



Evaluation of apoptotic effects of recombinant klotho protein on human colorectal cancer cells

Derya AKYILDIZ ÜSTÜNER ^{*1}, Sibel GÜNEŞ BAĞIŞ^{1,2,3}, Ayla EKER SARIBOYACI^{1,2,3}, Onur UYSAL^{1,2,3}, Tuğba SEMERCİ SEVİMLİ^{2,3}, Merve Nur SOYKAN^{2,3}

ORCID: 0000-0002-8511-946X; 0000-0003-0846-1170; 0000-0003-4536-9859; 0000-0001-6800-5607; 0000-0003-4856-2304; 0000-0003-1231-9791

¹ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Tıbbi Laboratuvar Teknikler Programı, Eskişehir, Türkiye

² Hücre Tedavi ve Kök Hücre Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi, ESTEM, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye

³ Kök Hücre Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, ESTEM, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye

Abstract

Colorectal cancer is the most common type of gastrointestinal cancer in the world. Klotho is an anti-aging glycosylated transmembrane protein that plays an important role in regulating phosphate and calcium homeostasis in the body and acts as a hormone. Klotho not only functions as a "suppressor of aging", but also regulates cell survival and proliferation and acts as a potential tumor suppressor that plays a role in cancer metastasis. Mutations in the gene expressing the klotho protein have been identified in the pathogenesis of various cancers, including lung, liver, breast, pancreatic, thyroid, ovarian, kidney, and colon cancer. In this study, recombinant klotho (r-klotho) protein, which plays an important role in cell proliferation, tumor migration and invasion, was detected in apoptosis-resistant human colorectal cancer cells (Caco-2) with different concentrations (0.075 µg/mL, 0.15 µg/mL, 0.3 µg/mL, 0.6 µg/mL, and 0.9 µg/mL) and hours (24 and 48 hours). It was aimed to investigate the possible cytotoxic and apoptotic effects on the healthy colon (CCD 841 CoN) and cancer cells of exogenous application by adding to the culture medium. For this purpose, in the present study, for the first time, colorectal cancer cells were treated with r-klotho. The in vitro viability effects of r-klotho on cancer and healthy cells were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and flow cytometry analyses of active caspase-3/7. Our findings revealed that r-klotho works as a tumor suppressor by suppressing cell proliferation and inducing cell apoptosis in human colorectal cancer cells. Consequently, klotho protein can be used as a potential antitumor agent for the development of new strategies in therapeutic interventions for colorectal cancer.

Keywords: colorectal cancer, recombinant klotho, cytotoxicity, caspase-3/7, apoptosis

----- * -----

Rekombinant klotho proteininin insan kolorektal kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi

Özet

Kolorektal kanser dünyada en sık görülen gastrointestinal kanser türüdür. Klotho, bedende fosfat ve kalsiyum homeostazının düzenlenmesinde önemli rol oynayan, hormon görevi de gören yaşlanma karşıtı glikozile edilmiş transmembran bir proteindir. Klotho sadece bir "yaşlanma baskılayıcı" olarak işlev görmez, aynı zamanda hücrenin hayatta kalmasını ve çoğalmasını da düzenler ve kanser metastazında rol oynayan potansiyel bir tümör baskılayıcı olarak görev yapar. Bu durum, kanser ve yaşlanmanın benzer moleküler özellikleri paylaştığı düşünüldüğünde, şartırtıcı değildir. Akciğer, karaciğer, meme, pankreas, tiroid, over, böbrek ve kolon kanseri de dahil çeşitli kanserlerin patogeneğinde, klotho proteinini eksprese eden gende, mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu çalışmada hücre

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902222393750; Fax.: +90222291677; E-mail: dustuner5@gmail.com

proliferasyonunda, tümör migrasyon ve invazyonunda önemli bir rol üstlenen rekombinant klotho (r-klotho) proteininin, apoptoza dirençli insan kolorektal kanser hücrelerine (Caco-2) farklı konsantrasyon (0,075µg/mL, 0,15µg/mL, 0,3µg/mL, 0,6µg/mL ve 0,9µg/mL) ve saatlerde (24 ve 48 saat) ekzojen olarak kültür besiyerine eklenerek uygulanmasının sağlıklı kolon (CCD 841 CoN) ve kanser hücreleri üzerindeki olası sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırmak amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak kolorektal kanser hücrelerinin r-klotho ile muamelesi gerçekleştirildi. R-klothonun kanser ve sağlıklı hücreler üzerindeki *in vitro* canlılığa etkileri 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) ve aktif kaspaz-3/7'nin flow sitometri analizleri ile değerlendirildi. Bulgularımız r-klothonun insan kolorektal kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu baskılamak ve hücre apoptozunu indüklemek yoluyla bir tümör baskılayıcı olarak çalıştığını ortaya koymuştur. Sonuç olarak klotho proteini, kolorektal kanser için terapötik girişimlerde yeni stratejilerin geliştirilebilmesi için, potansiyel antitümör bir ajan olarak kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: kolorektal kanser, rekombinant klotho, sitotoksisite, kaspaz-3/7, apoptoz

1. Giriş

Gastrointestinal sistemin kanserlerinden biri olan kolorektal kanser, erken dönemde belirti vermeyen, kadın ve erkeklerde yaygın olarak görülen bir kanser tipidir. Bu kanser türünün tedavisinde en çok tercih edilen tedavi seçeneği cerrahi yöntem olmakla birlikte radyoterapi ve kemoterapi de uygulanır. Günümüzde kolorektal kanser tedavisi için önemli ilerlemeler olmasına rağmen hastalığın moleküler mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu mekanizmaların araştırılması, yeni ve etkili terapötik ajanların geliştirilmesinde değerli bilgiler sunacaktır [1,2].

Kuro-o ve arkadaşları, ilk olarak 1997 yılında farelerle yaptıkları bir deneyde, klotho genini yaşlanma ile ilgili bir gen olarak tanımladılar ve bu genin sessizleştirilmesiyle, farelerin 8-9 hafta içerisinde öldüğünü tespit ettiler. Klotho geninde oluşan mutasyon sonucunda kısa ömür, infertilite, ateroskleroz, cilt atrofisi, osteoporoz ve amfizem gibi insanda yaşlanmaya benzer bir oluşum gözükülmektedir. Farelerde yapılan çalışmalarda 5. kromozomda yer alan klotho geninin normal işlevini yapamadığı durumlarda, bu fenotipik özelliklerin ortaya çıktığı belirlenmiştir [3,4].

Klotho proteini, 130 kDa ağırlığında transmembran bir beta glukuronidazdır. Farelerin 5. kromozomunda bulunan klotho geni, insanda fare ile homoloji gösteren 13. kromozom üzerinde yer almaktadır. İnsanda 13. kromozomun uzun kolunda yer alan alfa klotho geni 5 ekzon ve 4 introndan oluşur. Genin mRNA'larının alternatif işlenmesi sonucunda, zarda yer alan ve sekrete edilen olmak üzere iki farklı formda klotho proteini sentezlenir. Yapısal bir protein olan klotho zar proteini 1012 amino asitten oluşan tek geçişli bir zar proteinidir. Klothonun sekrete edilen formu kan, idrar ve serebrospinal sıvıda bulunur ve ağırlıklı olarak böbrek kıvrımlı tübüllerinde ve daha az ölçüde beyinde, üreme organlarında, endokrin bezlerde, idrar kesesinde, iskelet kası, plasenta ve kolonda eksprese edilir [5]. Sekrete edilen form 549 amino asitten oluşur. Bu protein; oksidatif stres, büyüme faktörü, reseptörler ve iyon kanallarının aktivitesini sağlayan humoral bir faktördür [6,7,8]. Yapısal zar proteini olan klotho ise, fibroblast büyüme faktörü 23'ün (FGF23) ko-reseptörü olarak görev yapar. Klotho aracılı FGF23 sinyalleşmesi hem fosfat hem de D vitamininin metabolizmasını kontrol edebilir [8,9].

Klotho genindeki mutasyonların pankreas [10,11,12], melanoma [13], akciğer [14,15], tiroid [16], servikal [17], meme [18,19], karaciğer [20,21], over [22], böbrek [23,24] ve kolon [25] kanseri gibi çeşitli kanserlerin patogeneğinde rol oynayan nedenlerden biri olduğu düşünülmektedir. Klotho geninin antitümör etkisini, başlıca hücre çoğalmasında görevli olan insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) [20,26,27], ekstrasellüler sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK) [20], Wnt/beta-katenin [28] ve PI3K/AKT [24] sinyal yolları üzerine etki ettiği belirlenmiştir [25]. Klothonun kolorektal kanser hücrelerinde IGF-1 aracılı PI3K/AKT yolağı üzerinden epitelyal mezenkimal geçişi, tümör migrasyonunu ve invazyonunu inhibe ederek önlediği gösterilmiştir [29].

Klotho proteinin salgılanmasındaki artışın, meme, akciğer ve servikal kanser hücre hatlarında hücre proliferasyonunu, motilitesini ve invazyonunu baskıladığı ve kanser hücrelerinin apoptozunu uyardığı belirlenmiştir [17,18,30,31]. Örneğin kemoterapiye dirençli insan akciğer kanser hücrelerinde klotho proteininin aşırı ekspresyonunun IGF-1/insülin yolağının fosforillenmesini sağladığı ve apoptozu artırdığı bildirilmiştir [30]. Yapılan başka bir çalışmada ise kemoterapiye dirençli insan akciğer kanser hücrelerinde klothonun aşırı ekspresyonunun, PI3K/Akt yolağını baskıladığı ve kanser büyümesini yavaşlattığı tespit edilmiştir [14]. Pankreas kanser hücrelerinde klotho proteinindeki ekspresyon artışının, IGF-I ve fibroblast büyüme faktörünün inaktivasyonuna neden olduğu ve kanser hücrelerinin çoğalmasını baskıladığını bildirilmiştir [10].

Genel olarak şu ana kadar yapılan çalışmaların, “klotho gen” ekspresyonunu artırarak kanser hücreleri üzerinde etkili ve hedefe yönelik tedavi protokolleri oluşturmayı hedeflediği gözlenmektedir. Bu çalışma protokollerinin bazılarında *in vitro* veya *in vivo* ekzojen klotho protein uygulanması, bazılarında da hücrenin kendi klotho geninin ekspresyonunu artırmaya yönelik stratejiler kullanılarak, bu genin fonksiyonunun çeşitli sinyal yolları üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Ancak rekombinant klotho proteininin kanser hücrelerinin kültür besiyerine ekzojen olarak eklendiği az sayıda çalışma bulunmaktadır [12,27,28,32]. Bu az sayıda çalışmada ise daha çok sinyal yolları üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada, çeşitli konsantrasyonlardaki rekombinant klotho proteini ekzojen olarak, insan kolorektal adenokarsinom kökenli kanser hücre hattının (Caco-2) kültür besiyerine eklenerek, kolorektal kanser hücrelerinin sitotoksisitesi ve apoptotik cevabı belirlenmiştir.

2. Materyal ve yöntem

Çalışmamızda, klothonun insan kolon adenokarsinom kökenli hücre hattı (Caco-2) üzerine etkisini değerlendirmek için; kanser hücrelerinin in vitro toksisite (MTT) analiz ve apoptozun belirteçlerinden aktif kaspaz 3/7 ile analiz edilmek üzere aşağıdaki deney grupları oluşturularak 3'er kez tekrarlandı.

1. Grup: Sağlıklı kolon hücreleri (CCD 841 CoN)
2. Grup: Kolon kanseri hücreleri (Caco-2)
3. Grup: r-klotho eklenmiş kolon kanser hücreleri (r-klotho+Caco-2)
4. Grup: r-klotho eklenmiş sağlıklı kolon hücreleri (r-klotho+CCD 841 CoN)

2.1. Hücrelerin temini, çözündürülmesi ve kültüre edilmesi

CCD 841 CoN (ATCC® CRL-1790™, sağlıklı kolon epitelyal hücre hattı) ve Caco-2 (ATCC® HTB-37™, insan kolorektal adenokarsinoma epitelyal hücre hattı), hücre hatları ATCC (Washington, DC, ABD) firmasından temin edildi.

Sağlıklı kolon hücreleri (CCD 841 CoN) ve kolorektal kanser hücreleri (Caco-2) DMEM (Dulbecco Modifiye Eagle's Medium; %1 stabil glutamin, %1 penisilin/streptomisin ve %10 fetal sıgır serumu) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) besiyeri içerisinde 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren inkübatörde hücreler tutununcaya kadar kültüre edildi.

2.2. Rekombinant klothonun in vitro sitotoksitesisi

İnsan rekombinant klotho (r-klotho) üretici firma tarafından temin edildi (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Almanya, katalog no: SRP3102-20UG). Üretici önerisi doğrultusunda 1 mL D-PBS içerisinde stok solüsyon hazırlandı ve kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı. R-klothonun Caco-2 ve CCD841 hücreleri için canlılık ve proliferasyon düzeylerine etkisinin değerlendirilmesinde MTT (Acros Organics B.V.B.A. Massachusetts, ABD) testi kullanıldı.

Caco-2 ve CCD841 CoN hücreleri 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Caco-2 ve CCD841 CoN hücreleri 0,075µg/mL, 0,15µg/mL, 0,3µg/mL, 0,6µg/mL ve 0,9µg/mL konsantrasyonlarında r-klotho ile 24 ve 48 saat boyunca inkübe edildi [12,27,28,32]. İnkübasyon sonunda 10µL/kuyucuk MTT solüsyonu eklendi. Hücreler daha sonra %5 CO₂ içeren nemli bir ortamda 37°C'de 3 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası oluşan kristallerinin çözünmesi için her bir kuyuya 100µl dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. Absorbans değerleri 570 nm'de monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda (BIOTEK ELx808IU, Vermont, ABD) tespit edildi.

2.3. Aktif kaspaz-3/7 flow sitometri analizi

Aktif kaspaz-3/7 analizi hücrelerde apoptotik cevabın belirlenmesi amacıyla yapıldı (Cell Meter™ live cell caspase-3/7 and fosfotidil serin belirleme kit, AAT Bioquest, California, ABD). Tüm deney gruplarındaki hücreler süspanse hale getirilerek sayıldı. Tüm gruplardan 2x10⁵ hücre %10 FBS içeren DMEM ile yıkandı. 1:150 oranında dilüe edilmiş TF3-DEVD-FMK ve propidyum iyodür 1:500 oranında seyreltilerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Devamında, hücreler 300xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve pellet alınarak üzerine 1 mL yıkama solüsyonu eklendi. Süspanse edilen hücreler tekrar 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Son olarak pellete 500 µL yıkama solüsyonu eklenerek FACSCalibur (BD Biosciences) cihazında okundu. Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi.

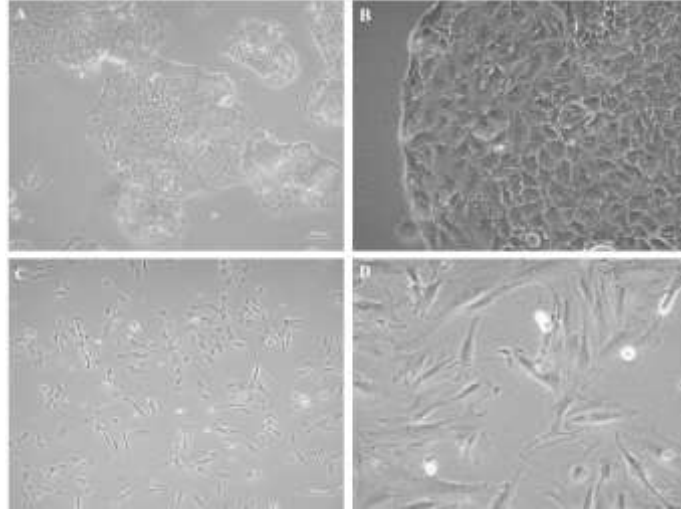
2.4. İstatistiksel analizler

Değişkenlere ait normalite testlerinde Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanılmıştır. Normal dağılım gösteren bağımsız değişkenlere Student's *t*-test uygulanmıştır. *p*<0.05 olasılık değerleri önemli olarak kabul edilmiştir. Tüm veri analizleri IBM SPSS Statistics 22 paket programları ile yapılmıştır. (*n* = 3, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

3. Bulgular

3.1. Caco-2 ve CCD841 CoN hücrelerinin kültürü

Hücreler faz-kontrast mikroskopunda günlük olarak incelenerek ekran görüntüleri alındı. Caco-2 hücrelerinin epitelyal karaktere sahip olduğu kaldırım taşı yapısındaki morfolojik görüntü belirlendi. CCD841 CoN hücrelerinin ise fibroblast karaktere sahip olduğu ve iğsi morfolojik yapıdaki görüntüsü görüntülendi (Şekil 1).



Şekil 1. Caco-2 ve CCD841 hücrelerinin faz-kontrast mikroskop altında morfolojik özellikleri (A-D). Caco-2 hücrelerinin kültürdeki erken ve ileri pasajlardaki görünüşleri. (A) 5. pasaj, 6. gün. (B) 4. pasaj, 5. gün. CCD841 CoN hücrelerinin kültürdeki erken ve ileri pasajlardaki görünüşleri. (C) 6. pasaj, 2. gün. (D) 4. pasaj, 6. gün. (Barlar: A-C 200μm, B-D 50μm)

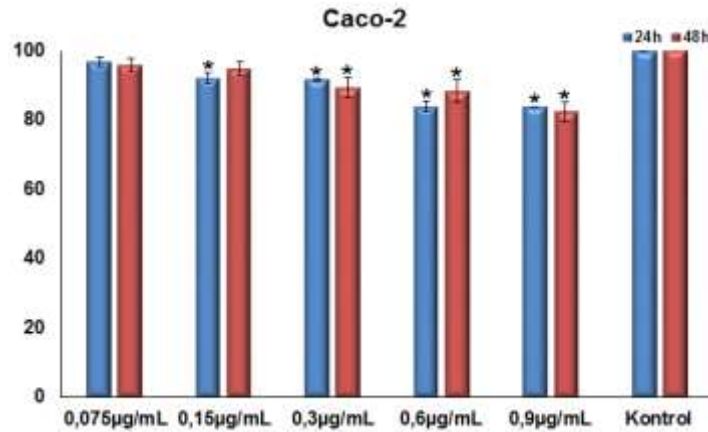
3.2. Klothonun MTT testi ile sitotoksik dozunun belirlenmesi

Caco-2 (kolorektal kanser hücreleri) ve CCD841 (sağlıklı kolon hücreleri) hücreleri, 24 ve 48 saat; 0,075μg/mL, 0,15μg/mL, 0,3μg/mL, 0,6μg/mL ve 0,9μg/mL dozlarında r-klotho ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda Caco-2 ve CCD841 CoN hücrelerinin canlılık değerleri (%) ve istatistiksel değerlendirmeleri Tablo 1.'de gösterilmiştir.

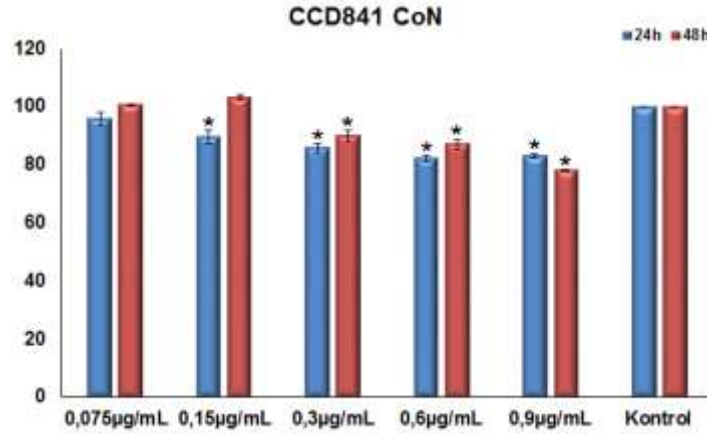
CCD841 CoN sağlıklı kolon ve Caco-2 kolorektal kanser hücrelerine r-klothonun uygulanan tüm dozlarında 24 ve 48 saat sonunda hücre canlılığının istatistiksel olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 2-3, Tablo 1).

Tablo 1. R-klotho ile inkübe edilen Caco-2 ve CCD841 CoN hücrelerinin 24 ve 48 saat sonunda canlılık değerleri üzerine etkisi (%)

Klotho (μg/mL)	Canlılık Değerleri (%)							
	Caco-2				CCD841 CoN			
	24 saat	p değeri	48 saat	p değeri	24 saat	p değeri	48 saat	p değeri
0,075	96,77	$p<0.05^*$	95,86	$p>0.05$	95,69	$p>0.05$	100,8	$p>0.05$
0,15	92,11	$p<0.05^*$	94,85	$p>0.05$	89,67	$p<0.05^*$	103,4	$p<0.05^*$
0,3	91,64	$p<0.05^*$	89,40	$p<0.05^*$	85,79	$p<0.05^*$	89,92	$p<0.05^*$
0,6	84,02	$p<0.05^*$	88,43	$p<0.05^*$	82,36	$p<0.05^*$	87,01	$p<0.05^*$
0,9	83,81	$p<0.05^*$	82,46	$p<0.05^*$	82,98	$p<0.05^*$	78,12	$p<0.05^*$
Kontrol	100	-	100	-	100	-	100	-



Şekil 2. Caco-2 hücrelerine 0,075μg/mL, 0,15μg/mL, 0,3μg/mL, 0,6μg/mL ve 0,9μg/mL dozlarında uygulanan r-klothonun 24 ve 48 saat sonunda hücrelerdeki canlılığa etkisinin MTT analizi ile belirlenmesi (n=3, * $p<0.05$)

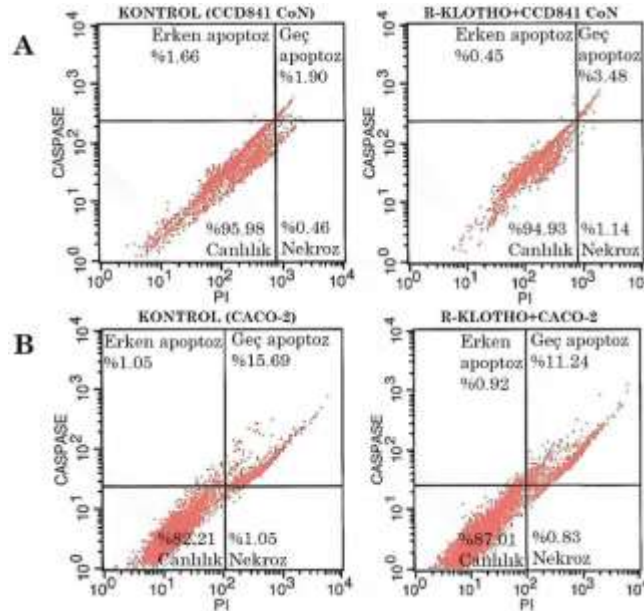


Şekil 3. CCD841 CoN hücrelerine 0,075µg/mL, 0,15µg/mL, 0,3µg/mL, 0,6µg/mL ve 0,9µg/mL dozlarında uygulanan r-klothonun 24 ve 48 saat sonunda hücrelerdeki canlılığa etkisinin MTT analizi ile belirlenmesi (n=3, *p<0.05)

3.3. Klothonun CCD841 CoN ve Caco-2 hücrelerinde 24 ve 48 saatteki etkisinin flow sitometri analizi

Rekombinant klothonun 24 ve 48 saatteki etkisinin sağlıklı CCD841 CoN kolon hücre hattında değerlendirildiği aktif kaspaz-3/7 flow sitometri analizimizde kontrol grubundaki hücre canlılığının %95.98, erken apoptozun %1.66, geç apoptozun %1.90 ve nekrozun %0.46 olduğu tespit edildi. Bu hücrelere 0,3 µg/mL r-klotho uygulanan grupta 24 saat sonunda hücre canlılığının %94.93, erken apoptozun %0.45, geç apoptozun %3.48 ve nekrozun %1.14 olduğu görüldü (Şekil 4A).

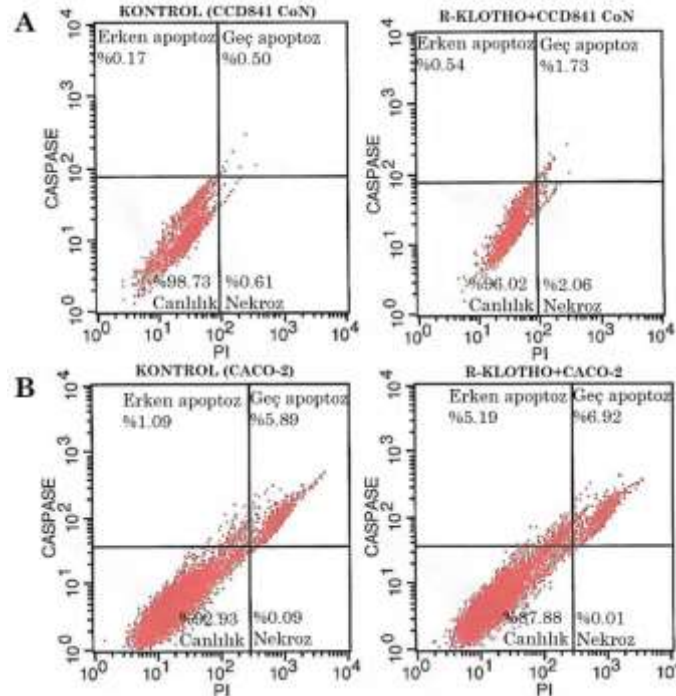
Kolorektal kanser hücrelerinde (Caco-2) kontrol grubundaki hücre canlılığı %82.21 iken, erken apoptoz %1.05, geç apoptoz %15.69 ve nekroz %1.05 idi. 0,3 µg/mL r-klothonun uygulandığı grupta 24 saat sonunda hücre canlılığının %87.01, erken apoptozun %0.92, geç apoptozun %11.24 ve nekrozun %0.83 olduğu tespit edildi (Şekil 4B).



Şekil 4. CCD841 CoN ve Caco-2 hücre hatlarına 0,3 µg/mL r-klotho eklenmesinin 24 saat sonunda kaspaz 3/7 aktivasyonuna etkisi. (A) CCD841 CoN hücreleri. (B) Caco-2 hücreleri

Sağlıklı kolon hücre hattında (CCD841 CoN) kontrol grubunda canlılık %98.73, erken apoptoz %0.17, geç apoptoz %0.50 ve nekroz %0.61'di. 0,3 µg/mL r-klotho uygulamasından 48 saat sonra hücre canlılığı %96.02, erken apoptoz %0.54, geç apoptoz %1.73 ve nekroz miktarı ise %2.06 olarak tespit edildi (Şekil 5A).

Kolorektal kanser hücrelerinde (Caco-2) kontrol grubunda canlılık %92.93 iken, erken apoptoz %1.09, geç apoptoz %5.89 ve nekroz %0.09 oranındaydı. 0,3µg/mL r-klotho uygulamasından 48 saat sonra ise hücre canlılığının %87.88, erken apoptozun %5.19, geç apoptozun %6.92 ve nekrozun %0.01 olduğu görüldü (Şekil 5B).



Şekil 5. Klothonun sağlıklı CCD841 CoN ve Caco-2 hücrelerinde 48 saat sonunda kaspaz3/7 aktivasyonuna etkisi. (A) CCD841 CoN hücreleri. (B) Caco-2 hücreleri

4. Sonuçlar ve Tartışma

Klotho birçok biyolojik süreçte yer alan tümör baskılayıcı, yaşlanma ve inflamasyona karşı koruyucu olan transmembran bir proteindir. Bu protein oksidatif stres, reseptörler, büyüme faktörleri ve iyon kanalları gibi hücre içi birçok metabolik olayın düzenlenmesinde etkilidir. Klothonun; Ca^{+2}/P homeostazı, insulin benzeri büyüme faktörü-1'in regülasyonu, forkhead box O (FOXO) transkripsiyon faktörleri üzerinden oksidatif stresin azaltılması, endotel kaynaklı nitrik oksit sentezinin indüksiyonu yoluyla endotelin korunması, tümör nekroz faktörü (TNF)- α kaynaklı nükleer faktör (NF)- κ B aktivitesinin inhibisyonu ve endotel adezyon moleküllerinin ekspresyonunun düzenlenmesi gibi pek çok işlevi bilinmektedir. Ayrıca p53/p21, cAMP, protein kinaz C ve Wnt sinyalleme de dahil olmak üzere hücre içi sinyal mekanizmalarına katılma gibi pek çok fizyolojik fonksiyonu belirlenmiştir. İnsanlarda, 40 yaşından sonra serum klotho düzeyleri azalır. Klotho düzeylerindeki bu azalma hipertansiyon, böbrek fonksiyon bozukluğu ve kanser gibi yaşlanma ile ilişkili çeşitli hastalıklarda gözlenebilir. Son kanıtlar, klothonun insulin ve Wnt sinyal yollarını baskıladığını, oksidatif stresi inhibe ettiğini, fosfatase ve kalsiyum emilimini düzenlediğini göstermektedir. Yapılan güncel çalışmalarda, klotho proteinindeki azalmanın sadece yaşlanmaya değil, aynı zamanda kanser oluşumuna da neden olduğu belirlenmiştir [3,5,6,7,8,25].

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde kolorektal kanser, sıklığı giderek artan, tüm dünyada kadınlarda 2 ve erkeklerde 3. en sık görülen gastrointestinal sistemin kanserlerinden biridir [2]. Metastaz ve cerrahi müdahale sonrası hastalığın tekrarı, kolorektal kanserin kötü prognozunu ana nedenlerindedir. Tedavisi için önemli ilerlemeler olmasına rağmen moleküler mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır ve bu nedenle hastaların mortalite oranı tüm dünyada yüksektir. Bu mekanizmaların araştırılması, yeni ve etkili terapötik ajanların geliştirilmesinde değerli bilgiler sunacaktır. Kolorektal kanserin etiolojisinde, mutasyon veya benzeri genetik değişikliklerin birikimi sonucu dokulardaki çoğalmayı kontrol eden mekanizmalardaki fonksiyon bozuklukları yer almaktadır. Günümüzde moleküler çalışmaların ilerlemesiyle birlikte birçok araştırmada kolorektal kanser gelişiminin çoklu genler ve proteinlerdeki mutasyonlarla ilişkili olduğu bulunmuştur Apoptoz, hücrelerin kontrollü olarak ölüm veya sağ kalımını etkileyen önemli bir mekanizma olup, kanser ve benzeri hastalıkların gelişiminin engellenmesinde önemli role sahiptir. Programlanmış hücre ölümüyle ilgili sinyal yollarındaki kusurlar, kontrolsüz hücre çoğalmasına ve sonunda kansere yol açabilir. Birkaç kanser tipinde kemoterapiye olan kanser direncinin üstesinden gelmeye yönelik tedavi protokolü olarak anti-apoptotik süreci destekleyen rekombinant proteinler ile kemoterapiye duyarlılığın artırılmasını hedefleyen hibrit yaklaşımlar hem deneysel modellerde hem de erken klinik çalışmalarda olumlu gelişmeler gözlemlenmiştir [1,25].

Klotho, normal hücrelerde apoptotik hücre ölümünü baskılayarak, kanser hücre apoptozunun bir indükleyicisi olarak görev yapar. Yapılan çalışmalarda, kanserli dokulardaki klotho geninin ekspresyonunda diğer dokulara kıyasla azalma olduğu tespit edilmiştir ve bu ekspresyon kaybının malign oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir. Klothonun ektopik ekspresyonu, hücre apoptozunun indüksiyonu ve S-fazı hücre döngüsü durması yoluyla kolon kanseri hücre hatlarının hücre proliferasyonunun inhibisyonuna yol açar. Yapılan çalışmalarda sağlıklı kolon dokusuna kıyasla kolorektal kanser dokusundaki hücrelerde klothonun hücre sitoplazmasında belirgin bir şekilde azaldığı, tümör

invazyonuyla negatif yönde ilişki olduğu bulunmuştur. Klothonun promotör hipermetilasyon yoluyla inaktive olduğunu ve potansiyel olarak kolon kanserinde bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev görebileceğini bildirilmiştir. Araştırmaların sonuçları klotho geninin bir tümör baskılayıcı olarak potansiyel rolünün yanı sıra, malignitelerin erken tespitine yardımcı olma potansiyeline sahip prognostik bir tümör biyobelirteci olduğunu göstermektedir [25]. Ek olarak, klotho aşırı ekspresyonu genellikle kanser hücresi canlılığının azalmasına yol açar ve çözünür klotho ile tedavi, mide, pankreas, kolon ve meme kanserleri dahil olmak üzere preklonik kanser modellerinde tümör hacminin azalmasına neden olur [25,29]. Flow sitometri analizlerimiz daha önce yapılan çalışmalarını desteklemektedir. Nitekim hücre canlılığı ve apoptoz üzerine en çok etkisini gördüğümüz 0,3 µg/mL r-klothonun uygulandığı sağlıklı kolon hücre hattı grubunda, 24 saat sonunda, sağlıklı hücrelerin apoptozunun baskılandığı kanser hücrelerinin canlılığının azaldığı tespit edilmiştir. 48 saat sonunda kolorektal kanser hücrelerinde hücre canlılığı kontrol grubuna göre ileri derecede anlamlı oranda azalırken apoptoz artmıştır.

Klotho, kolorektal kanser dokusunda ve hücre hatlarında kısmen veya tamamen susturulmuş durumdadır [25]. HT29, HCT116, DLD1, LS180, SW620, SW480 ve Colo-320 kolorektal kanser hücreleri ile yapılan *in vitro* çalışmalarda klotho tedavisinin, kanser hücrelerinde proliferasyonu önemli ölçüde azalttığı ve apoptoza neden olduğu ortaya konmuştur. MO3.13, HepG2, SMMC-7721, LY1 ve LY8 kanser hücrelerinde ise klothonun kanser hücrelerinin canlılığını ve proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir [12,25,27,28,32,33]. Çalışmamızda, Caco-2 kolorektal kanser hücrelerinde ve CCD841 CoN sağlıklı kolon hücrelerinde klotho ile çeşitli dozlarla tedavi sonrasında, hücre canlılığının 48 saatte azaldığı bulundu. Sağlıklı kolon hücreleri ve kolorektal kanser hücreleri karşılaştırıldığında benzer şekilde hücre canlılığında azalışın olduğu görülmektedir.

Klotho başlangıçta yaşlanma karşıtı bir protein olarak keşfedildi. Ancak o zamandan beri kanser biyolojisindeki potansiyel terapötik rolü nedeniyle büyük ilgi gördü. Bu durum, kanser ve yaşlanmanın benzer moleküler özellikleri paylaştığı düşünüldüğünde belki de şaşırtıcı değildir. Normal ve tümör dokularını karşılaştıran çalışmalarda klothonun aşağı regülasyonunun kanser gelişimi ve hasta sonuçlarının kötüleşmesi ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır. Klothonun kolon kanser hücre hatlarının %83,3'ünde ve birincil kolorektal kanser dokularının %85'inde promotör metilasyonu yoluyla aşağı regüle edildiği gösterilmiştir [25]. Klothonun bir tümör baskılayıcı olarak potansiyel rolünün yanı sıra malignitelerin erken tespitine yardımcı olma potansiyeline de sahip bir prognostik tümör biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. Klothonun epigenetik değişiminin, kanser gelişimi ve kanserin prognozu üzerindeki etkisi hala güncelliğini korumaktadır.

Klotho proteininin biyolojisinin hala tam olarak anlaşılabilmesi terapötik müdahaleleri sınırlamaktadır. Yirmi beş yılı aşkın bir süre önce keşfedilmesinden bu yana klothoya olan büyük ilgiye rağmen, çeşitli nedenlerle hiçbir klotho tabanlı tedavi klinik faz denemelerine ulaşmamıştır. Bu çalışmada apoptoza dirençli kolorektal kanser hücre hattında, rekombinant klotho proteininin kanser hücrelerinin canlılığını azalttığı ve apoptozunu artırdığını gösterilmiştir. Buna göre r-klothonun apoptoza ve kemoterapötik ilaçlara karşı oldukça dirençli olan insan kolorektal kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu baskılamak ve hücre apoptozunu indüklemek yoluyla bir tümör baskılayıcı olarak çalıştığı sonucuna varılmıştır. Ancak klotho proteininin, anti-proliferatif ve apoptotik etkisini hangi mekanizma ile gerçekleştiriyor olduğu hakkında daha ileri moleküler çalışmalarla analiz edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Sonuç olarak rekombinant klotho proteini, kolorektal kansere yönelik tedavi protokollerinde uygulanabilir ancak daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelerinden (ESOGU-BAP, PN:202046043) sağlanan hibelerle desteklenmiştir.

Kaynaklar

- [1] Zhang, X., Shi, H., Tang, H., Fang, Z., Wang, J., & Cui, S. (2015). miR-218 inhibits the invasion and migration of colon cancer cells by targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *International journal of molecular medicine*, 35(5), 1301-1308.
- [2] Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1), 7-30.
- [3] Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., ... & Nabeshima, Y. I. (1997). Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *nature*, 390(6655), 45-51.
- [4] Kuro-o, M. (2018). Molecular mechanisms underlying accelerated aging by defects in the FGF23-klotho system. *International journal of nephrology*, 2018.
- [5] Matsumura, Y., Aizawa, H., Shiraki-Iida, T., Nagai, R., Kuro-o, M., & Nabeshima, Y. I. (1998). Identification of the humanklothogene and its two transcripts encoding membrane and secretedklothoprotein. *Biochemical and biophysical research communications*, 242(3), 626-630.
- [6] Yamamoto, M., Clark, J. D., Pastor, J. V., Gurnani, P., Nandi, A., Kurosu, H., ... & Kuro-o, M. (2005). Regulation of Oxidative Stress by the Anti-aging Hormone Klotho*♦. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 38029-38034.

- [7] Kuro-o, M. (2008). Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence.
- [8] Klotho, K. O. M. (2010). Pflugers archives. *European Journal of Physiology*, 459, 333-343.
- [9] Urakawa, I., Yamazaki, Y., Shimada, T., Iijima, K., Hasegawa, H., Okawa, K., ... & Yamashita, T. (2006). Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*, 444(7120), 770-774.
- [10] Abramovitz, L., Rubinek, T., Ligumsky, H., Bose, S., Barshack, I., Avivi, C., ... & Wolf, I. (2011). KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(13), 4254-4266.
- [11] Jiang, B., Gu, Y., & Chen, Y. (2014). Identification of novel predictive markers for the prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Investigation*, 32(6), 218-225.
- [12] Chen, C. D., Li, H., Liang, J., Hixson, K., Zeldich, E., & Abraham, C. R. (2015). The anti-aging and tumor suppressor protein Klotho enhances differentiation of a human oligodendrocytic hybrid cell line. *Journal of Molecular Neuroscience*, 55(1), 76-90.
- [13] Camilli, T. C., Xu, M., O'Connell, M. P., Chien, B., Frank, B. P., Subaran, S., ... & Weeraratna, A. T. (2011). Loss of Klotho during melanoma progression leads to increased filamin cleavage, increased Wnt5A expression, and enhanced melanoma cell motility. *Pigment cell & melanoma research*, 24(1), 175-186.
- [14] Wang, Y., Chen, L., Huang, G., He, D., He, J., Xu, W., ... & Wu, J. (2013). Klotho sensitizes human lung cancer cell line to cisplatin via PI3k/Akt pathway. *PloS one*, 8(2), e57391.
- [15] Ibi, T., Usuda, J., Inoue, T., Sato, A., & Takegahara, K. (2017). Klotho expression is correlated to molecules associated with epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinoma. *Oncology letters*, 14(5), 5526-5532.
- [16] Dai, X., Zhang, J., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M. E., Alharbi, S. A., ... & Sethi, G. (2015). Targeting TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor by natural products as a potential therapeutic approach for cancer therapy. *Experimental Biology and Medicine*, 240(6), 760-773.
- [17] Lee, J., Jeong, D. J., Kim, J., Lee, S., Park, J. H., Chang, B., ... & Lee, M. S. (2010). The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Molecular cancer*, 9(1), 1-10.
- [18] Wolf, I., Levanon-Cohen, S., Bose, S., Ligumsky, H., Sredni, B., Kanety, H., ... & Rubinek, T. (2008). Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene*, 27(56), 7094-7105.
- [19] Rubinek, T., Shulman, M., Israeli, S., Bose, S., Avraham, A., Zundeleovich, A., ... & Wolf, I. (2012). Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 133(2), 649-657.
- [20] Shu, G., Xie, B., Ren, F., Liu, D. C., Zhou, J., Li, Q., ... & Zhou, J. (2013). Restoration of klotho expression induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Cellular oncology*, 36(2), 121-129.
- [21] Xie, B., Zhou, J., Yuan, L., Ren, F., Liu, D. C., Li, Q., & Shu, G. (2013). Epigenetic silencing of Klotho expression correlates with poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Human pathology*, 44(5), 795-801.
- [22] Lojkin, I., Rubinek, T., Orsulic, S., Schwarzmann, O., Karlan, B. Y., Bose, S., & Wolf, I. (2015). Reduced expression and growth inhibitory activity of the aging suppressor klotho in epithelial ovarian cancer. *Cancer letters*, 362(2), 149-157.
- [23] Turan, K., & Ata, P. (2011). Effects of intra-and extracellular factors on anti-aging klotho gene expression.
- [24] Zhu, Y., Xu, L., Zhang, J., Xu, W., Liu, Y., Yin, H., ... & Lin, Z. (2013). K lotho suppresses tumor progression via inhibiting PI 3 K/A kt/GSK 3β/Snail signaling in renal cell carcinoma. *Cancer science*, 104(6), 663-671.
- [25] Pan, J., Zhong, J., Gan, L. H., Chen, S. J., Jin, H. C., Wang, X., & Wang, L. J. (2011). Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Tumor Biology*, 32(4), 729-735.
- [26] Xie, B., Chen, J., Liu, B., & Zhan, J. (2013). Klotho acts as a tumor suppressor in cancers. *Pathology & Oncology Research*, 19(4), 611-617.
- [27] Zhou, X., Fang, X., Jiang, Y., Geng, L., Li, X., Li, Y., ... & Wang, X. (2017). Klotho, an anti-aging gene, acts as a tumor suppressor and inhibitor of IGF-1R signaling in diffuse large B cell lymphoma. *Journal of hematology & oncology*, 10(1), 1-11.
- [28] Tang, X., Wang, Y., Fan, Z., Ji, G., Wang, M., Lin, J., ... & Meltzer, S. J. (2016). Klotho: a tumor suppressor and modulator of the Wnt/β-catenin pathway in human hepatocellular carcinoma. *Laboratory investigation*, 96(2), 197-205.
- [29] Li, X. X., Huang, L. Y., Peng, J. J., Liang, L., Shi, D. B., Zheng, H. T., & Cai, S. J. (2014). Klotho suppresses growth and invasion of colon cancer cells through inhibition of IGF1R-mediated PI3K/AKT pathway. *International journal of oncology*, 45(2), 611-618.
- [30] Chen, B., Wang, X., Zhao, W., & Wu, J. (2010). Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29(1), 1-7.

- [31] Doi, S., Zou, Y., Togao, O., Pastor, J. V., John, G. B., Wang, L., ... & Kuro-o, M. (2011). Klotho inhibits transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 8655-8665.
- [32] Sun, H., Gao, Y., Lu, K., Zhao, G., Li, X., Li, Z., & Chang, H. (2015). Overexpression of Klotho suppresses liver cancer progression and induces cell apoptosis by negatively regulating wnt/ β -catenin signaling pathway. *World journal of surgical oncology*, 13(1), 1-8.
- [33] Soyocak, A., & Koc, G. (2020). Effect of black grape extract on MMP-9 gene expression in breast cancer cells. *Biological Diversity and Conservation*, 13, 194-199.