

Farklı kültür ortamlarındaki böbrek hücrelerinde osteopontin sentezi ve lokalizasyonu

Neslihan TAŞÇENE¹, Hilal KARAGÜL²

¹Şap Enstitüsü Müdürlüğü; ²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

Özet: Osteopontin (OPN), böbrek epitel hücrelerinden idrara salgılanan ve üriner sistemde taş oluşumuna karşı (özellikle kalsiyum okzalit taşı oluşumunda) savunma mekanizmasında önemli rolü olan bir glikoproteindir. Bu çalışmada, OPN'nin taş oluşumunu indükleyen farklı kültür ortamlarındaki MDCK (Madin Darby Canine Kidney) hücrelerinde ve ortama salınan düzeylerindeki değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın diğer bir amacı ise farklı kültür ortamlarındaki MDCK hücrelerinde OPN'in lokalizasyonunda oluşabilecek değişikliklerin araştırılmasıdır. Çalışmada MDCK II (Madin Darby Canine Kidney) hücre hattı kullanılmıştır. MDCK hücrelerinde OPN ekspresyonu, RT-PCR takiben agar jel elektroforez ile gösterilmiştir. NaHPO₄, MgSO₄, CaCl₂, Na₃C₆H₅O₇ ve NaOx/CaC₁₂ (COM) uygulamasıyla oluşturulan farklı kültür ortamlarındaki osteopontinin hücre içi yerleşimi immunofloresans konfokal mikroskopla gösterilmiştir. Hücre içi OPN düzeyleri Western blot yöntemiyle, ortama salgılanan OPN düzeyleri ise immunopresipitasyon sonrası Western blot ile gösterilmiştir. Farklı kültür ortamlarındaki MDCK hücrelerinde ve ekstraselüler matrikse salınan OPN düzeylerinde kontrol grubuna göre herhangi bir farklılık tespit edilememiştir. Na₃C₆H₅O₇ ve COM eklenen gruplarda konfokal lazer mikroskopik incelemesinde OPN'in hücre içi homojen dağılımının bozulduğu ve fibriller kümelenmeler tarzında hücre zarına doğru biriktiği gözlenmiştir. Farklı MDCK kültür ortamlarında, OPN'in hücre içi lokalizasyonunda değişiklikler şekillenmiştir. OPN'in fonksiyonlarını açıklamak için, OPN izoformlarının yapısı ve modifikasyonlarıyla ilgili daha çok araştırmaya gerek duyulmaktadır.

Anahtar sözcükler: Kalsiyum okzalit, MDCK hücre hattı, osteopontin, RT-PCR, Western blot.

Osteopontin synthesis and localization in different cultured renal cells

Summary: Osteopontin (OPN) is a glycoprotein which synthesized within the kidney and secreted into the urine by epithelial cells and can inhibit forming the kidney stones especially calcium oxalate stones. The aim of this study is to compare levels of OPN in MDCK (Madin Darby Canine Kidney) cells with different culture conditions and levels of secreted OPN in different culture conditions. Another objective of this study is determination of OPN localization in MDCK cells with different culture conditions. MDCK II (Madin Darby Canine Kidney) cell line were used. OPN expression in MDCK cells was investigated with RT-PCR and agar gel electrophoresis methods. MDCK cells treated with NaHPO₄, MgSO₄, CaCl₂, Na₃C₆H₅O₇ and COM, intracellular distribution of osteopontin in that cells were monitored by confocal immunofluorescence microscopy technique. Intracellular OPN levels were analysed by Western blot. Secreted OPN in the medium were also analysed by Western blot after immunoprecipitation. Osteopontin levels in different MDCK culture conditions and secreted in extracellular matrix were compared with control groups, there was found any differences between the groups. Intracellular homogen distribution of OPN in cells that made with Na₃C₆H₅O₇ and COM solutions were not monitored, osteopontin conglomerates near the cell membrane as a fibrillar aggregate were observed in that cells. Intracellular localization of OPN in different MDCK cell culture conditions was changed. In order to explain functions of OPN, it is necessary that making more researches about structures and modifications of OPN isoforms.

Keywords: Calcium oxalate, MDCK cell line, osteopontin, RT-PCR, Western blot.

Giriş

Osteopontin (OPN), çok sayıda fonksiyonu olan, özellikle kemik dokusunda yüksek oranda salınımı olmasının yanında makrofajlar, epitel hücreleri, düz kas hücreleri ve endotel hücreler gibi çeşitli hücrelerde de salınımı tesbit edilmiş bir glikofosfoproteindir (2, 18, 31). Normal kemik rezorpsiyonunun düzenlenmesi, üriner kristalizasyonun ve kardiyovasküler kalsifikasyonun engellenmesi, makrofaj sitokin üretimi, T hücresi aktivas-

yonu ve Th1 cevabının stimülasyonu gibi lökosit fonksiyonları, epitel, endotel ve düz kas hücrelerinin yaşamını sürdürmesi, hücre proliferasyonu yara iyileşmesi, tümör invazyonu ve metastaz gibi kanser biyolojisi olmak üzere birçok biyolojik fonksiyonu vardır (17, 18).

OPN böbrek epitel hücrelerinden (Henle kulbu, distal tubul hücreleri ve papillar epitel hücreleri dahil) idrara salgılanmaktadır (18).

OPN'in, üriner sistemde taş oluşumuna karşı özellikle de kalsiyum okzalata taşı oluşumuna karşı savunma mekanizmasında önemli bir rolü vardır. Normalde idrar, içerisindeki mineral maddeler ve tuzlarla doymuş durumda bulunmaktadır. Homeostazis sayesinde bu mineraller idrar yollarında çökme yapmadan vücuttan uzaklaştırılmakta ve özellikle kalsiyum tuzlarının çökmesi engellenmektedir (18).

OPN, kalsiyum okzalata kristallerinin in vitro ortamda nükleasyonunu, gelişmesini ve agregasyonunu engelleyebilmektedir. Ayrıca, böbrek hücre kültürüne kalsiyum okzalata kristallerinin bağlanmasını engellemektedir. Bunlara ek olarak osteopontin, kalsiyum okzalata kristallerinin kalsiyum okzalata dihidrat fazında kalmasını sağlar ki bu form kalsiyum okzalata monohidrat fazına göre böbrek epitel hücrelerine daha az tutunan bir fazdır (18, 33)

OPN'in posttranslasyonel modifikasyonları tam olarak anlaşılmamış olmakla beraber fosforilize olmuş osteopontinin, böbrekte kristal oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (15, 20, 26, 34).

Çalışmada, böbrek epitel hücrelerinden idrara salgılanan ve üriner sistemde taş oluşumuna karşı özellikle de kalsiyum okzalata taşı oluşumuna karşı savunma mekanizmasında önemli bir rolü olduğu düşünülen OPN'in, taş oluşumunu indükleyen CaCl_2 , MgSO_4 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, NaHPO_4 , $\text{NaOx}/\text{CaCl}_2$ (COM) solüsyonları ile farklı kültür ortamları oluşturulan MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) hücrelerindeki düzeylerinin araştırılması ve OPN'in hücre içerisinde sentezlenip hücre dışına sekrete edilen bir protein olması nedeniyle de, hem ortama salgılanan düzeylerinin belirlenmesi hem de ortama salgılanan düzeyleri ile farklı kültür ortamlarındaki MDCK hücrelerinde OPN yerleşimindeki farklılıkların gösterilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hücre kültürü: Çalışmada MDCK II (Madin Darby Canine Kidney) hücre hattı kullanılmıştır. MDCK I ve II olmak üzere 2 tipi vardır. MDCK I distal tubul epitel hücrelerinden, II ise toplama kanalı epitel hücrelerinden oluşmaktadır (28). MDCK hücreleri, %10 fetal dana serumu (FCS), %1 Penicilin-Streptomycin ve 1 g/l glikoz içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ile 37 °C'de ve %5 CO_2 'li etüvde inkube edilmiştir. Hücreler %90 konfluent hale gelinceye kadar üremeleri izlenmiştir.

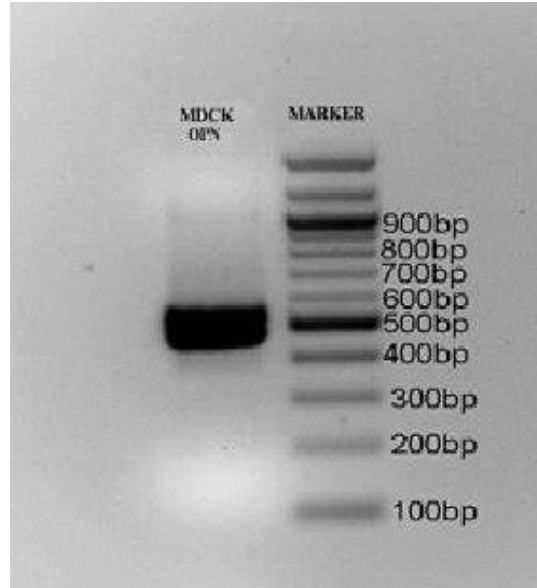
Hücre kültüründe RNA ile cDNA ekstraksiyonu ve reverse transcriptase RNA ile cDNA ekstraksiyonu ve reverse transcriptase PCR: MDCK hücre kültüründe, OPN varlığını ortaya koyabilmek amacı ile, MDCK hücrelerinden, total RNA izolasyon kiti (Nükleospin RNA II, 740 955 22) ile total RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi (Fermentas Revert Aid Stand, K 1612) yapılmış ve elde edilen cDNA'larda OPN'e spesifik gen bölgesi PCR yardımı ile üretilmiştir.

Primer olarak;

Forward Primer: GGCATTGCCTACGCCATTCCGA

Reverse Primer: GAGGTGCCTCTCACTGTCCGGGAA kullanılmıştır.

cDNA'lardaki spesifik sekansın üretilmesi amacı ile DNA Polimerase sample kiti (R010Q) ile PCR işlemi tamamlanmıştır. PCR sonrası %1'lik agaroz jel elektroforezi ile MDCK hücrelerinde OPN ekspresyonu gösterilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. MDCK hücrelerinde osteopontin ekspresyonunun tespiti amacıyla yapılan RT-PCR ve agar jel elektroforez sonucu.

Figure 1. RT-PCR and agarose gel electrophoresis results for the detection of osteopontin expression in MDCK cells.

Farklı kültür ortamlarının oluşturulması: OPN ekspresyonu tespit edildikten sonra konfluent hale getirilen MDCK hücrelerine CaCl_2 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, COM'ın pH'ları 7,4'e ayarlanmış farklı konsantrasyonları uygulanmıştır. Bir hafta sonunda hücrelerin ölmediği en yüksek dozlar (0,01 M NaHPO_4 , 0,2 M MgSO_4 , 0,06 M CaCl_2 , 0,015 M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0,001 M COM) tespit edilmiştir. Uygulanacak konsantrasyonlar hücre canlılık testlerine göre belirlenmiştir. Çalışmada her çözeltinin en yüksek dozlarının yanında farklı 2 düşük konsantrasyon daha (CaCl_2 0,045 M ve 0,03 M, Na_2HPO_4 0,0075M ve 0,005M, Sodyum sitrat 0,00125M ve 0,0075M, COM 0,00075M ve 0,0005M, MgSO_4 0,15 M ve 0,1 M) kullanılmıştır. Kontrol grubu, hiçbir kimyasalla muamele edilmeyen 1g/l glikoz içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ortamındaki MDCK hücreleri tarafından oluşturulmuştur;

SDS-PAGE ve Western blot analizleri: Oluşturulmuş olan farklı kültür ortamlarındaki kimyasallarla muamele edilerek yaklaşık bir haftada yoğun hale gelen MDCK hücreleri, PBS ile yıkandıktan sonra Triton X 100 ile muamele edilip hücre kazıyıcı ile pleytlerden kazanılmış,

polipropilen tüplere alınmıştır. Lizatlardaki protein miktarları Bradford metoduyla ölçülmüş ve 50 µg uygulanacak şekilde tüm numuneler eşit düzeyde uygulanmıştır.

SDS-PAGE metodu, Reynolds ve Tanford'un (23) bildirdikleri şekilde uygulanmıştır. SDS-PAGE sonucu elde edilen jel membrana aktarılarak Amhercam ECL plus Western blotting tayin kiti (cat no: RPN2132) ile bantlar immunofloresans prensibine dayanarak görüntülenmiştir. Primer antikor olarak Biotrend polyclonal osteopontin human antikor (100-401-404), ve sekonder antikor olarak Dakocytomation polyclonal goat anti rabbit Ig kullanılmıştır.

OPN'in hücre içi yerleşimi immunofloresans konfokal mikroskop ile gösterilmiştir. 1:50 konsantrasyonda osteopontin antikoruna bloking buffer içerisinde hazırlanmış; sekonder antikor (Alexa Fluor® 568 rabbit anti-goat IgG A11079, invitrogen) 1:100 konsantrasyonda hazırlanmıştır.

Farklı kültür ortamlarındaki MDCK hücrelerinden ortama salgılanan OPN düzeyleri ise immunopresipitasyon takiben Western blot ile gösterilmiştir.

Bulgular

Yoğun MDCK hücrelerinden total RNA izolasyonunu takiben elde edilen cDNA RT-PCR ile çoğaltılıp, %1'lik agar jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Aynı

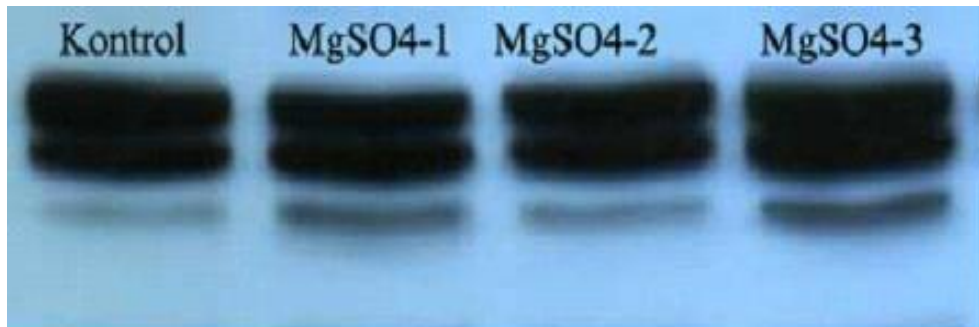
jele uygulanan 100-1200 bp'lık markıra göre değerlendirilerek 498 bp'lık osteopontin bantı belirlenmiştir (Şekil 1).

MDCK hücrelerindeki OPN üç bant olarak gözlenmektedir (Şekil 2, 3). İkinci bant 66 kDa ağırlığındaki en önemli OPN bantıdır (Kompleks 1 bantı). Birinci bant kompleks 1 formu, üçüncü bant ise mannozdan zengin olan formdur. Kompleks 1 ve 2 izoformlarının fosforilize ve/veya O-bağlı oligosakkarit içeren formlar oldukları düşünülmektedir (30).

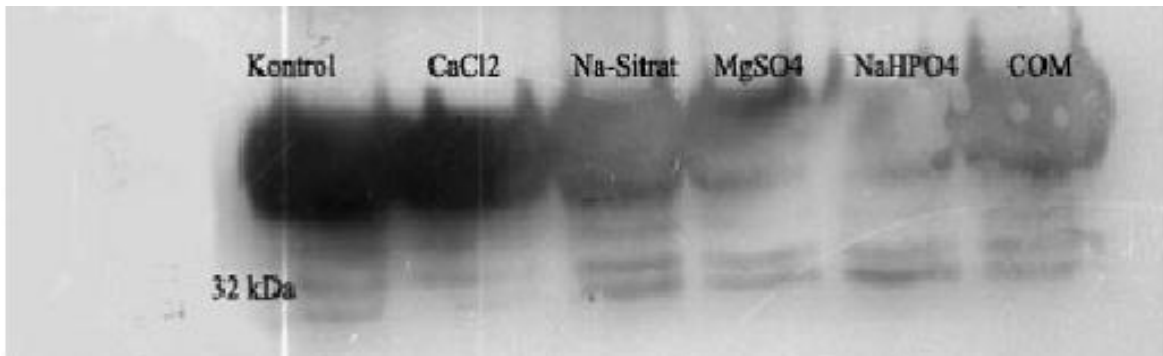
CaCl₂ (0,06 M, 0,045 M ve 0,03 M), Na₂HPO₄ (0,01M, 0,0075M ve 0,005M), Sodyum sitrat (0,015M, 0,00125M ve 0,0075M), COM (0,001M, 0,00075M ve 0,0005M) ile MgSO₄ (0,2 M, 0,15 M ve 0,1 M) ilave edilen gruplar ile kontrol grubu MDCK hücrelerinde OPN düzeyleri incelenmiş, yapılan denemelerde de fark tespit edilememiştir (Şekil 2).

Farklı kültür ortamlarındaki MDCK hücrelerinin ortamlarına salgılanan OPN düzeyleri immunopresipitasyon Western blot metoduyla gösterilmiştir. 32 kDa ağırlıktaki bant, osteopontinin sekrete edilen formudur. Ortama salgılanan osteopontin düzeylerinde kontrol grubuna göre fark tespit edilememiştir (Şekil 3).

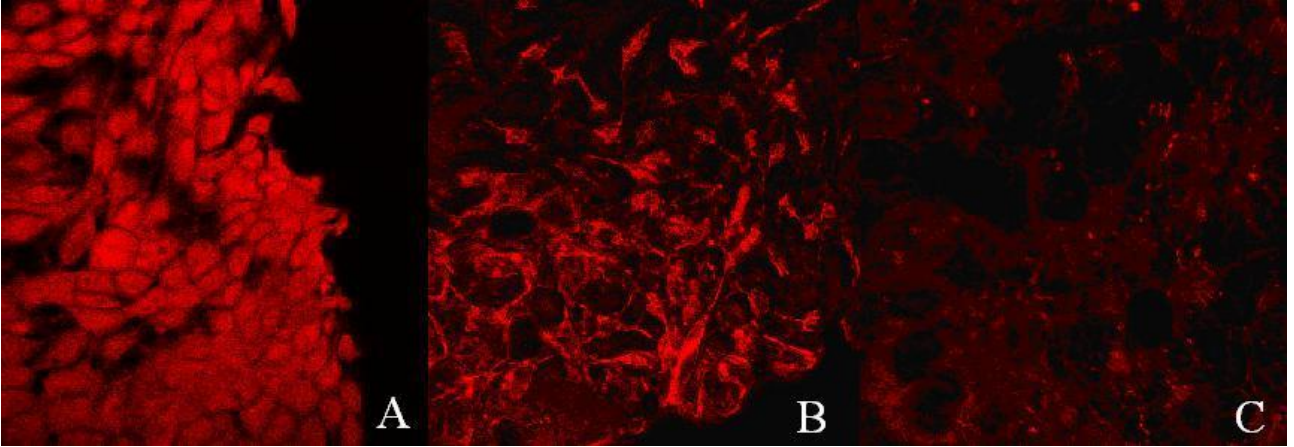
Sağlıklı MDCK hücrelerinde OPN'in yoğun bir şekilde hücre içerisinde homojen lokalizasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Hücre membranının siyah renkli gözlenmesi membranda lokalizasyonun olmadığını göstermiştir (Şekil 4A).



Şekil 2. 0,2 M (MgSO₄-1), 0,15 M (MgSO₄-2) ve 0,1 M (MgSO₄-3) MgSO₄ uygulanmış, MDCK hücrelerdeki osteopontin düzeyleri.
Figure 2. Osteopontin levels in MDCK cells treated with 0,2 M (MgSO₄-1), 0,15 M (MgSO₄-2) and 0,1 M (MgSO₄-3) MgSO₄.



Şekil 3. 0,06 M CaCl₂, 0,015 M Na-Sitrat, 0,2 M MgSO₄, 0,01 M NaHPO₄, ve 0,001 M COM uygulanmış MDCK hücrelerden ortama salınan osteopontin düzeyleri.
Figure 3. Released osteopontin levels from MDCK cell treated with 0,06 M CaCl₂, 0,015 M Na-Sitrat, 0,2 M MgSO₄, 0,01 M NaHPO₄ and 0,001 M COM.



Şekil 4. MDCK hücrelerinde osteopontin lokalizasyonunun konfokal lazer mikroskopik görüntüsü. A. Kontrol MDCK hücrelerinde osteopontin lokalizasyonu (x100). B. 0,2 M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ uygulanmış MDCK hücrelerinde osteopontin fibriler tarzda hücreler arasında ve hücre içinde kümelenmiş, homojen dağılım bozulmuştur (x100). C. 0,001 M COM uygulanmış MDCK hücrelerinde osteopontinin homojen dağılımı bozulmuş, fibriler tarzda kümelenmiş ve kalsiyum-okzalit kristalleri gözlenmiştir (x100).

Figure 4. Confocal microscopic image of osteopontin localization in MDCK cell. A. Osteopontin localization in control MDCK cells (X100). B. Osteopontin clustered fibrillar style in MDCK cells treated with 0,2 M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$. Homogeneous distribution is distorted (x100). C. Homogeneous distribution of osteopontin is distorted and clustered fibrillar style in MDCK cells treated with 0,001 M COM and calcium-oxalate crystals were observed (x100).

Hücre ortamına CaCl_2 eklenmiş MDCK hücrelerinde görüntü alınamamıştır, kalsiyumun hücre membranı üzerine etkisi sebebiyle görüntü alınamadığı düşünülmektedir.

Hücre ortamına Na_2HPO_4 ve MgSO_4 eklenmiş MDCK hücrelerinde kontrol hücreleriyle karşılaştırıldıklarında OPN lokalizasyonunda fark gözlenmemiştir.

Hücre ortamına $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ eklenmiş MDCK hücrelerinde OPN lokalizasyonunun, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ilavesi sonucunda fibriler tarzda hücreler arasında ve hücre içinde kümelenmiş, homojen dağılımın bozulduğu gözlenmiştir. Hücrelerin yapısında bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4B).

Hücre ortamına COM eklenmiş MDCK hücrelerinde OPN'in homojen dağılımının bozulduğu, fibriler tarzda kümelenmeler oluşturduğu ve kalsiyum-okzalit kristalleri gözlenmiştir (Şekil 4C).

Tartışma ve Sonuç

OPN'in taş oluşumunu hem engellediğine (6, 7, 9, 11, 14, 19, 22, 25, 29, 30, 35, 37) hem de indüklediğine (8, 13, 24, 38, 39) dair pek çok çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte halen OPN'in taş oluşumu üzerine etkisiyle ilgili bilinmeyen yönler ve buna ilişkin tartışmalar bulunmaktadır.

Bu çalışmada, MDCK hücrelerinde OPN (498 kb) ekspresyonu RT-PCR metodu ile gösterilmiştir. Itoh ve ark. (12), böbrek epitel hücrelerinde oksidatif stres sonucu oluşan apoptozisin OPN'le ilişkisini araştırdıkları çalışmada, OPN ekspresyonunu RT-PCR metodu ile göstermişlerdir. Yamate ve ark. (38) ise MDCK hücre membranına kalsiyum okzalit kristallerinin tutunması üzerine osteopontinin etkisiyle ilgili olarak yaptıkları çalışmada, OPN'in MDCK hücrelerindeki ekspresyonunu,

immunofloresans metodu ile göstermişlerdir. MDCK hücre kültürü dışında BSC-1 (maymun böbrek hücre kültürü), LLCPK1 (domuz böbrek hücre kültürü) gibi pek çok böbrek hücre kültüründe de OPN ekspresyonu olduğunu bildirmişlerdir (16, 36). Ayrıca in vivo ortamda insan böbrek hücrelerinde (10, 15) ve rat böbrek hücrelerinde de (13) OPN ekspresyonu gösterilmiştir. OPN'in molekül ağırlığı, kullanılan SDS-PAGE sistemindeki ve akrilamid oranındaki farklılığa bağlı olarak ya da osteopontinin post-translasyonel modifikasyonları sonucu hücre içi formlarının 44 ile 75 kDa arasında farklı molekül ağırlığına sahip formları olduğu bildirilmektedir (5, 34).

Farklı hücrelerden orijin alan OPN'in, farklı post translasyonel modifikasyonlara bağlı olarak farklı fonksiyonları olabileceği bildirilmektedir (27). Bu çalışmada da MDCK hücrelerinde Western blot metoduyla osteopontine ait 72 ile 55 kDa arası molekül ağırlığına sahip 3 adet bant tespit edilmiştir. Tespit edilen ikinci bant 66 kDa ağırlığındaki en önemli OPN bantıdır (Kompleks 1 bantı). Birinci bantın mannozdan zengin olan, üçüncü bantın ise kompleks 2 formu olduğu; kompleks 1 ve 2 izoformlarının fosforile ve/veya O-bağlı oligosakkarit içeren formlar oldukları düşünülmektedir (30). Yapılan bir çalışmada da ikinci bantın 66 kDa moleküler ağırlığına sahip form olduğu, ortamda gözlenen formun ise 32 kDa moleküler ağırlığına sahip bağı form olduğu bildirilmiştir (1). Bu çalışmada da tespit edilen 32 kDa molekül ağırlığına sahip bantın, Agnihotri ve ark.'nın da (1) belirttiği forma karşılık geldiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, sağlıklı hücrelerdeki OPN sitoplazmada homojen dağılım göstermektedir ve bu dağılım kırmızı ışıkla gösterilmiştir. Hücre membranında ise osteopontin görülmemekte ve hücre membranı siyah

renkte gözlenmektedir. Hücre membranında osteopontinin görüntülenmemesinin, OPN'nin sentezlendikten sonra hücreden dışarı sekrete edilmesi ve hücreler arası boşluğa verilmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Versult ve ark. (33), insan böbreğinden izole edilen distal ve proksimal böbrek tubul hücre kültüründe, OPN'in hücre içerisinde lokalizasyonunu immunofloresans ve konfokal lazer mikroskopla görüntülemişler, proksimal tubul hücrelerinin hücre membranında OPN lokalizasyonu gözleyemez iken, distal tubul hücrelerinde hücre membranında lokalize olduğunu göstermişlerdir (15).

Hücre ortamına sodyum sitrat eklenmiş MDCK hücrelerinde OPN'in fibriler tarzda hücreler arasında ve hücre içinde kümelendiği gözlenmiş, fakat hücrelerin yapısında bir değişim gözlenmemiştir. Hücre ortamına COM eklendiğinde OPN, hücreler arasında ve bazı hücrelerin içinde veziküler tarzda, kümelenmeler halinde gözlenmiştir. Ayrıca parlak kırmızı renkli olarak kalsiyum okzalit kristalleri görülmüştür. Verhulst ve ark. (33), insan böbrek tubul hücrelerinde kalsiyum okzalit kristallerinin tutunma kapasitesini incelemek için yaptıkları çalışmada da, hücrelerdeki kalsiyum okzalit kristallerini floresans mikroskop ile göstermişlerdir (33). In vitro çalışmalarda, okzalit veya kalsiyum okzalit kristallerinin böbrek epitel hücrelerinde oksidatif strese sebep olduğu bildirilmektedir. Artan oksidatif stresin de OPN üretimine neden olduğu belirtilmiştir (32).

Çalışmada $CaCl_2$ uygulanan hücrelerde immunofloresans ile görüntü alınamamıştır. Kalsiyumun hücre membranı permabilitesini azalttığı düşünüldüğünde, hücre membran kanallarındaki permabilitenin azalması ya da hücresel iletinin tamamen kesilmesi sitoplazmadaki iyonize kalsiyum miktarında artışa neden olmaktadır. Bu nedenle kalsiyumun ayırıcı bir ajan olduğu ileri sürülmektedir (21). Buna göre çalışmada immunofloresans ile görüntü alınamaması, hücre membran permabilitesinin azalması sonucunda hücreye OPN antikor girişinin engellenmesi ve buna bağlı olarak immunofloresansın çalışmamış olmasından kaynaklanmış olabilir.

In vitro şartlarda, $CaCl_2$, Na_2HPO_4 , $MgSO_4$, $Na_3C_6H_5O_7$ ve COM ile bir hafta boyunca muamele edilen MDCK hücrelerindeki ve kontrol hücrelerindeki OPN düzeyleri Western blot metoduyla incelendiğinde; OPN düzeylerinin kontrol grubu ile diğer gruplarda aynı olduğu gözlenmiştir. In vitro şartlarda yapılan bir çalışmada (40), sitrat verilen gruplarda OPN ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Cha ve ark.'nın (3) yaptıkları başka bir çalışmada ise, sodyum içermeyen yemle beslenen farelerin böbrek dokularında OPN ekspresyonunun daha az olduğu tespit edilmiştir (3).

Lieske ve ark. (16), MDCK ve BSC-1 (maymun böbrek hücre kültürü) hücreleriyle yaptıkları çalışmada, kalsiyum okzalit kristali hücre ortamlarına eklendikten 6 saat sonra, BSC-1 hücrelerinde ise 12 saat sonra OPN mRNA düzeylerinin maksimum seviyede olduğunu, 24

saatte ise normal seviyeye indiğini bildirmişlerdir. Kalsiyum okzalit kristalinin eklenmesinin stimülasyonu hızlandırdığı ve bu nedenle 6 ve 12 saatte değişimleri gözledikleri bildirilmektedir. Ayrıca bu çalışmada Northern blot tekniği kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan RT-PCR sonucunda farklı kültür ortamlarındaki hücrelerde OPN mRNA düzeylerinde de bir farklılık tespit edilememiştir. Western blot ve RT-PCR sonuçları ile OPN düzeylerinde değişiklik olmadığı desteklenmiştir. Farklı kültür ortamlarındaki MDCK hücrelerinin ortamlarına salgılanan OPN düzeyleri kontrol grubu ile diğer gruplarda aynı olduğu gözlenmiştir.

OPN'in farklı izoformlarının kristal oluşumu üzerine etkilerinin bakıldığı bir çalışmada, rekombinant OPN'nin COM kristal oluşumunu önlemede etkisi bulunamazken, fosforilasyon yönünden zengin süt OPN ve daha az fosforile olan kemik OPN'nin kristal oluşumunu önlediği ifade edilmiştir (15). Fosforile OPN yanında poliaspartik asit uzantısı olan OPN'nin taş oluşumunu önlediğini bildiren çalışmalarda bulunmaktadır (4).

Sonuç olarak; MDCK hücrelerine $CaCl_2$, Na_2HPO_4 , $MgSO_4$, $Na_3C_6H_5O_7$ ve COM çözeltileri eklenerek elde edilen farklı kültür ortamlarındaki ve ekstrasellüler matrikse salınan osteopontin düzeylerinde kontrol gruplarıyla karşılaştırılmaları sonucunda herhangi bir farklılık tespit edilememiştir. OPN'in düzeylerinde farklılık gözlenmemekle beraber sodyum sitrat ve kalsiyum okzalit eklenen gruplarda osteopontinin hücre içi homojen dağılımının bozulduğu ve fibriler kümelenmeler tarzında hücre zarına doğru biriktiği gözlenmiştir. OPN formlarının fizyolojik önemleri henüz tam olarak açık olmasa da muhtemelen post translasyonel farklılıklar sonucunda OPN'in farklı fonksiyonel rolleri oluşmaktadır. OPN'in, taş oluşumunu engellediğine ve indüklediğine dair farklı görüşler olmakla beraber OPN'in taş oluşumu üzerine etkisiyle ilgili bilinmeyen yönler bulunmakta ve halen tartışmalar devam etmektedir. OPN'in taş oluşumuna etkisini gösterecek çalışmalarda, düzeylerinden çok fosforile ve glikozile formlarına ilişkin yapılacak tespitler ileriye ışık tutması bakımından daha faydalı olacaktır.

Kaynaklar

1. **Agnihotri R, Crawford HC, Haro H ve ark.** (2001): *Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin)*. J Biol Chem, **276**, 28261-28267.
2. **Altıntaş A, Saruhan G, Benbir G ve ark.** (2009): *The role of osteopontin: A Shared pathway in the pathogenesis of multiple sclerosis and osteoporosis*. J Neurol Sci, **276**, 41-44.
3. **Cha J, Ahn Y, Lim SW ve ark.** (2000): *Decreased osteopontin expression in the rat kidney on a sodium deficient diet*. YMJ, **41**, 128-135.
4. **Chien Y, Masica DL, Gray JJ ve ark.** (2009): *Modulation of calcium oxalate dihydrate growth by selective crystal-face binding of phosphorylated osteopontin and polyaspartate peptide showing occlusion by sectoral (compositional) zoning*. JBC, **284**, 23491-23501.

5. **Denhardt DT, Xiaojia G** (1993): *Osteopontin: A protein with diverse functions*. *FASEB J*, **7**, 1475-1482.
6. **Gericke A, Qin C, Spevak L ve ark.** (2005): *Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization*. *Calcif Tissue Int*, **77**, 45-54.
7. **Giachellia CM, Steitz S** (2000): *Osteopontin: A versatile regulator of inflammation and biomineralization*. *Matrix Bio*, **19**, 615-622.
8. **Gilbert M, Shaw WJ, Long JR ve ark.** (2000): *Chimeric peptides of statherin and osteopontin that bind hydroxyapatite and mediate cell adhesion*. *J Biol Chem*, **275**, 16213-16218.
9. **Hoyer JR, Asplin JR, Otvos L** (2001): *Phosphorylated osteopontin peptides suppress crystallization by inhibition of the growth of calcium oxalate crystals*. *Kidney Int*, **60**, 77-82.
10. **Hudkins KL, Giachelli CM, Cui Y ve ark.** (1999): *Osteopontin expression in fetal and mature human kidney*. *J Am Soc Nephrol*, **10**, 444-457.
11. **Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA** (1994): *Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: Structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation*. *Biochem J*, **300**, 723-728.
12. **Itoh Y, Yasui T, Okada A ve ark.** (2005): *Examination of the antioxidative effect in renal tubular cells and apoptosis by oxidative stress*. *Urol Res*, **33**, 261-266.
13. **Kohri K, Nomura S, Kitamura Y ve ark.** (1993): *Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin)*. *J Biol Chem*, **268**, 15180-15184.
14. **Kumar V, Vega LP, Farrell G ve ark.** (2005): *Urinary macromolecular inhibition of crystal adhesion to renal epithelial cells is impaired in male stone formers*. *Kidney Int*, **68**, 1784-1792.
15. **Langdon A, Wignall GR, Rogers K ve ark.** (2009): *Kinetics of calcium oxalate crystal growth in the presence of osteopontin isoforms: an analysis by scanning confocal interference microscopy*. *Calcif Tissue Int*, **84**, 240-248.
16. **Lieske JC, Hammes MS, Hoyer JR ve ark.** (1997): *Renal cell osteopontin production is stimulated by calcium oxalate monohydrate crystals*. *Kidney Int*, **51**, 679-686.
17. **Liu Y, Zhang D, Sui X ve ark.** (2009): *Overexpression of human osteopontin increases cell proliferation and migration in human embryonic kidney-293 cells*. *Cell Mol Biol Lett*, **14**, 670-678.
18. **Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V ve ark.** (2002): *Osteopontin-a molecule for all seasons*. *Q J Med*, **95**, 3-13.
19. **Min W, Shiraga H, Chalko C ve ark.** (1998): *Quantitative studies of human urinary excretion of uropontin*. *Kidney Int*, **53**, 189-193.
20. **O'Young J, Chirico S, Tarhuni N ve ark.** (2009): *Phosphorylation of osteopontin peptides mediates adsorption to and incorporation into calcium oxalate crystals*. *Cells Tissues Organs*, **189**, 51-55.
21. **Peracchia C** (1977): *Calcium effects on gap junction structure and cell coupling*. *Nature*, **271**, 669-671.
22. **Qui SR, Wierzbicki A, Orme CA ve ark.** (2007): *Molecular modulation of calcium oxalate crystallization by osteopontin and citrate*. *PNAS*, **101**, 1811-1815.
23. **Reynolds JA, Tanford C** (1970): *The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes*. *J Biol Chem*, **245**, 5161-5165.
24. **Robinovich YI, Esayanur M, Daosukho S ve ark.** (2006): *Adhesion force between calcium oxalate monohydrate crystal and kidney epithelial cells and possible relevance for kidney stone formation*. *J Coll Inter Sci*, **300**, 131-140.
25. **Silverman L, Boskey AL** (2004): *Diffusion systems for evaluation of biomineralization*. *Calcif Tissue Int*, **75**, 494-501.
26. **Sodek J, Ganss B, Mckee MD** (2000): *Osteopontin*. *Crit Rev Oral Biol. Med*, **11**, 279-303.
27. **Sun BS, You J, Li Y ve ark.** (2013): *Osteopontin knockdown suppresses non small cell lung cancer cell invasion and metastasis*. *Chin Med J*, **126**, 1683-1688.
28. **Svennevig K, Prydz K, Kolset SO** (1995): *Proteoglycans in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells*. *Biochem J*, **311**, 881-888.
29. **Taller A, Grohe B, Rogers KA ve ark.** (2007): *Specific adsorption of osteopontin and synthetic polypeptides to calcium oxalate monohydrate crystals*. *Biophys J*, **93**, 1768-1777.
30. **Taşçene N, İsgüder Z, Salmanoğlu B** (2014): *Osteopontin expression in polarized MDCK cells*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **20**, 671-674.-
31. **Ulrich O, Mann K, Haase W ve ark.** (1991): *Biosynthesis and secretion of an osteopontin-related 20-kDa polypeptide in the Madin-Darby canine kidney cell line*. *J Biol Chem*, **266**, 3518-3525.
32. **Umekawa T, Iguchi M, Uemura H ve ark.** (2006): *Oxalate ions and calcium oxalate crystal-induced up-regulation of osteopontin and monocyte chemoattractant protein-1 in renal fibroblasts*. *BJU Int*, **98**, 656-660.
33. **Verhulst A, Persy VP, Rompay AV ve ark.** (2002): *Osteopontin synthesis and localization along the human nephron*. *J Am Soc Nephrol*, **13**, 1210-1218.
34. **Wang L, Guan X, Tang R ve ark.** (2008): *Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of calcium oxalate crystallization*. *J Phys Chem B*, **112**, 9151-9157.
35. **Wesson JA, Johnson RJ, Mazzali M ve ark.** (2003): *Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules*. *J Am Soc Nephrol*, **14**, 139-47.
36. **Xie Y, Sakatsume M, Nishi S ve ark.** (2001): *Expression, roles, receptors and regulation of osteopontin in the kidney*. *Kidney Int*, **60**, 1645-1657.
37. **Yamaguchi S, Wiessner J, Hasegawa A ve ark.** (2002): *Calcium oxalate monohydrate crystal binding substance produced from Madin-Darby canine kidney cells*. *Int J Urol*, **9**, 50-58.
38. **Yamate T, Kohri K, Umekawa T ve ark.** (1998): *Interaction between osteopontin on Madin-Darby canine kidney cell membrane and calcium oxalate crystal*. *Urol Int*, **62**, 81-86.
39. **Yamate T, Tsuji H, Amasaki N ve ark.** (2000): *Analysis of osteopontin DNA in patients with urolithiasis*. *Urol Res*, **28**, 159-166.
40. **Yasui T, Sato M, Fujita K ve ark.** (2001): *Effects of citrate on renal stone formation and osteopontin in a rat urolithiasis model*. *Urol Res*, **29**, 50-56.

Geliş tarihi: 01.07.2015 / Kabul tarihi: 09.08.2016

Yazışma Adresi:

Prof.Dr.Hilal Karagül
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
06110 Dışkapı, Ankara.
e-mail: karagul@veterinary.ankara.edu.tr