

**KRONİK BÖBREK HASTALIĞINDA
KLOTHO ve VDR GENİ POLİMORFİZMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Kuyuş HEKİMLER ÖZTÜRK

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Saliha Handan YILDIZ**

Tez No: 2012-011

2012-Afyonkarahisar

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KRONİK BÖBREK HASTALIĞINDA
KLOTHO ve VDR GENİ POLİMORFİZMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Kuyaş HEKİMLER ÖZTÜRK

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Saliha Handan YILDIZ

**Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından BAP 10.TIP.24
proje numarası ile desteklenmiştir**

Tez No: 2012-011

2012- AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez savunması tarihi: 14/12/2012



Prof.Dr.Davut GÜL
Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Jüri Başkanı



Doç.Dr.Mehmet Ali SÖZEN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye



Doç.Dr.Şeref YÜKSEL
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye



Yrd.Doç.Dr.Saliha Handan YILDIZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Danışman



Yrd.Doç.Dr.Müjgan Ö. ERDOĞAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Doktora programı öğrencisi Kuyaş HEKİMLER ÖZTÜRK'ün “**Kronik Böbrek Hastalığında KLOTHO ve VDR geni Polimorfizmlerinin Araştırılması**” başlıklı tezi 19.12.2012 günü saat 11:00 de Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof.Dr.Kağan ÜÇOK
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde ve sonuca ulaştırılmasında ilgi ve yardımını gördüğüm danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Saliha Handan YILDIZ'a, bu aşamaya gelmemde büyük emekleri olan, yolumu aydınlatan, desteğini her zaman hissettiğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Necat İMİRZALIOĞLU'na, çalışmalarım için gerekli ortamı sağlayan Anabilim Dalı Başkanım Prof. Dr. Mustafa SOLAK'a, tezin klinik aşamasında her türlü desteğini gördüğüm Doç. Dr. Serap DEMİR ve asistanlarına, çalışma azmini her zaman örnek aldığım ve her konuda yanımda olan hocam Yrd. Doç. Dr. Yasemin SOYSAL'a, ünite sorumlum Yrd. Doç. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN'a, biyokimyasal parametrelerin çalışılmasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Tülay KÖKEN ve Bio. Keriman ÖZUĞUR'a, istatistik çalışmalarımın yapılmasında değerli destekleri ve katkılarını gördüğüm Prof. Dr. İsmet DOĞAN'a; Sevgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Oğuz ÖZTÜRK'e ve tüm stresimi alan, hayatımın anlamı, yaşama sevincim, biricik kızımız Ela ÖZTÜRK'e;

Her zaman olduğu gibi tezim konusunda da yardımlarını gördüğüm dostlarım Yrd. Doç. Dr. Asuman ÖZGÖZ, Arş. Grv. Fadime MUTLU İÇDUYGU ve içten desteğini her zaman hissettiren değerli ağabeyim Yrd. Doç. Dr. M. Galip İÇDUYGU'ya;

Yıllardır iş yükümüzü alan bölüm sekreterimiz Burçin BİLİM ve bölümümüz tüm Öğretim Elemanlarına;

Beni bugünlere getiren, sevgiyle, sabırla her zaman, maddi manevi desteklerini esirgmeden yanımda olan, mutluluğumun ve huzurumun en büyük kaynakları canım annem, babam, kardeşlerim ve tüm aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bu tezi BAP 10.TIP.24 proje numarası ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kronik Böbrek Hastalığı	1
1.1.1. Kronik Böbrek Hastalığının Evrelerinin Tanımlanması ve Sınıflandırılması.....	2
1.1.2. Kronik Böbrek Hastalığının Prevalansı	4
1.1.3. Kronik Böbrek Hastalığının Etiyolojisi.....	5
1.1.4. Kronik Böbrek Hastalığı ve Osteoporozis	6
1.1.4.1. Kronik Böbrek hastalığı ve Osteoporoziste Kemik Değişimlerinin Tanısı	7
1.2. <i>KLOTHO</i> Geni ve Fonksiyonları	8
1.2.1.1. Membran Klotho Proteininin Fonksiyonu	11
1.2.1.1.1. FGF23 için ko-reseptör olan Klotho	11
1.2.1.1.2. Klotho ve FGF23 aracılı kemik-böbrek endokrin eksenini.....	12
1.2.1.2. Salgılanan Klotho Proteininin Fonksiyonu	13
1.2.1.2.1. İyon Kanal Aktivitesinin Düzenlenmesi	13
1.2.1.2.2. Büyüme Faktörü Sinyalinin Düzenlenmesi	14
1.2.2. Klotho ve Kronik Böbrek Hastalığı	15
1.3. Vitamin D ve Vitamin D Reseptör (VDR) Fonksiyonları	17
1.3.1. Vitamin D Reseptör Gen Yapısı	18
1.3.2. <i>VDR</i> Geninin Fonksiyonu	19
1.3.3. <i>VDR</i> Geni Polimorfizmleri.....	19
1.3.4. <i>VDR</i> Geni ve Kronik Böbrek Hastalığı.....	20
1.3.5. <i>VDR</i> Geni ve Kemik Biyolojisi.....	21
1.4. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri.....	23
1.5. DNA Dizi Analizi	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	25
2.1. Hasta ve Kontrol Grupları.....	25
2.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	26
2.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler.....	27
2.4. Kullanılan Solüsyon ve Tamponların Hazırlanması	29
2.5. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	30
2.6. <i>KLOTHO</i> Geni için PCR Koşulları.....	31
2.7. <i>KLOTHO</i> Geni için PCR Temizleme.....	33
2.8. <i>KLOTHO</i> Geni Dizi Analizi.....	34
2.9. <i>VDR</i> Geni için PCR Koşulları.....	36
2.10. %2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması	37
2.11. Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Kontrolünün Yapılması.....	37
2.12. Enzim Kesimi.....	37

2.12.1. <i>VDR</i> Geni ApaI Polimorfizmi için ApaI Enzim Kesimi.....	37
2.12.2. <i>VDR</i> Geni TaqI Polimorfizmi için TaqI Enzim Kesimi.....	38
2.13. İstatistiksel Değerlendirme.....	39
3. BULGULAR	40
3.1. <i>VDR</i> Geni Polimorfizmlerinin Genotiplendirilmesi.....	40
3.2. <i>KLOTHO</i> Geni Polimorfizmlerinin Genotiplendirilmesi.....	47
4. TARTIŞMA	56
4.1. <i>KLOTHO</i> Geni Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi.....	56
4.2. <i>VDR</i> Geni Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi.....	61
5. SONUÇ	66
ÖZET	67
SUMMARY	68
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ	85

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KBH	: Kronik Böbrek Hastalığı
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Değeri
K/DOQI	: Böbrek Hastalığı Sonuçları Kalite İnisiyatifi
SDBY	: Son Dönem Böbrek Yetmezliği
NHANES III	: Üçüncü Ulusal Sağlık ve Beslenme İncelemesi Anketi
FGF23	: Fibroblast Büyüme Faktörü-23
PTH	: Paratiroid Hormon
VDR	: Vitamin D reseptör
DEXA	: Çift Enerjili X Işını Absorbsiyometrisi
UTR	: Translasyonu yapılmayan bölge
KMD	: Kemik Mineral Dansite
NaPi-2a	: TipII Sodyum-Fosfat Taşıyıcısı
TRPV5	: Geçici reseptör potansiyel katyon kanalı, subaile 5, eleman 5
ROMK1	: Renal Dış Medullar Potasyum Kanalı
IGF-I	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I
IL-2	: İnterlökin-2
sHPT	: Sekonder Hiperparatiroidizmin
TNP	: Tek Nükleotid Polimorfizm
DNA	: Deoksiribonükleik asit
RFLP	: Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
A	: Adenin
G	: Guanin
C	: Sitozin
T	: Timin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: Kronik böbrek hastalığının başlama ve progresyon evreleri ve terapötik önlemler.....	3
Şekil 1.2: <i>KLOTHO</i> geninin kromozom13q12'deki lokalizasyonu.....	9
Şekil 1.3: Klotho protein yapısının şematik diagramı.....	9
Şekil 1.4: <i>KLOTHO</i> geni, transkriptleri ve proteinleri gösteren şema.....	10
Şekil 1.5: Kromozom 13q12 üzerinde <i>KLOTHO</i> polimorfizm dizilerinin haritası...	17
Şekil. 1.6: <i>VDR</i> geninin kromozom 12q13.11' deki lokalizasyonu.....	18
Şekil 1.7: <i>VDR</i> geninin ekzon-intron yapısı ve bilinen polimorfizmlerin yerleşimi..	20
Şekil 3.1.1: <i>VDR</i> geni ApaI polimorfizmi, 740 bç'lik amplifikasyon ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	41
Şekil 3.1.2: <i>VDR</i> geni ApaI polimorfizmi, 740 bç'lik amplifikasyon ürününün ApaI enzimi ile yapılan kesim sonuçlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	41
Şekil 3.1.3: <i>VDR</i> geni TaqI polimorfizmi, 740 bç'lik amplifikasyon ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	43
Şekil 3.1.4: <i>VDR</i> geni TaqI polimorfizmi, 740 bç'lik amplifikasyon ürününün TaqI enzimi ile yapılan kesim sonuçlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	43
Şekil 3.2.1: <i>KLOTHO</i> geni C1818T polimorfizmi, 401 bç'lik amplifikasyon ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	48
Şekil 3.2.2: <i>KLOTHO</i> geni C1818T (rs564481) polimorfizmi 28 nolu kontrole ait homozigot CC genotipini gösteren sekans grafiği.....	48
Şekil 3.2.3: <i>KLOTHO</i> geni C1818T (rs564481) polimorfizmi 13 nolu kontrole ait heterozigot CT genotipini gösteren sekans grafiği.....	48
Şekil 3.2.4: <i>KLOTHO</i> geni C1818T (rs564481) polimorfizmi 70 nolu hastaya ait homozigot TT genotipini gösteren sekans grafiği.....	49
Şekil 3.2.5: <i>KLOTHO</i> geni G395A polimorfizmi, 421 bç'lik amplifikasyon ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	50
Şekil 3.2.6: <i>KLOTHO</i> geni G395A (rs1207568) polimorfizmi 192 nolu hastaya ait homozigot GG genotipini gösteren sekans grafiği.....	51
Şekil 3.2.7: <i>KLOTHO</i> geni G395A (rs1207568) polimorfizmi 186 nolu hastaya ait heterozigot GA genotipini gösteren sekans grafiği.....	51
Şekil 3.2.8: <i>KLOTHO</i> geni G395A (rs1207568) polimorfizmi 193 nolu hastaya ait homozigot AA genotipini gösteren sekans grafiği.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1.1. Kronik böbrek hastalığının tanımlanması, evrelendirilmesi, prevalansı ve eylem planı	4
Tablo 3.1.1. Hasta ve kontrol gruplarında <i>VDR</i> geni ApaI A/C polimorfizmi için genotip dağılımı	42
Tablo 3.1.1.1 ApaI polimorfizminin genotip ve allel frekansları	42
Tablo 3.1.2. Hasta ve kontrol gruplarında <i>VDR</i> geni TaqI C/T polimorfizminin genotip dağılımı	44
Tablo 3.1.2.1. TaqI polimorfizminin genotip ve allel frekansları	44
Tablo 3.1.3. Kronik böbrek hastalarında hipertansiyon durumunun <i>VDR</i> geni genotipleriyle ilişkisinin değerlendirilmesi	45
Tablo 3.1.4. Kronik böbrek hastalarında diyabet durumunun <i>VDR</i> geni genotipleriyle ilişkisinin değerlendirilmesi	45
Tablo 3.1.5. PTH düzeyinin <i>VDR</i> geni genotipleriyle ilişkisinin değerlendirilmesi ..	46
Tablo 3.1.6. Kronik böbrek hastalarında Sol Ön Kol/SA kemik mineral dansite ölçümleri ile <i>VDR</i> geni genotipleri arasındaki ilişkisinin değerlendirilmesi	47
Tablo 3.2.1. Hasta ve kontrol gruplarında <i>KLOTHO</i> geni C1818T C/T polimorfizmi için genotip dağılımı	49
Tablo 3.2.1.1. C1818T polimorfizminin genotip ve allel frekansları	50
Tablo 3.2.2. Hasta ve kontrol gruplarında <i>KLOTHO</i> geni G395A G/A polimorfizmi için genotip dağılımı	52
Tablo 3.2.2.1. G395A polimorfizminin genotip ve allel frekansları	52
Tablo 3.2.3. Kronik böbrek hasta grubunda hipertansiyon durumunun <i>KLOTHO</i> geni genotipleriyle ilişkisinin değerlendirilmesi	53
Tablo 3.2.4. Kronik böbrek hasta grubunda diyabet durumunun <i>KLOTHO</i> geni genotipleriyle ilişkisinin değerlendirilmesi	53
Tablo 3.2.5. Kronik böbrek hastalarında parathormon düzeyinin <i>KLOTHO</i> geni genotipleriyle ilişkisinin değerlendirilmesi	54
Tablo 3.2.6. Son Ön Kol/SA kemik mineral dansite ölçümleri ile <i>KLOTHO</i> geni genotipleri arasındaki ilişkisinin değerlendirilmesi	55

1. GİRİŞ

1.1. Kronik Böbrek Hastalığı

Kronik böbrek hastalığı (KBH), glomerüler filtrasyon değerinde (GFR) azalmanın sonucu böbreğin sıvı-solüt dengesini ayarlama ve metabolik-endokrin fonksiyonlarında kronik ve ilerleyici bozulma hali olarak tanımlanabilir (Akpolat ve ark., 1996). Kronik böbrek hastalığının neticesinde böbrek yetmezliğine ilave olarak azalmış böbrek fonksiyonu ve kardiyovasküler hastalıklar da görülmektedir. Şu an ki kanıtlar, bu kötü sonuçların bazılarının önlenebileceğini ya da erken tanı ve tedavi ile geciktirilebileceğini göstermiştir (Levey ve ark, 2003). Kronik böbrek hastalığının tanı ve tedavisinin erken evrede yapılamaması birçok nedene bağlıdır. Genelde herkesin bir tanım ve sınıflamayı kabul etmemesi ve erken teşhis için gereken basit testlerin standart olarak uygulanmaması bu nedenlerin başında gelmektedir (McClellan ve ark., 1997; Obrador ve ark., 1999; Coresh ve ark., 2001)

Nefrologlar tarafından kılavuz kitap olarak kabul edilen Böbrek Hastalığı Sonuçları Kalite İnisiyatifi (K/DOQI)'nde KBH tanımı için 2 kriter belirlenmiştir (KDOQI, 2002). Bunlar;

1. GFR azalsın ya da azalmasın, 3 ay ve daha uzun süre devam eden böbreğin yapısal veya işlevsel bozukluğuna bağlı kan ve idrar kompozisyonunda anormallik, görüntüleme testlerinde anormallik, böbrek biyopsisinde anormallik bulgularından bir veya daha fazlasının olması.

2. GFR'nin 3 ay ve daha uzun süre ile 60 ml/dk/1.73m²'den az olmasıdır.

Kronik böbrek hastalığında, GFR'deki azalmanın süresi 3-6 aydan daha uzundur. GFR, genellikle yıllar içinde giderek azalır ve bu azalma, altta yatan nedene göre değişiklik gösterir. Böbrek yetersizliği olan bir olguda; üç aydan uzun süren azotemi, uzun süreli üremik belirti ve bulgular, renal osteodistrofi, anemi, hiperfosfatemi, hipokalsemi, idrar sedimentinde geniş silendirler ve radyolojik incelemelerde

bilateral küçük böbrekler kronik hastalık göstergeleridir. Bu özellikler KBH'nı akut böbrek yetmezliğinden ayırmaktadır (Akoğlu ve Süleymanlar, 1996).

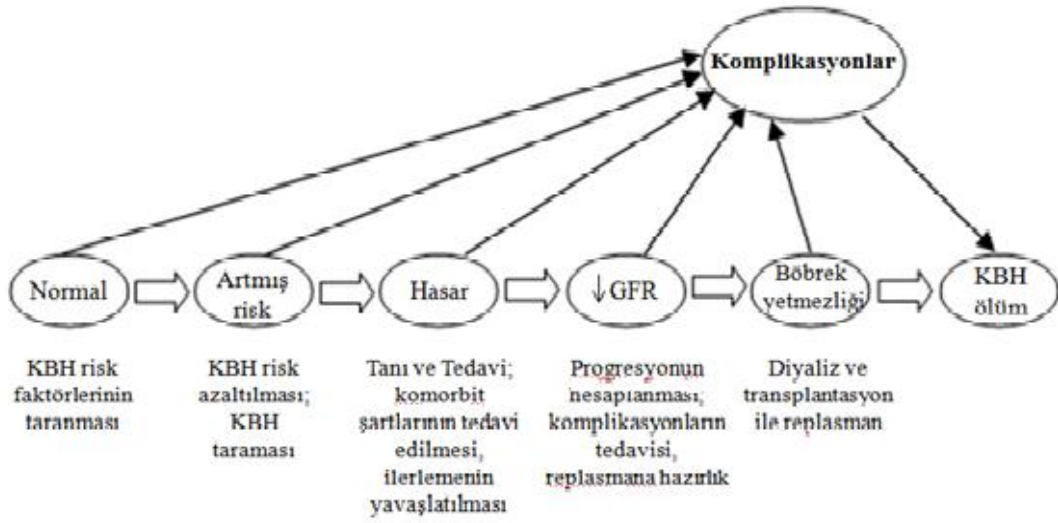
Glomerüler filtrasyon hızına göre 5 evreye ayrılan KBH sınıflandırmasında, en son dönem olan 5. evre, böbrek yetmezliği olarak kabul edilmekte ve bu evredeki hastalar tedavi altına alınmaktadır. Kronik böbrek yetmezliğinin 5. evresinde böbrekler vücuttaki atık maddeleri artık temizleyemediklerinden, hasta yaşamını ancak hemodiyaliz, periton diyalizi veya böbrek nakli ile sürdürebilmektedir (Levey ve ark, 2003).

1.1.1.Kronik Böbrek Hastalığının Evrelerinin Tanımlanması ve Sınıflandırılması

Kronik böbrek hastalığı, böbrek hasarı veya 3 ya da daha fazla aydır devam eden azalmış böbrek fonksiyonu (azalmış GFR) olarak tanımlanır. KBH'nın erken evreleri rutin laboratuvar ölçümleriyle belirlenebilir. Böbrek hasarı genellikle böbrek biyopsisinden daha ziyade markörlerle belirlenir. Çalışma grubuna göre kalıcı proteinüri böbrek hasarının temel markörüdür (Keane ve Eknayan, 1999). Spot idrar örneklerinde 30 mg/g'dan daha büyük albumin-kreatinin oranı genellikle anormal olarak değerlendirilir; cinsiyete göre bu değer değişmektedir, erkeklerde 17 mg/g'dan daha büyük, kadınlarda 25 mg/g'dan daha büyük olanlar KBH hastası olarak tanımlanır (Warram ve ark., 1996; Jacobs ve ark., 2002). Hasarın diğer markörleri; idrar sedimentinde anormallikler, kanda anormallikler, idrar ölçümleri ve görüntülemeadaki anormalliklerdir.

GFR'si normal olan fakat böbrek hasarı markörleri olan kişiler, kronik böbrek hastalığı için artmış risk taşımaktadırlar. GFR, sağlıklı ve hasta kişilerde bütün böbrek fonksiyonlarının en iyi ölçümüdür (Smith, 1951). GFR'nin normal seviyesi, yaş, cinsiyet ve vücut ölçüsüne göre değişmektedir. Genç erişkinlerde normal GFR yaklaşık 1.73 m² başına 120-130 mL/min'dir ve yaşla giderek azalır (Smith, 1951; Davies ve Shock, 1950; Lindeman ve ark., 1985; Rowe ve ark., 1976). GFR seviyesi 1.73 m² başına 60 mL/min'den daha az olanlarda normal böbrek fonksiyonlarının yarısı ya da daha fazlasının kaybı söz konusudur. GFR'de yaşa bağlı azalma normal

yaşlanmanın bir parçası olmasına rağmen, yaşlılıkta azalmış GFR, ölüm ve KVH gibi kötü sonuçların bağımsız prediktörüdür (Shlipak ve ark., 2002; Manjunath ev ark., 2003). GFR yaşla azalır, kronik böbrek hastalığının prevalansı yaşla artar; 60 yaşından daha yaşlı kişilerin yaklaşık %17'si, 1.73 m² başına 60 mL/min'den daha düşük GFR'ye sahiptir (Coresh ve ark., 2003). Şekil 1.1.'de kronik böbrek hastalığının başlama ve progresyon evreleri verilmiştir.



Şekil 1.1: Kronik böbrek hastalığının başlama ve progresyon evreleri ve terapötik önlemler

Üçüncü Ulusal Sağlık ve Beslenme İncelemesi Anketi (NHANES III) verileri daha düşük GFR seviyesi olan kronik böbrek hastalarının komplikasyonlarının artan prevalansını göstermiştir (KDOQI, 2002). Bu veriler ve diğer çalışmalar, kronik böbrek hastalığının şiddetini sınıflandırmak için GFR kullanımının güçlü bir kaynak olduğunu göstermektedir. Tablo 1.1'de, NHANES III'den elde edilen verilerin kullanılmasıyla kronik böbrek hastalığının evrelerinin sınıflandırılması ve her bir evrenin prevalansı gösterilmiştir (Coresh ve ark, 2003).

Tablo 1.1. Kronik böbrek hastalığının tanımlanması, evrelendirilmesi, prevalansı ve eylem planı

Evre	Tanım	GFR (mL/min)	Prevalans (%)	Eylem
-	Artmış risk	≥ 90	-	KBH riskini azaltma
1	Normal ya da artmış GFR' li böbrek hasarı	≥ 90	3.3	Komorbit şartlarının tedavisi, ilerlemenin yavaşlatılması, KVH riskinin azaltılması
2	Hafif artmış GFR' li böbrek hasarı	60-89	3.0	İlerlemenin hesaplanması
3	Kısmen azalmış GFR	30-59	4.3	Komplikasyonların değerlendirilmesi ve tedavisi
4	Şiddetli azalmış GFR	15-29	0.2	Böbrek replasman tedavisi için hazırlık
5	Böbrek yetmezliği	<15 (veya diyaliz)	0.1	Böbrek replasmanı (eğer üremi varsa)

1.1.2. Kronik Böbrek Hastalığının Prevalansı

Dünya çapında bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilen kronik böbrek yetmezliğinin insidansı ve prevalansı her geçen gün artış göstermektedir (US, 2000). Türk Nefroloji Derneği (TSN) 2008 yıllık kaydından elde edilen veriler Türkiye'de ki SDBH insidansının 2000 yılından beri yaklaşık 4 kat artarken, prevalansının 2 kat arttığını göstermiştir (Erek ve ark., 2002; Serdengeçti ve ark., 2009).

Türkiye'de 8765 kronik böbrek hastasında yapılan çalışmada KBH' nın kadınlarda (%18.4) erkeklerden (%12.8) daha yaygın olduğu görülmüştür. KBH' nın prevalansının yaşla birlikte arttığı ve 60 yaş ve üzerindeki kişilerde %38.3 iken, 60 yaş altındaki kişilerde %11.5 olduğu bildirilmiştir. Evre 3 KBH, özellikle 60 yaş üzerindeki kişilerde daha yaygın olup KBH prevalansı, kırsal kesimde yaşayanlarda, kentsel alanda yaşayanlardan kısmen daha yüksektir. KBH prevalansı Marmara bölgesinde yaşayanlarda (%19.7) en yüksek olmakla birlikte bunu Güneydoğu Anadolu (%18.6), Karadeniz (%16.1), Doğu Anadolu (%14.2), Ege (%13.8), İç Anadolu (%12.6) ve Akdeniz (%11.7) bölgesinin takip ettiği belirlenmiştir. KBH hastalarının çoğunun evre 1-3 arasında olduğu ve KBH evre 1, 2, 3, 4 ve 5 prevalans

oranının sırasıyla %5.4, %5.2, %4.7, %0.3, %0.2 olduğu bildirilmiştir. KDOQI kılavuzu ile yayınlanan KBH' nin kriterlerini kullanarak Türkiye' de tüm toplumun prevalansı %15.7 bulunmuştur (Süleymanlar ve ark, 2011). Benzer şekilde KDOQI kriterleri kullanılarak KBH prevalansı NHANES-III (1999-2004) verilerine dayanarak USA'de %13.1 ve HUNT-II (1995-1997) verilerine dayanarak Norveç'te %10.2 olarak bildirilmiştir (Coresh ve ark., 2007; Hallan ve ark., 2006).

Amerika Birleşik Devletlerinde diyaliz tedavisi veya böbrek nakli ile yaşamını sürdüren kronik böbrek hastalarının sayısındaki artışı gösteren bir projeksiyon çalışması yapılmış ve 1999'da 340,000 olan sayının 2010'da 651,000'e ulaşacağı öngörülmüştür (US, 2000).

Birleşik Devletler Böbrek Veri Sistemi (USRDS) ve Avrupa Böbrek Birliği (ERA-EDTA), son dönem böbrek hastalığı (SDBH) olarak bilinen, evre 5 kronik böbrek hastalığının insidansı ve prevalansının giderek arttığını göstermişlerdir (<http://www.era-edta-reg.org/index.jsp?p=annrep>). 2009 USRDS atlasında yayınlanan uluslararası karşılaştırmalar, Taiwan (her 1 milyon kişide 415), Jalisco-Mexico (her 1 milyon kişide 372) ve USA (her 1 milyon kişide 361), son dönem böbrek hastalığının en yüksek insidansına sahip ülkeler olduğunu göstermiştir. Prevalans açısından Taiwan (her 1 milyon kişide 2288), Japonya (her 1 milyon kişide 2060) ve USA (her 1 milyon kişide 1698) en yüksek orana sahiptir (<http://www.usrds.org/atlas.htm>). ABD'de KBH evre 1-4'ün prevalansı, Ulusal Sağlık ve Beslenme İncelemesi Araştırması (NHANES) 1999-2004 sonuçlarına göre %13.1 olduğu gösterilmiştir. Populasyon tabanlı çalışmalar orta KBH (<60 mL/min/1.73 m² olarak tanımlanır) 30 veya daha büyük yaştaki kişiler için %7.2, daha yaşlı populasyonda %23.4'den %35.8'e değiştiğini göstermektedir (Coresh ve ark., 2007).

1.1.3. Kronik Böbrek Hastalığının Etyolojisi

Böbrek hasarı olmayan ve yüksek ya da normal GFR'ye sahip bazı kişiler kronik böbrek hastalığı için artmış risk taşımaktadırlar. Kronik böbrek hastalığında artmış riski olan kişilerin oranı bilinmemektedir. Riski arttıran faktörlerin arasında; diabetes

mellitus, hipertansiyon, sistemik lupus eritematozus, ileri yaş (60-70 yaş), akut böbrek hastalıkları sayılabilir (Harris ve ark., 1998; Burt ve ark., 1995; Lawrence ve ark., 1998; Elixhauser ve ark., 2001).

Ülkemizde kronik böbrek hastalığının nedenlerine baktığımızda etiyolojiye göre; kronik glomerulonefrit (%21), diyabetik nefropati (%16), hipertansiyon, nefroskleroz (%16), ürolojik problemler (taş, obstrüksiyon, veziko üreteral reflü) (%8), kronik interstitiyel nefrit (%7), kistik böbrek hastalıkları (%5), diğerleri (nedeni belli) (%6) ve nedeni belirsiz (%22) olmak üzere sıralanabilir (Tanrıverdi ve ark., 2010).

1.1.4. Kronik Böbrek Hastalığı ve Osteoporozis

Osteoporozis, düşük kemik kütlesi, artmış kemik kırılabilirliği ve artmış kırık riskine yatkınlık ile karakterizedir. Osteoporoz herhangi bir yaşta meydana gelebilir ve postmenapozal hormonal durumlar, paratiroid hormon anormallikleri, yetersiz vitamin D, beslenme bozuklukları, hamilelik, hareketsizlik, ilaçlar gibi çeşitli mekanik, endokrin ve metabolik faktörlere dayanan heterojen bir etiyolojiye sahiptir (Ginaldi ve ark., 2005; Delmas, 2002; Yun ve Lee, 2004). Kronik böbrek hastalarında, mineral ve kemik metabolizmasında meydana gelen bozulmalara sık rastlanmaktadır. Bu bozuklukların artmış mortalite ve morbidite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Massry ve ark., 2003).

Kemik metabolizması kronik böbrek hastalığının evrelerinde devamlı olarak değişmektedir (Quarles, 2003). Fosfat, FGF23 (Fibroblast Büyüme Faktörü-23) ve kalsitrol bağımsız olarak kronik böbrek hastalarında kemik turnoverını etkiler (Santos ve ark., 2003). Fosfat direk olarak, olgun osteoklastlar tarafından kemik emilimini inhibe eder ve aynı zamanda yeni osteoklastların yapımını önler. Bu inhibisyon yüksek PTH (Paratiroid Hormon) seviyesi varlığında bile meydana gelir (Kanatani ve ark., 2003). Yüksek FGF23 seviyesi osteoblastların mineralleştirici aktivitesini bozar, FGF ailesinin diğer üyelerinde olduğu gibi osteoblastik olgunlaşmayı baskılar (Larsson ve ark., 2004). Vitamin D reseptör (VDR) aracılığı ile hareket eden kalsitrol, normalde kemik üzerinde anabolik etkiye sahiptir ve kemiğin yeniden yapılanması için önemlidir. Böylece düşük kalsitrol seviyesi, kemiğin hem

oluşumu hem de emilimi üzerinde baskılayıcı etkiye neden olur (Panda ve ark., 2004).

KBH'da serum kalsiyum düzeyi kemik metabolizmasını etkileyebilir. Yüksek ekstraselüler iyonize kalsiyum konsantrasyonları kemik emilimi inhibisyonuna ve osteoklast apoptozisine neden olan sistolik Ca^{+2} artışını tetiklerken, iyonize kalsiyum konsantrasyonunda minör azalmalar dolaylı olarak PTH salgısını artırarak osteoklastik aktiviteyi uyarır (Zaidi ve ark., 1999; Lorget ve ark., 2000). Bunlara ek olarak yüksek ekstraselüler Ca^{+2} konsantrasyonları, osteoklast prekürsör hücrelerde lokalize olan kalsiyum algılayıcı reseptörleri etkileyerek osteoklast oluşumunu inhibe eder. Böylece KBH başlangıcında, düşük kalsitrol/VDR (Vitamin D Reseptör) sistem, yüksek fosfat ve FGF23 baskınlığı, PTH'nun uyarıcı etkisi gibi kemik metabolizması üzerinde baskılayıcı etkisi olan faktörler, azalmış kemik turnover oranına neden olur (Kanatani ve ark., 1999).

1.1.4.1. Kronik Böbrek hastalığı ve Osteoporoziste Kemik Değişimlerinin Tanısı

Genel populasyonda osteoporozisin tanısı, çift enerjili X ışını absorpsiyometrisi (DEXA) kullanılarak kemik mineral dansite (KMD) değerlendirilmesiyle yapılmaktadır. Osteoporozisin tanımlanması lomber omurga ya da femur boynuna uygulanan KMD ölçümlerine dayanır. T-skor, postmenapozal kadınlarda en önemli skor sistemidir. T-skor, 20-29 yaş arasındaki sağlıklı beyaz kadınlar ile kıyaslandığında hastanın kemik dansitesini yansıtır. (WHO study group, 1994).

Osteoporozisin sınıflandırılması, kırık riskine göre hastaların derecelendirilmesini sağlayan DEXA ölçümü ile yapılır. Kırık riski genellikle kemik gücünü yansıtır. Kemik gücü iki faktörle belirlenir 1) kemik mineral yoğunluğu 2) kemik kalitesi. Bu demek oluyor ki, sadece kemik dansitesini ölçen DEXA, sadece kemik gücünü belirleyen kırık riski ile bağlantılıdır. Diğer kemik mimarisi, kemik yeniden yapılanma oranı, hasar birikimi, kemik yapısı ve mineralizasyonunu içeren kemik kalitesi DEXA ile belirlenemez (Seeman ve Delmas, 2006). Kronik böbrek hastalığında ise osteoporozisin tanımlanması için sol femur boyun ve lomber omurgada yapılan DEXA ölçümünün uygulanabilirliği şüphelidir. Çünkü klinik

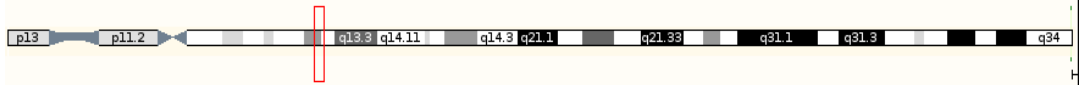
sonuçlarla KMD arasında veri uyumu yoktur (Cunningham ve ark., 2004). Kemik biyopsisi renal osteodistrofinin tanısı için altın standarttır ve aynı zamanda kemik hacmi ölçümü yanı sıra kemik turnover oranı ve mineralizasyon oranını da verir (Moe ve ark., 2006). Ancak zor ve zahmetli bir işlem olması ve bu örneği değerlendirecek deneyimde patolojik bulunamaması nedeniyle, günlük uygulamada hayata geçirilememiştir. Ayrıca tüm hastalarda tanı amaçlı rutin kullanımı halen önerilmemektedir. Kortikal kemik bölgelerinde (distal radius) kemik kütlesinin ölçümü ise kemik kaybını belirlemede kabul görmektedir ve kemik turnover ile daha uyumludur (Evrenkaya, 2011).

1.2. *KLOTHO* Geni ve Fonksiyonları

KLOTHO geni, farelerde aşırı eksprese olduğunda yaşam süresini uzatan, bozulduğunda yaşlanmayı hızlandıran “yaşlanmayı baskılayıcı gen” olarak tanımlanmıştır. *KLOTHO* gen ekspresyonundaki bir defekt, yaşamın ilk 3-4 haftasına kadar fenotipinde kendini göstermez, fakat daha sonra gelişme geriliği, hipogonadotropik hipogonadizm, hızlı timik involüsyonu, deri atrofileri, sarkopeni, vasküler kalsifikasyon, osteopeni, bilişsel bozukluk, işitme kaybı, motor nöron dejenerasyonu, yaşamın ilk 2 ayında prematüre ölüm gibi multiple yaşlanma benzeri fenotipin oluşmasında öncü olur. Aksine, *KLOTHO* geni aşırı eksprese olan transgenik fareler, wild-tipe farelerden daha uzun süre yaşar. Böylece *KLOTHO* geni aşırı eksprese olduğunda yaşam süresini uzatan bozulduğunda yaşlanmayı hızlandıran gen olarak fonksiyon görür (Kuro-o, 2010).

1.2.1. *KLOTHO*' nun Moleküler Özellikleri: Gen, mRNA ve Protein

KLOTHO geni, 5 ekzon, 4 introndan oluşur ve 50 kb' dan daha uzun bir bölge içinde kromozom 13q12 de lokalizedir (Şekil 1.2.). (Matsumura ve ark, 1998; Shiraki-Iida ve ark., 1998; Razzaque MS, 2009).



Şekil 1.2: *KLOTHO* geninin kromozom13q12'deki lokalizasyonu

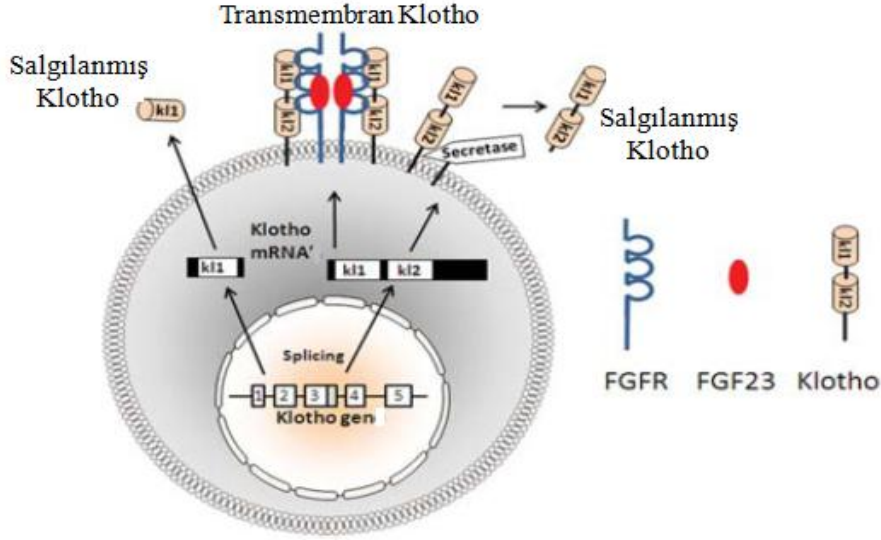
(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?g=ENSG00000133116;r=13:33590207-33640282)

Promotör bölgelerinde TATA-box dizileri yoktur ve SP1 için dört bağlanma bölgesi içerir. Klotho 2 transkriptten oluşmaktadır; bunlardan 1012 aminoasit (130kDa) kodlayan ve 5.2 kb büyüklüğündeki transkript, tek geçişli membran protein özelliğindedir. Bu form, kısa transmembran domainini kaybettikten sonra dolaşımında serbest kalır ve moleküler ağırlığı yavaş yavaş düşer. Salgılanmış formu, daha küçük boyuttaki (65-70 kDa) proteine tamamen metabolize olur. Alternatif mRNA splicingden türeyen diğer transkript, yaklaşık 65-70 kDa moleküler ağırlıklı 242 aminoasite sahip olup Klotho' nun N-terminal bölgesini kodlar (Şekil 1.3).



Şekil 1.3: Klotho protein yapısının şematik diagramı. Klotho, N-terminalde sinyal dizileri ve C-terminalde kısa sitoplazmik domain ile transmembran domain içerir. Klotho proteininin ekstraselüler domaini β -glukozidaz ile homolog diziler paylaşan 2 internal tekrardan (KL1 ve KL2) oluşur.

Her iki proteinde β -glukozidaz ailesine aittir. Salgılanmış formun ekspresyonu membran formuna göre baskın çıkmaktadır. İnsan Klotho proteini fare Klotho proteini ile %86 oranında aminoasit benzerliği göstermektedir. Klotho' nun ekstraselüler domaini 2 internal tekrar içerir (KL1, KL2). Bu tekrarlar birbirleriyle %21 benzerliğe sahip olup, her biri 450 aminoasit uzunluğundadır. Bu iki domain hücrel membranın yüzeyinde kelebek şeklinde bir molekül oluştururlar (Torres ve ark, 2007). İntraselüler domaini ise çok kısadır (10 aminoasit uzunluğunda) (Şekil 1.4) (Kuro-o, 2010; http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000133116;r=13:33590207-33640282).



Şekil 1.4: *KLOTHO* geni, transkriptleri ve proteinleri gösteren şema.

Klotho proteinlerinin bir diğer özelliği, salgılanmış form ve membran formunun, in vivo Klotho sekresyonu için regülatör mekanizma ve posttranslasyon Klotho işlenmesinde oligomerik bir kompleks oluşturmalarıdır (Torres ve ark, 2007).

Klotho mRNA'sı çoğunlukla böbrekte distal sarmal tübüler hücrelerde ve beyinde koroid pleksusta eksprese edilmektedir. Ayrıca hipofiz, paratiroid, pankreas, ovaryum, testis ve plasenta gibi pek çok endokrin organda da eksprese edilir (Kuro-o ve ark, 1997). Klotho'nun otokrin, parakrin ve endokrin faaliyetleri arasında ayırım yapmak zordur çünkü farklı hücre tiplerinde farklı fonksiyonlar gösterir. Fare genetik çalışmaları, Klotho'nun, FGF sinyalizasyonunda, kalsiyum ve fosfat iyon transportunda ve enerji metabolizmasındaki rolünü içeren in vivo fonksiyonlarının tanımlanmasına öncü olmuştur (Razaque ve ark, 2012).

Klotho proteini, mineral ve vitamin D metabolizmasının kontrolünde anahtar rol oynamaktadır. Klotho proteini FGF reseptörü olarak FGF23'ün bağlanması için gereklidir (Kurosu ve ark., 2006). Klotho proteininin sentezinde Vitamin D önemli bir regülatör olmasına rağmen sentezi indükleyen diğer faktörler tamamen tanımlanamamıştır (Forster ve ark., 2011).

KLOTHO geninin dokuya spesifik ekspresyonuna rağmen, Klotho ekspresyonundaki bir defektin sistemik fenotiplere neden olması Klotho'nun endokrin sistemlerde görevli olabileceğini akla getirmektedir. Son çalışmalar, mineral metabolizmasının

ve büyüme faktörü sinyalinin endokrin düzenlenmesinde, Klotho preteininin çoklu fonksiyonlarını ortaya koymuştur.

1.2.1.1. Membran Klotho Proteininin Fonksiyonu

1.2.1.1.1. FGF23 için ko-reseptör olan Klotho

FGF23'ün böbrekte fosfat tutulumuyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda FGF23, idrara fosfat atılımını desteklemek için böbrekte hareket eden kemikten derive olan bir hormon olarak tanımlanmıştır (Quarles, 2008). İdrara salınan fosfat primer olarak, renal proksimal tübüllerden yeniden emilen fosfat miktarıyla belirlenir. Proksimal tübüllerde bulunan lüminal sıvıdaki fosfat başlıca, proksimal tübüllerin apikal fırça sınır membranında eksprese edilen tipII sodyum-fosfat taşıyıcısı (NaPi-2a) yoluyla alınır. FGF23 fosfatürük aktivitesini NaPi-2a'yi baskılayarak gösterir (Liu ve Quarles, 2007).

FGF23 geninde oluşan missens mutasyonlar; yüksek serum FGF23 seviyeleri, hipofosfatem ve kemik mineralizasyonunda defektlere neden olmaktadır (Shimada ve ark., 2002). Aksine, FGF23'ten yoksun fareler yaygın yumuşak doku kalsifikasyonu ve hiperfosfatem ile karakterize fosfat-retensiyon fenotipleri geliştirirler (Shimada ve ark., 2004). Bunlara ek olarak FGF23'ten yoksun fareler gelişme geriliği, hipogonadizm, prematür timik involüsyon, sarkopeni, osteopeni, deri atrofisi, pulmoner emfisemiye de içeren Klotho eksikliği olan farelerde prematüre yaşlanma sendromunu anımsatan, beklenmeyen fenotipler de gösterirler (Urakawa ve ark., 2006). Genetik çalışmalarla uyumlu olarak, biyokimyasal ve hücre biyolojisi çalışmaları, Klotho proteininin FGF23 için zorunlu bir koreseptör olarak fonksiyon gösterdiğini ortaya koymuştur (Urakawa ve ark., 2006; Kuro-o, 2006).

FGF23'ün FGF reseptörlerine affinitesi çok düşüktür ve fizyolojik konsantrasyonlarda Klotho olmadan aktive edilemez (Yu ve ark., 2005). Klotho proteini, pek çok FGF reseptör izoformlarıyla (FGFR1c, 3c ve 4) ikili kompleks oluşturur ve FGF reseptörlerinin FGF23'e olan affinitelerini anlamlı derecede yükseltir (Kurosu ve ark., 2006). Klotho'nun böbreğe spesifik ekspresyonu,

FGF23'ün multiple FGF reseptör izoformları eksprese eden diğer pek çok doku arasında neden FGF23'ün böbreği hedef organ olarak belirlediğini de açıklamaktadır. Böylece, Klotho ve FGF23, fosfat hemostazını koruyan bu yeni tanımlanmış kemik-böbrek endokrin ekseninin temel komponentleri olarak ortaya çıkmıştır (Kuro-o, 2008). Bu endokrin eksenin diğer bir önemli fonksiyonu serum D vitamini seviyelerini düzenlemektir. Vitamin D'nin diyetle alınan fosfatın bağırsaklardan emilimini harekete geçiren bir aktivitesi vardır (Dusso ve ark., 2005). D vitamininin aktif formu (1,25 dihidroksivitamin D₃) böbrekte inaktif prekürsöründen (25-hidroksivitamin D₃) *Cyp27b1* geni tarafından kodlanan 1 α -hidroksilaz ile sentezlenir ve *Cyp24* tarafından kodlanan 24-hidroksilaz tarafından inaktive edilir. FGF23, *Cyp27b1* gen ekspresyonunu baskılayarak ve *Cyp 24* gen ekspresyonunu artırarak, serum 1,25 dihidroksivitamin D₃ seviyelerinde azalmaya yol açar (Shimada ve ark., 2004). Böylece, fosfatürük bir hormon olarak fonksiyon göstermesinin yanında, FGF23 vitamin D için bir karşı-regülatör hormon olarak fonksiyon gösterir. FGF23'ün bu iki farklı aktivitesi birlikte, Klotho bağımlı bir mekanizmayla negatif bir fosfat dengesini indükler (Liu ve ark., 2006).

1.2.1.1.2. Klotho ve FGF23 aracılı kemik-böbrek endokrin eksen

Vitamin D, kemikte *FGF23* geninin ekspresyonunu pozitif yönde regüle eder. 1,25 dihidroksivitamin D₃'ün enjeksiyonu, rodentlerde serum FGF23 seviyelerini saatler içinde yükseltir (Shimada ve ark., 2003). 1,25 dihidroksivitamin D₃'ün nükleer vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanması, diğer bir nükleer reseptör RXR (Retinoid X reseptörü) ile heterodimerizasyonu indükler. VDR-RXR heterodimeri sırayla FGF23 geninin promotör bölgesine bağlanır ve ekspresyonu transaktivite eder (Kuro-o, 2008). Osteositlerden salınan FGF23 böbrekteki Klotho-FGFR kompleksine ulaşır ve 1,25 dihidroksivitamin D₃'ün baskılamak ve inaktivasyonunu harekete geçirmek için sinyal aktarır ve böylece negatif feedback ilmeğini kapatır. Bu negatif feedback ilmeği vitamin D hemostazı için önemlidir çünkü FGF23 veya Klotho' daki defektler farelerde ve insanlarda yükselmiş 1,25 dihidroksivitamin D₃ seviyelerine sebep olur (hipervitaminosis D) (Perwad ve ark., 2005; Saito ve ark., 2005; Takeda ve ark.,

2004). Klotho ve FGF23 yoksunu fareler, vitamin D'den yoksun diyet aldıklarında normal serum fosfat ve kalsiyum seviyeleri göstermiş ve artık yaşlanma benzeri fenotipler geliştirmemişlerdir (Stubs ve ark., 2007; Tsujikawa ve ark.,2003).

1.2.1.2.Salgılanan Klotho Proteininin Fonksiyonu

1.2.1.2.1. İyon Kanal Aktivitesinin Düzenlenmesi

Klotho proteini, FGF23 için ko-reseptör olarak fonksiyon göstermesinin yanında, humoral faktör olarak ta fonksiyon gösterir. Klotho proteininin ekstraselüler domaini, Klotho proteininin salgılanmış formunu üretmek için membrana tutunmuş proteazlar ADAM10 ve ADAM17 tarafından tutturulurlar (Chen ve ark., 2007). ~120-130 kDa'luk ekstraselüler domainin tamamı kan, idrar ve serebrospinal sıvıda bulunmaktadır (Imura ve ark., 2004; Kurosu ve ark., 2005). Böylece, Klotho proteini en az iki formda bulunur. Birisi, birincil olarak renal tübüler hücrelerde eksprese edilen membran Klotho'su; diğeri kan, idrar ve serebrospinal sıvıda bulunan salgılanmış Klotho'dur.

Membran Klotho'su FGF23 için ko-reseptör olarak görev yaparken, salgılanmış Klotho FGF23 için çözümlü reseptör olarak görev yapamaz çünkü FGF23'e yüksek affinitesi olan yalnız başına Klotho proteini veya FGFR değil *KLOTHO*-FGFR kompleksidir (Kurosu ve ark., 2006). Bu bulgular, salgılanmış Klotho'nun FGF23'ten bağımsız bir görevi olabileceğini akla getirmektedir. Son yapılan çalışmalar, salgılanmış Klotho proteininin, membran Klotho'sundan farklı olarak, çoklu iyon kanallarının regülasyonu ve hücre yüzeyindeki büyüme faktörü reseptörlerinin regülasyonunu da içeren yeni fonksiyonlarının olduğunu ortaya koymuştur.

Geçici reseptör potansiyel katyon kanalı, subaile 5, eleman 5 (TRPV5), salgılanmış Klotho proteinleri tarafından regüle edilen iyon kanallarından biridir (Cha ve ark, 2008; Chang ve ark., 2005). TRPV5, renal tübüler hücrelerin apikal kenarında eksprese edilen bir iyon kanalıdır ve böbrekteki transepitelyal Ca^{+2} geri emiliminde, Ca^{+2} girişinde birincil olarak sorumludur (Hoenderop ve ark., 2005). Salgılanmış

Klotho proteini TRPV5'in internalizasyonunu inhibe ederek hücre yüzeyindeki TRPV5'in sayısını artırır, böylece TRPV5-aracılı Ca^{+2} girişini ve renal Ca^{+2} geri emilimini artırır. Aslında Klotho yoksunu fareler, yabani tip farelere göre idrara daha fazla kalsiyum atılımını gösterir (Tsuruoka ve ark., 2006). TRPV5'in Klotho'nun indüklemesiyle plazma membranında tutulması, TRPV5'in glikanlarının modifikasyonu ile birliktelik gösterir (Cha ve ark., 2008; Chang ve ark., 2005). Dahası, salgılanmış Klotho renal dış medullar potasyum kanalı (ROMK1)'ni TRPV5 regülasyonunun ki ile aynı mekanizmayla regüle eder. ROMK1, renal tübüler hücrelerin apikal kenarında eksprese edilen ve birincil olarak idrara potasyum atılmasından sorumlu bir potasyum kanalıdır. Salgılanmış Klotho plazma membranındaki ROMK1'in sayısını ve idrarda potasyum atılımını artırır. Salgılanmış Klotho'nun bu aktivitesi hücre yüzeyi glikoproteinlerinin internalizasyonunun düzenlenmesi için yeni bir mekanizma olarak görünmektedir (Cha ve ark., 2009).

1.2.1.2.2. Büyüme Faktörü Sinyalinin Düzenlenmesi

Klotho yoksunu fareler, hipoglisemik, hipoinsülinemiktir ve insüline aşırı derecede duyarlıdır (Hesse ve ark., 2007; Utsugi ve ark., 2000). Aksine, Klotho'yu aşırı eksprese eden transgenik fareler normal açlık glikoz seviyeleri göstermelerine ve diyabetik olmamalarına rağmen insüline ve IGF-I (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I)'e dirençlidir. Bu gözlemler Klotho'nun İnsülin/IGF-1 aktivitesinde inhibitör etkisi olabileceğini akla getirmektedir (Kurosu ve ark., 2005).

Salgılanmış Klotho'nun insülin-IGF-I reseptörlerinin aktivitesini inhibe ediş mekanizması hala tamamlanmamış olsa da, salgılanmış Klotho'nun insülin/IGF-I reseptörlerinin hücre yüzeyindeki sayısını glikanlarını modifiye etmek suretiyle internalizasyonlarını değiştiriyor olması muhtemeldir. Klotho'nun insülin/IGF-I reseptörlerini inhibe etme yeteneği, Klotho'nun anti-aging özelliğinden kaynaklanıyor olabilir çünkü yukarıda tartışıldığı gibi pek çok genetik bulgu insülin benzeri sinyal yolağının kısmi inhibisyonu yaşlanmayı baskılayan evrimsel olarak korunmuş mekanizmalardan biridir. İnsülin, salgılanmış Klotho proteininin serum seviyelerini yükseltebilir buda sırasıyla periferik dokularda insülin sinyalini inhibe

edip, devam eden insülin etkisini engeller. Bu salgılanmış Klotho'nun endokrin etkisiyle gerçekleşen yeni bir insülin sinyalini negatif feedback mekanizmasını temsil ediyor olabilir ve neden Klotho yoksunu farelerin aşırı derecede insüline duyarlı olduğunu kısmen açıklayabilir.

Salgılanmış Klotho proteininin pek çok Wnt ligandlarına bağlandığını ve Wnt'nin bu hücre yüzey reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek Wnt sinyalini inhibe ettiği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2007). Wnt sinyalinin aktivasyonu kök hücre proliferasyonu ve yaşamı için çok önemliyse de devamlı ve uzun süren Wnt sinyal aktivasyonu, kök hücrelerin bitkinliğine ve tükenmesine neden olabilir. Kök hücre disfonksiyonu doku rejenerasyonunu sınırlayıp, yaşlanma sürecini potansiyel olarak etkilediği için salgılanmış Klotho proteininin Wnt sinyalini inhibe etme yeteneği, Klotho yoksunu farelerde yaşlanma benzeri fenotiplere neden olmaktadır. Bu bulgular Klotho yoksunluğunun Wnt sinyal aktivasyonu ve kök hücre yaşlanmasında süreklilik oluşturduğunu göstermektedir (Kirstetter ve ark., 2006; Scheller ve ark., 2006).

1.2.2. Klotho ve Kronik Böbrek Hastalığı

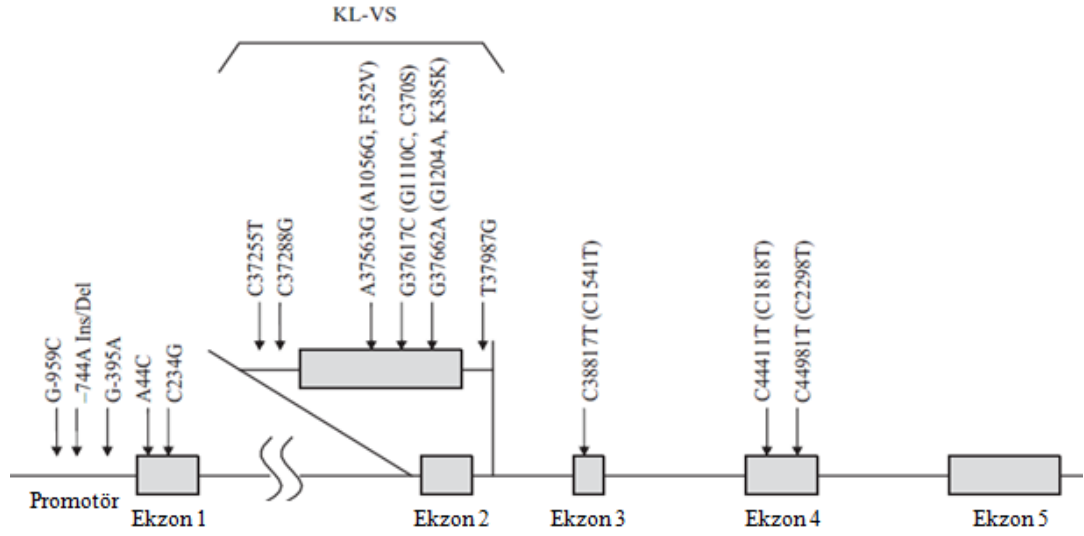
Klotho böbreklerde fazla miktarda eksprese olur. Klotho'nun çözünür formu böbreğin korunması ve böbrek sıvı-solüt dengesinin düzenlenmesinde birçok faaliyet gösteren endokrin bir madde olarak fonksiyon görür. Hem akut böbrek yetmezliği hem kronik böbrek hastalığında renal ve sistemik Klotho eksikliği vardır. KBH'da Klotho eksikliği renal hastalıkların ilerlemesine ve ekstrarenal komplikasyonlara neden olmaktadır. Kronik böbrek hastalarında Klotho seviyesi, yumuşak doku kalsifikasyonlarının varlığını, şiddetini ve ilerleme oranını tahmin etmede bir belirleyici olabilir (Hu ve ark., 2012). Yumuşak doku kalsifikasyonu ve özellikle vasküler kalsifikasyon, kronik böbrek hastalığında yüksek mortaliteyle ilişkili kötü komplikasyonlardır. Klotho en az 3 mekanizma ile yumuşak doku kalsifikasyonuna karşı korur: fosfatüri, renal fonksiyonların korunması ve fosfat alımını inhibe ederek vasküler düz kas hücrelerini direkt etkileyerek yapar.

Klotho eksikliği hem akut böbrek yetmezliği hem de kronik böbrek hastalığında glomerular filtrasyon oranının azalmasını artırırken; aşırılığı bu oranı korur. Klotho eksikliğinin düzeltilmesiyle, KBH'da ekstrarenal komplikasyonların gelişimi önlenir ve ilerlemesi geciktirilebilir. Özetle Klotho çeşitli renal hastalıklarda önemli bir moleküldür ve terapötik tedavinin yanı sıra diagnostik ve prognostik biyomarkör olarak önemli bir role sahiptir (Hu ve ark., 2010).

1.2.3. *KLOTHO* Gen Polimorfizmleri

İnsan *KLOTHO* geninde 10'dan fazla mutasyon ya da tek nükleotid polimorfizmleri rapor edilmiştir (Şekil 1.6). Promotörde lokalize olan G395A'nın kemik mineral dansite (Kawano ve ark., 2002; Yamada ve ark., 2005), osteoartrit (Tsezou ve ark., 2008), sistolik kan basıncı (Rhee ve ark., 2006), aterosklerotik koroner arter hastalığı (Imamura ve ark., 2006; Rhee ve ark., 2006), erken damar yolu disfonksiyonu (Kim ve ark., 2008) ve kardiyembolik atak (Kim ve ark., 2006) ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Ekson 4'te lokalize olan diğer tek nükleotid polimorfizmi C1818T'nin ise, kemik mineral dansite (Kawano ve ark., 2002), açlık glukoz, aterosklerotik koroner arter hastalığı (Rhee ve ark., 2006) ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. KL-VS olarak bilinen 6 tek nükleotid polimorfizmi ise gizli koroner arter hastalığı (Arking ve ark., 2003), yüksek dansite lipoprotein (HDL) kolesterol (Arking ve ark., 2005) ve insan yaşam süresi (Arking ve ark., 2002) ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Kim ve ark., 2006; Arking ve ark., 2003).

KLOTHO geni polimorfizmlerinin, böbrek hastalığı ve diyalizli hastalar arasında çarpıcı bir bağlantı oluşturması beklenmesine rağmen, diyalizli hastalarda bu iki polimorfizm ile ilişki seyrek olarak bildirilmiştir. Asya popülasyonunda KL-VS polimorfizmleri ve G395A ve C1818T polimorfizmleri hariç diğer polimorfizmlerde seyrek bulunmaktadır. Japon diyaliz hastalarında C1818T ve G3895A polimorfizmleri LDL kolesterol ve ürik asit ile ilişkili bulunmuş olup ilişki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Shimoyama ve ark., 2009).



Şekil 1.5: Kromozom 13q12 üzerinde *KLOTHO* polimorfizm dizilerinin haritası.

1.3. Vitamin D ve Vitamin D Reseptör (VDR) Fonksiyonları

Vitamin D, endokrin sistem kemik ve kalsiyum dengesinin kontrol merkezidir (Valdivielso ve Fernandez, 2006). Vitamin D, yan zincirindeki farklılık nedeniyle değişik formlara sahiptir ve biyolojik olarak inaktiftir. Vitamin D'nin 25 hidroksi (25(OH)D) ve 1,25 dihidroksi (1,25(OH)2D) metabolitleri mevcut olup bunlardan 1,25 dihidroksivitamin D3 (1,25(OH)2D3) aktif formdur (Armas ve ark.,2004; Lips, 2006). Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D3 (kalsitrol), kalsiyum dengesi üzerindeki genomik etkilerini düzenlemek için spesifik bir reseptör yoluyla faaliyet gösteren ve düzenlenen dolaşımdaki formudur (Hausler ve ark., 1998). Dahası, vitamin D, iskelet metabolizması ve kalsiyum emilimi yanında immün cevap ve kanser gibi diğer metabolik yollarda da önemli rol oynar. Örneğin, immün sistemde monosit farklılaşmasını destekler, lenfosit çoğalmasını inhibe eder ve IL-2 (İnterlökin-2), interferon- γ ve IL-12 gibi sitokinlerin salgılanmasında görev alır. Kanser hücrelerinin bazı tiplerinde vitamin D, antiproliferatif etki gösterir (Risch ve Merikangas, 1996).

Vitamin D reseptör geni tarafından gen transkripsiyonunun kontrolünü içeren temel basamaklar; reseptöre ligandın bağlanması, retinoid X reseptör (RXR) ile heterodimerizasyon, heterodimerin vitamin D cevap elementlerine (VDRE)

bağlanması ve diğer nükleer proteinlerin transkripsiyonel kompleksin içine alınmasıdır. Böylece *VDR* genindeki genetik değişimler, kalsiyum metabolizması, hücre çoğalması ve immün fonksiyonu etkileyerek gen aktivasyonu üzerinde önemli defektlere öncü olabilir (Sone ve ark., 1990).

1.3.1. Vitamin D Reseptör Gen Yapısı

VDR cDNA' sının 1988 yılında klonlanmasından sonra (Baker ve ark., 1998) insan *VDR* geninin genomik yapısının keşfedilmesi yaklaşık 10 yıl sürmüş ve genin önemli bölümleri 1997 yılında ortaya koyulmuştur (Miyamoto ve ark., 1997). *COL2A1* geninin hemen yanında, kromozom 12q13.11' de lokalize olan *VDR* geni, 100 kb'den daha uzun olup 11 ekzon içermektedir. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VDR>) *VDR* 427 aminoasitten oluşan yaklaşık 50 kDa'luk molekül ağırlıklı bir proteindir. *VDR* geninin 1A, 1B, 1C olarak bilinen ilk 3 ekzonu 5'UTR bölgesini kodlar ve *VDR* transkriptlerinde polimorfik olarak bulunur. Diğer 8 ekzon (ekzon 2-9) yapısal gen ürünü olan proteini kodlamaktadır (Audi ve ark., 1999). *VDR* geninin 3 unique mRNA izoformları ekzon 1B ve 1C'nin farklı splayzinginin sonucu olarak üretilir. Ekson 1A' daki DNA dizileri, GC'den zengindir ve açık bir TATA kutusu içermez. SP1 transkripsiyonel faktörü için birkaç bağlanma bölgesi ve diğer aktivatörleri içerir. *VDR* geni ekzon 2 ve ekzon 3 DNA bağlayıcı, ekzon 7, ekzon 8 ve ekzon 9 ise vitamin D bağlayıcı bölgelerdir (Çakır ve Ersoy Tunalı, 2010; <http://omim.org/entry/601769>).



Şekil. 1.6: *VDR* geninin kromozom 12q13.11' deki lokalizasyonu

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?g=ENSG00000111424;r=12:48235320-48336831)

VDR geni birçok dokuya özgün transkriptler oluşturabilme kapasitesine sahiptir. Birbiriyle bağlantı eşitsizliği (LD) gösteren intron 8 ve ekzon 9'da ve ayrıca ekzon 2'de çeşitli polimorfizmler saptanmıştır.

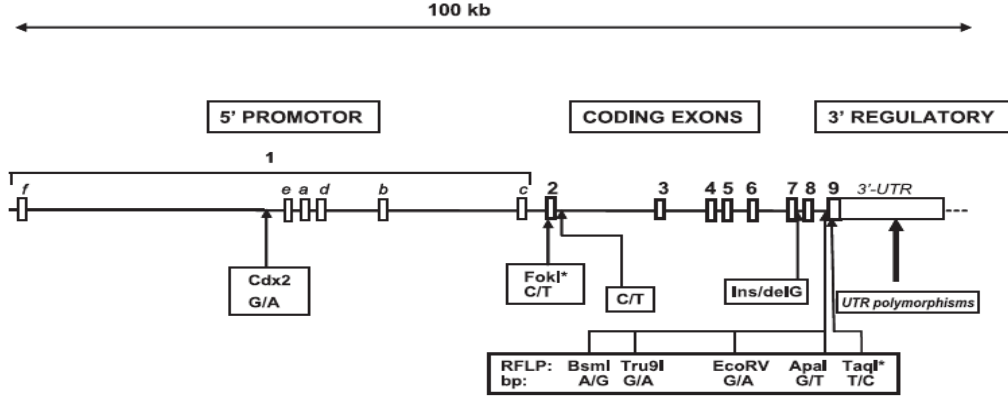
1.3.2. *VDR* Geninin Fonksiyonu

VDR, iki ayrı fonksiyonel domain içinde aminoasit benzerlikleri gösteren, proteinlerin nükleer reseptör süperail üyesidir. *VDR*'nin N-terminal bölgesi DNA tanıma ve bağlanmadan sorumlu iki çinko parmak içinde yapılır, C-terminal bölgesi ise 1,25-(OH)₂D₃ hormonunu bağlar (Jurutka ve ark., 2000).

Böbrekte 1,25(OH)₂D₃ seviyesi; 1,25(OH)₂D₃'ün *VDR*'yi etkileyerek, 1,25(OH)₂D₃'ü sentezleyen enzim CYP27B1'i baskılaması sonucu, oluşan ürünün inhibe edilmesi yoluyla kontrol edilir. Yapılan çalışmalarda CYP27B1'in böbrekten derive olmuş HEK293 (Human Embriyonic Kidney-293) hücrelerinde *VDR* aracılığıyla 1,25(OH)₂D₃ tarafından downregüle olduğu doğrulanmıştır. HEK293 hücrelerinde 1,25(OH)₂D₃ tarafından CYP27B1'in inhibisyonunun, promotör yakınında CYP27B1 taranskripsiyonel başlangıç bölgesinde negatif VDRE ve transkripsiyonel başlama bölgesinin uzağında 2 klasik VDREs ile ligand *VDR*'nin etkileşimi ile ilişki olduğu gösterilmiştir (Turunen ve ark., 2007).

1.3.3. *VDR* Geni Polimorfizmleri

1990' larda *VDR* geninin 3' ucunda, ApaI (Faraco ve ark.,1989;), EcoRV (Morrison ve ark., 1992), BsmI (Morrison ve ark., 1992), TaqI (Morrison ve ark., 1994) ve Tru9I (Ye ve ark., 2000) restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri keşfedilmiştir. Şekil 1.8'de şu an bilinen *VDR* polimorfizmleri verilmiştir.



Şekil 1.7: VDR geninin ekzon-intron yapısı ve bilinen polimorfizmlerin yerleşimi (A.G. Uitterlinden et al. / Gene 338 (2004) 143–156)

VDR geninde fonksiyonel dizi varyasyonlarını tanımlamak için 3' regülatör bölgesinde odaklanılmıştır. BsmI, ApaI ve TaqI genin 3' ucuna yakın bölgede lokalize olup bağlantı dengesizliği (LD) çevrilmeyen bölgeyi (UTR) içeren 3' regülatör bölge içindedir. VDR geninin 3'-UTR bölgesi birçok polimorfizm içermektedir ve böylece güçlü LD sayesinde Bsm-Apa ve Taq RFLP ile gözlenen birliktelik açıklanabilir. Genin 3'-UTR bölgesinin, ekspresyonun düzenlenmesi ve özellikle mRNA stabilitesinin regülasyonu ile ilgili olduğu bilinmektedir (Decker ve Parker, 1995). 3'-UTR bölgesindeki reseptör polimorfizmleri mRNA stabilitesini etkileyen AUUUA motifleri olarak tanımlanmaktadır (Schaaf ve Cidlowski, 2002). 3'-UTR'deki fonksiyonel polimorfizmlerin doğru şekilde tanımlanması ve iyi tanımlanmış farklı hücre tiplerinin kullanılması özellikle BsmI, ApaI ve TaqI gibi 3' polimorfizmlerinin birlikteliğini göstermek için moleküler mekanizmaların aydınlanmasına yardımcı olacaktır. Bu çalışmalar, bütün bilinen VDR polimorfizmlerini ve birbirleriyle ilişkisini analiz etmek için çok önemlidir çünkü VDR ekspresyonu ve aktivitesini belirlemek için birbirleriyle etkileşimde olacaklardır (Uitterlinden ve ark., 2004).

1.3.4. VDR Geni ve Kronik Böbrek Hastalığı

Kronik böbrek hastalığında, vitamin D ve vitamin D analoglarının böbrek koruyucu etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Kronik böbrek hastalığının gelişmesinde ilk

olarak 1,25(OH)2D3'ün azalmış serum seviyesi meydana gelir ve bu artmış böbrek inflamasyonu ile ilişkilidir. Plazma 25(OH)D3 seviyesi ile SDBY riski ve evre 2-5 kronik böbrek hastalıklı hastalardaki ölüm arasında zıt bir ilişki vardır.

Vitamin D'nin hormonal formu 1,25(OH)2D3, kalsiyum, fosfat ve sülfat dengesini düzenler. Gözlemsel veriler, oral kalsitrol takviyesinin kronik böbrek hastalığı olan kişilerde yükselmiş yaşam kalitesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda Vitamin D, 1,25(OH)2D3, *Renin* geninin transkripsiyonunu azaltır ve böylece renin-anjiyotensin sistemini direkt olarak ayarlar (Martin ve ark., 2010).

Böbrek yetmezliğinde *VDR* polimorfizmlerinin etkisi bu hastalarda vitamin D'nin kompleks rol oynaması nedeni ile araştırılmıştır. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda temel komplikasyonlardan biri sekonder hiperparatiroidizmin (sHPT) gelişmesidir. Kalsitrol-VDR kompleksi, paratiroid hormon sentezi ve paratiroid hücre çoğalmasını regüle eder (Szaba ve ark., 1989; Patel ve ark., 1994). Böylece VDR reseptörü ile kalsitrolün etkileşimi, paratiroid bezi hücre çoğalması yanında PTH sentezini inhibe eder. Üremik sHPT olan hastalar, son 10 yıl boyunca hiperkalsemiyi düzeltmek ve dolayısıyla sHPT'i önlemek için vitamin D metabolitleri ile tedavi edilmiştir.

Araştırmacılar, post-transplant diabetes mellitus riski ile TaqI polimorfizminin t alleli ilişkisi ve etkisini göstermişlerdir (Numakura ve ark., 2005). Buna ek olarak, ApaI polimorfizminin aa genotipinin, prediyaliz hastalarında yüksek PTH ve osteokalsin seviyesi ve kalsiyum seviyesindeki değişiklikler ve PTH salgılanmasının regüle edilmesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Yokoyama ve ark., 1998; Yokoyama ve ark., 2001).

1.3.5. VDR Geni ve Kemik Biyolojisi

Vitamin D, normal kemik metabolizması için gereklidir ve vitamin D reseptör vasıtasıyla barsak ve böbrek tarafından kalsiyum alımını regüle etmektedir. Kronik böbrek hastalığı-mineral kemik bozuklukları (KBH-MKB), altta yatan kronik böbrek hastalığına bağlı olarak mineral ve kemik metabolizmasında ortaya çıkan kalsiyum, fosfor, parathormon (PTH) ve vitamin D metabolizması anormalliklerini içeren

sistemik bir bozukluktur. Böbrek hastalığı başlangıcında fosfat birikimi ve FGF23 ve paratiroid hormon gibi fosfatürük hormonların seviyesi yükselmeye başlar (Quarles, 2003). Serum FGF23'teki bu yükseliş, PTH'daki yükselişten daha önce gerçekleşir ve bağımsız bir şekilde renal fosfat ekskresyonu artarak serum fosfat normal oranda korunur (Ritz ve Gross, 2005). Artmış PTH, fosfatın renal ekskresyonunu artırarak ve 1 α -hidroksilaz aktivitesini uyararak fosfat ve plazma kalsitrol seviyelerini normale çevirir. Bununla birlikte PTH'nun temel hedefi, kemik turnoverını artırmayı sağlayan plazma kalsiyum konsantrasyonunu düzenlemektir (Santos ve ark., 2003). Çalışmalar, normal populasyonda (Morrison ve ark., 1994; Uitterlinden ve ark., 1996; Yamagata ve ark., 1994), ikiz çiftlerde (Morrison ve ark., 1994; Hustmyer ve ark., 1994), premenapozal kadınlarda (Garnero ve ark., 1995; Houston ve ark., 1996; Fleet ve ark., 1995; Salamone ve ark., 1996), postmenapozal kadınlarda (Houston ve ark., 1996; Keen ve ark., 1995; Kroger ve ark., 1995; Krall ve ark., 1995; Looney ve ark., 1995), yaşlı kadınlarda (Gross ve ark., 1996; Ferrari ve ark., 1995; Melhus ve ark., 1994), sağlıklı kadınlarda (Riggs ve ark., 1995), osteoporozlu kadınlarda (Riggs ve ark., 1995), beyaz ve siyahi kadınlarda (Fleet ve ark., 1995) gerçekleştirilmiştir. Bütün bu çalışmalar Kafkaslar (Houston ve ark., 1996; Keen ve ark., 1995), İtalyanlar (Ferrari ve ark., 1995), Finliler (Kroger ve ark., 1995), Kuzey Amerikalılar (Fleet ve ark., 1995; Krall ve ark., 1995), İsveçliler (Melhus ve ark., 1994), Hollandalılar (Uitterlinden ve ark., 1996), Avusturyalılar (Morrison ve ark., 1992), Almanlar (Baltzer ve ark., 1999), Fransızlar (Garnero ve ark., 1995), Doğulular (Yamagata ve ark., 1994) ve Güney Amerikalılar (Lazeretti ve ark., 1997) gibi farklı etnik kökenli populasyonlarda yapılmıştır. Bütün bu çalışmalardan çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir. Sonuçlar bazılarında ilişkili bazılarında ise tartışmalı bulunmuştur. Bu farklılıklar beslenmedeki farklılıklar (Krall ve ark., 1995; Kiel ve ark., 1997), farklı populasyonlarda (Morrison ve ark., 1994) genotip dağılımı ya da her bir çalışmadaki örnek sayısı ile açıklanabilir.

1.4. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri

Restriksiyon endonükleazlar (RE), bakterilerde yabancı bir DNA molekülünün hücreye girişine karşı bir savunma mekanizması sağlayan enzimlerdir. Bakterilerin DNA molekülünü yüzden fazla farklı tanıma bölgesinden kesen çok sayıda RE vardır ve her biri DNA üzerinde 4-8 bazlık özgün dizileri tanır. RE'lar DNA'yı belli bölgelerden kesmek için kullanılabilir (Cooper ve Hausman, 2006). Bu enzimler DNA'yı molekül içinde kestikleri için endonükleaz, aktiviteleri yabancı DNA'da sınırlı kaldığı için restriksiyon olarak tanımlanır (Solak ve ark., 2000).

Bu tekniğin uygulanabilmesindeki temel mantık; transisyon ya da transversiyon tipindeki mutasyon ya da polimorfizmin bu bölgedeki bir enzimin tanıma dizisini ortadan kaldırdığı gibi bazen de bir enzim için o bölgede yeni bir tanıma dizisi oluşumuna neden olabileceğidir.

Bu yöntemde kan ya da dokudan izole edilen DNA parçası PCR işlemine tabi tutulur. PCR ile çoğaltılan bölge uygun restriksiyon enzimleri ile kesilir. Kesilen parçalar elektroforez yöntemi ile jelde yürütüldükten sonra çeşitli yöntemlerle boyanarak görünür hale getirilir. Ultraviyole ışık altında büyüklükleri incelenir ve fragmentlerin büyüklüğüne göre analiz yapılır (Lüleyap, 2008).

Hedef DNA bölgesinin RE enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan ve uzunlukları açısından çeşitlilik gösteren DNA fragmentleri, Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP) olarak adlandırılır. RFLP'ler birçok hastalıkta kalıtsal marker olarak kullanılmaktadır (Nussbaum ve ark., 2005).

1.5. DNA Dizi Analizi

DNA dizileme, mutasyon belirlemede altın standarttır. DNA dizi analizi için en yaygın olarak kullanılan yaklaşım Sanger yöntemidir. Çok basamaklı bir işlem olan Sanger dizi analizinin avantajı, başlangıçtaki orjinal kalıp için komplementer zinciri sentezleyen DNA polimerazı inhibe etmek amacıyla nükleotidlerin kimyasal analoglarının kullanılmasıdır. DNA dizi analizini başlatmak için kısa bir oligonükleotid ile DNA sentezi başlatılır ve DNA polimeraz, kalıp iplik boyunca

hareket eder veya radyoaktif işaretli nükleotidleri ya da floresan işaretli nükleotidleri yeni sentezlenen zincir içersine ekler. Dört sekans reaksiyonunun her birine dört normal nükleotidin her biri yalnızca bir inhibitör analogunun eklenmesi ile bir sekans bilgisi sağlanır. Örnekler jel elektroforezi ile analiz edildiğinde, bir seri bant elde edilir. Daha sonra analiz edilen DNA fragmentinin nükleotid dizisini saptamak için doğrusal bir merdiven olarak okunabilir.

Günümüzde, DNA dizi analizine ait işlemi otomatikleştirmek için cihazlar geliştirilmiştir ve bunlar hem normal hem de mutant genlerin analizi için rutin olarak kullanılmaktadır. (Nussbaum ve ark., 2005).

Bu çalışmanın amacı, kronik böbrek hastalarından ve sağlıklı bireylerden oluşan çalışma grubunda, *KLOTHO* geninin G-395A ve C1818T polimorfizmleri ve Vitamin D reseptör geninin ApaI ve TaqI polimorfizmlerini genotipleyerek, hasta ve kontrol grubu arasındaki sıklığını belirlemek ve böylece hastalık ile söz konusu polimorfizmlerin arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır. Ayrıca hastalık ile ilişkili bazı biyokimyasal parametreler ile bu polimorfizmlerin ilişkisini değerlendirerek hastalığın etiyojisi üzerine söz konusu polimorfizmlerin etkisini araştırmaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

“Kronik Böbrek Hastalığında KLOTHO ve VDR Geni Polimorfizmlerinin Araştırılması" isimli bu tezin çalışmalarına başlanmadan önce Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Danışma Kurulu Başkanlığı'ndan 07.06.2010 tarihli ve 2010/B054 karar numaralı etik kurul onayı alınmıştır.

2.1. Hasta ve Kontrol Grupları

Bu çalışmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD/Nefroloji BD kliniğinde kronik böbrek hastalığı tanısı almış yaşları 18 ile 69 yaş arasında olan, akut ya da kronik inflamatuvar ya da infeksiyöz hastalığı olmayan, hipo/hipertiroidisi olmayan, vaskülit ve aort koartasyonu olmayan, bilinen mental hastalığı olmayan, malignitesi olmayan, son 1 yılda akut majör kardiyovasküler olay geçirmemiş, bilinen orta-ağır KOAH'ı olmayan 104 diyalize girmemiş kronik böbrek hastası ve bilinen herhangi bir hastalığı olmayan 104 kontrol grubu çalışmaya dahil edildi.

Çalışma kriterlerine uygun olan bireylere etik kurulca onaylanmış onam formları imzalatılarak çalışma grubu oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubuna ait gerekli bilgiler daha önceden hazırlanmış olan hasta bilgi formları her hasta için poliklinik doktorları tarafından dolduruldu. Olgular yaş, cinsiyet, kilo, boy, BMI, ön kol KMD (Sol Önkol/SA)), sistolik kan basıncı ve diyastolik kan basıncının yanında elde edilen serum örneklerinde tam kan sayımı, sedimentasyon, CRP, böbrek fonksiyon testleri, açlık glukoz, total kolesterol, trigliserit, HDL kolesterol, LDL kolesterol, VLDL, TSH, PTH gibi biyokimyasal parametreler açısından değerlendirildi. Hastalardan EDTA'lı tüplere 4cc kan alındı. Alınan kanlar DNA izolasyonu yapılana kadar +4°C' de muhafaza edildi. DNA izolasyonundan sonra ise -20 °C' de saklandı.

2.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Mikro santrifüj (**Heraeus – Biofuge pico**)

Soğutmalı santrifüj (**Thermo**)

Hassas terazi (**Sartorius**)

Hot plate (**Nüve**)

Vorteks (**Nüve**)

Spektrofotometre (**NanoDrop ND-1000**)

Termal Cyclers (**Eppendorf - Mastercycler personal**)

Termal Cyclers (**Techne**)

Mikropipetler (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl) (**Eppendorf Research**)

Çeker ocak

Distile su cihazı (**Barnstead**)

Yatay elektroforez tankı (**Thermo**)

Mikrodalga fırın (**Arçelik**)

Buzdolabı (**Profilo**)

Derin dondurucu (-20) (**Bosch**)

Jel görüntüleme sistemi (**BioDoc-It® Imaging System-UVP**)

Güç kaynağı (**Apelex**)

ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (**Applied Biosystems**)

Jel görüntüleme sistemi (**Wealtec Dolphin-View**)

Santrifüj (**Sarstedt, Gruppe, DESAGA**)

Mini Cyclers (**MJ Research**)

Termal Cyclers (**Global Genomics Partner, Bio-Neer**)

Santrifüj (**Rotina 420, Hettich Zentrifugen**)

Real-Time PCR (**ABI, GeneAmp 5700 Sequence Detection System**)

GE-LUNAR DPX PRO

2.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

DNA İzolasyon Kiti (High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche))

Binding Buffer (**Roche**)

Proteinaz K (**Roche**)

Inhibitor Removal Buffer (**Roche**)

Wash Buffer (**Roche**)

Elution Buffer (**Roche**)

Collection Tüpler (**Roche**)

Filtreli Tüpler (**Roche**)

Primerler

KLOTHO geni C1818T (rs564481) polimorfizmi için primerler (Metabion)

F: 5'- TTACCTGTGGGATGTCCACCA -3'

R: 5'- GATGGCCGAGCTCTT GAA AG -3'

KLOTHO geni G395A (rs1207568) polimorfizmi için primerler (Metabion)

F: 5'- CAGTCCCAACGCAACCCATA -3'

R: 5'- TCAGGTTTCATTCTCTTTGCCT -3'

VDR geni ApaI (rs7975232) polimorfizmi için primerler (Iontek)

F: 5'- CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG -3' (48,6 nmol)

R: 5'- GCAACTCCTCATGGGCTGAGGTCTCA -3' (39,4 nmol)

VDR geni TaqI (rs731236) polimorfizmi için primerler (Iontek)

F: 5'- CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG -3' (38,5 nmol)

R: 5'- GCAACTCCTCATGGGCTGAGGTCTCA -3' (35,8 nmol)

Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (**Applied Biosystems**)

ABI PRISM® 3100 POP-4™ polymer (**Applied Biosystems**)

Disodium EDTA.2H₂O (**Sigma**)

Sodyum Asetat (**Sigma**)

Formamid (**Applied**)

Binding Buffer NTI (**Macherey-Nagel**)
Wash Buffer NT3 (**Macherey-Nagel**)
Elution Buffer NE (**Macherey-Nagel**)
0,2 µl' lik 8'li strip tüp (**Greiner Bio-One**)
ApaI restriksiyon enzimi-10u/µl, 3000u (**Fermentas**)
ApaI enzim tamponu (**Fermentas**)
TaqI restriksiyon enzimi-10u/µl, 3000u (**Fermentas**)
TaqI enzim tamponu (**Fermentas**)
Taq DNA polimeraz-5u/µl, 500u (**Fermentas**)
Maxima Taq DNA polimeraz-5u/µl, 500u (**Fermentas**)
MgCl₂, 25mM (**Fermentas**)
10X HotStart PCR tamponu-1,25ml (**Fermentas**)
dNTP mix, 10 mM-0,2 ml (**Fermentas**)
DNA Marker (**Fermentas GeneRuler** 100 bp DNA Ladder, 0,5µg/µl, 50 µg)
Isopropanol (**Sigma**)
%70' lik Ethanol absolute (**Merck**)
%100' lik Ethanol absolute (**Merck**)
Agaroz (**Multicell**)
5 X TBE Buffer (**Biological Industries**)
Etidyum bromür (**Sigma**)
Orange G (**Sigma**)
6X Loading Dye (**Fermentas**)
Bromphenol blue (Sodium Salt %0.25, Ficoll 400 %15) (**Applichem**)
Erlen mayer (**Isolab**)
Mezürler (50 ml, 100 ml, 500 ml) (**Isolab**)
Steril sarı ve beyaz pipet ucu (**Axygen**)
0.2 ml'lik Ependorf tüpleri (**Axygen**)
1.5 ml'lik Ependorf tüpleri (**Axygen**)
2 ml' lik collection tüpler (**Macherey-Nagel**)
Çeşitli boyutta cam şişeler (**Isolab**)
Steril dH₂O

2.4. Kullanılan Solüsyon ve Tamponların Hazırlanması

Inhibitör removal Buffer

20 ml absolute ethanol eklenerek hazırlandı

Wash Buffer

80 ml absolute ethanol eklenerek hazırlandı

Proteinaz K

4,5 ml steril distile suda çözülerek hazırlandı.

KLOTHO geni C1818T (rs564481) polimorfizmi için Forward Primer

Liyofilize içeriğe 200 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

KLOTHO geni C1818T (rs564481) polimorfizmi için Reverse Primer

Liyofilize içeriğe 200 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

KLOTHO geni G395A (rs1207568) polimorfizmi için Forward Primer

Liyofilize içeriğe 200 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

KLOTHO geni G395A (rs1207568) polimorfizmi için Reverse Primer

Liyofilize içeriğe 200 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

VDR geni ApaI(rs7975232) polimorfizmi için Forward Primer

Liyofilize içeriğe 486 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

VDR geni ApaI(rs7975232) polimorfizmi için Reverse Primer

Liyofilize içeriğe 394 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

VDR geni TaqI(rs731236) polimorfizmi için Forward Primer

Liyofilize içeriğe 385 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

VDR geni TaqI(rs731236) polimorfizmi için Reverse Primer

Liyofilize içeriğe 358 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

0.5 X TBE Buffer

5 X TBE Buffer'dan 1'e 9 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlandı.

0.5 M EDTA

186,1 g Disodium EDTA.2H₂O 800ml dH₂O'da çözüldü, pH NaOH'le 8'e ayarlandı, total volüm 1000ml'ye tamamlandı.

125 mM EDTA

100ml 0.5M EDTA'ya 400 ml dH₂O eklenerek hazırlandı.

3M Sodyum Asetat

40,8 g NaOAc 70 ml dH₂O'da çözüldü, pH glasiyal asetik asitle 5.2'ye ayarlandı, total volüm 100ml'ye tamamlandı.

2.5. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

İzolasyon High Pure PCR Template Preparation Kit ile gerçekleştirilmiştir.

1. Önceden 70 C⁰'ye getirilmiş su banyosuna son basamakta ilave edilmek üzere yeterli miktarda elution buffer inkübasyona bırakıldı.
2. 200 µl kan, 200 µl binding buffer ve 40 µl Proteinaz K 1,5 ml lik tüpe sırasıyla eklendi.
3. Karışım vortekslendikten sonra santrifüjde spin atıldı ve 70 ⁰C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. 10 dakika sonunda karışımın üzerine 100µl isopropanol eklendikten sonra vortekslendi, santrifüjde spin atıldı ve altında collection tüp (toplama tüpü) bulunan filtreli tüpe aktarıldı.
5. Filtreli tüpe aktarılan karışım 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve collection tüp değiştirildi.
6. Inhibitor removal buffer'dan 500 µl ilave edildi ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildikten sonra collection tüp değiştirildi.
7. 500 µl wash buffer ilave edildi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra collection tüp değiştirildi.
8. Yıkama işlemi, yani 7. basamak tekrar edildi.
9. Yıkamalardan sonra boş collection tüple 13.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Collection tüp atıldı ve filtreli tüpler 1,5 ml lik tüplere yerleştirildikten sonra 150µl elution buffer ilave edilerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

2.6. *KLOTHO* Geni için PCR Koşulları

KLOTHO geninin 4. ekzonunda yer alan C1818T (rs564481) ve promotör bölgede yer alan G395A (rs1207568) SNP değişimlerini dizi analiziyle tespit etmek amacıyla PCR gerçekleştirildi. Bunun için toplam 50 µl'lik PCR karışımı hazırlandı.

***KLOTHO* geni C1818T polimorfizmi için hazırlanan 50 µl'lik PCR karışımı:**

10X PCR Buffer	5µl
MgCl ₂ (25 mM)	3µl
dNTP mix (25 mM)	5µl
F primer (10 pmol)	2 µl
R primer (10 pmol)	2 µl
Taq DNA polimeraz	0,25 µl
dH ₂ O	27,50µl
Kalıp DNA	5 µl

Ependorf tüpler içinde hazırlanan karışım pipetaj ve kısa bir santrüfuj işleminden sonra ısı döngüsü aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan Thermal Cycler'a yerleştirildi.

***KLOTHO* geni C1818T polimorfizmi için hazırlanan Thermal Cycler ısı döngüsü:**

95 °C	5 dk	
95 °C	1 dk	} 30 Döngü
55 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
72 °C	7 dk	
4 °C	Saklama	

KLOTHO geni G395A polimorfizmi için hazırlanan 50 µl'lik PCR karışımı:

10X PCR Buffer	5µl
MgCl ₂ (25 mM)	3µl
dNTP mix (25 mM)	5µl
F primer (10 pmol)	2 µl
R primer (10 pmol)	2 µl
Taq DNA polimeraz	0,25 µl
dH ₂ O	31,75µl
Kalıp DNA	1 µl

Ependorf tüpler içinde hazırlanan karışım pipetaj ve kısa bir santrüfuj işleminden sonra ısı döngüsü aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan Thermal Cycler'a yerleştirildi.

KLOTHO geni G395A polimorfizmi için hazırlanan Thermal Cycler ısı döngüsü:

95 °C	5 dk	
95 °C	1 dk	} 30 Döngü
55 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
72 °C	7 dk	
4 °C	Saklama	

1. tur PCR'da 2 primer ve bunun ürünlerinin kullanılarak yapıldığı 2. tur PCR'da 2 çift primer kullanıldı. Bu şekilde nested PCR yapılmış oldu. 2. tur PCR'dan sonra agoroz jel hazırlandı. PCR ürünleri agoroz jelde yürütülüp elektroforezde görüntüleme yapıldı.

Agaroz Jelde Görüntüleme

Agaroz jel yükleme tamponu (6X):

- % 0,05 Bromofenol mavi,
- % 15 Fikol,
- % 0,05 Ksilen siyanol.
- %2 lik agaroz jel kullanıldı.

2.7. KLOTHO Geni için PCR Temizleme

PCR temizleme için Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II kit kullanılmıştır.

1. 100 µl PCR ürününe 200 µl Binding Buffer NTI ilave edildi.
2. Eppendorf tüpler 2 ml'lik collection tüplere yerleştirildi.
3. 11000 rpm'de 30 sn. santrifüj edildi.
4. 700 µl Buffer NT3 ilave edilerek yıkama işlemine geçildi.
5. 11000 rpm'de 30 sn. santrifüj edildi.
6. Gerekli olursa yıkama aşaması tekrarlanabilir.
7. Buffer NT3'ü uzaklaştırmak için 11000 rpm' de 1 dk. santrifüj edildi.
8. Buffer NT3'den kalan etanolün tamamen uzaklaştırılması için tüpler 70⁰C'de 2-5 dk. inkübe edilir.
9. 1,5 ml' lik yeni eppendorf tüplere filtreli tüpler yerleştirilir ve 15-30 µl Buffer NE eklendi.
10. Oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edildi.
11. 11000 rpm' de 1 dk. santrifüj edildi.

2.8. *KLOTHO* Geni Dizi Analizi

Sekans PCR:

PCR ürünleri ile “Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing” kiti içerisinde bulunan Big Dye Karışımı kullanılarak, *KLOTHO* geni C1818T ve G395A SNP’lerinin ilk PCR’ında kullanılan F primerlerle sekans PCR’ı gerçekleştirilmiştir.

***KLOTHO* C1818T ve G395A polimorfizmi için hazırlanan 20 µl’lik Sekans PCR karışımı:**

Big Dye Karışımı	8 µl
Primer F	3.2 pmol
İlk PCR ürünü	5 µl
dH ₂ O	3.8 µl

Ependorf tüpler içinde hazırlanan karışım pipetaj ve kısa bir santrüfuj işleminden sonra ısı döngüsü aşağıdaki şekilde hazırlanmış olan Thermal Cycler’a yerleştirildi.

***KLOTHO* C1818T ve G395A polimorfizmi için Sekans PCR Thermal Cycler ısı döngüsü:**

96°C	30 sn	
96°C	10 sn	} 30 Döngü
50°C	5 sn	
60°C	4 dk	

Sekans Temizleme:

Sekans temizleme, her biri 20 µl PCR ürünü içeren 96 kuyucuklu reaksiyon plate’te Ethanol/EDTA/Sodyum Asetat metodu ile yapıldı ve 15 µl formamid içinde çözülerek DNA dizi analizi makinesine verildi.

1. 96 kuyucuklu reaksiyon plate thermalcyclers'dan alındı ve kısa süreli spin atıldı.
2. Her bir kuyucuğa 2 µl EDTA (125 mM) ilave edildi ve kuyucuğun tabanına ulaşması sağlandı.
3. Her bir kuyucuğa 2 µl Sodyum Asetat (3 M) ilave edildi ve kuyucuğun tabanına ulaşması sağlandı.
4. Kuyucuklara 50 µl %100'lük ethanol ilave edildi.
5. Plate aliminyum bantla tamamen kaplandı ve 4 kez ters düz edilerek karıştırıldı.
6. Oda ısısında 15 dakika inkübe edildi.
7. 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
8. Plate santrifüjden çıkarılıp ters çevrildi ve spin atıldı.
9. Kuyucuklara 70 µl %70'lik ethanol ilave edildi.
10. Soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
11. Plate santrifüjden çıkarılıp ters çevrildi ve spin atıldı.
12. Kuyucukların karanlıkta iyice kurumaması sağlandı.
13. Devam etmek için örneklere enjeksiyon buffer ilave edildi. Hemen çalışılmıyacaksa plate alüminyum folyo ile kaplandı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

Kapiller Elektroforez:

Sekansı takiben reaksiyon purifikasyonu yapıldıktan sonra, örnekler Applied Biosystems kapiller elektroforeze dayalı genetik analizörde (ABI 3100) analiz için hazır hale geldi. Kapiller elektroforezde, siklus sekans reaksiyon ürünleri elektrokinetik olarak, POP-4 polimerle doldurulmuş kapillerlere enjekte edildi. Uygulanan yüksek voltajla, negatif yüklü DNA fragmanları pozitif elektroda doğru, kapillerler içindeki polimer boyunca hareket etti.

Veri Analizi:

Kapiller elektroforezden sonra, veri toplama software'i Sequencing Analysis Software Version 5.1 ile ham verilerden oluşan bir örnek dosyası oluşturdu.

Toplanan renk-veri bilgilerinin karşılık gelen nükleotid bazlarına dönüştürülmesi için veri analizi yapılması amacıyla Finch TV programı kullanıldı.

2.9. VDR Geni için PCR Koşulları

VDR geninin intron 8 bölgesinde yer alan ApaI (rs7975232) ve ekzon 9 bölgesinde yer alan TaqI (rs731236) polimorfizmlerini, PCR RFLP metoduyla tespit etmek amacıyla PCR gerçekleştirildi. PCR'ı takiben RFLP için %2'lik agaroz jel dökülerek enzim kesim ürünleri jelde yürütüldü. Bunun için toplam 50 µl'lik PCR Mix'i hazırlandı.

VDR Geni ApaI ve TaqI Polimorfizmleri için Hazırlanan 50 µl'lik PCR karışımı:

10X PCR Buffer	5µl
MgCl ₂ (25 mM)	3µl
dNTP mix (10 mM)	1µl
F primer (100 nmol)	1µl
R primer (100 nmol)	1µl
Taq DNA polimeraz (500U)	0.5 µl
dH ₂ O	33.5 µl
Kalıp DNA	5µl

VDR Geni ApaI ve TaqI Polimorfizmleri için Hazırlanan Thermal Cyclus Isı Döngüsü:

94 ⁰ C	5 dk	} 10 Döngü
94 ⁰ C	20 sn	
65 ⁰ C	50 sn	
72 ⁰ C	1 dk	

94 ⁰ C	20 sn	} 25 Döngü
63 ⁰ C	50 sn	
72 ⁰ C	1 dk	
72 ⁰ C	6 dk	
4 ⁰ C	Saklama	

2.10. %2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması

PCR sonunda, amplifikasyon ürünlerinin kontrol edilmesi için %2'lik agaroz jel hazırlandı. 150 ml 0,5X TBE içine 3 g agaroz eklenerek mikrodalga fırında saydamlaşınca kadar kaynatılıp, içerisine çeker ocak altında 10 µl EtBr ilave edildi ve toplam volüm jel dökme setine dökülerek tarak yerleştirildi. Jel donduktan sonra tarak çıkarıldı. Böylece ürünün yüklenmesi için gerekli olan kuyucuklar oluşturuldu.

2.11. Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Kontrolünün Yapılması

Hazırlanan %2'lik agaroz jel, içinde 0,5X TBE bulunan elektroforez tankına alındı. Jel tarağının oluşturduğu kuyulardan ilkinde 1µl 6X yükleme boya solüsyonu, 2µl marker DNA, 3µl dH₂O karışımı; diğer kuyulara ise 2 µl yükleme tamponu brom fenol blue ile birlikte 10µl PCR ürünü yüklendi. 100 voltta 1,5 saat yürütüldü. Sonuçlar jel görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

2.12. Enzim Kesimi

2.12.1. VDR Geni ApaI Polimorfizmi için ApaI Enzim Kesimi

PCR'dan sonra kontrol edilen ve amplifiye olan örneklere ApaI enzim kesimi uygulandı. Bunun için hazırlanan karışım aşağıda verilmiştir.

PCR ürünü	10µl
dH ₂ O	18µl
10X Buffer B	2µl
ApaI enzim	1,5µl

Eppendorf tüpler içinde hazırlanan karışım hafifçe pipetaj yaparak karıştırıldı ve santrifüj yapıldı. 37⁰C’de 3 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda elde edilen ürünler %2’lik agaroz jelde kontrol edildi. Agaroz jele markır ve enzim kesim ürünlerinin yüklemesi PCR ürünlerinin kontrolü için yapılan yüklemeyle aynı şekilde yapıldı. Agaroz jel elektroforeziyle yapılan RFLP analizi sonucunda elde edilen bantlara göre üç farklı genotip belirlendi:

PCR ürünü : 740 bç

Genotip AA : 740 bç büyüklüğünde tek bant

Genotip Aa : 740 bç, 515 bç, 225 bç büyüklüğünde 3 bant

Genotip aa : 515 bç, 225 bç büyüklüğünde 2 bant

2.12.2. VDR Geni TaqI Polimorfizmi için TaqI Enzim Kesimi

PCR’ dan sonra kontrol edilen ve amplifiye olan örneklere TaqI enzim kesimi uygulandı. Bunun için hazırlanan karışım aşağıda verilmiştir.

PCR ürünü	10µl
dH ₂ O	18µl
10X Buffer TaqI	2µl
ApaI enzim	1,5µl

Eppendorf tüpler içinde hazırlanan karışım hafifçe pipetaj yaparak karıştırıldı ve santrifüj yapıldı. 65⁰C’de 3 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda elde edilen ürünler %2’lik agaroz jelde kontrol edildi. Agaroz jele marker ve enzim kesim ürünlerinin

yüklemesi PCR ürünlerinin kontrolü için yapılan yüklemeyle aynı şekilde yapıldı. Agaroz jel elektroforeziyle yapılan RFLP analizi sonucunda elde edilen bantlara göre üç farklı genotip belirlendi:

PCR ürünü : 740 bç

Genotip TT : 495 bç, 245 bç büyüklüğünde 2 bant

Genotip Tt : 495 bç, 290 bç, 245 bç, 205 bç büyüklüğünde 4 bant

Genotip tt : 290 bç, 245 bç, 205 bç büyüklüğünde 3 bant

2.13. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analiz PASW (Predictive Analytics SoftWare) version 19 programı kullanılarak yapılmıştır. Kontrol ve çalışma grupları arasındaki yaş ortalaması için T-testi kullanılmıştır. Diğer parametreler için Fisher'in ki kare testi (X^2 dağılımı) kullanılmıştır. p değeri <0.05 olduğunda istatistiksel açıdan anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Ayrıca her bir polimorfizmin genotip dağılımı Hardy-Weinberg dengesine (HWE) uygunluk bakımından X^2 testi kullanılarak test edilmiştir. P değeri >0.05 ise Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD/Nefroloji BD kliniğinde takip edilerek kronik böbrek hastalığı tanısı almış (diyalize girmemiş) yaşları 18 ile 69 arasında olan 104 hasta ve bilinen herhangi bir hastalığı olmayan 104 kontrol çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen kronik böbrek hastalarının yaş ortalaması 56.76 ± 1.22 iken, kontrol grubunun yaş ortalaması 49.13 ± 1.00 olarak hesaplanmıştır.

VDR geni ApaI, TaqI ve *KLOTHO* geni C1818T, G395A polimorfizmlerinin hasta ve kontrol grubundaki genotip dağılımları hesaplanmış ve aralarındaki fark istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

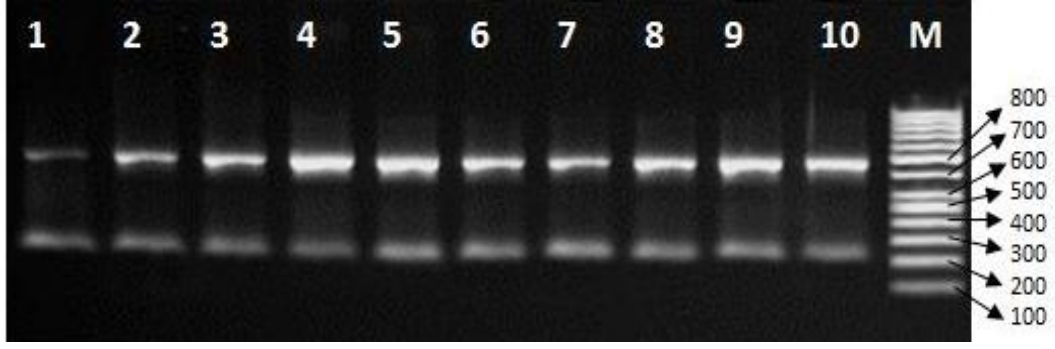
Çalışma kapsamında ayrıca kronik böbrek hastalarında hipertansiyon, diyabet, PTH düzeyi ve kemik mineral dansite verileri ile VDR ve *KLOTHO* geni polimorfizmlerinin genotip dağılımları karşılaştırılmıştır.

VDR geni ApaI, TaqI ve *KLOTHO* geni C1818T, G395A polimorfizmleri için hasta ve kontrol grubunda elde edilen genotip dağılımları, Hardy-Weinberg dengesine (HWE) uygunluk bakımından X^2 testi kullanılarak test edilmiştir. Hardy-Weinberg analizi, beklenen ve gözlenen homozigot değeri, beklenen ve gözlenen heterozigot değeri ve allel frekansı hesaplamaları yapılmıştır.

3.1. VDR Geni Polimorfizmlerinin Genotiplendirilmesi

Çalışma grubunda, VDR geni ApaI (rs7975232) ve TaqI (rs731236) TNP'leri PCR-RFLP yöntemiyle genotiplendirildi.

VDR geni 3' kodlanmayan bölge (untranslated region=UTR) polimorfizmlerinden intron 8'de bulunan ApaI (rs7975232) A/C polimorfizminin tespiti için PCR uygulaması sonucu 740 bç'lik ilk ürünün kontrolü %2'lik agaroz jelde yapılmıştır, Bazı olgulara ait agaroz jel görüntüsü verilmiştir (Şekil 3.1.1).



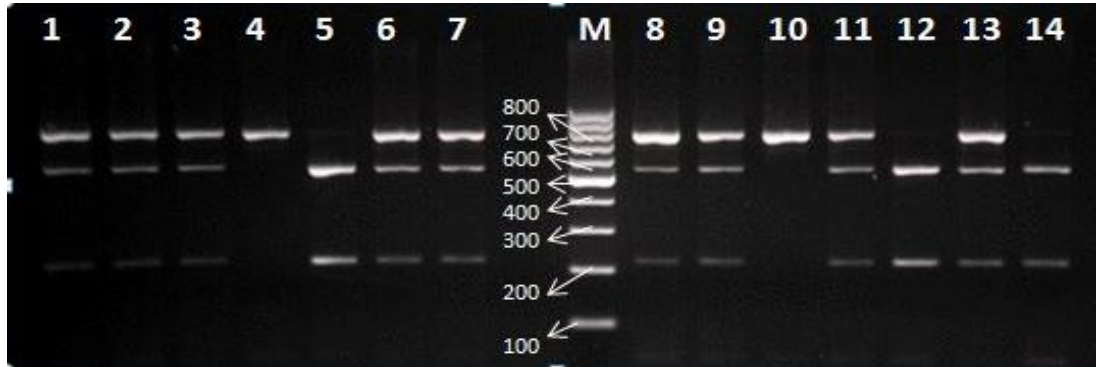
Şekil 3.1.1: *VDR* geni *ApaI* polimorfizmi, 740 bç'lik amplifikasyon ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü. M: Marker DNA (100bç, 200bç, 300bp, 400bç, 500bç, 600bç, 700bç, 800bp, 900bç, 1000bç). 1-10: Olgulara ait amplifikasyon ürünü.

Birinci PCR'dan sonra amplifiye olan örneklere *ApaI* enzim kesimi uygulandı. Kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde kontrol edildi (Şekil 3.1.2). Elde edilen bant paternine göre aşağıda verildiği şekilde genotipleme yapıldı.

Homozigot AA : 740 bç büyüklüğünde tek bant

Heterozigot Aa : 740bç, 530bç, 210bç büyüklüğünde 3 bant

Homozigot aa : 530bç, 210bç büyüklüğünde 2 bant



Şekil 3.1.2: *VDR* geni *ApaI* polimorfizmi, 740 bç'lik amplifikasyon ürününün *ApaI* enzimi ile yapılan kesim sonuçlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü. M: Marker DNA 100bç, 200bç, 300bp, 400bç, 500bç, 600bç, 700bç, 800bp, 900bç, 1000bç). 1-14: Olgulara ait *ApaI* enzim kesim ürünleri. (1:Aa, 2:Aa, 3:Aa, 4:AA, 5:aa, 6:Aa, 7:Aa, 9:Aa, 10:AA, 11:Aa, 12:aa, 13:Aa, 14:aa)

VDR geni *ApaI* (rs7975232) polimorfizminin genotip dağılımı olgu grubunda %42.3 (44/104) AA, %34.6 (36/104) Aa, %23.1 (24/104) aa; kontrol grubunda %58.6 (61/104) AA, %18.3 (19/104) Aa, %23.1 (24/104) aa bulunmuştur. *VDR* geni *ApaI*

(rs7975232) polimorfizmi genotip dağılımı olgu ve kontrol grupları arasında değerlendirilmiş ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olup Aa genotipi hasta grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 3.1.1.).

Tablo 3.1.1. Hasta ve kontrol gruplarında VDR geni ApaI A/C polimorfizmi için genotip dağılımı

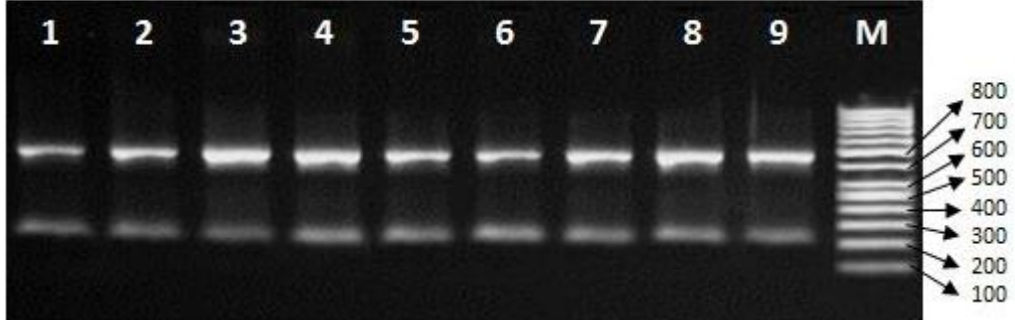
	VDR Geni ApaI Genotip Sıklığı			Toplam (n)	p değeri
	AA (n/%)	Aa (n/%)	aa (n/%)		
Hasta	44 (%42,3)	36 (%34,6)	24 (%23,1)	104	0.018
Kontrol	61 (%58,6)	19 (%18,3)	24 (%23,1)	104	

VDR geni ApaI polimorfizminin hasta grubundaki A alleli frekansı 0.596, a alleli frekansı 0.404 olarak bulunurken kontrol grubundaki A alleli frekansı 0.678, a alleli frekansı 0.322 olarak bulunmuştur. Allel frekansı açısından gruplar arasında fark bulunmamıştır ($p=0.083$). ApaI genotip frekansı hasta ve kontrol grubunda HW dengesine uymamaktadır (sırasıyla; $p=0.004$, $p=0.000$). VDR geni ApaI polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda genotip ve allel frekansı dağılımları Tablo 3.1.1.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1.1.1 ApaI polimorfizminin genotip ve allel frekansları

ApaI	Allel	Frekans	Genotip	n	Frekans		X^2	p değeri
					Gözlenen	Beklenen		
Hasta	A	0.678	AA	44	0.423	0.355	8.22	0.004
	a	0.322	Aa	36	0.346	0.482		
			aa	24	0.231	0.163		
Kontrol	A	0.596	AA	61	0.586	0.460	35.19	0.000
	a	0.404	Aa	19	0.182	0.436		
			aa	24	0.230	0.104		

VDR geni 3' kodlanmayan bölge (untranslated region=UTR) polimorfizmlerinden ekzon 9'da bulunan TaqI (rs731236) C/T polimorfizminin tespiti için PCR uygulaması sonucu 740 bç'lik ilk ürünün kontrolü %2'lik agaroz jelde yapılmıştır, bazı olgulara ait agaroz jel görüntüsü verilmiştir (Şekil 3.1.3).



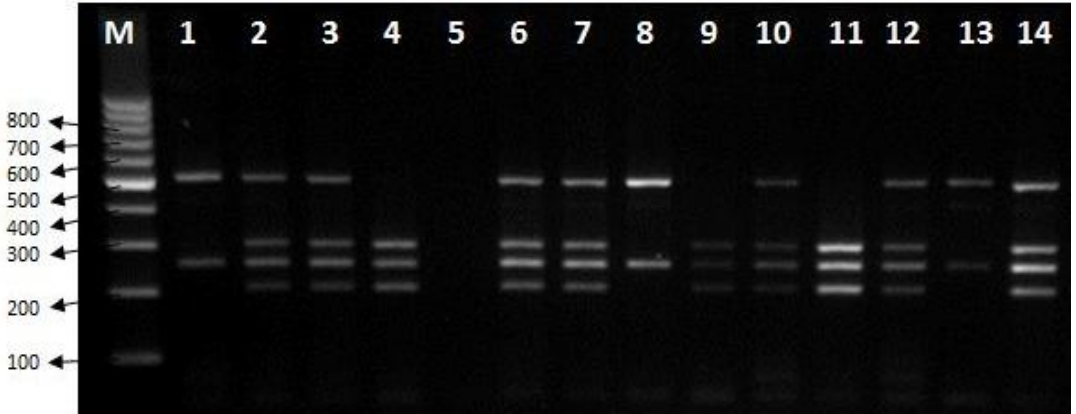
Şekil 3.1.3: VDR geni TaqI polimorfizmi, 740 bç'lik amplifikasyon ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü. M: Marker DNA (100bç, 200bç, 300bp, 400bç, 500bç, 600bç, 700bç, 800bp, 900bç, 1000bç). 1-9: Olgulara ait amplifikasyon ürünü.

Birinci PCR'dan sonra amplifiye olan örneklerle TaqI enzim kesimi uygulandı. Kesim ürünleri %2' lik agaroz jelde kontrol edildi (Şekil 3.1.4). Elde edilen bant paternine göre aşağıda verildiği şekilde genotipleme yapıldı.

Homozigot TT : 495 bç, 245 bç büyüklüğünde 2 bant

Heterozigot Tt : 495 bç, 290 bç, 245 bç, 205 bç büyüklüğünde 4 bant

Homozigot tt : 290 bç, 245 bç, 205 bç büyüklüğünde 3 bant



Şekil 3.1.4: VDR geni TaqI polimorfizmi, 740 bç'lik amplifikasyon ürününün TaqI enzimi ile yapılan kesim sonuçlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü. M: Marker DNA 100bç, 200bç, 300bp, 400bç, 500bç, 600bç, 700bç, 800bp, 900bç, 1000bç). 1-14: Olgulara ait Apal enzim kesim ürünleri. (1:TT, 2:Tt, 3:Tt, 4:tt, 6:Tt, 7:Tt, 8:TT, 9:tt, 10:Tt, 11:tt, 12:Tt, 13:TT, 14:Tt).

VDR geni TaqI (rs731236) polimorfizminin genotip dağılımı olgu grubunda %50 (52/104) TT, %39.4 (41/104) Tt, %10.6 (11/104) tt; kontrol grubunda %48.1

(50/104) TT, %39.4 (41/104) Tt, %12.5 (13/104) tt bulunmuştur. *VDR* geni TaqI (rs731236) polimorfizminin genotip dağılımı açısından gruplar arasında fark bulunmamıştır ($p=0,902$) (Tablo 3.1.2.).

Tablo 3.1.2. Hasta ve kontrol gruplarında *VDR* geni TaqI C/T polimorfizminin genotip dağılımı

	<i>VDR</i> Geni TaqI Genotip Sıklığı			Toplam (n)	p değeri
	TT (n/%)	Tt (n/%)	tt (n/%)		
Hasta	52 (%50)	41 (%39,4)	11 (%10,6)	104	0.902
Kontrol	50 (%48,1)	41 (%39,4)	13 (%12,5)	104	

VDR geni TaqI polimorfizminin hasta grubundaki T alleli frekansı 0.697, t alleli frekansı 0.303 olarak bulunurken kontrol grubundaki T alleli frekansı 0.678, t alleli frekansı 0.322 olarak bulunmuştur. TaqI genotip frekansı hasta grubunda ($p=0.498$) ve kontrol grubunda ($p=0.32$) olup HW dengesine uymaktadır. *VDR* geni TaqI polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda genotip ve allel frekansı dağılımları Tablo 3.1.2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1.2.1. TaqI polimorfizminin genotip ve allel frekansları

TaqI	Allel	Frekans	Genotip	n	Frekans		X^2	p değeri
					Gözlenen	Beklenen		
Hasta	T	0.697	TT	52	0.500	0.485	0.46	0.498
	t	0.303	Tt	41	0.394	0.422		
			tt	11	0.106	0.092		
Kontrol	T	0.678	TT	50	0.480	0.460	0.98	0.32
	t	0.322	Tt	41	0.394	0.436		
			tt	13	0.125	0.104		

Kronik böbrek hastası olan 104 olgudan hipertansiyonu olan birey sayısı 62 (%59.6), hipertansiyonu olmayan birey sayısı ise 42 (%40.4) olarak bulunmuştur. Hipertansiyonu olan ve olmayan bireyler ile *VDR* geni ApaI, TaqI genotip dağılımları arasında fark bulunmamıştır (sırasıyla; $p=0.260$; $p=0.124$). Hasta grubu hipertansiyonu olan ve olmayanlarda *VDR* geni polimorfizmlerinin genotip dağılımı Tablo 3.1.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1.3. Kronik böbrek hastalarında hipertansiyon durumunun *VDR* geni genotipleriyle ilişkisinin değerlendirilmesi

Grup	SNP	Genotip	Hasta (n/%)	p değeri
Hipertansif	ApaI	AA	27(40.5)	0.260
		Aa	24(38.7)	
		aa	11(17.7)	
Hipertansif olmayan	ApaI	AA	17(40.5)	
		Aa	12(28.6)	
		aa	13(31)	
Hipertansif	TaqI	TT	26(61.9)	0.124
		Tt	29(46.8)	
		tt	7(11.3)	
Hipertansif olmayan	TaqI	TT	26(61.9)	
		Tt	12(28.6)	
		tt	4(9.5)	

Kronik böbrek hastası olan 104 olgudan diyabetik olan birey sayısı 41 (%39.4), diyabetik olmayan birey sayısı ise 63 (%60.6) olarak bulunmuştur. Diyabetik olan ve olmayan bireyler ile *VDR* geni ApaI, TaqI genotip dağılımları arasında fark bulunmamıştır (sırasıyla; $p=0.084$; $p=0.602$). Hasta grubunda diyabetik olan ve olmayanlarda *VDR* geni polimorfizmlerinin genotip dağılımı Tablo 3.1.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1.4. Kronik böbrek hastalarında diyabet durumunun *VDR* geni genotipleriyle ilişkisinin değerlendirilmesi

Grup	SNP	Genotip	Hasta (n/%)	p değeri
Diyabetik	ApaI	AA	16(39)	0.084
		Aa	19(46.3)	
		aa	6(14.6)	
Diyabetik olmayan	ApaI	AA	28(44.4)	
		Aa	17(27)	
		aa	18(28.6)	
Diyabetik	TaqI	TT	18(43.9)	0.602
		Tt	18(43.9)	
		tt	5(12.2)	
Diyabetik olmayan	TaqI	TT	34(54)	
		Tt	23(36.5)	
		tt	6(9.5)	

Hasta grubunda PTH düzeyi normal olan birey sayısı 29 (%27.9), yüksek olan birey sayısı 75 (%72.1), kontrol grubunda parathormon düzeyi normal olan birey sayısı 87 (%83.65), yüksek olan birey sayısı 17 (%16.35) olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu arasında PTH düzeyi normal olanlar ile ApaI, TaqI genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.420$; $p=0.432$). PTH düzeyi yüksek olan bireyler ile ApaI, TaqI genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.106$; $p=0.330$). PTH düzeyi ile VDR geni polimorfizmlerinin genotip dağılımı Tablo 3.1.5’de verilmiştir.

Tablo 3.1.5. PTH düzeyinin VDR geni genotipleriyle ilişkisinin değerlendirilmesi

Grup	SNP	Genotip	Hasta (n/%)	Kontrol (n/%)	p değeri	
Normal	ApaI	AA	13(44.8)	51(58.6)	0.420	
		Aa	7(24.1)	17(19.5)		
		aa	9(31)	19(21.8)		
	TaqI	TT	17(58.6)	39(44.8)		0.432
		Tt	9(31)	37(42.5)		
		tt	3(10.3)	11(12.6)		
Yüksek	ApaI	AA	31(44.8)	10(58.8)	0.106	
		Aa	29(38.7)	2(11.8)		
		aa	15(20)	5(29.4)		
	TaqI	TT	35(46.7)	11(64.7)		0.330
		Tt	32(42.7)	4(23.5)		
		tt	8(10.7)	2(11.8)		

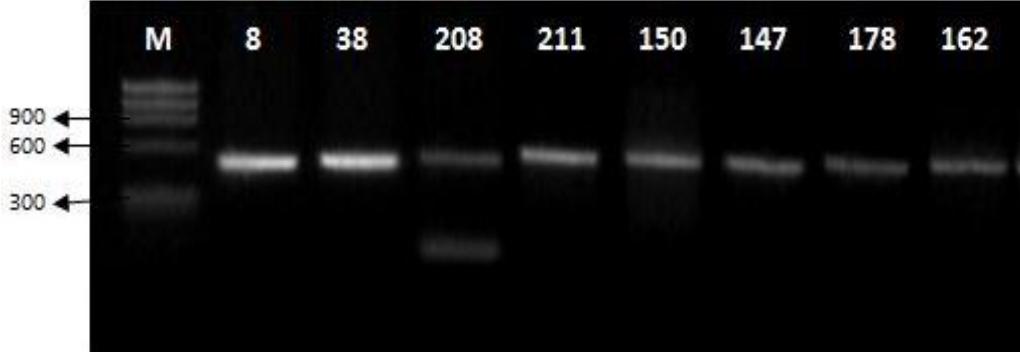
Kronik böbrek hastası 104 hastadan Sol Ön Kol/SA ortalamasına göre; 30 (%28.9) osteoporoz, 36 (%34.6) osteopeni, 38 (%36.5) normal olan birey ile 12 (%11.5) osteoporoz, 39 (%37.5) osteopeni, 53 (%50.9) normal KMD’li kontrol arasında genotip dağılımları incelenmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında osteoporozu olan bireyler ile ApaI, TaqI genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.229$; $p=0.865$). Osteopenisi olan bireyler ile ApaI, TaqI genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.331$; $p=0.816$). Normal bireyler ile ApaI, TaqI genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.149$; $p=0.922$). Sol Ön Kol/SA kemik mineral dansite ölçümleri ile VDR geni ApaI ve TaqI polimorfizmleri genotip dağılımları Tablo 3.1.6.’da verilmiştir.

Tablo 3.1.6. Kronik böbrek hastalarında Sol Ön Kol/SA kemik mineral dansite ölçümleri ile *VDR* geni genotipleri arasındaki ilişkisinin değerlendirilmesi

Ön Kol KMD (Sol Ön Kol/SA)' ye göre Genotip Dağılımı					
Grup	SNP	Genotip	Hasta (n/%)	Kontrol (n/%)	p değeri
Osteoporoz	ApaI	AA	12(40)	6(66.7)	0.229
		Aa	12(40)	3(33.3)	
		aa	6(20)	0(0)	
	TaqI	TT	13(43.3)	3(33.3)	0.865
		Tt	14(46.7)	5(55.6)	
		tt	3(10)	1(11.1)	
Osteopeni	ApaI	AA	15(41.7)	20(51.3)	0.331
		Aa	14(38.9)	9(23.1)	
		aa	7(19.4)	10(25.6)	
	TaqI	TT	19(52.8)	18(46.2)	0.816
		Tt	14(38.9)	18(46.2)	
		tt	3(8.3)	3(7.7)	
Normal	ApaI	AA	17(44.7)	35(62.5)	0.149
		Aa	10(26.3)	7(12.5)	
		aa	11(28.9)	14(25)	
	TaqI	TT	20(52.6)	29(51.8)	0.922
		Tt	13(34.2)	18(32.1)	
		tt	5(13.2)	9(16.1)	

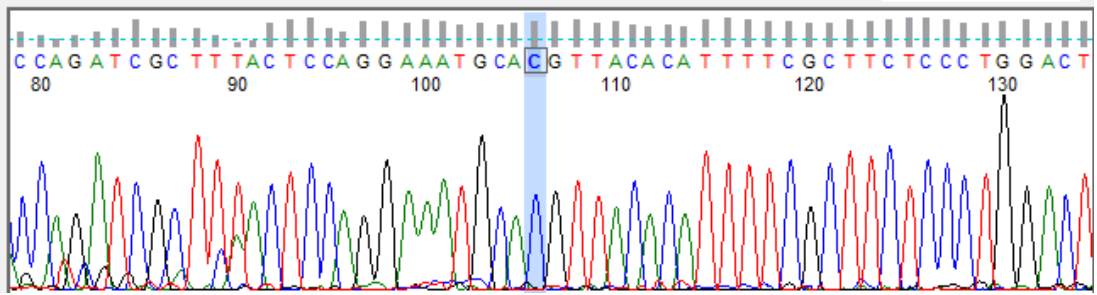
3.2. *KLOTHO* Geni Polimorfizmlerinin Genotiplendirilmesi

Çalışma grubunda, *KLOTHO* geni C1818T (rs564481), G395A (rs1207568) TNP'leri dizi analizi yöntemiyle belirlendi. *KLOTHO* geninin ekson 4'de bulunan C1818T (rs564481) polimorfizminin C/T değişimini genotiplendirmek üzere ilgili bölgeyi kapsayan yaklaşık 300 bç büyüklüğündeki bölgenin dizi analizi gerçekleştirilmiştir. 401 bp'lik PCR ürününün kontrolü %2'lik agaroz jelde yapılmıştır (Şekil.3.2.1.).

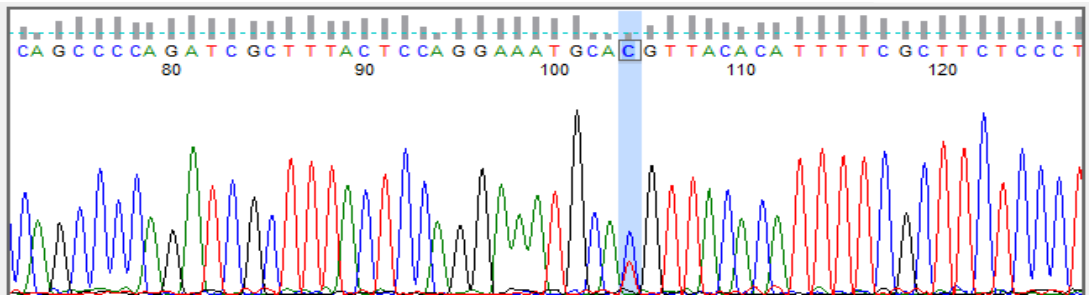


Şekil 3.2.1: *KLOTHO* geni C1818T polimorfizmi, 401 bp'lik amplifikasyon ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü. M: Marker DNA. 8, 38, 208, 211, 150, 147, 178, 162 nolu olgulara ait amplifikasyon ürünü.

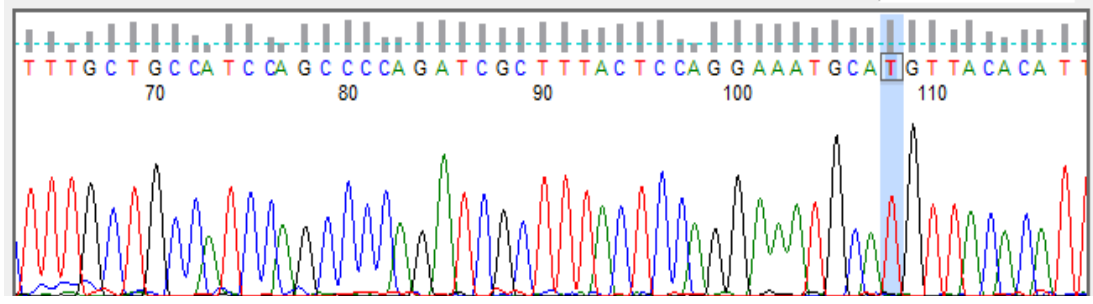
KLOTHO geni C1818T polimorfizmi için bazı olgulara ait Sequencing Analysis Software Version 5.2.0'in oluşturduğu ham verilerden Finch TV 1.4.0 kromatogram görüntüleyici programının oluşturduğu grafik görüntüleri verilmiştir. *KLOTHO* geni C1818T polimorfizmi CC genotipini gösteren sekans grafiği Şekil 3.2.2.'de, CT genotipini gösteren sekans grafiği Şekil 3.2.3.'de, TT genotipini gösteren sekans grafiği Şekil 3.2.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2.2: *KLOTHO* geni C1818T (rs564481) polimorfizmi 28 nolu kontrole ait homozigot CC genotipini gösteren sekans grafiği.



Şekil 3.2.3: *KLOTHO* geni C1818T (rs564481) polimorfizmi 13 nolu kontrole ait heterozigot CT genotipini gösteren sekans grafiği.



Şekil 3.2.4: *KLOTHO* geni C1818T (rs564481) polimorfizmi 70 nolu hastaya ait homozigot TT genotipini gösteren sekans grafiği.

KLOTHO geni C1818T polimorfizminin genotip dağılımı olgu grubunda %41.3 (43/104) CC, %47.1 (49/104) CT, %11.5 (12/104) TT; kontrol grubunda %33.65 (35/104) CC, %58.65 (61/104) CT, %7.7 (8/104) TT bulunmuştur. *KLOTHO* geni C1818T polimorfizminin genotip dağılımı açısından gruplar arasında fark bulunmamıştır ($p=0,231$) (Tablo 3.2.1.).

Tablo 3.2.1. Hasta ve kontrol gruplarında *KLOTHO* geni C1818T C/T polimorfizmi için genotip dağılımı

	<i>KLOTHO</i> Geni C1818T Genotip Sıklığı			Toplam (n)	p değeri
	CC (n/%)	CT (n/%)	TT (n/%)		
Hasta	43 (%41,3)	49 (%47,1)	12 (%11,5)	104	0.231
Kontrol	35 (%33.65)	61 (%58.65)	8 (%7.7)	104	

KLOTHO geni C1818T polimorfizminin hasta grubundaki C alleli frekansı 0.649, T alleli frekansı 0.351 olarak bulunurken kontrol grubundaki C alleli frekansı 0.630, T alleli frekansı 0.370 olarak bulunmuştur. C1818T genotip frekansı hasta grubunda HW dengesine uyumlu olup ($p=0.73$), kontrol grubunda ise HW dengesine uyumlu değildi ($p=0.008$). *KLOTHO* geni C1818T polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda genotip ve allel frekansı dağılımları Tablo 3.2.1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2.1.1. C1818T polimorfizminin genotip ve allel frekansları

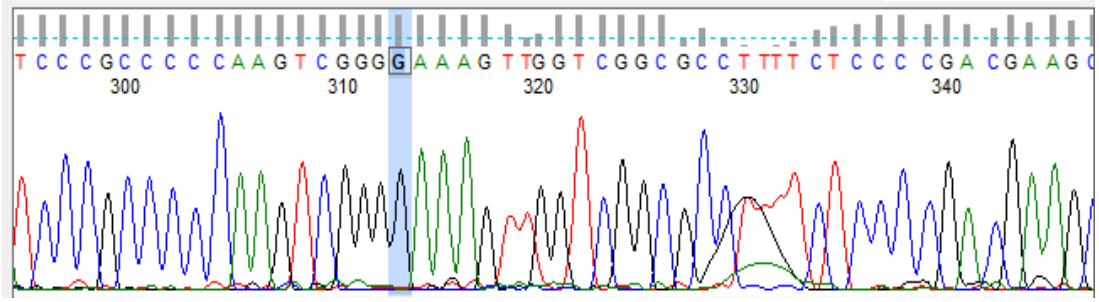
C1818T	Allel	Frekans	Genotip	n	Frekans		X ²	p değeri
					Gözlenen	Beklenen		
Hasta	C	0.649	CC	43	0.413	0.421	0.12	0.73
	T	0.351	CT	49	0.471	0.456		
			TT	12	0.115	0.123		
Kontrol	C	0.630	CC	35	0.336	0.397	6.91	0.008
	T	0.370	CT	61	0.586	0.466		
			TT	8	0.077	0.137		

KLOTHO geninin promotör bölgesinde bulunan G-395A polimorfizminin G/A değişimini genotiplendirmek üzere ilgili bölgeyi kapsayan yaklaşık 300 bç büyüklüğündeki bölgenin dizi analizi gerçekleştirilmiştir. 421 bç'lik PCR ürünün kontrolü %2'lik agaroz jelde yapılmıştır (Şekil 3.2.5.).

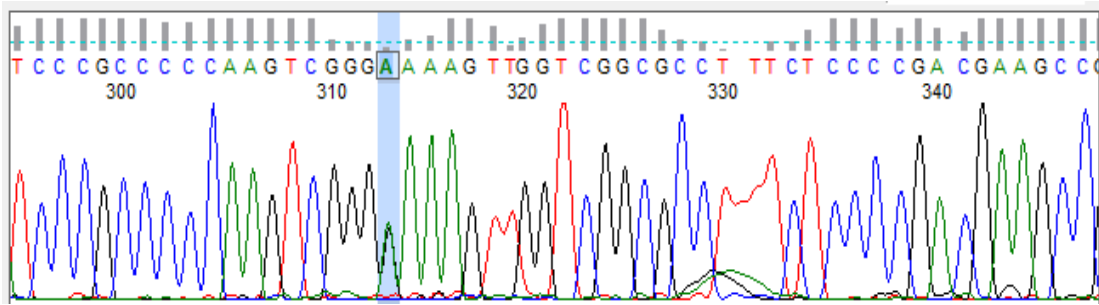


Şekil 3.2.5: *KLOTHO* geni G395A polimorfizmi, 421 bç'lik amplifikasyon ürününün %2'lik agaroz jel görüntüsü. M: Marker DNA. 8, 38, 208, 211, 150, 147, 178, 162 nolu olgulara ait amplifikasyon ürünü.

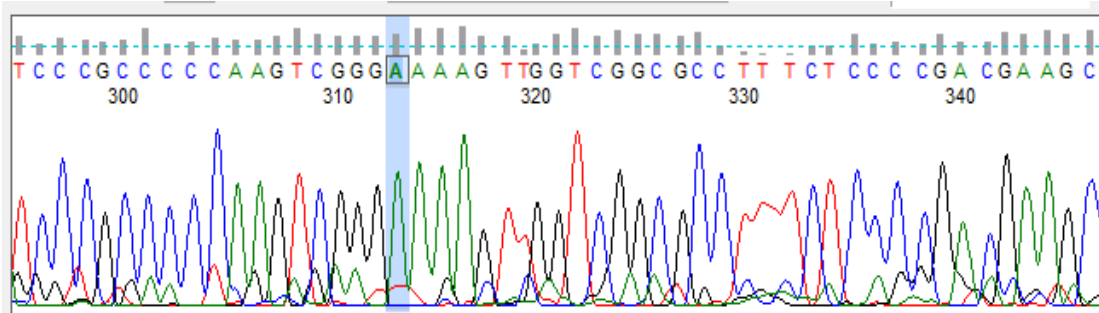
KLOTHO geni G395A (rs1207568) polimorfizmi için bazı olgulara ait Sequencing Analysis Software Version 5.2.0'ın oluşturduğu ham verilerden Finch TV 1.4.0 kromatogram görüntüleyici programının oluşturduğu grafik görüntüleri verilmiştir. *KLOTHO* geni G395A polimorfizmi GG genotipini gösteren sekans grafiği Şekil 3.2.6.'da, GA genotipini gösteren sekans grafiği Şekil 3.2.7.'de, AA genotipini gösteren sekans grafiği Şekil 3.2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2.6: *KLOTHO* geni G395A (rs1207568) polimorfizmi 192 nolu hastaya ait homozigot GG genotipini gösteren sekans grafiği.



Şekil 3.2.7: *KLOTHO* geni G395A (rs1207568) polimorfizmi 186 nolu hastaya ait heterozigot GA genotipini gösteren sekans grafiği.



Şekil 3.2.8: *KLOTHO* geni G395A (rs1207568) polimorfizmi 193 nolu hastaya ait homozigot AA genotipini gösteren sekans grafiği.

KLOTHO geni G395A (rs1207568) polimorfizminin genotip dağılımı olgu grubunda %40,4 (42/104) GG, %55,8 (58/104) GA, %3,8 (4/104) AA; kontrol grubunda %34,6 (36/104) GG, %56,7 (59/104) GA, %8,7 (9/104) AA bulunmuştur. *KLOTHO* geni G395A (rs1207568) polimorfizminin genotip dağılımı açısından gruplar arasında fark bulunmamıştır ($p=0,302$) (Tablo 3.2.2.).

Tablo 3.2.2. Hasta ve kontrol gruplarında *KLOTHO* geni G395A G/A polimorfizmi için genotip dağılımı

	<i>KLOTHO</i> Geni G395A Genotip Sıklığı			Toplam (n)	p değeri
	GG (n/%)	GA (n/%)	AA (n/%)		
Hasta	42 (%40.4)	58 (%55.8)	4 (%3.8)	104	0.302
Kontrol	36 (%34.6)	59 (%56.7)	9 (%8.7)	104	

KLOTHO geni G395A polimorfizminin hasta grubundaki G alleli frekansı 0.683, A alleli frekansı 0.317 olarak bulunurken kontrol grubundaki G alleli frekansı 0.630, T alleli frekansı 0.370 olarak bulunmuştur. G395A genotip frekansı hasta ve kontrol grubunda HW dengesinde değildi (sırasıyla; $p=0.003$; $p=0.03$). *KLOTHO* geni G395A polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda genotip ve allel frekansı dağılımları Tablo 3.2.2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2.2.1. G395A polimorfizminin genotip ve allel frekansları

G395A	Allel	Frekans	Genotip	n	Frekans		X^2	p değeri
					Gözlenen	Beklenen		
Hasta	G	0.683	GG	42	0.404	0.466	8.58	0.003
	A	0.317	GA	58	0.558	0.434		
			AA	4	0.038	0.101		
Kontrol	G	0.630	GG	36	0.346	0.397	4.88	0.03
	A	0.370	GA	59	0.567	0.466		
			AA	9	0.086	0.137		

Kronik böbrek hastası olan 104 olgudan hipertansiyonu olan birey sayısı 62 (%59.6), hipertansiyonu olmayan birey sayısı ise 42 (%40.4) olarak bulunmuştur. Hipertansiyonu olan ve olmayan bireylerde *KLOTHO* geni C1818T, G395A genotip dağılımları arasında fark bulunmamıştır (sırasıyla; $p=0.552$; $p=0.092$). Hasta grubu hipertansiyonu olan ve olmayanlarda *KLOTHO* geni polimorfizmlerinin genotip dağılımı Tablo 3.2.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2.3. Kronik böbrek hasta grubunda hipertansiyon durumunun *KLOTHO* geni genotipleriyle ilişkisinin değerlendirilmesi

Grup	SNP	Genotip	Hasta (n/%)	p değeri
Hipertansif	C1818T	CC	23(37.1)	0.552
		CT	31(50)	
		TT	8(12.9)	
Hipertansif olmayan	C1818T	CC	20(47.6)	
		CT	18(42.9)	
		TT	4(9.5)	
Hipertansif	G395A	GG	20(32.3)	0.092
		GA	40(64.5)	
		AA	2(3.2)	
Hipertansif olmayan	G395A	GG	22(52.4)	
		GA	18(42.9)	
		AA	2(4.8)	

Kronik böbrek hastası olan 104 olgudan diyabetik olan birey sayısı 41 (%39.4), diyabetik olmayan birey sayısı ise 63 (%60.6) olarak bulunmuştur. Diyabetik olan ve olmayan bireylerde *KLOTHO* geni C1818T ve G395A genotip dağılımları arasında fark bulunmamıştır (sırasıyla; p=0.084; p=0.602) (Tablo 3.2.4)

Tablo 3.2.4. Kronik böbrek hasta grubunda diyabet durumunun *KLOTHO* geni genotipleriyle ilişkisinin değerlendirilmesi

Grup	SNP	Genotip	Hasta (n/%)	p değeri
Diyabetik	C1818T	CC	13(31.7)	0.084
		CT	20(48.8)	
		TT	8(19.5)	
Diyabetik olmayan	C1818T	CC	30(47.6)	
		CT	29(46)	
		TT	4(6.3)	
Diyabetik	G395A	GG	16(39)	0.602
		GA	22(53.7)	
		AA	3(7.3)	
Diyabetik olmayan	G395A	GG	26(41.3)	
		GA	36(57.1)	
		AA	1(1.6)	

Hasta grubunda PTH düzeyi normal olan birey sayısı 29 (%27.9), yüksek olan birey sayısı 75 (%72.1), kontrol grubunda PTH düzeyi normal olan birey sayısı 87 (%83.65), yüksek olan birey sayısı 17 (%16.35) olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu arasında PTH düzeyi normal olanlar ile C1818T, G395A genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.938$; $p=0.549$). PTH düzeyi yüksek olan bireyler ile C1818T genotip dağılımı arasında fark bulunmazken ($p=0.077$) G395A genotip dağılımı arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0.046$). PTH düzeyi yüksek olan hasta grubunda GG genotipi PTH düzeyi yüksek olan kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). PTH düzeyi ile *KLOTHO* geni polimorfizmlerinin genotip dağılımı Tablo 3.2.5’de verilmiştir.

Tablo 3.2.5. Kronik böbrek hastalarında parathormon düzeyinin *KLOTHO* geni genotipleriyle ilişkisinin değerlendirilmesi

Grup	SNP	Genotip	Hasta (n/%)	Kontrol (n/%)	p değeri
Yüksek	C1818T	CC	34(45.3)	5(29.4)	0.077
		CT	32(42.7)	12(70.6)	
		TT	9(12)	0(0)	
	G395A	GG	34(45.3)	3(17.6)	0.046
		GA	39(52)	12(70.6)	
		AA	2(2.7)	2(11.8)	
Normal	C1818T	CC	9(31)	30(34.5)	0.938
		CT	17(58.6)	49(56.3)	
		TT	3(10.3)	8(9.2)	
	G395A	GG	8(27.6)	33(37.9)	0.549
		GA	19(65.5)	47(54)	
		AA	2(6.9)	7(8)	

Kronik böbrek hastası 104 hastadan Sol Ön Kol/SA ortalamasına göre; 30 (%28.9) osteoporoz, 36 (%34.6) osteopeni, 38 (%36.5) normal olan bireyler ve 104 kontrol grubunda 12 (%11.5) osteoporoz, 39 (%37.5) osteopeni, 53 (%50.9) normal olan bireyler ile genotip dağılımları incelenmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında osteoporozu olan bireyler ile C1818T, G395A genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.811$; $p=0.522$). Osteopenisi olan bireyler ile C1818T, G395A genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.813$; $p=0.268$). Normal bireyler ile C1818T, G395A genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir

(sırasıyla; p=0.297; p=0.934). Sol Ön Kol/SA kemik mineral dansite ölçümleri ile *KLOTHO* geni C1818T ve G395A polimorfizmleri genotip dağılımları Tablo 3.2.6.'da verilmiştir.

Tablo 3.2.6. Son Ön Kol/SA kemik mineral dansite ölçümleri ile *KLOTHO* geni genotipleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

Ön Kol KMD (Sol Ön Kol/SA)' ye göre Genotip Dağılımı					
Grup	SNP	Genotip	Hasta (n/%)	Kontrol (n/%)	p değeri
Osteoporoz	C1818T	CC	13(43.3)	5(55.6)	0.811
		CT	13(43.3)	3(33.3)	
		TT	4(13.3)	1(11.1)	
	G395A	GG	11(36.7)	2(22.2)	0.522
		GA	18(60)	6(66.7)	
		AA	1(3.3)	1(11.1)	
Osteopeni	C1818T	CC	14(38.9)	14(35.9)	0.813
		CT	17(47.2)	21(53.8)	
		TT	5(13.9)	4(10.3)	
	G395A	GG	16(44.4)	12(30.8)	0.268
		GA	19(52.8)	23(59)	
		AA	1(2.8)	4(10.3)	
Normal	C1818T	CC	16(42.1)	16(28.6)	0.297
		CT	19(50)	37(66.1)	
		TT	3(7.9)	3(5.4)	
	G395A	GG	15(39.5)	22(39.3)	0.934
		GA	21(55.3)	30(53.6)	
		AA	2(5.3)	4(7.1)	

4. TARTIŞMA

Kronik böbrek hastalığı (KBH), çeşitli nedenlere bağlı olarak, nefronların ilerleyici ve geri dönüşümsüz kaybı sonucunda oluşan bir sendromdur (Levey ve ark., 2005). KBH, genellikle yaşamda geç başlar ve yavaş ilerler, GFR'si azalmış çoğu kişi böbrek yetmezliği gelişmeden önce kardiyovasküler hastalıklardan yaşamını yitirir. Bununla birlikte azalmış GFR, hipertansiyon, anemi, malnütrisyon, kemik hastalıkları, nöropati ve düşük yaşam kalitesi gibi komplikasyonlarla da ilişkilidir (Levey ve ark., 1998). Hastalığa yakalanma riskini arttıran faktörlerin arasında; diabetes mellitus, sistemik lupus eritematozus, ileri yaş (60-70) ve akut böbrek hastalıkları da sayılabilir (USRDS, 2000). Kronik böbrek hastalığına yatkınlık genlerinin çevresel ve kalıtsal faktörlerle birleştiğinde, hastalığın prognozu açısından önemli olduğu birçok çalışma ile ortaya koyulmuştur (Kuro-o ve ark., 1997).

4.1. *KLOTHO* Geni Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi

KLOTHO geni, bir anti-aging protein olarak tanımlanır ve 5 ekzon ve 4 introndan oluşup 50 kb uzunluğundadır (Kuro-o ve ark., 1997). Klotho, çoklu biçiminden dolayı farklı biyolojik fonksiyonları gerçekleştiren tek geçişli transmembran proteindir. Membran bağlı Klotho, temel fosfatonin olan FGF-23'ün koreseptörü iken soluble Klotho endokrin madde olarak fonksiyon görür. Akut böbrek hasarı ve kronik böbrek hastalığı, bozuk renal fonksiyonunun çok duyarlı bir biyomarkörü olan Klotho eksikliğini gösterir. Klotho eksikliği hem akut böbrek yetmezliği hem de kronik böbrek hastalığında glomerular filtrasyon oranının azalmasını artırırken; aşırılığı bu oranı korur (Hu ve ark., 2010). *KLOTHO* geninin dokuya spesifik ekspresyonuna rağmen, klotho ekspresyonundaki bir defektin sistemik fenotiplere neden olması klotho'nun endokrin sistemlerde görevli olabileceğini akla getirmektedir.

Çalışmamızda 104 diyalize girmemiş kronik böbrek hastası ve 104 kontrolde *KLOTHO* geni C1818T ve G395A varyantları ile *VDR* geni ApaI ve TaqI varyantları

genotiplendirilmiştir. Çalışmada incelenen genler seçilirken daha önce KBH ile söz konusu genlerin ürünü olan proteinlerin ilişkisinin gösterilmiş olması göz önünde bulundurulmuştur. Bu çalışma seçilen genler açısından KBH'da yapılan ilk ilişkilendirme çalışması özelliğini taşımaktadır. Yaptığımız çalışmada *KLOTHO* ve *VDR* genlerine ait söz konusu polimorfizmlerin kronik böbrek hastalığı ile ilişkisini araştırmak için olgu ve kontrol grubunda bu genotiplerin dağılımını karşılaştırarak istatistiksel olarak değerlendirdik. Böylece, genotiplerin hastalık ile asosiyasyon gösterip göstermediğini ortaya koymaya çalıştık. Kronik böbrek hastalarında çalıştığımız ilgili varyantlar, ilişkili olduğu düşünülen çeşitli klinik ve biyokimyasal parametreler ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda *KLOTHO* geni C1818T (rs564481) polimorfizminin genotip dağılımı olgu grubunda %41.3 (43/104) CC, %47.1 (49/104) CT, %11.5 (12/104) TT; kontrol grubunda %33.65 (35/104) CC, %58.65 (61/104) CT, %7.7 (8/104) TT bulunmuştur. Gruplar arasında *KLOTHO* geni C1818T (rs564481) polimorfizminin genotip dağılımı açısından fark bulunmamıştır ($p=0,231$) *KLOTHO* geni C1818T polimorfizminin hasta grubundaki C alleli frekansı 0.649, T alleli frekansı 0.351 olarak bulunurken kontrol grubundaki C alleli frekansı 0.630, T alleli frekansı 0.370 olarak bulunmuştur.

KLOTHO geni G395A (rs1207568) polimorfizminin genotip dağılımı ise olgu grubunda %40.4 (42/104) GG, %55.8 (58/104) GA, %3.8 (4/104) AA; kontrol grubunda %34.6 (36/104) GG, %56.7 (59/104) GA, %8.7 (9/104) AA bulunmuştur. Gruplar arasında *KLOTHO* geni G395A (rs1207568) polimorfizminin genotip dağılımı açısından istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,302$) *KLOTHO* geni G395A polimorfizminin hasta grubundaki G alleli frekansı 0.683, A alleli frekansı 0.317 olarak bulunurken kontrol grubundaki G alleli frekansı 0.630, T alleli frekansı 0.370 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre, *KLOTHO* geni C1818T ve G395A polimorfizmleri kronik böbrek hastalığı ile asosiye görünmemektedir ($p>0.05$). Hasta ve kontrol grubu arasındaki genotip ve allel frekansı dağılımlarının birbirine yakın olduğu görülmektedir. Bu durumun, kronik böbrek hastalığının kompleks ve çok etkenli olması, hasta grubumuzun yeterince selektif olmaması ve çalışmaya dahil olan birey sayısı azlığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Günümüzde, hipertansiyonun böbrek yetmezliği ilerledikçe sıklığının arttığı ve kontrolsüz hipertansiyonun böbrek yetmezliğinin ilerlemesini hızlandığı iyi bilinmektedir (Sezer ve ark., 2003). Son zamanlarda araştırmacılar, hipertansiyon dahil kardivasküler hastalıkların gelişimi için majör risk faktörü olarak arteriyel yaşlanma üzerinde durmaktadırlar. Çalışmalar yeni aday genler üzerindeki çalışmaları hedeflemektedir. Yeni bir anti-aging gen olan Klotho, yaşlanma ve kardiyovasküler hastalıklar arasında bir köprüdür (Kurosu ve ark.).

Wang ve ark, 215 hipertansiyonu olan, 220 hipertansiyonu olmayan Han Çinlisinde yaptıkları çalışmada *KLOTHO* G395A TNP' nin A allelini taşıyanların kontrol grubuna göre hipertansiyonu olan grupta daha yüksek bulmuşlardır (Wang ve ark., 2010). Shimoyama ve ark, yaptıkları çalışmada 476 sağlıklı Japon olguda *KLOTHO* geni G395A polimorfizmi taşıyanlar ile taşımayanlar arasında ortalama sistolik kan basıncı açısından önemli fark gözlenmezken (Shimoyama ve ark., 2009), Rhee ve ark, koroner arter hastalığı olan Kore kadınlarında sistolik kan basıncını *KLOTHO* G395A polimorfizminin A allelini taşıyanlarda taşımayanlara oranla daha yüksek bulmuşlardır (Rhee ve ark., 2006). Çalışmamızda kronik böbrek hastalığına eşlik eden hipertansiyonu olan olgularda C1818T için %37.1 (23/104) CC, %50 (31/104) CT, %12.9 (8/104) TT genotipi gözlenmiştir. G395A TNP' si için %32.3 (20/104) GG, %64.5 (40/104) GA, %3.2 (2/104) AA genotipi gözlenmiş olup her iki polimorfizm için de gruplar arasında genotip dağılımı açısından fark bulunmamıştır (sırasıyla; p=0.552; p=0.092). Çalışmamız bu açıdan Shimoyama ve arkadaşların yaptıkları çalışma ile uyum göstermektedir.

Son dönemlerde yapılan araştırmalara göre dünyanın her yerinde diyabete bağlı böbrek yetmezliği gelişen hasta oranı giderek artmaktadır. Diyabetik hastalarda meydana gelen hiperglisemi damarları bozarak böbrek hasarlarına neden olmaktadır (KDOQI, 2002; Süleymanlar ve ark., 2005). Klotho'nun, glukoz kontrolünde, diyabette ve fosfat metabolizmasında ki etkisi halen tartışmalıdır (Razzaque, 2012).

Huzurevinde yaşayan 804 yetişkinde yapılan çalışmada, ≥ 65 bireylerde Klotho serum seviyesinin giderek azaldığı gözlenmiştir. Bu yaş grubunda gözlenen Klotho seviyesinde azalma klinik ve terapötik açıdan gelecek araştırmalar için önemli bir veridir (Semba ve ark., 2011). Glikoz metabolizması üzerinde salgılanmış ya da membran bağlı Klotho'nun potansiyel etkisinin altında yatan mekanizmanın

anlaşılması için ilave çalışmalar gerekmektedir (Paroni ve ark., 2012). *KLOTHO*, murin modellerinde gösterildiği üzere, insülin sinyalizasyonundaki öneminden dolayı tip-2 diyabet için aday genidir ve yaşam süresinde potansiyel rol oynar (Kurosu ve ark., 2005).

Shimoyama ve ark, 476 sağlıklı Japon hastada, *KLOTHO* geni C1818T ve G395A polimorfizmleri ile açlık glukoz değerleri arasındaki asosiasyonu belirlemek için yaptıkları çalışmada; G395A'nın A taşıyıcılarını GG genotipine kıyasla yüksek ve C1818T'nin T taşıyıcılarını CC genotipine kıyasla yüksek bulmuşlardır (Shimoyama, 2009). Çalışmamızda diyabetik olgularda C1818T TNP'i için %31.7 (13/104) CC, %48.8 (20/104) CT, %18.5 (8/104) TT genotipi gözlenmiştir. G395A TNP'si için %39 (16/104) GG, %53.7 (22/104) GA, %7.3 (3/104) AA genotipi gözlenmiş olup her iki polimorfizm için de gruplar arasında genotip dağılımı açısından fark bulunmamıştır (sırasıyla; $p=0.084$; $p=0.602$). Elde ettiğimiz sonuçlar literatürle uyumluluk göstermemektedir.

Çalışmamızda kronik böbrek hastalığına bağlı olarak gelişen kemik mineral bozukluklarında görev alan PTH düzeyleri ile genotip dağılımları arasındaki asosiasyon incelenmiş olup; hasta ve kontrol grubu arasında PTH düzeyi normal olanlar ile C1818T, G395A genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.938$; $p=0.549$). PTH düzeyi yüksek olan bireyler ile C1818T genotip dağılımı arasında fark bulunmazken ($p=0.077$) G395A genotip dağılımı arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.046$). PTH düzeyi yüksek olan hasta grubunda GG genotipi kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 104 kronik böbrek hastasından PTH düzeyi yüksek olanlar arasında C1818T için en yüksek %45.3 ile CC genotipi, en düşük %12 ile TT genotipine rastlanırken, G395A için en yüksek %52 ile GA genotipi, en düşük %2.7 ile AA genotipine rastlanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar; PTH düzeyinin, G395A polimorfizmi ve kronik böbrek hastalığı riski arasındaki asosiasyonu etkileyebileceğini akla getirmektedir

Yapılan genetik bağlantı analizi ve aday gen bağlantı çalışmaları ile osteoporozis ya da osteoporotik kırıkların prevalansı ve kemik kitlesinin düzenlenmesinde aday genler öne sürülmüştür ve bu aday genlere *KLOTHO*'da dahildir (Yamada ve ark., 2005). Bizde çalışmamızda insanlarda osteoporozisin patofizyolojisine *KLOTHO*

geninin olası katkılarını incelemek için, kemik dansite ile *KLOTHO* geni TNP'lerinin asosiasyonunu değerlendirdik.

Literatüre baktığımızda; Mullin ve ark., ortalama yaşları 75 olan 1.190 postmenapozal kadında *KLOTHO* geni G395A (C387T), C1818T (c.1775G>A) ve IVS1+8262c>t polimorfizmleri ile DEXA ölçümü kullanılarak yapılan kemik mineral dansite arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışmada G395A için %68.9 GG genotipi, %28 GA genotipi, %3.1 AA genotipine rastlanırken, C1818T TNP'i için %15.4 CC genotipi, %43.5 CT genotipi, %41.1 TT genotipine rastlanmıştır. G395A'nın G alleli ve artmış KMD arasında bir eğilim gözlemlenmedi istatistikî olarak anlamlı bulunmamıştır (Mullin ve ark., 2005). Yamada ve ark., yaşları 40-79 arasında olan 1.110 kadında *KLOTHO* geni G395A polimorfizmi ile tüm vücut, lomber vertebra, sağ femur boyun, sağ trokanter ve sağ Ward's üçgeni DEXA vasıtasıyla yapılan ölçümler arasındaki asosiasyonu araştırmışlardır. Premenapozal kadınlarda G395A için %71.6 (199/278) GG genotipi, %25.5 (71/278) GA genotipi, %2.9 (18/278) AA genotipi bulunurken; postmenapozal kadınlarda G395A için %73.9 (602/815) GG genotipi, %23.4 (191/815) GA genotipi, %2.7 (22/815) AA genotipi bulunmuştur. Ayrıca G395A genotip dağılımı Hardy-Weinberg dengesinde olup, lomber vertebra açısından KMD, GG genotipli kadınlarda, AA genotipli olanlardan anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p \leq 0.005$). Postmenapozal kadınlarda tüm vücut ya da lomber vertebra için KMD, GG genotipli olanlar, AA genotipli olanlar ya da kombine GA ve AA genotipli olanlardan daha düşük bulmalarına rağmen bu ilişki için p değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Yamada ve ark., 2005). Shimoyama ve ark., 476 sağlıklı Japonda (291 erkek, 185 kadın) yaptıkları çalışmada *KLOTHO* geni C1818T ve G395A polimorfizmleri ile kemik mineral dansite arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve kemik mineral dansiteyi kadınlarda G395A'nın A alleli taşıyıcıları GG genotipine kıyasla yüksek bulmuşlardır. Premenapozal kadınların KMD'si G395A'nın GG genotipi (n=48) için 0.705 ± 0.044 g/cm² ve G395A'nın A alleli taşıyıcıları (n=29) 0.710 ± 0.059 g/cm² olarak bulunurken; postmenapozal kadınların KMD'si G395A'nın GG genotipi (n=65) için 0.605 ± 0.088 g/cm² ve G395A'nın A alleli taşıyıcıları (n=18) 0.622 ± 0.102 g/cm² olarak bulunmuşlardır. *KLOTHO* geni G395A polimorfizmi ve menapozal duruma ilişkin KMD arasında önemli bir ilişki saptamamışlardır (Shimoyama ve ark., 2009).

Kawano ve ark., 215 postmenapozal kadında *KLOTHO* geni C1818T ve G395A polimorfizmleri ile KMD ilişkisini araştırmışlar ve G395A'nın A alleli taşıyıcıları GG taşıyıcılarına kıyasla düşük, C1818T'nin T alleli taşıyıcıları CC taşıyıcılarına kıyasla düşük olduğunu rapor etmişlerdir (Kawano ve ark., 2002). Bu sonuçlar *KLOTHO*'nun, kadınlarda azalmış KMD için duyarlı bir gen olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda kronik böbrek hastası 104 hastadan Sol Ön Kol/SA ortalamasına göre; hasta grubunda 30 (%28.9) osteoporoz, 36 (%34.6) osteopeni, 38 (%36.5) normal olan birey; kontrol grubunda ise 12 (%11.5) osteoporoz, 39 (%37.5) osteopeni, 53 (%50.9) normal birey ile genotip dağılımları incelenmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında osteoporozu olan bireyler ile C1818T, G395A genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.811$; $p=0.522$). Osteopenisi olan bireyler ile C1818T, G395A genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.813$; $p=0.268$). Literatürdeki pek çok veriden farklı olarak çalışma sonuçlarımızda A alelini osteopenik KBH hastalarında KBH olmayan osteopenik kontrol grubuna göre düşük bulduk. Bu sonuç muhtemelen çalışma grubumuzdaki vaka serisi oluşturulurken osteoporozu yatkinlik oluşturan kriterlerden ziyade KBH ile osteoporoz ilişkisi üzerinde durulmasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca osteoporozun çok etkenli multifaktöriyel bir hastalık olması ve hasta grubumuzu oluştururken kemik mineral dansiteyi etkileyecek faktörlerin dışlanmaması sonuçlarımızın anlamsız çıkmasına neden olmuş olabilir.

4.2. VDR Geni Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi

Kronik böbrek hastalığının ilerlemesinin vitamin D eksikliği ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Sandra ve ark., 2009). Son yapılan çalışmalarda vitamin D'nin, immün, renal ve kardiyovasküler sistemde önemli bir düzenleyici olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca KBH olan hastalarda vitamin D'nin renin anjiyotensin sisteminde düzenleyici görev aldığı bildirilmiştir (Sandra ve ark., 2009).

Çalışmamız sonucunda *VDR* geni ApaI (rs7975232) polimorfizminin genotip dağılımı olgu grubunda %42.3 (44/104) AA, %34.6 (36/104) Aa, %23.1 (24/104) aa;

kontrol grubunda %58.6 (61/104) AA, %18.3 (19/104) Aa, %23.1 (24/104) aa bulunmuştur. *VDR* geni ApaI (rs7975232) polimorfizminin genotip dağılımı açısından Aa genotipi hasta grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). ApaI polimorfizminin hasta grubundaki A alleli frekansı 0.596, a alleli frekansı 0.404 olarak bulunurken kontrol grubundaki A alleli frekansı 0.678, a alleli frekansı 0.322 olarak bulunmuştur. A alelinin frekansı kontrol grubunda hasta grubuna oranla fazla olmasına rağmen (OD= 0,701 CI=0.469-1,048) bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.083$).

VDR geni TaqI (rs731236) polimorfizminin genotip dağılımı olgu grubunda %50 (52/104) TT, %39.4 (41/104) Tt, %10.6 (11/104) tt; kontrol grubunda %48.1 (50/104) TT, %39.4 (41/104) Tt, %12.5 (13/104) tt bulunmuştur. Gruplar arasında *VDR* geni TaqI (rs731236) polimorfizminin genotip dağılımı açısından fark bulunmamıştır ($p=0,902$). TaqI polimorfizminin hasta grubundaki T alleli frekansı 0.697, t alleli frekansı 0.303 olarak bulunurken kontrol grubundaki T alleli frekansı 0.678, t alleli frekansı 0.322 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre, *VDR* geni ApaI polimorfizminin Aa genotipi kronik böbrek hastalığı ile asosiyeye görünmektedir ($p<0.05$). TaqI polimorfizminin ise hasta ve kontrol grubu arasındaki genotip ve allel frekansı dağılımlarının birbirine yakın olduğu görülmektedir. Bu yüzden, TaqI polimorfizmi kronik böbrek hastalığı ile asosiyeye görünmemektedir ($p>0.05$).

VDR geni bazı hastalıklar için iyi bir aday genidir. Bu gen kan basıncını düzenlemede etkili olan RAS (Renin-Angiotensin System)'i regüle etmede önemli bir role sahiptir (Swapna ve ark., 2011).

Vural ve ark, 100 hipertansiyon ve diyabeti olan ve 100 sağlıklı Türk hastada *VDR* geni TaqI polimorfizmini değerlendirmişler ve genotip dağılımını hasta grubunda %51 TT, %46 Tt, %3 tt, kontrol grubunda %35 TT, %49 Tt, %16 tt olarak bulmuşlardır. Hasta gruptaki T allel frekansını kontrolden anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Sonuç olarak *VDR* geni TaqI polimorfizminin allel frekansı ve genotip dağılımı ile hipertansiyon ve T2DM hastaları ve kontrol grubu arasında fark bulunmamışlardır (Vural ve ark., 2012). Çalışmamızda genotip dağılımı hasta grubunda hipertansiyonu olanlarda %26 TT, %29 Tt, %7 tt, hipertansiyonu olmayanlarda ise %26 TT, %12 Tt, %4 tt olarak bulunmuştur. Hipertansiyonu olan ve olmayan

bireylerde *VDR* geni ApaI, TaqI genotip dağılımları arasında fark bulunmamıştır (sırasıyla; $p=0.260$; $p=0.124$). Bu açıdan çalışma verilerimiz Vural ve ark.'nın yaptıkları çalışma ile uyumludur.

Vitamin D, önemli bir immün düzenleyici özelliğe sahiptir ve insülin sekresyonunu etkileyerek T1DM ve T2DM'in etiyolojisinde rol oynayabilir (Müller ve Bendtzen,1992; Palomer ve ark., 2008). *VDR* polimorfizmleri β -hücrelerinin salgı kapasitesini etkileyerek T2DM patogenezinde rol oynayabilir (Speer ve ark., 2011). Son zamanlarda yapılan çalışmalarla T1DM (Chang ve ark., 2000; Skrabic ve ark., 2003) ve T2DM (Hitman ve ark., 1998; Malecki ve ark., 2003) ve *VDR* polimorfizminin bazı allelik varyantları arasında ilişki saptanmıştır. TaqI genotipi Fransız popülasyonunda T2DM, obezite ve hastalığın erken başlangıcı ile ilişkili bulunmuştur (Ye ve ark., 2001). Kafkas popülasyonunda T2DM'li hastalarda glukoz intoleransı ve ApaI polimorfizminin GG genotipi arasında asosiyasyon saptanmıştır (Oh ve ark., 2002). Bu bulgular gösteriyor ki, *VDR* her iki diyabet tipi için yeni bir aday genidir.

Dilmeç ve ark, Türk popülasyonunda T2DM'li 72 hastada ApaI (g.59979G>T) TNP'i için, GG genotipi %9.7 (7/72), GT genotipi %52.8 (38/72), TT genotipi %37.5 (27/72); TaqI (g.60058T>C) için TT genotipi %45.8 (33/72), TC genotipi %34.7 (25/72), CC genotipi %19.4 (14/72) olarak bulmuşlardır (Dilmeç ve ark., 2010).

Çalışmamızda KBH gurubunda diyabetik birey sayısı 41 (%39.4), diyabetik olmayan birey sayısı ise 63 (%60.6) kişidir. Diyabetik olan ve olmayan bireylerde *VDR* geni ApaI, TaqI genotip dağılımları arasında fark bulunmamıştır (sırasıyla; $p=0.084$; $p=0.602$). Genotip frekansları ApaI için, AA genotipi %39 (16/41), Aa genotipi %46.3 (19/41), aa genotipi %14.6 (6/41); TaqI için ise TT genotipi %43.9 (18/41), Tt genotipi %43.9 (18/41), tt genotipi %12.2 (5/41) olarak bulunmuştur. Çalışma verilerimiz KBH'lı olgularda T2DM ile *VDR*'nin ApaI ve TaqI polimorfizmlerinin oluşturduğu genotipler açısından asosiyasyon için kanıt sağlamamıştır.

Kronik böbrek hastalığında ve diyaliz hastalarında gelişen hiperparatiroidizm ile *VDR* geni polimorfizmlerinin ilişkili olabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir. Özdemir ve ark, Türk popülasyonunda SDBY olan 186 hastada PTH cevabının etkisi ve *VDR* geni polimorfizmleri arasındaki asosiyasyonu değerlendirmişler ve TaqI polimorfizmi genotip frekansı %36.7 TT, %60.5 Tt, %2.8 tt olarak bulmuşlardır.

TaqI polimorfizminin TT varyantını hiperparatiroidizm ile ilişkili bulmuşlardır. Hemodiyaliz durumu ve PTH seviyelerine göre elde ettikleri veriler, hiperparatiroidizm üzerinde TT varyasyonunun etkisi olduğunu öne sürmektedir. (Özdemir ve ark., 2005). Yokoyama ve ark, SDBY olan 58 Japon olguda paratiroid cevap ve *VDR* gen polimorfizmlerini değerlendirmişler ve ApaI polimorfizmi için %12.1 (23/58) AA genotipi, %39.6 (23/58) Aa genotipi, %48.3 (28/58) aa genotipi bulmuşlar ve aa genotipi taşıyanların PTH seviyelerinin AA ve Aa genotipi taşıyanlardan daha yüksek bulmuşlardır (Yokoyama ve ark., 2001). Yine Yokoyama ve ark.'nın yaptığı diğer bir çalışmada 129 SDBY olan Japonda paratiroid cevap ile ApaI ve BsmI polimorfizmlerinin ilişkisini araştırmışlar ve ApaI polimorfizmi genotip sıklığını %14.2 AA, %47.2 Aa, %38.6 aa olarak bulmuşlardır. aa genotipini taşıyanlarda PTH seviyesini AA ve Aa genotipini taşıyanlardan 2 kat daha yüksek bulmuşlar. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda *VDR* gen polimorfizmlerinin, SDBY olan hastalarda paratiroid cevabı etkileyebileceği ve Japon hastalarda özellikle ApaI polimorfizminin BsmI polimorfizminden daha bilgi verici olabileceğini öne sürmüşlerdir. *VDR* geni a alleli sekonder hiperparatiroidizmin ve SDBY olan hastalarda kemik hastalıklarının patogenezini belirleyebileceğini rapor etmişlerdir (Yokoyama ve ark., 1998).

Çalışmamızda parathormon düzeyi yüksek olan bireyler ile ApaI, TaqI genotip dağılımı arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (sırasıyla; p=0.106; p=330). ApaI TNP'i için genotip dağılımları, %44.8 (31/104) AA, %38.7 (29/104) Aa, %20 (15/104) aa; TaqI TNP' i için %46.7 (35/104) TT, %42.7 (32/104) Tt, %10.7 (8/104) tt olarak bulunmuştur. Görüldüğü üzere her iki polimorfizmede en sık yüzde yabancı alellerdedir, çalışma verilerimiz literatürle uyumlu değildir.

Böbrek fonksiyonları ve kemik mineral dansite arasındaki ilişki bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Duman ve ark, 75 postmenapozal osteoporotik, 66 sağlıklı kadında kemik mineral dansite ve *VDR* geni ApaI, TaqI ve BsmI polimorfizmleri arasındaki asosiasyonu değerlendirmişler ve Türk populasyonunda genotip frekanslarını; osteoporotik kadınlarda ApaI TNP' i için %17.2 AA, %74.8 Aa, %8 aa, TaqI için %30.8 TT, %56 Tt, %13.2 tt; kadın kontrollerde ApaI için %22.7 AA, %68.2 Aa, %9.1 aa, TaqI için %34.9 TT, %42.4 Tt, %22.7 tt olarak bulmuşlardır ve *VDR* gen allellerinin kemik kitlesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu öne sürmüşlerdir

(Duman ve ark., 2004). Kurt ve ark, 81 osteoporotik, 122 osteopenik Türk postmenapozal kadında *VDR FokI* ve *TaqI* polimorfizmleri ile KMD arasındaki ilişkiyi değerlendirmişler ve *TaqI* için %41.7 (83/203) TT, %44.2 (88/203) Tt, %14.1 (28/203) tt olarak bulmuşlardır. Ayrıca *VDR* geni *TaqI* polimorfizmini kemiğin herhangi bir bölgesindeki kemik mineral dansite ile ilişkili bulmamışlardır (Kurt ve ark., 2012). Yoldemir ve ark, 130 postmenapozal, 130 premenapozal kadında *VDR* geni *BsmI*, *FokI*, *ApaI* ve *TaqI* polimorfizmleri DXA ölçümleri ile lomber vertebra ve femur boyunun KMD'si arasındaki asosiasyonu değerlendirmişler ve premenapozal kadınlarda %23.85 AA, %56.15 Aa, %20 aa, postmenapozal kadınlarda %26.15 AA, %46.15 Aa, %27.70 aa; premenapozal kadınlarda %37.69 TT, %45.38 Tt, %16.92 tt, postmenapozal kadınlarda %39.23 TT, %45 Tt, %15.38 tt olarak bulmuşlardır. Premenapozal ve postmenapozal kadınlar arasında *VDR* gen polimorfizmlerinin frekansında farklılık bulunmamıştır. KMD ölçümleri ile premenapozal ve postmenapozal kadınlarda genotipler arasında herhangi bir fark saptamamışlardır (Yoldemir ve ark., 2011). Çalışmamızda, Sol Ön Kol/SA ortalamasına göre; 30 (%28.9) osteoporoz, 36 (%34.6) osteopeni, 38 (%36.5) normal olan bireyler ile genotip dağılımları incelenmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında osteoporozu olan bireyler ile *ApaI*, *TaqI* genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.229$; $p=0.865$). Osteopenisi olan bireyler ile *ApaI*, *TaqI* genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.331$; $p=0.816$). Normal bireyler ile *ApaI*, *TaqI* genotip dağılımı arasında fark gözlenmemiştir (sırasıyla; $p=0.149$; $p=0.922$). Çalışma verilerimizin literatür ile uyumluluk göstermemesinin nedenlerinden birisi yapılan bazı çalışmaların *VDR* polimorfizmlerinin KMD üzerine olası etkisi üzerinde yoğunlaşmasına rağmen pek çok farklı çalışmanın popülasyonda KMD'nin poligenik kalıtmı olduğunu öne sürmesidir. Ayrıca çalışma grubumuzdaki vaka serisi oluşturulurken osteoporozu yatkinlik oluşturan kriterlerden ziyade KBH ile osteoporoz ilişkisi üzerinde durulmasında sonuçların literatürden sapma göstermesine neden olmuş olabilir.

5. SONUÇ

Bu çalışma *KLOTHO* ve *VDR* gen polimorfizmleri ile kronik böbrek hastalığının ilişkisi üzerine yapılan ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Çalışma genotiplendirme temeline ve olgu kontrol serisi arasındaki genotip dağılımlarının ilişkilendirilmesine dayanmaktadır. Bu verilerin yanı sıra hastalığın patofizyolojisi üzerine etkisi olduğu düşünülen bazı biyokimyasal parametreler ile genotipler arasındaki ilişkide incelenmiş ve hastalık ile ilişkili veriler değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda pek çok veri serisi değerlendirilmiş olup, *VDR* geni ApaI polimorfizminin Aa genotipi olgu grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte PTH düzeyi yüksek olan hasta grubunda *KLOTHO* geni G395A polimorfizminin GG genotipini taşıyanlar kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Çalışma sonuçlarımız değerlendirildiğinde hem *KLOTHO* hem de *VDR* geni polimorfizmlerinin kronik böbrek hastalığı ile ilişkisi açısından yeni ve değerli bilgiler elde edilmiştir. İncelediğimiz biyokimyasal parametreler ile genotiplendirme sonuçlarımız değerlendirildiğinde görülen farklı sonuçların olası sebeplerinden biri çalışmaların farklı etnik kökenden, farklı sayıda, farklı nitelikte olgu grupları üzerinde yapılması olabilir. Bir diğeri ise KBH gibi kompleks multifaktöryel hastalıklarda hastalığın oluşum ve gelişiminde etkisi olan pek çok farklı gen ve polimorfizmin bir arada, etkileşim halinde ve çevre ile birlikte sürece katılmasıdır. Bu bağlamda, bu tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçların daha geniş olgu grupları, daha çok sayıda aday gen ve polimorfizmin birlikte değerlendirilerek araştırılması gerektiği kanısındayız.

Kronik böbrek hastalığına neden olan genetik risk faktörlerinin iyi anlaşılması; hastalığa yatkınlığın, hastalık ortaya çıkmadan önce belirlenmesini ve belki de kişinin risk profiline uygun önleyici tedavilerin uygulanabilmesini mümkün kılacaktır. Kişinin yaşamını zora sokan kronik böbrek hastalığının önlenmesi ve tedavisi için genetik çalışmalar umut olacaktır.

ÖZET

Kronik Böbrek Hastalığında KLOTHO ve VDR Geni Polimorfizmlerinin Araştırılması

Kronik böbrek hastalığı (KBH), insidansı ve prevalansı giderek artan, kötü prognozlu ve yüksek maliyetli yaygın bir halk sağlığı problemidir. Ayrıca, morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biridir. Kronik böbrek hastalığına yatkınlık genlerinin çevresel ve kalıtsal faktörlerle birleştiğinde, hastalığın prognozu açısından önemli olduğu birçok çalışma ile ortaya koyulmuştur.

Bu çalışmanın amacı, kronik böbrek hastalarından ve sağlıklı bireylerden oluşan çalışma grubunda, *KLOTHO* geninin G395A ve C1818T polimorfizmleri ve Vitamin D reseptör geninin ApaI ve TaqI polimorfizmlerini genotipleyerek, hasta ve kontrol grubu arasındaki sıklığını belirlemek ve böylece hastalık ile söz konusu polimorfizmlerin arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır. Ayrıca hastalık ile ilişkili bazı biyokimyasal parametreler ile bu polimorfizmlerin ilişkisini değerlendirerek hastalığın etiolojisi üzerine söz konusu polimorfizmlerin etkisini araştırmaktır.

Kronik böbrek hastalığı tanısı almış yaş ortalaması 56.76 ± 1.22 olan 104 hasta ve yaş ortalaması 49.13 ± 1.00 olan 104 kontrol grubunda *KLOTHO* geni C1818T ve G395A TNP'leri DNA dizi analizi, *VDR* geni ApaI ve TaqI TNP'leri ise PCR-RFLP yöntemiyle çalışılmıştır.

Çalışmamızda, 104 kronik böbrek hastasında *VDR* geni ApaI (rs7975232) TNP'i genotip dağılımı %42.3 AA, %34.6 Aa, %23.1 aa bulunurken TaqI (rs731236) TNP'i genotip dağılımı %50 TT, %39.4 Tt, %10.6 tt olarak bulunmuştur. *KLOTHO* geni C1818T TNP'i genotip dağılımı %41.3 CC, %47.1 CT, %11.5 TT bulunurken G395A TNP'i %40,4 GG, %55.8 GA, %3.8 AA olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, çalışmamızda pek çok veri serisi değerlendirilmiş olup *VDR* geni ApaI polimorfizminin Aa genotipi olgu grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, hem *KLOTHO* hem de *VDR* geni polimorfizmlerinin kronik böbrek hastalığı ile ilişkisi açısından yeni ve değerli bilgiler elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Kronik Böbrek Hastalığı, *KLOTHO*, *VDR*, Polimorfizm

SUMMARY

Investigation of *KLOTHO* and *VDR* Gene Polymorphisms in Chronic Kidney Disease

Chronic Kidney Disease (CKD) is a common public health problem with bad prognosis and high cost whose incidence and prevalence increase continuously. In addition, it is an important cause of morbidity and mortality. It was proven in many studies that combination of susceptibility genes of Chronic Kidney Disease with environmental and hereditary factors is important for prognosis of the disease.

Aim of this study is to determine the incidence of G395A and C1818T polymorphisms of *KLOTHO* gene and ApaI and TaqI polymorphisms of Vitamin D gene among case and control groups and to establish the relation between corresponding polymorphisms and Chronic Kidney Disease. Also it aims to investigate the effect of given polymorphisms on etiology of the disease by evaluating relation between various relevant biochemical parameters and these polymorphisms.

C1818T and G395A SNP's of *KLOTHO* gene were studied by using DNA sequence analysis and ApaI and TaqI SNP's of *VDR* gene were analyzed by PCR-RFLP method for CKD diagnosed 104 patient with the average age of 56.76 ± 1.22 and for 104 control group with the average age of 49.13 ± 1.00 .

In this study, ApaI (rs7975232) SNP genotype distribution of *VDR* gene for 104 Chronic Kidney Disease patient was determined as %42.3 AA, %34.6 Aa, %23.1 aa, while TaqI (rs731236) SNP genotype distribution was determined as %50 TT, %39.4 Tt, %10.6 tt. C1818T SNP genotype distribution of *Klotho* gene was found as %41.3 CC, %47.1 CT, %11.5 TT and G395A SNP genotype distribution was attained as %40,4 GG, %55.8 GA, %3.8 AA.

In conclusion, many series of data have been evaluated in this study and ApaI polymorphism of *VDR* gene was found meaningfully high for case group compare to control group. Also, new and valuable information were obtained for the relation of both *KLOTHO* and *VDR* gene polymorphisms with Chronic Kidney Disease.

Keywords: Chronic Kidney Disease, *KLOTHO*, *VDR*, Polymorphism.

KAYNAKLAR

- AKOĞLU, E., SÜLEYMANLAR, G. (1996). Kronik Böbrek Yetersizliği, Temel İç Hastalıkları, Güneş Kitabevi, sy. 769-776.
- AKPOLAT, T., UTAŞ, C., SÜLEYMANLAR, G. Nefroloji El Kitabı. Nobel Tıp Kitabevi, sy. 272-273.
- ARKING, D.E., ATZMON, G., ARKING, A., BARZILAI, N., DIETZ, H.C. (2005). Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ Res.*, 96:412–418.
- ARKING, D.E., BECKER, D.M., YANEK, L.R., FALLIN, D., JUDGE, D.P., MOY, T.F., BECKER, L.C., DIETZ, H.C. (2003). KLOTHO allele status and the risk of early onset occult coronary artery disease. *Am J Hum Genet.*, 72:1154–1161.
- ARKING, D.E., KREBSOVA, A., MACEK, M.J.R., ARKING, A., MIAN, I.S., FRIED, L., HAMOSH, A., DEY, S., MCINTOSH, I., DIETZ, H.C. (2002). Association of human aging with a functional variant of Klotho. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:856–861.
- ARMAS, L.A., HOLLIS, B.W., HEANEY, R.P. (2004). Vitamin D2 is much less effective than Vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab.*, 89:5387–5391.
- AUDI, L., GARCIA-RAMIREZ, M., CARRASCOSA, A. (1999). Genetic determinants of bone mass. *Horm Res.*, 51:105–123.
- BAKER, A.R., MCDONNELL, D.P., HUGHES, M., CRISP, T.M., MANGELSDORF, D.J., HAUSSLER, M.R., PIKE, J.W., SHINE, J., O'MALLEY, B.W., (1988). Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:3294–3298.
- BALTZER, A.W., REINECKE, J., WEHLING, P., GRANRATH, M., SCHULITZ, KP. (1999). Bone density and bone metabolism regulated by vitamin D receptor allele polymorphism in a German study sample. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 137(3):273–279.
- BURT, V.L., WHELTON, P., ROCCELLA, E.J., BROWN, C., CUTLER, J.A., HIGGINS, M., HORAN, M.J, LABARTHE, D. (1995). Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertensio*, 25:305-313.
- CHA, S.K, HU, M.C, KUROSU, H., KURO-O, M., MOE, O., HUANG, C.L. (2009). Regulation of ROMK1 channel and renal K⁺ excretion by Klotho. *Mol Pharmacol.*, 76:38–46.

- CHA, S.K., ORTEGA, B., KUROSU, H., ROSENBLATT, K.P., KURO-O, M., HUANG, C.L. (2008). Removal of sialic acid involving Klotho causes cell surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105:9805–9810.
- CHANG, Q., HOEFS, S., VAN DER KEMP, A.W., TOPALA, C.N., BINDELS, R.J., HOENDEROP, J.G. (2005). The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science*, 310:490–493.
- CHANG, T.J., LEI, H.H., YEH, J.I., CHIU, K.C., LEE, K.C., CHEN, M.C., TAI, T.Y., CHUANG, L.M. (2000). Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to Type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clinical Endocrinology*, 52:575–580.
- CHEN, C.D., PODVIN, S., GILLESPIE, E., LEEMAN, S.E., ABRAHAM, C.R. (2007). Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:19796–19801.
- COOPER, G.M., HAUSMAN, R.E. (2006). Hücre Moleküler Yaklaşım. İzmir Tıp Kitabevi, İzmir.
- CORESH, J., ASTOR, B.C., GREENE, T., EKNOYAN, G., LEVEY, A.S. (2003). Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis.*, 41:1-12.
- CORESH, J., SELVIN, E., STEVENS, L.A., MANZI, J., KUSEK, J.W., EGGERS, P., VAN LENTE, F., LEVEY, A.S. (2007). Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*, 298: 2038–2047.
- CORESH, J., WEI, G.L., MCQUILLAN, G., BRANCATI, F.L., LEVEY, A.S., JONES, C., KLAG, M.J. (2001). Prevalence of high blood pressure and elevated serum creatinine level in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Arch Intern Med.*, 161:1207-1216.
- CUNNINGHAM, J., SPRAGUE, S.M., CANNATA-ANDIA, J., COCO, M., COHEN-SOLAL, M., FITZPATRICK, L., GOLTZMANN, D., LAFAGE-PROUST, M.H., LEONARD, M., OTT, S., RODRIGUEZ, M., STEHMAN-BREEN, C., STERN, P., WEISINGER, J. (2004) Osteoporosis Work Group. Osteoporosis in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.*, 43(3):566–571
- ÇAKIR, Ö.O., ERSOY TUNALI, N. (2010). CaOx böbrek taşı oluşumunda VDR polimorfizmlerinin rolü. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 8(2):1-12.
- DAVIES, D.F., SHOCK, N.W. (1950). Age changes in glomerular filtration rate, effective renal plasma flow, and tubular excretory capacity in adult males. *J Clin Invest.*, 29:496-507.

- DECKER, C.J., PARKER, R. (1995). Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7:386–392.
- DELMAS, P.D. (2002). Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 359:2018–2026.
- DİLMEC, F., UZER, E., AKKAFA, F., KOSE, E., VAN KUILENBURG, A.B. (2010). Detection of VDR gene ApaI and TaqI polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus using PCR-RFLP method in a Turkish population. *J Diabetes Complication*, 24(3):186-91.
- DUMAN, B.S., TANAKOL, R., ERENŞOY, N., OZTÜRK, M., YILMAZER, S. (2004). Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in postmenopausal osteoporotic and healthy women. *Med Princ Pract.*, 13(5):260-6.
- DUSSO, A.S., BROWN, A.J, SLATOPOLSKY, E. (2005). Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 289:F8–28.
- ELIXHAUSER, A., KLEMSTINE, K., STEINER, C., BIERMAN, A.S. (2001). Procedures in U.S. Hospitals, 1997. HCUP Fact Book No. 2. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality.
- EREK, E., SULEYMANLAR, G., SERDENGEÇTİ, K. (2002). Nephrology, dialysis and transplantation in Turkey. *Nephrol Dial Transplant*, 17:2087–2093.
- EVRENKAYA, T.R. (2011). Kronik Böbrek Hastalığı-Mineral ve Kemik Bozuklukları. *Türkiye Klinikleri J Nephrol-Special Topics*, 4(1):1-3.
- FERRARI, S., RIZZOLI, R., CHEVALLEY, T., SLOSMAN, D., EISMAN, J.A., BONJOUR, J.P. (1995). Vitamin-D-receptor-gene polymorphisms and change in lumbar-spine bone-mineral density. *Lancet*, 18-2;345(8947):423–4.
- FLEET, J.C., HARRIS, S.S, WOOD, R.J., DAWSONHUGHES, B. (1995). The BsmI vitamin-D receptor restriction-fragment-length-polymorphism (Bb) predicts low bone-density in premenopausal black-and-white women. *J Bone Miner Res.*, 10(6):985–90.
- FORSTER, R.E., JURUTKA, P.W., HSIEH, J.C., HAUSSLER, C.A., LOWMILLER, C.L., KANEKO, I., HAUSSLER, M.R., KERR WHITFIELD, G. (2011). Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, Oct 28;414(3):557-62.
- GARNERO, P., BOREL, O., SORNAYRENDU, E., DELMAS, P.D. (1995). Vitamin-D-receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J Bone Miner Res.*, 10(9):1283–8.
- GINALDI, L., DI BENEDETTO, M.C., DE MARTINIS, M. (2005). Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immun Ageing* 2:14.

- GROSS, C., ECCLESHALL, T.R., MALLOY, P.J., VILLA, M.L., MARCUS, R., FELDMAN, D. (1996). The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res.*, 11(12):1850–5.
- HALLAN, S.I., CORESH, J., ASTOR, B.C., ASBERG, A., POWE, N.R., ROMUNDSTAD, S., HALLAN, H.A., LYDERSEN, S., HOLMEN, J. (2006). International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *J Am Soc Nephrol.*, 17: 2275–2284.
- HARRIS, M.I., FLEGAL, K.M., COWIE, C.C., EBERHARDT, M.S., GOLDSTEIN, D.E., LITTLE, R.R., WIEDMEYER, H.M., BYRD-HOLT, D.D. (1998). Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care*, 21:518-24.
- HAUSSLER, M.R., WHITFIELD, G.K., HAUSSLER, C.A., HSIEH, J.C., THOMPSON, P.D., SELZNICK, S.H., DOMINGUEZ, C.E., JURUTKA, P.W. (1998). The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res.*, 13(3):325–49.
- HESSE, M., FROHLICH, L.F., ZEITZ, U., LANSKE, B., ERBEN, R.G. (2007). Ablation of vitamin D signaling rescues bone, mineral, and glucose homeostasis in Fgf-23 deficient mice. *Matrix Biol.*, 26:75–84.
- HITMAN, G.A., MANNAN, N., MCDERMOTT, M.F., AGANNA, E., OGUNKOLADE, B.W., HALES, C.N., BOUCHER, B.J. (1998). Vitamin D receptor gene polymorphisms influence insulin secretion in Bangladeshi Asians. *Diabetes*, 47:688–690.
- HOENDEROP, J.G., NILIUS, B., BINDELS, R.J. (2005). Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev.*, 85:373–422.
- HOUSTON, L.A., GRANT, S.F.A., REID, D.M., RALSTON, S.H. (1996). Vitamin D receptor polymorphism, bone mineral density, and osteoporotic vertebral fracture: studies in a UK population. *Bone*, 18(3):249–52.
- http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000133116;r=13:33590-207-33640282. Erişim Tarihi: 12.11.2012
- <http://www.era-edta-reg.org/index.jsp?p=annrep>. Erişim Tarihi: 12.11.2012
- <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VDR>. Erişim Tarihi: 12.11.2012
- HU, M.C., KURO-O, M., MOE, O.W. (2010). Klotho and kidney disease. *J Nephrol.* 16:S136-44.

- HU, M.C., KURO-O, M., MOE, O.W. (2012). The emerging role of Klotho in clinical nephrology. *Nephrol Dial Transplant.*, 27(7):2650-2657.
- HUSTMYER, F.G., PEACOCK, M., HUI S, JOHNSTON. C.C., CHRISTIAN, J. (1994). Bone mineral density in relation to polymorphism at the Vitamin-D-receptor gene locus. *J Clin Invest.*, 94(5):2130–4.
- IMAMURA, A., OKUMURA, K., OGAWA, Y., MURAKAMI R, TORIGOE M, NUMAGUCHI Y, MUROHARA T. (2006). Klotho gene polymorphism may be a genetic risk factor for atherosclerotic coronary artery disease but not for vasospastic angina in Japanese. *Clin Chim Acta.*, 371: 66–70.
- IMURA, A., IWANO, A., TOHYAMA, O., TSUJI, Y., NOZAKI, K., HASHIMOTO, N., FUJIMORI, T., NABESHIMA, Y. (2004). Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett.*, 565:143–147.
- JACOBS, D.R. JR., MURTAUGH, M.A., STEFFES, M., YU, X., ROSEMAN, J., GOETZ, F.C. (2002). Gender- and race-specific determination of albumin excretion rate using albumin-to-creatinine ratio in single, untimed urine specimens: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *Am J Epidemiol.* 155:1114-9.
- JURUTKA, P.W., REMUS, L.S., WHITFIELD, G.K., THOMPSON, P.D., HSIEH, J.C., ZITZER, H., TAVAKKOLI, P., GALLIGAN, M.A., DANG, H.T.L., HAUSSLER, C.A., HAUSSLER, M.R. (2000). The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Molec. Endocr.*, 14: 401-420.
- K/DOQI. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Kidney Disease Outcome Quality Initiative. *Am J Kidney Dis.*, 39:S1-246.
- KANATANI, M., SUGIMOTO, T., KANO, J., KANZAWA, M., CHIHARA, K. (2003). Effect of high phosphate concentration on osteoclast differentiation as well as bone-resorbing activity. *J Cell Physiol.*, 196:180–189.
- KANATANI, M., SUGIMOTO, T., KANZAWAM, YANO S., CHIHARA, K. (1999). High extracellular calcium inhibits osteoclast-like cell formation by directly acting on the calcium-sensing receptor existing in osteoclast precursor cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 261:144–148.
- KAWANO, K., OGATA, N., CHIANO, M., MOLLOY, H., KLEYN, P., SPECTOR, T.D., UCHIDA, M., HOSOI, T., SUZUKI, T., ORIMO, H., INOUE, S., NABESHIMA, Y., NAKAMURA, K., KURO-O, M., KAWAGUCHI, H. (2002). Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J Bone Miner Res.*, 17(10):1744–51.

- KEANE, W.F., EKNOYAN, G. (1999). Proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, elimination (PARADE): a position paper of the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis.*, 33:1004-10.
- KEEN, R.W., MAJOR, P.J., LANCHBURY, J.S., SPECTOR, T.D. (1995). Vitamin-D-receptor gene polymorphism and bone loss. *Lancet*, 345(8955):990.
- KIEL, D.P., MYERS, R.H., CUPPLES, L.A., KONG, X.F., ZHU, X.H., ORDOVAS, J., SCHAEFER, E.J., FELSON, D.T., RUSH, D., WILSON, P.W.F., EISMAN, J.A., HOLICK, M.F. (1997). The BsmI vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (bb) influences the effect of calcium intake on bone mineral density. *J Bone Miner Res.*, 12 (7):1049–57.
- KIM, Y., KIM, J.H., NAM, Y.J., KONG, M., KIM, Y.J., YU, K.H., LEE, B.C., LEE, C. (2006). Klotho is a genetic risk factor for ischemic stroke caused by cardioembolism in Korean females. *Neurosci Lett.*, 407(3):189–194.
- KIM, Y., JEONG, S.J., LEE, H.S., KIM, E.J., SONG, Y.R., KIM, S.G., OH, J.E., LEE, Y.K., SEO, J.W., YOON, J.W., KOO, J.R., KIM, H.J., NOH, J.W., PARK, S.H. (2008). Polymorphism in the promoter region of the Klotho gene (G-395A) is associated with early dysfunction in vascular access in hemodialysis patients. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 23:201-207.
- KIRSTETTER, P., ANDERSON, K., PORSE, B.T., JACOBSEN, S.E., NERLOV, C. (2006) Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol.*, 7:1048–1056.
- KRALL, E.A., PARRY, P., LICHTER, J.B., DAWSONHUGHES, B. (1995). Vitamin-D-receptor alleles and rates of bone loss—influences of years since menopause and calcium intake. *J Bone Miner Res.*, 10(6):978–84.
- KROGER, H., MAHONEN, A., RYHANEN, S., TURUNEN, A.M., ALHAVA, E., MAENPAA, P. (1995). Vitamin-D-receptor genotypes and bone-mineral density. *Lancet*, 345(8959):1238.
- KURO-O, M. (2006). Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, 15:437–441.
- KURO-O, M. (2008). Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. *Trends Endocrinol Metab.*, 19:239–245.
- KURO-O, M., MATSUMURA, Y., AIZAWA, H., KAWAGUCHI, H., SUGA, T., UTSUGI, T., OHYAMA, Y., KURABAYASHI, M., KANAME, T., KUME, E., IWASAKI, H., IIDA, A., SHIRAKI-IIDA, T., NISHIKAWA, S., NAGAI, R., NABESHIMA, Y. (1997). Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 390:45–51.

- KURO-O, M., MATSUMURA, Y., AIZAWA, H., KAWAGUCHI, H., SUGA, T., UTSUGI, T., OHYAMA, Y., KURABAYASHI, M., KANAME, T., KUME, E., IWASAKI, H., IIDA, A., SHIRAKI-IIDA, T., NISHIKAWA, S., NAGAI, R., NABESHIMA, YI. (1997). Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 390:45–51.
- KURO-O, M. (2010). *Klotho*. *Eur J Physiol.*, 459:333-343.
- KUROSU, H., OGAWA, Y., MIYOSHI, M., YAMAMOTO, M., NANDI, A., ROSENBLATT, K.P., BAUM, M.G., SCHIAVI, S., HU, M.C., MOE, O.W., KURO-O, M. (2006). Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by *klotho*. *J Biol Chem.*, 281:6120–6123.
- KUROSU, H., YAMAMOTO, M., CLARK, J.D., PASTOR, J.V., NANDI, A., GURNANI, P., MCGUINNESS, O.P., CHIKUDA, H., YAMAGUCHI, M., KAWAGUCHI, H., SHIMOMURA, I., TAKAYAMA, Y., HERZ, J., KAHN, C.R., ROSENBLATT, K.P., KURO-O, M. (2005). Suppression of aging in mice by the hormone *Klotho*. *Science*. 309(5742):1829-1833.
- KURT, O., YILMAZ-AYDOGAN, H., UYAR, M., İSBİR, T., SEYHAN, M.F., CAN, A. (2012). Evaluation of ER α and VDR gene polymorphisms in relation to bone mineral density in Turkish postmenopausal women. *Mol Biol Rep*. 39(6):6723-30.
- LARSSON, T., MARSELL, R., SCHIPANI, E., OHLSSON, C., LJUNGGREN, O., TENENHOUSE, H.S., JUPPNER, H., JONSSON, K.B. (2004). Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the $\alpha 1(I)$ collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalacia, and disturbed phosphate homeostasis. *Endocrinology*, 145:3087–3094.
- LAWRENCE, R.C., HELMICK, C.G., ARNETT, F.C., DEYO, R.A., FELSON, D.T., GIANNINI, E.H., HEYSE, S.P., HIRSCH, R., HOCHBERG, M.C., HUNDER, G.G., LIANG, M.H., PILLEMER, S.R., STEEN, V.D., WOLFE, F. (1998). Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum*. 41(5):778-99.
- LAZARETTI, C., DUARTEDE OLIVEIRA, M.A., RUSSO, E.M.K., VIEIRA, J.G.H. (1997). Vitamin D receptor alleles and bone mineral density in a normal premenopausal Brazilian female population. *Braz J Med Biol Res.*, 30(8):929–32.
- LEVEY, A.S., CORESH, J., BALK, E.T., KAUSZ, A., LEVIN, A., STEFFES, M.W., HOGG, R.J. D., PERRONE, R., LAU, J., EKNOYAN, G. (2003). National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Ann Intern Med*. 139:137-147.
- LEVEY, A.S., BETO, J.A., CORONADO, B.E., EKNOYAN, G., FOLEY, R.N., KASISKE, B.L., KLAG, M.J., MAILLOUX, L.U., MANSKE, C.L., MEYER, K.B., PARFREY, P.S., PFEFFER, M.A., WENGER, N.K., WILSON, P.W., WRIGHT, J.T, JR. (1998). Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: what do

we know? What do we need to learn? Where do we go from here? National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease. *Am J Kidney Dis.* 32(5):853-906.

LEVEY, A.S., ECKARDT, K.U., TSUKAMOTO, Y., LEVIN, A., CORESH, J., ROSSERT, J., DE ZEEUW, D., HOSTETTER, T.H., LAMEIRE, N., EKNOYAN, G. (2005). Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.*, 67:2089-2100.

LINDEMAN, R.D., TOBIN, J., SHOCK, N.W. (1985). Longitudinal studies on the rate of decline in renal function with age. *J Am Geriatr Soc.*, 33:278-85.

LIPS, P. (2006). Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol.*, 92:4-8.

LIU, H., FERGUSSON, M.M., CASTILHO, R.M., LIU, J., CAO, L., CHEN, J., MALIDE, D., ROVIRA, I.I., SCHIMEL, D., KUO, C.J., GUTKIND, J.S., HWANG, P.M., FINKEL, T. (2007). Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science*, 317:803–806.

LIU, S., QUARLES, L.D. (2007). How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol.*, 18:1637–1647.

LIU, S., TANG, W., ZHOU, J., STUBBS, J.R., LUO, Q., PI, M., QUARLES, L.D. (2006). Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol.*, 17:1305–1315.

LOONEY, J.E., YOON, H.K., FISCHER, M., FARLEY, S.M., FARLEY, J.R., WERGEDAL, J.E., BAYLINK, D.J. (1995). Lack of a high prevalence of the bb-vitamin-D-receptor genotype in severely osteoporotic women. *J Clin Endocrinol Metab.*, 80(7):2158–62.

LORGET, F., KAMEL, S., MENTAVERRI, R., WATTEL, A., NAASSILA, M., MAAMER, M., BRAZIER, M. (2000). High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 268:899–903.

LÜLEYAP, H.Ü. (2008). Moleküler Genetiğin Esasları. Nobel Kitabevi, Adana.

MALECKI, M.T., FREY, J., MOCZULSKI, D., KLUPA, T., KOZEK, E., SIERADZKI, J. (2003). Vitamin D receptor gene polymorphisms and association with Type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 111, 505–509.

MANJUNATH, G., TIGHIOUART, H., CORESH, J., MACLEOD, B., SALEM, D.N., GRIFFITH, J.L. (2003). Level of kidney function as a risk factor for cardiovascular outcomes in the elderly. *Kidney Int.* 63:1121-1129.

MARTIN, R.J., MCKNIGHT, A.J., PATTERSON, C.C., SADLIER, D.M., MAXWELL, A.P. (2010). Warren 3/UK GoKinD Study Group. A rare haplotype of the vitamin D

receptor gene is protective against diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.*, 25(2):497-503.

MASSRY, S.G., COBURN, J.W., GLENN, M., CHERTOW, G.M., HRUSKA, K.A., LANGMAN, C., MALLUCHE, H. (2003). K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Chronic Kidney Disease. *American Journal of Kidney Diseases*, 42:7-9

MATSUMURA, Y., AIZAWA, H., SHIRAKI-IIDA, T., NAGAI, R., KURO-O, M., NABESHIMA, Y. (1998). Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun.*, 242:626–630.

MCCLELLAN, W.M., KNIGHT, D.F., KARP, H., BROWN, W.W. (1997). Early detection and treatment of renal disease in hospitalized diabetic and hypertensive patients: important differences between practice and published guidelines. *Am J Kidney Dis.*, 29:368-75.

MELHUS, H., KINDMARK, A., AMER, S., WILEN, B., LINDH, E., LJUNGHALL, S. (1994). Vitamin-D receptor genotypes in osteoporosis. *Lancet* 1-10;344 (8927):949–50.

MIYAMOTO, K., KESTERSON, R.A., YAMAMOTO, H., TAKETANI, Y., NISHIWAKI, E., TATSUMI, S., INOUE, Y., MORITA, K., TAKEDA, E., PIKE, J.W. (1997). Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molec. Endocr.*, 11: 1165-1179.

MOE, S., DRUEKE, T., CUNNINGHAM, J., GOODMAN, W., MARTIN, K., OLGAARD, K., OTT, S., SPRAGUE, S., LAMEIRE, N., EKNOYAN, G. (2006). Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.*, 69: 1945–1953.

MORRISON, N.A., QI, J.C., TOKITA, A., KELLY, P.J., CROFTS, L., NGUYEN, T.V., SAMBROOK, P.N., EISMAN, J.A. (1994). Prediction of bone-density from vitamin-D receptor alleles. *Nature*, 20-1:367(6460):284–7.

MORRISON, N.A., YEOMAN, R., KELLY, P.J., EISMAN, J.A. (1992). Contribution of transacting factor alleles to normal physiological variability vitamin-D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1-8;89(15):6665–9.

MULLIN, B.H., WILSON, S.G., ISLAM, F.M., CALAUTTI, M., DICK, I.M., DEVINE, A., PRINCE, R.L. (2005). Klotho gene polymorphisms are associated with osteocalcin levels but not bone density of aged postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.*, 77(3):145-51.

- MÜLLER, K., BENDTZEN, K. (1992). Inhibition of human T lymphocyte proliferation and cytokine production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Differential effects on CD45RA⁺ and CD45R0⁺ cells. *Autoimmunity*, 14, 37–43.
- NATIONAL KIDNEY FOUNDATION (2002). K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.*, 39(Suppl 1):S1-266.
- NUMAKURA, K., SATOH, S., TSUCHIYA, N., HORIKAWA, Y., INOUE, T., KAKINUMA, H., TOGASHI, H., MATSUURA, S., TADA, H., SUZUKI, T., HABUCHI, T. (2005). Incidence and risk factors of clinical characteristics, tacrolimus pharmacokinetics, and related genomic polymorphisms for posttransplant diabetes mellitus in the early stage of renal transplant recipients. *Transplant Proc.*, 37(4):1865–7.
- NUSSBAUM, R.L., MCINNES, R.R., WILLARD, H.F., BOERKOEL, III.C.F. (2005). Thompson & Thompson. *Tıbbi Genetik*, 6. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Sti., Saunders.
- OBRADOR, G.T., ARORA, P., KAUSZ, A.T., RUTHAZER, R., PEREIRA, B.J., LEVEY, A.S. (1999). Level of renal function at the initiation of dialysis in the U.S. end-stage renal disease population. *Kidney Int.*, 56:2227-35.
- OBRADOR, G.T., RUTHAZER, R., ARORA, P., KAUSZ, A.T., PEREIRA, B.J. (1999). Prevalence of and factors associated with suboptimal care before initiation of dialysis in the United States. *J Am Soc Nephrol.*, 10:1793-800.
- OH, J.Y., BARRETT-CONNOR, E. (2002). Association between vitamin D receptor polymorphism and Type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: The Rancho Bernardo Study. *Metabolism*, 51,356–359.
- OZDEMİR, F.N., SEZER, S., ATAC, B., TUTAL, E., VERDİ, H., SAHİN, F., HABERAL, M. (2005). Vitamin D receptor BsmI and TagI gene polymorphisms in a Turkish ESRD population: influences on parathyroid hormone response. *Transplant Proc.*, 37(7):2922-4.
- PALOMER, X., GONZALEZ-CLEMENTE, J.M., BLANCO-VACA, F., MAURICIO, D. (2008). Role of vitamin D in the pathogenesis of Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 10,185–197.
- PANDA, D.K., MIAO, D., BOLIVAR, I., LI, J., HUO, R., HENDY, G.N., GOLTZMAN, D. (2004). Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem.*, 279(16):16754–16766.
- PARONI, G., SERIPA, D., PANZA, F., ADDANTE, F., COPETTI, M., D'ONOFRIO, G., PELLEGRINI, F., FONTANA, L., PILOTTO, A. (2012). Klotho locus, metabolic traits, and serum hemoglobin in hospitalized older patients: a genetic association analysis. *Age (Dordr)*, 34(4):949-68.

- PATEL, S.R., KE, H.Q., HSU, C.H. (1994). Regulation of calcitriol receptor and its messenger-RNA in normal and renal failure rats. *Kidney Int.* 45(4):1020–7.
- PERWAD, F., AZAM, N., ZHANG, M.Y., YAMASHITA, T., TENENHOUSE, H.S., PORTALE, A.A. (2005). Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1, 25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice. *Endocrinology*, 146:5358–5364.
- QUARLES, L.D. (2008). Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest.*, 118:3820–3828.
- QUARLES, L.D. (2003). FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 285:E1–E9.
- RAZZAQUE, M.S. (2009). The FGF23-Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis. *Nat Rev Endocrinol.*, 5(11):611-9.
- RAZZAQUE, M.S. (2012). The Role of Klotho in energy metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*. Advance online publication 29 May 2012; doi:10.1038/nrendo.2012.75.
- RHEE, E.J., OH, K.W., LEE, W.Y., KIM, S.Y., JUNG, C.H., KIM, B.J., SUNG, K.C., KIM, B.S., KANG, J.H., LEE, M.H., KIM, S.W., PARK, J.R. (2006). The differential effects of age on the association of KLOTHO gene polymorphisms with coronary artery disease. *Metabolism*, 55(10):1344–1351.
- RHEE, E.J., OH, K.W., YUN, E.J., JUNG, C.H., LEE, W.Y., KIM, S.W., BAEK, K.H., KANG, M.I., PARK, S.W. (2006). Relationship between polymorphisms G-395A in promoter and C1818T in exon 4 of the KLOTHO gene with glucose metabolism and cardiovascular risk factors in Korean women. *J Endocrinol Invest.*, 29(7):613–618.
- RIGGS, B.L., NGUYEN, T.V., MELTON, L.J., MORRISON, N.A., O'FALLON, W.M., KELLY, P.J., EGAN, K.S., SAMBROOK, P.N., MUHS, J.M., EISMAN, J.A. (1995). The contribution of vitamin-D receptor gene alleles to the determination of bone-mineral density in normal and osteoporotic women. *J Bone Miner Res.*, 10(6):991–6.
- RISCH, N., MERIKANGAS, K., (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 273:1516–1517.
- RITZ, E., GROSS, M.L. (2005). Hyperphosphatemia in renal failure. *Blood Purif.*, 23:6–9.
- ROWE, J.W., ANDRES, R., TOBIN, J.D., NORRIS, A.H., SHOCK, N.W. (1976). The effect of age on creatinine clearance in men: a cross-sectional and longitudinal study. *J Gerontol.*, 31:155-63.

- SAITO, H., MAEDA, A., OHTOMO, S., HIRATA, M., KUSANO, K., KATO, S., OGATA, E., SEGAWA, H., MIYAMOTO, K., FUKUSHIMA, N. (2005). Circulating FGF-23 is regulated by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 and phosphorus in vivo. *J Biol Chem.*, 280:2543–2549.
- SALAMONE, L., FERRELL, R., BLACK, D., EPSTEIN, R., KULLER, L., CAULEY, J. (1996). The lack of an association between vitamin D receptor genotype and rates of change in bone mineral density at the spine and hip in pre- and perimenopausal women. *Am J Epidemiol.*, 1-6;143(11):177.
- WILLIAMS, S., MALATESTA, K., NORRIS, K. (2009). Vitamin D and Chronic Kidney Disease. *Ethn Dis.* 19(4 Suppl 5): S5–8-11.
- SANTOS, F.R., MOYSES, R.M., MONTENEGRO, F.L., JORGETTI, V., NORONHA, IL (2003). IL-1 β , TNF- α , TGF- β , and bFGF expression in bone biopsies before and after parathyroidectomy. *Kidney Int.*, 63(3):899–907.
- SCHAAF, M.J., CIDLOWSKI, J.A., (2002). AUUUA motifs in the 3' UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids*, 67, 627– 636.
- SCHELLER, M., HUELSKEN, J., ROSENBAUER, F., TAKETO, M.M., BIRCHMEIER, W., TENEN, D.G., LEUTZ, A. (2006). Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat Immunol.*, 7:1037–1047.
- SEEMAN, E., DELMAS, P.D. (2006). Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med.*, 354(21):2250–2261.
- SEMBA, R.D., CAPPOLA, A.R., SUN, K., BANDINELLI, S., DALAL, M., CRASTO, C., GURALNIK, J.M., FERRUCCI, L. (2011). Plasma klotho and mortality risk in older community-dwelling adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*66(7):794-800.
- SERDENGECİTİ, K., SÜLEYMANLAR, G., ALTIPARMAK, M. (2009). Registry of the Nephrology Dialysis and Transplantation in Turkey (Registry-2008).Istanbul: Published by the Turkish Society of Nephrology.
- SEZER, S., KÜLAH, E., ÖZDEMİR, F.N. (2003). Hipertansiyonun renal komplikasyonlar ve böbrek hastalığının progresyonundaki rolü. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi.* 12 (2) 67-73.
- SHIMADA, T., HASEGAWA, H., YAMAZAKI, Y., MUTO, T., HINO, R., TAKEUCHI, Y., FUJITA, T., NAKAHARA, K., FUKUMOTO, S., YAMASHITA, T. (2004). FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res.*, 19:429–435.
- SHIMADA, T., KAKITANI, M., YAMAZAKI, Y., HASEGAWA, H., TAKEUCHI, Y., FUJITA, T., FUKUMOTO, S., TOMIZUKA, K., YAMASHITA, T. (2004). Targeted

ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest.*, 113:561–568.

SHIMADA, T., MUTO, T., URAKAWA, I., YONEYA, T., YAMAZAKI, Y., OKAWA, K., TAKEUCHI, Y., FUJITA, T., FUKUMOTO, S., YAMASHITA, T. (2002). Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology*, 143:3179–3182.

SHIMOYAMA, Y., TAKI, K., MITSUDA, Y., TSURUTA, Y., HAMAJIMA, N., NIWA, T. (2009). KLOTHO gene polymorphisms G-395A and C1818T are associated with low-density lipoprotein cholesterol and uric acid in Japanese hemodialysis patients. *Am J Nephrol.*, 30(4):383-8.

SHIMOYAMA, Y., NISHIO, K., HAMAJIMA, N., NIWA, T. (2009). KLOTHO gene polymorphisms G-395A and C1818T are associated with lipid and glucose metabolism, bone mineral density and systolic blood pressure in Japanese healthy subjects. *Clin Chim Acta.*, 406(1-2):134-8.

SHIRAKI-IIDA, T., AIZAWA, .H, MATSUMURA, Y., SEKINE, S., IIDA, A., ANAZAWA, H., NAGAI, R., KURO-O, M., NABESHIMA, Y. (1998). Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett.*, 424:6–10.

SHLIPAK, M.G., FRIED, L.F., CRUMP, C., BLEYER, A.J., MANOLIO, T.A., TRACY, R.P, FURBERG, C.D., PSATY, B.M. (2002). Cardiovascular disease risk status in elderly persons with renal insufficiency. *Kidney Int.*, 62:997-1004.

SKRABIC, V., ZEMUNIK, T., SITUM, M., TERZIC, J. (2003). Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to Type 1 diabetes in the Dalmatian population. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 59, 31–35.

SMITH, H.W. (1951). Comparative physiology of the kidney. In: Smith HW, ed. *The Kidney: Structure and Function in Health and Disease*. New York: Oxford Univ Pr; 520-574.

SOLAK, M., SENGİL, A.Z., ÖZTAS, S., BAGCI, H. (2000). Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi (Temel bilgiler) Afyon Kocatepe Üniversitesi Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırmalar Vakfı Yayınları, No: 5, Afyon.

SONE, T., MARX, S.J., LIBERMAN, U.A., PIKE, J.W. (1990). A unique point mutation in the human vitamin-D receptor chromosomal gene confers hereditary resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Mol Endocrinol.*, 4(4):623–31.

SPEER, G., CSEH, K., WINKLER, G., VARGHA, P., BRAUN, E., TAKACS, I., LAKATOS, P. (2001). Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus and in android type obesity. *European Journal of Endocrinology*, 144, 385–389.

- STUBBS, J.R., LIU, S., TANG, W., ZHOU, J., WANG, Y., YAO, X., QUARLES, L.D. (2007). Role of hyperphosphatemia and 1, 25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice. *J Am Soc Nephrol.*, 18:2116–2124.
- SULEYMANLAR, G., UTAS, C., ARINSOY, T., ATEŞ, K., ALTUN, B., ALTIPARMAK, M.R., ECDER, T., YILMAZ, M.E., ÇAMSARI, T., BAŞCI, A., ODABAŞ, A.R., SERDENGEÇTİ, K. (2011). A population-based survey of Chronic RENal Disease In Turkey--the CREDIT study. *Nephrol Dial Transplant.* 26: 1862-1871.
- SÜLEYMANLAR, G., SERDENGEÇTİ, K., EREK, E. (2005). Türkiye’de son dönem böbrek yetmezliğin etyolojisi. *Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri Dergisi*, 1(21): 1-8.
- SWAPNA, N., MOHANA VAMSI, U., USHA, G., PADMA, T. (2011). Risk conferred by FokI polymorphism of vitamin D receptor (VDR) gene for essential hypertension. *Indian J Hum Genet.*, 17(3): 201–206.
- SZABO, A., MERKE, J., BEIER, E., MALL, G., RITZ, E. (1989). 1,25(OH)₂ Vitamin-D3 inhibits parathyroid cell-proliferation in experimental uremia. *Kidney Int.*, 35(4):1049–56.
- TAKEDA, E., YAMAMOTO, H., NASHIKI, K., SATO, T., ARAI, H., TAKETANI, Y. (2004). Inorganic phosphate homeostasis and the role of dietary phosphorus. *J Cell Mol Med.*, 8:191–200.
- TANRIVERDİ, M.H., KARADAĞ, A., HATİPOĞLU, E.Ş. (2010). Kronik Böbrek Yetmezliği. *Konuralp Tıp Dergisi*, 2(2):27-32.
- TORRES, P.U., PRIÉ, D., MOLINA-BLÉTRY, V., BECK, L., SILVE, C., FRIEDLANDER, G. (2007). Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. *Kidney Int.*, 71(8):730-7.
- TSEZOU, A., FURUICHI, T., SATRA, M., MAKRYTHANASIS, P., IKEGAWA, S., MALIZOS, K.N. (2008). Association of KLOTHO gene polymorphisms with knee osteoarthritis in Greek population. *J Orthop Res.*, 26:1466–1470.
- TSUJIKAWA, H., KUROTAKE, Y., FUJIMORI, T., FUKUDA, K., NABESHIMA, Y. (2003). Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol.*, 17:2393–2403.
- TSURUOKA, S., NISHIKI, K., IOKA, T., ANDO, H., SAITO, Y., KURABAYASHI, M., NAGAI, R., FUJIMURA, A. (2006). Defect in parathyroid-hormone-induced luminal calcium absorption in connecting tubules of Klotho mice. *Nephrol Dial Transplant.*, 21:2762–2767.

- TURUNEN, M.M., DUNLOP, T.W., CARLBERG, C., VAISANEN, S. (2007). Selective use of multiple vitamin D response elements underlies the 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3-mediated negative regulation of the human CYP27B1 gene. *Nucleic Acids Res.* 35: 2734-2747.
- UITTERLINDEN, A.G., FANG, Y., VAN MEURS, J.B., POLS, H.A., VAN LEEUWEN, J.P. (2004). Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*, 338(2):143-56.
- UITTERLINDEN, A.G., POLS, H.A.P., BURGER, H. (1996). A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. *J Bone Miner Res.*, 11(9):1241-8.
- UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM. (2000). Excerpts from the 2000 U.S. Renal Data System Annual Data Report: Atlas of End Stage Renal Disease in the United States. *Am J Kidney Dis.* 36:S1-S279.
- URAKAWA, I., YAMAZAKI, Y., SHIMADA, T., IJIMA, K., HASEGAWA, H., OKAWA, K., FUJITA, T., FUKUMOTO, S., YAMASHITA, T. (2006). Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*, 444:770-774.
- UTSUGI, T., OHNO, T., OHYAMA, Y., UCHIYAMA, T., SAITO, Y., MATSUMURA, Y., AIZAWA, H., ITOH, H., KURABAYASHI, M., KAWAZU, S., TOMONO, S., OKA, Y., SUGA, T., KURO-O, M., NABESHIMAY, N., AGAI, R. (2000). Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. *Metabolism*, 49:1118-1123.
- VALDIVIELSO, J.M., FERNANDEZ, E. (2006). Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta.* 371(1-2):1-12.
- VURAL, H.C., MALTAS, E. (2012). RT-qPCR assay on the vitamin D receptor gene in type 2 diabetes and hypertension patients in Turkey. *Genetics and Molecular Research*, 11(1):582-590.
- WANG, H.L., XU, Q., WANG, Z., ZHANG, Y.H., SI, L.Y., LI, X.J., YANG, Q.H., XIAO, H. (2010). A potential regulatory single nucleotide polymorphism in the promoter of the Klotho gene may be associated with essential hypertension in the Chinese Han population. *Clin Chim Acta.* 411(5-6):386-90.
- WARRAM, J.H., GEARIN, G., LAFFEL, L., KROLEWSKI, A.S. (1996). Effect of duration of type I diabetes on the prevalence of stages of diabetic nephropathy defined by urinary albumin/creatinine ratio. *J Am Soc Nephrol.* 7:930-7.
- WHO STUDY GROUP (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. World Health Organization, Geneva: Switzerland.

- YAMADA, Y., ANDO, F., NIINO, N., SHIMOKATA, H. (2005). Association of polymorphisms of the androgenreceptor and Klotho genes with bonemineral density in Japanese women. *J MolMed.*, 83: 50–57.
- YAMAGATA, Z, MIYAMURA, T., IJIMA, S., ASAKA, A., SASAKI, M., KATO, J., KOIZUMI, K. (1994). Vitamin-D receptor gene polymorphism and bone-mineral density in healthy Japanese women. *Lancet* 8-10;344(8928):1027.
- YE, W.Z., REIS, A.F., DUBOIS-LAFORGUE, D., BELLANNÉ-CHANTELOT, C., TIMSIT, J., VELHO, G. (2001). Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity in Type 2 diabetic subjects with early age of onset. *European Journal of Endocrinology*, 145, 181–186.
- YOKOYAMA, K., SHIGEMATSU, T., KAGAMI, S., TSUKADA, T., ARAI, T., HARA, S., YAMADA, A., KAWAGUCHI, Y., HOSOYA, T. (2001). Vitamin D receptor gene polymorphism detected by digestion with Apa I influences the parathyroid response to extracellular calcium in Japanese chronic dialysis patients. *Nephron.*, 89(3):315-20.
- YOKOYAMA, K., SHIGEMATSU, T., TSUKADA, T., OGURA, Y., TAKEMOTO, F., HARA, S., YAMADA, A., KAWAGUCHI, Y., HOSOYA, T. (1998). Apa I polymorphism in the vitamin D receptor gene may affect the parathyroid response in Japanese with end-stage renal disease. *Kidney Int.*, 53(2):454-8.
- YOLDEMİR, T., YAVUZ, D.G., ANİK, G., VERİMLİ, N., ERENUS, M. (2011). Vitamin D receptor gene polymorphisms in a group of postmenopausal Turkish women: association with bone mineral density. *Climacteric.*, 14(3):384-91.
- YU, X., IBRAHIMI, O.A., GOETZ, R., ZHANG, F., DAVIS, S.I., GARRINGER, H.J., LINHARDT, R.J., ORNITZ, D.M., MOHAMMADI, M., WHITE, K.E. (2005). Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23. *Endocrinology*, 146:4647–4656.
- YUN, A.J., LEE, P.Y. (2004). Maladaptation of the link between inflammation and bone turnover may be a key determinant of osteoporosis. *Med Hypotheses.*, 63:532–537.
- ZAIDI, M., MOONGA, B.S., ADEBANJO, O.A. (1999). Novel mechanisms of calcium handling by the osteoclast: A review- hypothesis. *Proc Assoc Am Physicians*, 111:319–327.

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Kuyaş HEKİMLER ÖZTÜRK

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Süleyman Demirel Üniversitesi	2003
Y. Lisans	Mikrobiyoloji (FEF)	Süleyman Demirel Üniversitesi	2006
Doktora	Tıbbi Genetik (TIP)	Afyon Kocatepe Üniversitesi	2012

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

“Isparta İli Çiftçilerinde *Borrelia burgdorferi*'ye Karşı Oluşan Serum Antikorlarının Prevalansı”

Danışman: Doç. Dr. Abbas TANER/Prof. Dr. Yaşar AKSOYLAR

Doktora Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

“Kronik Böbrek Hastalığında KLOTHO ve VDR geni polimorfizmlerinin araştırılması”

Danışman: Prof. Dr. Necat İMİRZALIOĞLU/Yrd. Doç. Dr. S. Handan YILDIZ

Yabancı Dili: İngilizce

ÜDS Sağlık Bilimleri: 83,75 (Kasım 2008)

Projelerde Yaptığı Görevler:

- 1) İdiyopatik mental retardasyonlu çocuklarda subtelomerik yeniden düzenlenmelerin araştırılmasında MLPA tekniğinin etkinliğinin araştırılması, fenotip-genotip ilişkisi. KOCATEPE ÜNİV. BİLİMSEL ARAŞTIRMA VAKFI Projesi, 2008, **Araştırmacı**, 08.TIP.12
- 2) İnmemiş testis tanısı konmuş çocukların Y-kromozom mikrolelesyonu, MTHFR gen polimorfizmleri ve kromozom düzensizlikleri açısından değerlendirilmesi, KOCATEPE ÜNİV. BİLİMSEL ARAŞTIRMA VAKFI Projesi, 2008, **Yardımcı Araştırmacı**, 08.TIP.15
- 3) Visfatin geni polimorfizmlerinin diabetik nefropati ile ilişkisinin araştırılması, KOCATEPE ÜNİV. BİLİMSEL ARAŞTIRMA VAKFI Projesi, 2008, **Araştırmacı**, 08.TIP.26
- 4) WNT4 geninin gonadal gelişimdeki rolünün kriptorşidizm tanısı konan çocuklarda WNT4 geni mutasyon analizi ile araştırılması, KOCATEPE ÜNİV. BİLİMSEL ARAŞTIRMA VAKFI Projesi, 2009, **Araştırmacı**, 09.TIP.18
- 5) Kronik böbrek hastalığında KLOTHO ve VDR geni polimorfizmlerinin araştırılması, KOCATEPE ÜNİV. BİLİMSEL ARAŞTIRMA VAKFI Projesi, 2010, **Araştırmacı**, 10.TIP.24

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

1. Tıbbi Genetik Derneği
2. Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Derneği

ESERLER

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

- A1.** Şamlı H, Mutlu İcduygu F, Ozgoz A, Akbulut G, **Hekimler K**, İmirzalioglu N. Surgery for acute abdomen and MEFV mutations in patients with FMF. Acta Reumatol Port. Jul-Sep;34(3):520-4,2009.
- A2.** Soysal Y, Balcı S, **Hekimler K**, Liehr T, Ewers E, Schouman J, Bui T, Mutlu İcduygu F, Kosyakova N, İmirzalioglu N. "Characterization of a double ring

chromosome 4 mosaicism associated with bilateral hip dislocation, cortical dysgenesis, and epilepsy.” Am J Med Genet Part A. Dec;149A(12):2782-7,2009.

- A3.** Soysal Y, Vermeesch J, Davani NA, **Hekimler K**, İmirzalıoğlu N. “A 10.46 Mb 12p11.1-12.1 interstitial deletion coincident with a 0.19 Mb NRXN1 deletion detected by array CGH in a girl with scoliosis and autism.” Am J Med Genet Part A. Jul;155(7):1745-52,2011.
- A4.** Soysal Y, Vermeesch J, Davani NA, Şensoy N, **Hekimler K**, İmirzalıoğlu N. “Molecular characterization of microduplication 22q11.2 in a girl with hypernasal speech”. Genet Mol Res. 10(3): 2148-2154,2011.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler :

- B1.** Mutlu İçduygu F, Samli H, **Hekimler K**, Ozgoz A, Sivaci Y, İmirzalıoğlu N. “Evaluation of a case with 5p deletion syndrome.” European Journal of Human Genetics Conference, P03.160, May 23-26, Vienna, Austria, 2009.
- B2.** Samli H, Mutlu İcduygu F, Ozgoz A, Akbulut G, **Hekimler K**, İmirzalıoğlu N. “Acute abdomen reasoned surgery frequency and MEFV mutations in the patients with FMF.” European Journal of Human Genetics Conference, P13.14, May 23-26, Vienna, Austria, 2009.
- B3.** Samli H, Ozgoz A, Mutlu İçduygu F, **Hekimler K**, İmirzalıoğlu N, Sivaci Y. ”A case with mosaic ring chromosome 18.” European Journal of Human Genetics Conference, P03.112, May 23 - 26, Vienna, Austria, 2009.
- B4.** Soysal Y, Balcı S, **Hekimler K**, Liehr T, Ewers E, Schouman J, Bui T, İmirzalıoğlu N. “Characterization of a double ring chromosome 4 mosaicism associated with bilateral hip dislocation, cortical dysgenesis, and epilepsy.” European Journal of Human Genetics Conference, Poster No: P03.107, 23-26 May, Vienna, Austria, 2009.
- B5.** Özgöz A, Şamlı H, **Hekimler K**, Orhan B, Mutlu İçduygu F, Aktepe F, İmirzalıoğlu N. “Investigating FGFR2 and B7-H4 gene polymorphisms and their effects in breast cancer.” European Journal of Human Genetics

Conference, Poster No:P06.038. 28–31 May, Amsterdam, The Netherlands, 2011.

- B6.** Demir S, Özgöz A, İçduygu FM, **Hekimler K**, Köken T, İmirzalıoğlu N. “Visfatin gene mutation may increase tendency to nephropathy among diabetics.” European Journal of Human Genetics Conference, Poster No: P09.234. 28 – 31 May, Amsterdam, The Netherlands, 2011.
- B7.** Mutlu İçduygu F, Şamlı H, Evrensel T, Özgöz A, **Hekimler K**, Canhoroz M, İmirzalıoğlu N. “The influence of MDR1 gene C3435T, T1236C, G2677T/A, A2956G polymorphisms on breast cancer development risk.” European Journal of Human Genetics Conference, Poster No: P06.039. 28–31 May, Amsterdam, The Netherlands, 2011.
- B8.** Soysal Y, Vermeesch J, Davani NA, **Hekimler K**, İmirzalıoğlu N. “A 10.46 Mb 12p11.1-12.1 interstitial deletion coincident with a 0.19 Mb NRXN1 deletion detected by array CGH in a girl with scoliosis and autism. European Journal of Human Genetics Conference, Poster No: May, Amsterdam, The Netherlands, 2011.
- B9.** **Hekimler K**, Ozgoz A, Mutlu Icduygu F, Cetinkursun S, Narci A, Akin E, İmirzalıoğlu N. ”Y chromosome microdeletion analysis, thromborisk factors and cytogenetic analysis in patients with undescended testis.” In vivo 25:467-576 (2011), p530, poster no: 164. 4th International Congress of Molecular Medicine. 27-30 June, İstanbul, 2011.
- B10.** Cetisli A, Kulaç M, Mutlu Icduygu F, Ozgoz A, **Hekimler K**, İmirzalıoğlu N “Evaluating MEFV gene mutations in patients with Behcet’s Disease.” In vivo 25:467-576 (2011), p531, poster no: 167. 4th International Congress of Molecular Medicine.27-30 June, İstanbul, 2011.

C. Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler :

D. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

- D1.** Yousefi Rad A, **Hekimler K**. “Seroepidemiologic study on Lyme borreliosis in Isparta region in Turkey”. Hacettepe J. Biol. & Chem., 35(2),105-109,2007.

D2. Hekimler Öztürk K, Özgöz A, Mutlu İçduygu F, Soysal Y, Yılmaz Küsbeci Ö, İmirzalıoğlu N. “Prothrombotic gene polymorphisms in young patients with cerebrovascular accident.” Journal of Clinical and Analytical Medicine. Epub:21.05.2012 doi: 10.4328/JCAM.1024.

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

- E1.** Şamlı H, Özgöz A, Mutlu İçduygu F, **Hekimler K**, İmirzalıoğlu N. “Mozaik ring 18 olan bir olgunun değerlendirilmesi.” Uluslararası Katılımlı VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Poster No:193, 6-9 Mayıs, Çanakkale, 2008.
- E2.** Özgöz A, Şamlı H, Mutlu İçduygu F, **Hekimler K**, İmirzalıoğlu N. “45,XX,t(13q14q) karyotipi olan bir olgunun değerlendirilmesi.” Uluslararası Katılımlı VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Poster No:151, 6-9 Mayıs, Çanakkale, 2008.
- E3.** Mutlu İçduygu F, Şamlı H, **Hekimler K**, Özgöz A, Sıvacı Y, İmirzalıoğlu N. “5p delesyon sendromlu olan bir olgunun değerlendirilmesi.” Uluslararası Katılımlı VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Poster No:178, 6-9 Mayıs, Çanakkale, 2008.
- E5.** Cetişli A, Kulaç M, Mutlu İçduygu F, Özgöz A, **Hekimler K**, İmirzalıoğlu N. “Behçet hastalarında MEFV geni mutasyon frekansının değerlendirilmesi.” XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Poster No:150. 28-31 Ekim 2009, Bodrum.
- E6.** Soysal Y, Vermeesch J, **Hekimler K**, Alpay F, İmirzalıoğlu N. “16p11 kromozom bölgesinde mikrolelesyon saptanan multiple konjenital anomalili olgu sunumu.” V. Ege Genetik Sempozyumu. 19 Şubat 2010, İzmir.
- E7.** Demir S, Özgöz A, Mutlu İçduygu F, **Hekimler K**, Köken T, İmirzalıoğlu N. “Investigation of the relationship between Visfatin gene polymorphism and diabetic nephropathy.” Clinical Genetics 2010; 78 (Suppl. 1): 112-133. 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Poster No:X50, 01-05 Aralık 2010, İstanbul.
- E8.** Çetinkurşun S, **Hekimler K**, Narcı A, Özgöz A, Boyacı E, Mutlu İçduygu F, Tuncer AA, İmirzalıoğlu N. “İnmemiş testisli olgularda Y delesyonu ve trombofili panelinin prognostik önemi” Poster No: SBÜ43. 29. Ulusal Çocuk

Cerrahisi Kongresi. 16-19 Mayıs 2011, İstanbul, Çocuk Cerrahisi Dergisi, Kongre Özel Sayısı, Cilt 25, Ek Sayı, 2011.

- E9.** Özgöz A, Şamlı H, **Hekimler K**, Orhan B, Mutlu İçduygu F, Aktepe F, İmirzalıoğlu N. "Meme kanserinde FGFR2 ve B7-H4 geni polimorfizmlerinin ve etkilerinin araştırılması." Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31 (Suppl) S92. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 27-30 Ekim 2011, Antalya.
- E10.** Mutlu İçduygu F, Şamlı H, Evrensel T, Özgöz A, **Hekimler K**, Canhoroz M, İmirzalıoğlu N. "MDR1 geni C3435T, T1236C, G2677T/A, A2956G polimorfizmlerinin meme kanseri gelişim riski üzerine etkisi." Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31 (Suppl) S94. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2011, Antalya.
- E11.** **Hekimler K**, Özgöz A, Mutlu İçduygu F, Yılmaz Küsbeci Ö, Soysal Y, İmirzalıoğlu N. "Serebrovasküler olay geçiren genç hastalarda protrombotik gen polimorfizmlerinin araştırılması." Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31 (Suppl) S241. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 27-30 Ekim, 2011.
- E12.** Soysal Y, Narcı A, **Hekimler K**, İmirzalıoğlu N. "WNT4 geninin gonadal gelişimdeki rolünün kriptorşidizm tanısı konan çocuklarda WNT4 geni mutasyon analizi ile araştırılması." Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31 (Suppl) S241. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 27-30 Ekim, 2011.

Katıldığı Kongre ve Kurslar

- 1) II. Ege Farmakoloji günleri. Süleyman Demirel Üniversitesi. 25-27 Mayıs, 2007, Isparta.
- 2) III. Ege Genetik Sempozyumu. Pamukkale Üniversitesi. 1 Aralık, 2007, Denizli.
- 3) VIII. Uluslararası Katılımlı Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. 6-9 Mayıs, 2008, Çanakkale.
- 4) IV. Ege Genetik Sempozyumu. Adnan Menderes Üniversitesi. 21 Kasım, 2008, Kuşadası, Aydın.

- 5) V. Ege Genetik Sempozyumu. Dokuz Eylül Üniversitesi. 19 Şubat, 2010, İzmir.
- 6) IV. International Congress of Molecular Medicine. 27-30 June, İstanbul, 2011.

Mesleki Deneyimler

1- Prenatal Tanı (Hücre ve Doku Kültürü)

- a. Amniotik mayii hücre kültürü ve kromozom analizi
- b. Kord kanı hücre kültürü ve kromozom analizi
- c. Tahliye materyali doku kültürü ve kromozom analizi
- d. Cilt biyopsi materyali doku kültürü ve kromozom analizi

2- Postnatal Tanı (Hücre ve Doku Kültürü)

- a. Lenfosit hücre kültürü ve kromozom analizi
- b. Kemik iliği hücre kültürü ve kromozom analizi
- c. Tümör doku kültürü ve kromozom analizi

3- Moleküler Genetik

- a. PCR-RFLP
- b. Ters hibridizasyon yöntemi (strip metodu)
- c. RT-PCR
- d. DNA dizi analizi