı. Etidyum bromür ile boyanan bantlar UV altında incelendi.

Ban I ve MboI endonükleazlar ile kesim reaksiyonu

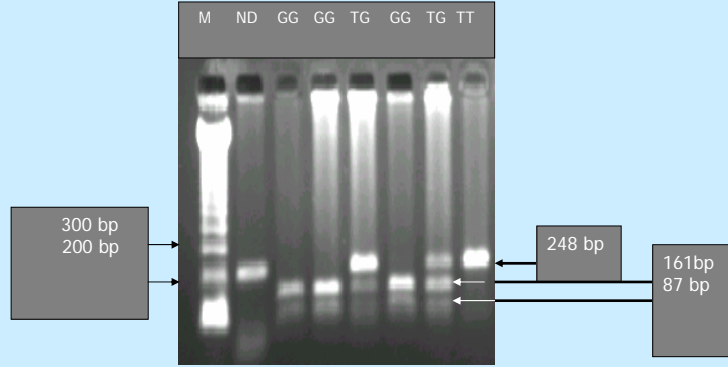
- 10 X Tampon
- Ban I /MboI kesim enzimi 0.5 U
- PCR ürünü 10 ml
- distile su ile 20 ml'ye tamamlandı.
- Bu şekilde hazırlanan kesim reaksiyon tüpleri 37° C'de 15-16 saat inkübe edildi. Kesim ürünleri %3'lük agaroz jelde elektroforez işlemine maruz bırakıldıktan sonra UV'de fotoğrafları çekildi.

Ban I I

- BanI I enzimi için kesim bölgesi içeren homozigot bireylerde (GG)161 ve 87 baz-çiftlik iki ayrı bant gözlemlendi. Heterozigot bireylerde ise (GT) 248, 161 ve 87 baz çift uzunluğunda 3 bant gözlemlendi. BanI I enzimi için kesim bölgesi içermeyen bireylerde (TT) sadece 248 baz çift uzunluğunda bant gözlemlendi.

- BanI I enzimi ile kesim reaksiyonuna maruz bırakılan örneklerden TT genotipine sahip olanlar kontrol amacı ile Mbol enzimi ile kesim reaksiyonuna maruz bırakıldılar. Mbol enzimi T alleli olduğunda bu ürünü 158. bazdan kesmektedir. Mbol enzimi için kesim bölgesi içeren homozigot bireylerde (TT) 158 ve 90 baz çiftlik iki ayrı bant gözlemlendi. Heterozigot bireylerde (TG) ise 248, 158 ve 90 baz çift uzunluğunda 3 bant gözlemlendi. Mbol enzimi için kesim bölgesi içermeyen bireylerde (GG) sadece 248 baz çift uzunluğunda bant gözlemlendi.

eNOS glu298Asp polimorfizmi jel elektroforez görüntüleri



Sonuçlar

Populasyonlar arasında eNOS glu298asp genotip dağılımları

	GG (%)	GT (%)	TT (%)	Referans
Kore n=411	79.6 89.9	19.5 10.1	9 0	<i>Moon, 2002</i> <i>Shin SY, 2004</i>
İspanyol n=117	36	46	17	<i>Gonzales-Gay MA, 2004)</i>
USA (Cambridge)	47.8	42	10.2	<i>Aroon D, 1999</i>
Japon n=270 n=128	92.6 85.9	6.7 14.1	0.7 0	<i>Suzuki H</i> <i>Yoon Y, 2000</i>

Türk toplumunda eNOS glu298asp genotip dağılımları

GG	TG	TT	
68.7	28.9	2.4	Berdeli A, 2005
49.3	41.3	9.3	Afrasyap L, 2004
66.0	22.0	12	Alaşehirli B, 2005

Akut proliferatif glomerulonefrit (APGN)'li hasta ve kontrol gruplarında eNOS glu298asp genotip dağılımları

Genotip	APGN n=21 (%)	Kontrol n=90 (%)
TT	2 (10)	15 (16.6)
TG	1 (5)	28 (31.1)
GG	18 (85)	47 (52.2)

Nefrotik sendrom hasta ve kontrol grupları eNOS glu298asp genotip dağılımları

Genotip	NS n=68 (%)	Kontrol n=90 (%)	p	Odds ratio CI 95%
TT	20 (29)	15 (16.6)	0.04	2.0830.97 30-4461
TG	16 (47)	28 (31.1)	0.1	0.68130.3 328-1.395
GG	32 (24)	47 (52.2)	0.3	0.81320.4 327-1528

Sonuç

Böbrekte sentezlenen NO, tübüler yapılarda ve vasküler yapılarda fizyolojik olarak renal kan akımı, bölgesel mikrosirkülasyon ve Na⁺ homeostazında rol oynamaktadır.

NS

- minimal lezyon hastalığı çocuklarda, membranöz glomerülo nefrit, minimal lezyon hastalığı ve fokal segmental glomerüloskleroz ise erişkinlerde nefrotik sendromun en önemli sebeplerindedir. Nefrotik düzeyde proteinüriye sebep olan bütün durumlarda asıl anormallik glomerüler geçirgenliğin artmasıdır.

NS

- Glomerüler geçirgenliği artıran neden tam bilinmemesine rağmen çeşitli faktörler suçlanmaktadır. NO gibi vasküler düzeyde bazı vazoaaktif mediyatörlerin proteinüriyi artırabileceğine dair çalışmalar bildirilmekle birlikte NO'nun nefrotik sendromdaki kesin rolü ve prognostik değeri bilinmemektedir.

HSP ve APGN

- Gerek HSP ve gerekse APGN'de renal tutulumun derecesi bireylere göre oldukça farklı olmaktadır. Klinik bulgular mikroskopik hematüriden ağır nefritik-nefrotik sendroma kadar değişen geniş bir spektrum oluşturmaktadır. HSP'de endotelial disfonksiyon oldukça önemlidir. İşlek ve ark. çalışmalarında HSP'li hastalarda NOx düzeylerinin hastalığın akut fazında yüksek, iyileşme döneminde ise kontrollerle benzer olduğunu göstermişlerdir. Bu patolojide NO yolağının rolü (hastalığın nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu) bilinmemekte, ancak bir şekilde rol oynadığı düşünülmektedir.

- Renal biyopsilerde, proliferatif tipteki lupus nefriti ve IgA nefropatisi'nde glomerülde iNOS ve eNOS pozitif hücreler saptanmıştır.
- IgAN ve LN'de eNOS ekspresyonu glomerüler hasarın derecesi ile negatif korele, iNOS ise pozitif koreledir.
- Deneysel çalışmalarda da eNOS inhibe edildiğinde GN şiddeti (inflamasyon ve renal hasar) artmaktadır.
- Yani; Normal ve hasta glomerüler endotelial hücrelerde eNOS tarafından NO sentezlenmektedir

- Diğer taraftan glomerulonefritler yoğun inflamasyon, iNOS indüksiyonu ve NO salınımında artma ile birlikte dir.
- Yani; iNOS ve eNOS farklı mekanizmalarla glomerüler hasara katkıda bulunmaktadır.

- eNOS genindeki polimorfizmlerin hastalık riski ve/veya prognozun kötü olması üzerindeki etkileri konusunda çeşitli yorumlar yapılabilir. Şöyleki; bu polimorfizmler eNOS'un kompleks posttranslasyonel modifikasyonunu etkileyerek veya protein degradasyonunu artırarak düşük enzimatik aktivite ve endotelial disfonksiyona neden olabilir, veya başka bir deyişle NO sentezinde defekt ve buna bağlı olarak NO düzeylerinin azalmasına yol açarak renal vasküler tonusun artması ve angiotensin II etkilerinin potansiyalize olması ile renal patolojilere neden olabilir.

- Ancak, bir çok hastalıkta olduğu gibi renal patolojilerin de multifaktöryel olduğu ve NO aktivitesinin patoloji gelişimine bir katkıda bulunuyor olabileceği de düşünölebilir.

- Stratta ve ark. renin-anjiotensin sistemine ait genler ve NOS geni polimorfizmleri ile membranöz glomerulonefrit progresyonu arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında ACE I/D polimorfizmi, eNOS 4b/a polimorfizmi ve anjiotensinojen (AGT) M235T polimorfizmini incelenmişlerdir. Membranöz glomerulopati ve eNOS geni intron 4 VNTR polimorfizmi arasında tek başına anlamlı bir ilişki bulunamazken, ACE I/D polimorfizminin D alleli, NOS 4 b/a polimorfizminin a alleli, ve AGT M235T polimorfizminin T alleli birlikte olduğuunda riskin arttığını göstermişlerdir.

Böbrekte tübüler ve vasküler yapılarda yoğun olarak bulunan eNOS'un genotipik varyantlarının dağılımının bilinmesi gerek hastalığa yatkınlık gerekse prognoz ve tedavi yanıtlarının değerlendirilmesi açısından önemlidir. eNOS polimorfizmlerinden intron 4a/b polimorfizmi ve glu298asp polimorfizmi tip1 ve tip2 diyabetik hastalarda, ADPKD, SLE gibi hastalıklarda renal tutulumun varlığı ve şiddeti, kötü prognoz ve ESRD'ye gidiş ile ilişkili bulunmuştur.

-

- Bu nedenle eNOS geni renal hastalıklarda aday genlerden birisi olabilir. Bu çalışmalarla yüksek sayıdaki hasta ve kontrol grupları ile renal tutulumla seyredabilen sistemik hastalıklar ve primer renal patolojilerde kliniğin şiddeti, prognoz ve tedavi cevapları konusunda yorum yapılabilecek ve yeni bakış açıları kazanılabilecektir.

Hedefler

- Bu çalışmalar primer renal patolojileri olan ve kronik bir hastalığa bağlı olarak gelişen nefropatiler ve/veya diğer komplikasyonlara sahip olan hasta gruplarında (diyabetik nöropati gibi) devam edecektir.
- eNOS glu298asp varyantının yanı sıra böbrek fizyolojisinde önemli rolü olduğu düşünülen nNOS'a ait polimorfizmlerin araştırılmasına başlanılmıştır.

- Çalışmalarım sırasında benimle birlikte olan çalışma arkadaşlarım Prof.Dr.Ayşe Balat ve Öğr.Gör.Dr.Sibel Oğuzkan'a destek ve yardımlarından dolayı,
- Çalışma koşullarımı sağlayan Farmakoloji Ab.Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarıma

teşekkür ederim