The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education

and Scientific Research

University of Mosul / College of Science

Department of Chemistry

Biochemical and molecular study for dickkopf-3 protein in patients with chronic kidney diseases

Hiba Rafid Kamal Jameel Al-Aadhamy

Ph.D. Thesis

In

Chemistry / Biochemistry

Supervised by

Prof. Dr. Thikra Ali Fathi Allwsh

1446 A.H **2024 A.D**

summary

The study aimed to find the biological role of Dickkopf-3 (DKK-3) protein and its relationship with chronic kidney disease (CKD) through a clinical study in healthy and patient individuals. (90) blood samples were collected for the control group and (90) samples for a group of newly diagnosed patients, aged between (30-70) years and of both sexes. A significant increase in the levels of DKK-3 was found in the patient group, and in smokers it was higher than non-smokers. Its levels also increased with age, while the levels of DKK-3 decreased with increasing body mass index, but no significant increase was shown between males and females.

The (28) Biochemical variables were measured in the control and patient groups. A significant decrease was found in indicators of kidney function that include glomerular filtration rate (GFR), albumin, and total protein. There was also a significant increase in urea, creatinine, uric acid and cystatin C levels, and significant increase in electrolytes potassium, phosphorus, sodium, and chloride in patients compared to healthy people. Also, bone indicators showed a significant decrease in calcium and vitamin D3 levels, with a significant increase in parathyroid hormone. As for glucose, the results showed a significant increase, while Iron showed a significant decrease in patients. The results also showed an increase in the levels of oxidants in the blood of patients that include malondialdehyde, peroxynitrite and peroxidase while antioxidant levels decreased significantly, for glutathione, and aryl esterase. Vitamins, such as C and E also billirubin were decreased significantly. As for inflammatory indicators, such as interferon-gamma, , and C-reactive protein, they showed a significant increase in kidney patients compared to healthy people.

To find the relationship between DKK-3 and biochemical variables, we found a linear correlation coefficient where a low negative correlation was found between DKK-3 and GFR , calcium, vitamin D3 and Iron, also, a positive correlation with urea, creatinine and parathyroid hormone. The study also found a positive correlation between DKK-3 and oxidizing agents (malondialdehyde, peroxidase and peroxynitrite) and an inverse correlation with glutathione. A

significant positive correlation was also found between DKK-3 and inflammatory markers (C-reactive protein and interferon-gamma).

The technical study included isolation and partial purification of DKK-3 from the blood plasma of a healthy person using ammonium sulfate with a saturation rate of 65% to precipitate proteins, then dialysis and gel filtration chromatography using a gel (Sephadex G-75), and two protein peaks appeared. The study estimated the level of DKK-3 in the protein peaks after separation, where peak A was the highest level and that the number of purifications of DKK-3 in peak A increased by 43 times compared to blood plasma after gel filtration. The purity of the isolated DKK-3 (peak A) was confirmed using RP-HPLC technology. The retention time of the isolated DKK-3 (peak A) was compared with that of the standard DKK-3 solution, which showed two peaks and the identical retention time indicated that the isolated DKK-3 (peak A) had similar physical and chemical properties to the standard solution.

The approximate molecular weight of isolated and partially purified DKK-3 (peak A) was found by using gel filtration chromatography and electrophoresis (SDS-PAGE) techniques and it is (66209±1000) Dalton and (65300±1000) Dalton respectively.

The moleculer study included estimating the level of gene expression of the DKK-3 gene in patients and the control group. The average expression level was 2.8 in the patient group, compared to 1.0 in the control group. This increase in gene expression of the DKK-3 gene is considered a major factor in the development of the disease. DNA sequencing and PCR analysis revealed an association between the disease and genetic variations in the DKK-3 gene, suggesting that specific genetic variants or mutations may be associated with the observed increase in gene expression and the development of the disease.

Additionally,The study compared DKK-3 gene sequences from CKD samples and the original sequence at National Center for Biotechnology Information (NCBI) to understand potential genetic changes linked to the disease. Results showed a deletion mutation at position 40945. Most mutations

found were transition mutations (G → A), which can affect protein function depending on their location within the gene.

الخلاصة

تناولت الدراسة ايجاد الدور الحيوي لبروتين ديكوف-3 (دي كي كي3) وعلاقته بمرض الكلى المزمن من خلال الدراسة السريرية له في الاشخاص الاصحاء والمرضى ، إذ جُمِع (90) أنموذج دم لمجموعة السيطرة و (90) أنموذج لمجموعة المرضى المشخصين حديثاً وتراوحت أَعمارهم بين (30-70) سنة ومن كلا الجنسين، وُجِدَ ارتفاع معنوي في مستوى (دي كي كي3) في مجموعة المرضى ، وفي المدخنين أَعلى من غير المدخنين كذلك يرتفع تركيزه مع التقدم بالعمر ، بينما ينخفض مستواه مع زياده مؤشر كتلة الجسم و لم يظهر فرق معنوي بين الذكور والإناث.

تم قياس (28) متغيرا من المتغيرات الكيموحيوية لدى مجموعتي السيطرة والمرضى ، وُجِدَ انخفاض معنوي في مؤشرات وظائف الكلى التي تضم معدل الترشيح الكبيبي والالبومين والبروتين الكلي بينما وجدا ارتفاعا معنويا في اليوريا والكرياتينين وحامض اليوريك والسستاتين سي كما وجد ارتفاع معنوي للإلكتروليتات مثل البوتاسيوم والفسفور والصوديوم والكلوريد في المرضى بالمقارنه مع الأصحاء. اظهرت مؤشرات العظام انخفاض معنوي في مستويات الكالسيوم وفيتامين دي 3 مع ارتفاع معنوي في هرمون الغده جار الدرقيه كما وجدا ارتفاع معنويا في الكلوكوز في حين ظهر انخفاض معنوي في الحديد كذلك أظهرت النتائج ارتفاع مستويات المؤكسدات في دم المرضى التي تضم المالون ديالديهايد ,البيروكسي نتريت والبيروكسديز, في حين وجد انخفاضا معنويا في مستويات مضادات الأكسدة وهي الكلوتاثايون وانزيم الاريل استريز, و فيتامين سي و اي وكذلك البيليروبين. مؤشرات الالتهاب المتمثلة بالانترفيرون كاما وانزيم الفوسفاتيز القاعدي و البروتين التفاعلي سي اظهرت ارتفاعا معنويا لدى مرضى الكلى مقارنه بالاصحاء.

لإيجاد العلاقة بين ديكوف-3 و المتغيرات الكيموحيوية تم ايجاد معامل الارتباط الخطي اذ وجدت علاقه ارتباط معنوية سلبية بين (دي كي كي3) ومعدل الترشيح الكبيبي والكالسيوم وفيتامين دي و الحديد وعلاقه ارتباط معنوية موجبه مع اليوريا والكرياتينين وهرمون الغده جار الدرقية. وجدت الدراسه ايضا علاقه ارتباط معنوية موجبه بين (دي كي كي3) والعوامل المؤكسده (المالون ديالديهايد و البيروكسي نتريت والبيروكسيديز) وعلاقه ارتباط معنوية سلبية مع مضادات الاكسدة, الكلوتاثيون, كذلك وجد علاقه ارتباط موجبه معنويه مع مؤشرات الالتهاب (البروتين التفاعلي سي والانترفيرون كاما).

تضمنت الدراسة التقنية عزل وتنقية (دي كي كي3) من بلازما دم شخص سليم ظاهريًا باستعمال كبريتات الأَمونيوم بنسبة تشبع 65% لترسيب البروتينات ثم عملية الفرز الغشائي وكروماتوغرافيا الترشيح

الهلامي باستعمال هلام (G-75 سفدكس)، وظهرت حزمتان بروتينيتان و قد قدر مستوى (دي كي كي3) في القمتين البروتينية بعد الفصل، حيث كانت القمة A هي الأعلى مستوى و بعدد مرات التنقية لـ (دي كي كي3) بمقدار 43 مرة مقارنة ببلازما الدم بعد الترشيح الهلامي علاوة على ذلك، تم استخدام كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء لتحديد نقاء (دي كي كي3) المعزولة (القمة A) من خلال مقارنة زمن الاحتفاظ بـ (االقمة A) ومحلول (دي كي كي3) القياسي و يشير زمن الاحتفاظ المطابق إلى أن (دي كي كي3)المعزول من (القمة A) له خصائص فيزيائية وكيميائية مماثلة للمحلول القياسي. تم إيجاد الوزن الجزيئي التقريبي لل (دي كي كي3) المعزول والمنقى جزئيًا (االقمة A) باستخدام تقنيات كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي والهجرة الكهربائية وكان (66209±1000) دالتون و (65300±1000) دالتون على التوالي.

تضمنت الدراسة الجينية تقدير مستوى التعبير الجيني لجين (دي كي كي3) لدى المرضى ومجموعة السيطرة. وكان متوسط مستوى التعبير 2.8 في مجموعة المرضى، مقارنة بـ 1.0 في مجموعة السيطرة وتعتبر هذه الزيادة في التعبير الجيني لجين (دي كي كي3) عاملاً رئيسيًا في تطور الحالة المرضية. كشف تسلسل الحمض النووي وتحليل تفاعل البوليميراز المتسلسل عن وجود علاقة بين المرض والاختلافات الجينية في جين (دي كي كي3)، مما يشير إلى أن المتغيرات الجينية أو الطفرات المحددة قد تكون مرتبطة بالزيادة الملحوظة في التعبير الجيني وتطور الحالة المرضية.

تقدم الدراسة ايضا التي قارنت بين تسلسلات جين (دي كي كي3) من عينات مرضى الكلى المزمن والتسلسل الأصلي في NCBI رؤى حول التغيرات الجينية المحتملة المرتبطة بالمرض. تظهر النتائج طفرة حذف في الموضع 40945، مما قد يتسبب في فقدان المادة الوراثية. معظم الطفرات التي تم العثور عليها هي طفرات انتقالية (G → A)، والتي يمكن أن تؤثر على وظيفة البروتين اعتمادًا على موقعها داخل الجين

جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

قسم الكيمياء

دراسه كيموحيويه و جزيئيه لبروتين dickkopf-3 في المرضى المصابين بامراض الكليه المزمنه

هبة رافد كمال جميل الأعظمي

اطروحة دكتوراة

الكيمياء / الكيمياء الحياتية

بإشراف

الاستاذ الدكتورة ذكرى علي فتحي علوش

1446هـ

2024 م