



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

**KLOTHO GENİ TRANSFEKTE EDİLMİŞ KOLON KANSER
HÜCRELERİNDE CANLILIK VE PROLİFERASYONUN
BELİRLENMESİ**

MERVE NUR SOYKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DR.ÖĞR. ÜYESİ SİBEL GÜNEŞ

Eskişehir

2021



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

**KLOTHO GENİ TRANSFEKTE EDİLMİŞ KOLON KANSER
HÜCRELERİNDE CANLILIK VE PROLİFERASYONUN
BELİRLENMESİ**

MERVE NUR SOYKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
DR.ÖĞR. ÜYESİ SİBEL GÜNEŞ

Eskişehir
2021
Proje No: ESOGÜ-BAP 2019-3031

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana yol gösteren, insani ve ahlaki değerleri ile örnek olan, tecrübelerini paylaşırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli Hocam Dr. Öğr. Üyesi Sibel GÜNEŞ'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan değerli Hocalarım Doç Dr. Ayla EKER SARIBOYACI, Dr. Öğr. Üyesi Onur UYSAL ve Öğr. Gör. Dr. Tuğba SEVİMLİ SEMERCİ'ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Uz. Mol. Biy. Ceren ÖZEL, Uzm. Biy. Bahar DEMİR ve Haya ERYBEH'e teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca manevi ve maddi destekleri esirgemeyen Annem Nurcan SOYKAN, Babam İsmail SOYKAN ve Ablam Zeynep SOYKAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Merve Nur SOYKAN

Eskişehir, 2021

ÖZET

Klotho Geni Transfekte Edilmiş Kolon Kanser Hücrelerinde Canlılık ve Proliferasyonun Belirlenmesi

Klotho geni birçok biyolojik süreçte yer alan anti-aging, anti-inflamatuvar ve anti-tümör özellikleri olan humoral bir faktördür. Klotho geninin ifadesindeki azalma, kolon kanseri de dahil olmak üzere çoğu kanser tipinde malign oluşumlara neden olur. Klothonun antitümör etkisi, kanser hücrelerinde malign oluşuma neden olan sinyal yollarını inhibe etmesinden kaynaklanır. Tümör nekroz faktörüne bağlı apoptozu indükleyen ligand (TRAIL), kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen tümör nekroz faktör (TNF) sitokin süper ailesinin bir üyesidir. İnsan tümörlerinin %60 gibi önemli bir oranı TRAIL'e karşı direnç gösterir. TRAIL, kanser tedavisinde kemoterapötik toksisiteye neden olmadan kanser hücrelerinin proliferasyonunu azaltarak apoptozu indükler. TRAIL, ölüm reseptörleri olan DR4 ve DR5 ile etkileşime girerek apoptotik etki gösterir.

Bu çalışmadaki amaç, TRAIL dirençli insan adenokarsinom kolon kanseri hücrelerinde (Caco-2), apoptoz indükleyicisi olduğu bilinen klotho geninin ekspresyonunu değiştirerek (gen aktivasyonu ve knock-out), bu ekspresyon değişimlerinin kanser hücrelerindeki TRAIL aracılı apoptotik duyarlılığa etkisinin olup olmadığını araştırmaktır. Böylece klotho geninin önemli fonksiyonlarından biri olan apoptotik sürecin, ilk kez TRAIL ölüm reseptörleri (DR4, DR5, DcR1 ve DcR2) üzerinden analiz edilmesi sağlandı. Bu amaçla öncelikle klotho geni CRISPR/Cas9 tekniği ile Caco-2 hücrelerinde klotho geni aktifleştirildi ve knock-out edildi. Klotho geninde yapılan bu ekspresyon değişikliklerinin kanser hücrelerindeki etkisi; annexinV/PI flow sitometri, WST-8, qRT-PCR, invazyon, koloni oluşturma potansiyeli ve immunohistokimyasal analizler ile değerlendirildi.

Sonuçlarımızda Caco-2 hücrelerinde klotho gen ekspresyon artışının hücrelerin proliferasyon, invazyon ve koloni oluşturma potansiyelini baskıladığı ve kaspaz aktivitesini artırdığı görüldü. Bu etkinin gen aktivasyonuna bağlı olup olmadığı ise genin knock-out edilmesiyle test edildi. Bulgularımız klotho gen aktivasyonunun apoptoza dirençli kanser hücresinde antitümör etkiye sahip olduğunu gösterdi.

Çalışmamızda ile elde edilen ilk verilerin in vivo çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği, klothonun kolon kanser tedavisinde güçlü bir belirteç olabileceği ve temel kanser çalışmaları için önemli bir alt yapı hazırlayacağı görüşündeyiz.

Anahtar Kelimeler: Kolon kanseri, klotho, TRAIL reseptörleri, antitümör etki, CRISPR-Cas9.



SUMMARY

Determination of Viability and Proliferation in Klotho Gene Transfected Colon Cancer Cells

The klotho gene is a humoral factor with anti-aging, antiinflammatory and antitumor properties, which is involved in many biological processes. Decreased expression of the klotho gene causes malignant formations in most types of cancer, including colon cancer. Klotho's antitumor effect is due to the inhibition of signalling pathways that cause malignant formation in cancer cells. Tumor necrosis factor-induced apoptosis inducing ligand (TRAIL) is a member of the TNF cytokine superfamily that induces apoptosis in cancer cells. A significant 60% of human tumors show resistance to TRAIL. TRAIL induces apoptosis in cancer treatment by reducing the proliferation of cancer cells without causing chemotherapeutic toxicity. TRAIL interacts with the death receptors DR4 and DR5 and demonstrate an apoptotic effect.

The aim of this study was to investigate whether these expression changes have an effect on TRAIL-mediated apoptotic sensitivity in cancer cells by altering (overexpression and knock-out) the expression of the klotho gene, which is an apoptosis inducer, in TRAIL-resistant human adenocarcinoma colon cancer cells (Caco-2). Thus, the apoptotic process, one of the important functions of the klotho gene, was analysed for the first time on TRAIL death receptors (DR4, DR5, DcR1 and DcR2). For that purpose, the klotho gene was firstly klotho gene activation and knock-out on Caco-2 cells using the CRISPR/Cas9 technique. The effect of these expression changes in the klotho gene on cancer cells; annexin V/PI flow cytometry, WST-8, qRT-PCR, invasion and colony-forming potential and immunohistochemical analysis.

In our results, it was seen that the increase in klotho gene expression in Caco-2 cells inhibited the proliferation, invasion and colony forming potential of the cells and increased the caspase activity. It was determined that the decrease in klotho gene expression had no effect on the viability of Caco-2 cells. These results show that klotho gene activation has an antitumor effect in cancer cells resistant to apoptosis. We are of the opinion that the first data obtained with this study should be supported by in

vivo studies and that klotho will be an important basis for basic cancer studies in order to be a strong marker in the treatment of colon cancer.

Keywords: Colon cancer, klotho, TRAIL receptors, antitumor effect, CRISPR-Cas9.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TABLO DİZİNİ	viii
ŞEKİL DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Kolorektal kanser	4
2.2. Klotho'nun Keşfi	6
2.2.1. Klotho geninin moleküler özellikleri	6
2.2.2. Klothonun kanser ve sinyal yolları ile ilişkisi	8
2.3. Tümör Nekroz Faktörü ile İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand.....	12
2.3.1. TRAIL reseptörler sistemi	13
2.3.2. TRAIL sinyal yolu	14
2.4. Gen Düzenleme: CRISPR/CAS9	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
3.2. Kullanılan Cihazlar	21
3.3. Yöntemlerin Uygulanması	22
3.3.1. Deney grupları	22
3.3.2. Hücrelerin temini, çözdürülmesi ve kültüre edilmesi	22
3.3.2.1. Hücrelerin temini	22
3.3.2.2. Hücrelerinin çözümlenmesi ve kültürü	22
3.3.3. CRISPR/Cas9 genomik düzenlemeyle Caco-2 hücrelerinde klotho genin aktivasyonu ve silinmesi (knock-out)	23
3.3.3.1. CRISPR/Cas9 genomik düzenlemeyle Caco-2 hücrelerinde klotho geninin aktivasyonu	23
3.3.3.2. CRISPR/Cas9 genomik düzenlemeyle Caco-2 hücrelerinde klotho geninin silinmesi (knock-out)	25
3.3.4. CRISPR/Cas9 genomik düzenlemeyle Caco-2 hücrelerinde apoptozun ve ölüm reseptörlerinin değerlendirilmesi	26
3.3.4.1. qRT-PCR yöntemi ile mRNA düzeyinde gen ekspresyon analizi	26
3.3.4.2. WST-8 testi ile canlılık ve proliferasyon analizi	28
3.3.4.3. Annexin V/PI flow sitometri analizi ile apoptozun belirlenmesi	29
3.3.4.4. Flow sitometri analizi ile TRAIL reseptörlerinin belirlenmesi	29

3.3.4.5. İmmünohistokimyasal (İHK) analizler	29
3.3.4.6. İnvazyon analizi	30
3.3.4.7. Koloni oluşturma potansiyelinin analizi	30
3.4. İstatistiksel Analizler	31
4. BULGULAR	32
4.1. Caco-2 ve CCD841 CoN Hücrelerinin Kültürü	32
4.2. CRISPR/Cas9 Genomik Düzenlemeyle Caco-2 Hücrelerinde Klotho Geninin Aktivasyonu ve Silinmesinin (Knock-out) Karakterizasyonu	32
4.2.1. qRT-PCR analizi	34
4.3. Caco-2 Hücrelerinde Klotho Geninin Aktivasyonu ve Knock-Out Edilmesi İle Apoptozun Belirlenmesi	34
4.3.1. qRT-PCR analizi	34
4.3.2. WST-8 testi	35
4.3.3. Annexin V/PI flow sitometri analizi	37
4.3.4. İmmünohistokimya analizi	39
4.3.5. İnvazyon analizi	41
4.3.6. Koloni oluşturma potansiyeli analizi	43
4.4 Caco-2 Hücrelerine Klotho Geninin Aktivasyonu ve Knock-Out Yapılmasının TRAIL Reseptörlerine Etkisi	45
4.4.1. Flow sitometri analizi	45
4.4.2. qRT-PCR analizi	46
4.4.3. İmmünohistokimya analizi	47
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR DİZİNİ	56
ÖZGEÇMİŞ	71

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. Hücrelerin kültüründe kullanılan besiyeri içeriği	23
Tablo 3.2. Real Time PCR analizi için sense ve antisense primerler	28



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kolorektal polipten kansere geçiş	4
Şekil 2.2. İnsan klotho geni	7
Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin klotho ile ilişkili sinyal yolları	10
Şekil 2.4. Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) reseptörleri	14
Şekil 2.5. TRAIL sinyal yolu	16
Şekil 2.6. CRISPR-cas sistemi	18
Şekil 3.1. Klotho CRISPR aktivasyon plazmidi	24
Şekil 3.2. Klotho CRISPR/Cas9 KO plazmidi	25
Şekil 3.3. Klotho HDR plazmidi	25
Şekil 4.1. Kültürdeki Caco-2 ve CCD841 CoN hücrelerinin morfolojik özellikleri	32
Şekil 4.2. Caco-2 hücrelerine; klotho ekspresyon vektörü, kontrol ekspresyon vektörü knock-out kontrol vektörü ve knock-out klotho vektörü transfekte edildikten sonraki faz-kontrast ve floresans mikroskoptaki görüntüleri	33
Şekil 4.3. Tüm gruplardaki klotho geninin hücre içi gen ekspresyon değişimi	34
Şekil 4.4. Kaspaz 3, kaspaz 8, bcl-2, bid, bax ve bad genleri tüm gruplardaki hücrelere göre hücre içi gen ekspresyon değişimi ...	35
Şekil 4.5. Caco-2 hücrelerine klotho ekspresyon vektörü ve kontrol ekspresyon vektörü ile transfeksiyonundan 24, 48 ve 72 saat sonra hücrelerin canlılık sonuçları.....	36
Şekil 4.6. Caco-2 hücrelerine klotho knock-out vektörü ve kontrol knock- out vektörü ile transfeksiyonundan 24, 48 ve 72 saat sonra hücrelerin canlılık sonuçları.....	37
Şekil 4.7. Caco-2 hücrelerine transfeksiyondan 48 saat sonra klotho gen ekspresyonundaki değişimin apoptotik etkisinin Annexin V/PI flow sitometri yöntemi ile analizi	38

Şekil 4.8. Caco-2 hücrelerine transfeksiyondan 72 saat sonra klotho gen ekspresyonundaki değişimin apoptotik etkisinin Annexin V/PI flow sitometri yöntemi ile analizi	39
Şekil 4.9. Caco-2 hücrelerinde klotho geninin aktivasyonu ve knock-out edilmesi sonucunda kaspaz 3 aktivitesini gösteren hücreler	40
Şekil 4.10. Caco-2 hücrelerinde klotho geninin aktivasyonu ve knock-out edilmesi sonucu kaspaz 8 aktivitesini gösteren hücreler	41
Şekil 4.11. Sağlıklı kolon hücreleri, kolon kanser hücreleri ve klotho ekspresyonu değiştirilen kolon kanser hücrelerinde in vitro yara iyileşme analizi	42
Şekil 4.12. Klotho gen ekspresyonundaki değişimin (klotho gen aktivasyonu ve knock-out) Caco-2 hücrelerinde invazyon kapasitesine etkisi.....	43
Şekil 4.13. Transfeksiyondan 48 saat sonra klotho geninin aktivasyonu ve knock-out edilmesiyle oluşan Caco-2 hücre kolonilerinin faz-kontrast mikroskopik görüntüleri	44
Şekil 4.14. Transfeksiyondan 48 saat sonra klotho geninin aktivasyonu ve knock-out edilmesiyle oluşan Caco-2 hücre kolonilerinin kristal violet ile boyama sonrası makroskopik görüntüleri	44
Şekil 4.15. Caco-2 hücrelerinde klotho gen ekspresyonundaki değişimin (klotho gen aktivasyonu ve knock-out) TRAIL reseptörlerine etkisinin flow sitometri yöntemiyle analizi	46
Şekil 4.16. DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genleri tüm gruptaki hücelere göre hücre içi gen ekspresyon değişimi	47
Şekil 4.17. Caco-2 hücrelerinde klotho gen ekspresyon değişimi sonucunda DR4 aktivitesini gösteren hücreler	48
Şekil 4.18. Caco-2 hücrelerinde klotho gen ekspresyonundaki değişimin sonucunda DR5 aktivitesini gösteren hücreler	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

Apo2L	: Apo-2 ligand
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TRAIL	: Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz-indükleyen ligand
CRISPR	: Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri
Cas	: CRISPR ile ilişkili genler
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ADAM10	: ADAM metallopeptidaz domain 10
ADAM17	: ADAM metallopeptidaz domain 17
FGF23	: Fibroblast büyüme faktörü 23
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
FoxO	: Forkhead box O
MnSOD	: Mitokondriyal mangan süperoksit dismutaz
TRPV5	: Geçici reseptör potansiyel katyon kanalı, V altfamilya, 5. üyesi
ERK1/2	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinazlar1/2
PI3K/AKT	: Fosfatidilinositol 3-kinaz/protein kinaz B
IGF-1R	: IGF-1 reseptörü
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
IRS	: İnsülin reseptör substratı
MMP	: Matriks metalloproteinaz
ECM	: Hücre dışı matriks
Bax	: Bcl -2 ilişkili x proteini
Bcl-2	: Bcl -2 apoptoz düzenleyici proteini
TRAIL-R1/DR4	: Ölüm reseptörü 4
TRAIL-R2/DR5	: Ölüm reseptörü 5
TRAIL-R3/DcR1	: Tuzak reseptörü 1
TRAIL-R4/DcR2	: Tuzak reseptörü 2
TRAIL-R5/OPG	: Osteoprotegerin
DISC	: Ölüm indükleyen sinyalleme kompleksi
FLICE	: Kaspaz 8 benzeri inhibitör protein
ATP	: Adenozin trifosfat
Apaf-1	: Apoptotik peptidaz aktive edici faktör-1

FBS	: Fötal sığır serumu
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
PBS	: Dulbecco's phosphate buffered saline
HG	: High glucose, yüksek şekerli
LG	: Low glucose, düşük şekerli
WST-8	: 2- (4-iodophenyl) -3- (4-nitrophenyl) -5- (2,4-disulfophenyl)- 2H-tetrazolium-8
KO	: Knock-out



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanserin özellikleri arasında kendi oluşturduğu büyüme sinyallerine yanıt vermesi, proliferasyon sinyallerini artırması, invazyon, metastaz, anjiyogenez, sınırsız replikasyon yeteneği ve hücre ölümüne direnç sayılabilir (Kretz vd., 2018). Kolon kanseri bu özelliklerin hepsini taşır ve erken dönemde hiçbir belirti göstermeden ilerleyebilir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) istatistiklerine göre kolon kanserinin dünyada görülme sıklığı erkeklerde üçüncü, kadınlarda ise ikinci sırada yer almaktadır. Günümüzde tedavi seçenekleri cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapidir.

Klotho geni ilk defa 1997 yılında Kuro-o ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Böbrekte distal kıvrımlı tübüllerde, beyinde koroid pleksus, hipofiz ve paratiroid bezinde, pankreas, yumurtalık, testis, plasenta, idrar kesesi, iç kulak, meme epiteli ve kolon hücrelerinde ekspresyon edilir (Kuro-o, 2009; Kuro-o, 2018). Klotho, normal hücrelerin doğal apoptotik sürecinde görevli iken, kanser hücrelerinde apoptozun indükleyicisi olarak görev yapar (Behera vd., 2017). Klotho, bu özelliği sayesinde kanserde terapötik girişimlerin geliştirilebilmesi için potansiyel bir ajan olarak önerilmektedir (Li vd., 2014; Zhou ve Wang, 2015).

Tümör dokularında klotho ekspresyonunun, sağlıklı bölgelere göre daha düşük olduğu ve klotho ekspresyon kaybının kolon da dahil olmak üzere bazı kanserlerde malign oluşuma neden olduğu belirlenmiştir (Li vd., 2014). Ayrıca sekrete klotho ifade eden kanser hastalarında, ifade etmeyen kanser hastalarına göre hastalığın mortalite oranının daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden klothonun, hastalığın prognozunu belirlemek açısından bağımsız bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür (Lu vd., 2008).

Apo-2 ligand (Apo2L) olarak da bilinen tümör nekroz faktörü (TNF) ile ilişkili apoptoz-indükleyen ligand (TRAIL), TNF sitokin süper ailesinin bir üyesidir (Pitti vd., 1996; De Miguel, Lemke, Anel, Walczak ve Martinez-Lostao, 2016). Yapılan çalışmalarda TRAIL'in sağlıklı hücreleri korurken kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği yani seçici bir apoptoz indükleyicisi olduğu bulunmuştur (De Miguel vd., 2016; Kretz vd., 2018). TRAIL, kanser tedavisinde kemoterapötik toksisiteye neden olmadan kanser hücrelerinin proliferasyonunu azaltarak apoptozu indükler (Refaat

vd., 2014). Ancak insan tümörlerinin yaklaşık olarak %60'ı TRAIL'e karşı direnç göstermektedir. Bu direncinin mekanizması hala belirsizdir (Yildiz vd., 2010).

Kolon kanseri hedef odaklı bir tedavinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulan, kansere bağlı ölümlerin dünyada yaygın olduğu bir kanser türüdür. Yapılan çalışmalarda insan kolon kanser hücrelerinin çoğunda TRAIL apoptozuna karşı bir direnç gözlenmiştir. İnsan gastrointestinal adenokarsinomlarda ve özellikle kolorektal kanserde dirençli hücrelerin TRAIL'in neden olduğu apoptozun sitotoksik etkilerine karşı nasıl duyarlılık kazanabileceği konusunda bir boşluk vardır. Çalışmamızda TRAIL ilişkili apoptoza karşı dirençli insan adenokarsinom kolon kanser hücrelerinde (Caco-2) apoptozu indüklediği bilinen klotho geninin ekspresyonundaki değişim günümüzde en çok kullanılan gen düzenleme tekniği olan CRISPR/Cas9 sistemiyle sağlandı. Kolon kanser hücrelerinde klotho geninin ekspresyon seviyesinin değiştirilmesinin TRAIL ölüm reseptörleri üzerinden kanser hücrelerindeki apoptotik duyarlılığa etkilerinin incelenmesi kapsamında;

- İnsan Caco-2 kanser hücrelerine CRISPR/Cas9 tekniğiyle klotho geni aktarılarak klotho+Caco-2 hücreleri elde edildi.
- Daha sonra elde edilen klotho+Caco-2 hücreleri; canlılık ve proliferasyon (WST-8 testi), apoptoz (Annexin V/PI), koloni oluşturma potansiyeli, invazyon yeteneği, gen seviyesindeki değişimler (qRT-PCR ile klotho, DR4, DR5, DcR1, DcR2, kaspaz 3, kaspaz 8, bcl₂, bid, bax, bad ve GAPDH'nin tespiti) ve immünohistokimyasal (DR4, DR5, kaspaz3 ve kaspaz 8) açıdan analiz edildi.
- Ardından Caco-2 hücrelerinde gözlediğimiz apoptotik cevabın, klotho geninin aşırı ekspresyonuna bağlı olup olmadığını belirlemek için insan Caco-2 kanser hücrelerinde CRISPR/Cas9 tekniğiyle klotho geni silinerek (knock-out) KO klotho-Caco2 hücreleri elde edildi.
- Daha sonra KO klotho-Caco2 ile yukarıdaki analizler tekrar edildi.
- Son olarak klotho+Caco-2 hücrelerinden elde edilen veriler; sağlıklı kolon hücreleri (CCD841 CoN), Caco2 hücreleri ve KO klotho-Caco-2 hücrelerinden elde edilenlerle karşılaştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra görülen ikinci ölüm nedenidir. Yunan doktor Hipokrat (460-370 MÖ) karsinom tümörlerini tanımlamak için “karkinos” kelimesini kullanmıştır. Celsus “karkinos” kelimesini Latince “cancer” olarak çevirmiştir, bu kelime aynı zamanda Latince’de yengeç anlamına gelir. Daha eski dönemlerde Mısır’da insan kemik kanseri ve meme kanseri vakalarının görüldüğüne dair el yazmaları bulunmaktadır. Sadece palyatif tedavilerin mevcut olduğu hatta günümüzde de hala kullanılan cerrahi yöntemlerle tümör dokusunu bulunduğu bölgeden çıkartarak tedavilerin denendiği bilinmektedir (Sudhakar, 2009).

Kanser hücrelerinin en temel iki özelliği vardır: Hücrelerin anormal büyümesi ve bölünmesi, yakın dokulara yayılması (invazyon) ve vücudun diğer bölümlerine yayılmasıdır (metastaz) (Alberts vd., 2015). Kanser hücrelerinin yayılımı kan dolaşımı ve lenf damarları yoluyla olabilir (Sudhakar, 2009). Tümör hücreleri iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olarak ayrılır. Benign tümör hücreleri sağlıklı hücrelere çok benzerdir, sağlıklı hücrelerdeki gibi hücre yapışma molekülleri aracılığıyla köken aldıkları dokuda bulunurlar, yayılım göstermezler. Malign tümör hücreleri ise sağlıklı hücrelere oranla daha hızlı bölünürler ve normal bir ölüm seyri izlemezler. Malign tümörler endoderm veya ektodermden köken alırlarsa karsinom, mezodermden köken alırlarsa da sarkom olarak adlandırılırlar. Karsinomlar bilinen en yaygın kötü huylu tümör tipidir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90’ını oluştururlar. Sarkomlar ise lösemiler ve lenfomalar olarak özel iki alt sınıfa ayrılarak kan ve immün sistem hücrelerinde görülürler (Lodish vd., 2011).

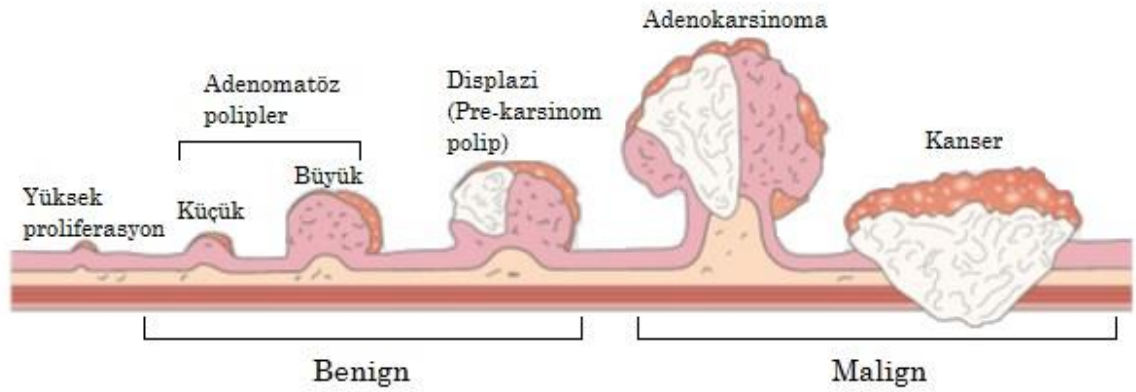
Kanser hücreleri temel altı özelliğe sahiptir. Bunlar:

1. Hücre çoğalmasını düzenleyen dıştan ve içten gelen sinyallere uymazlar.
2. Köken aldıkları dokularda yayılma eğilimi gösterirler (invazyon).
3. Yabancı bölgelerde yaşar ve çoğalırlar (metastaz).
4. Apoptoz yolaklarını inaktive ederek hücre ölümünden kaçınma eğilimindedirler.
5. Genetik ve epigenetik olarak kararsızdırlar.

6. Telomeraz enzimi üreterek veya telomerlerin stabilitesini sağlayarak hücrenin yaşlanmasını engellerler (Alberts vd., 2015).

2.1.1. Kolorektal kanser

Kolorektal kanser, kolorektal mukozadan meydana gelen rektum veya kalın bağırsak tümörlerini ifade eder. Kolorektal kanserin yaklaşık %95'i adenokarsinomdur. Adenokarsinom salgı yapabilme özelliğine sahip dokularda ortaya çıkan karsinom türüdür. Adenomatöz poliplerin displastik değişikliklere uğraması sonucunda malign tümör gelişimi ortaya çıkar (Şekil 2.1) (Thrumurthy, Thrumurthy, Gilbert, Ross ve Haji, 2016).



Şekil 2.1. Kolorektal polipten kansere geçiş (Thrumurthy 2016).

Kolorektal kanser, kolon kanseri ve rektum kanseri olarak iki gruba ayrılır. Kolon ve rektum kanserleri arasında etiyolojik farklılıklar bulunmuştur. Örneğin yüksek vücut kitle indeksi (b.w), düşük fiziksel aktivite, işlenmiş et ve alkolün diyetle yüksek miktarda alınımının kolon kanseri için risk faktörleri olduğu, ancak rektum kanseri için olmadığı gösterilmiştir. Mutasyonların ve kalıtsal kanser tiplerinin prevalansı, kolon kanseri ve rektum kanseri arasında değişiklik göstermektedir. Kolon ve rektum anatomik olarak lokasyon, kanlanma, drenaj ve innervasyon bakımından oldukça farklıdır. Bu farklılıklar primer tümörün invazif büyümesinin, cerrahi yaklaşımların ve tedavi sonuçlarının da farklılık göstermesine neden olur. Rektum kanserinde karaciğer, akciğer ve kemik metastazı görülürken, kolon kanserinde peritona metastaz görülür (Van der Sijp vd., 2016).

DSÖ verilerine göre, kolon kanserinin dünya üzerinde görülme sıklığı (prevalans) erkeklerde üçüncü kadınlarda ise ikinci sırada yer almaktadır. 2018 yılında dünya çapında 1.8 milyon kolon kanseri vakasının 861.000'inin ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir. Yine DSÖ raporuna göre, Türkiye'de kolon kanserinin görülme sıklığı kadın ve erkeklerde üçüncü sırada yer almaktadır. 2018 yılında yeni tanı almış 20.031 kişi bulunmaktadır (WHO, 2018). Kolon kanserine yakalanma oranı erkeklerde kadınlara göre önemli oranda yüksektir (Macrae, Goldberg, Seres ve Savarese, 2019).

Kolon kanseri görülme sıklığı tahminleri, 50 yaş ve üstü, korunmamış bireylerde; invaziv kolon kanseri olma ihtimali %0.5 ile %2.0 arasında, *in situ* karsinom olma ihtimali %1.0 ile %1.6 arasında, büyük adenom (≥ 1 cm) olma ihtimali %7 ile %10 arasında ve değişen boyutlarda adenom olma ihtimali ise %25 ile %40 arasındadır (Libutti vd., 2015).

Yaş, kolon kanseri insidansında diğer demografik faktörlere göre daha fazla etkilidir. 45 ile 50 yaşın üzerinde sporadik kolon kanseri önemli ölçüde artmaktadır. Hastaların yaklaşık %70'i 65 yaşın üzerindedir. Hemen hemen tüm ülkelerde yaşa göre standartlaştırılmış kolon kanseri insidans oranı kadınlarda erkeklere oranla daha düşüktür. Kolon kanserinin gelişme riskinde genetik faktörler ve yaşam tarzı (sigara, alkol, işlenmiş kırmızı et tüketimi ve hareketsiz yaşam gibi) belirleyici etkenler olarak görülmektedir (Davis vd., 2011; Libutti vd., 2015).

Kişilerin hastalık geçmişi; Crohn's hastalığı ve ülseratif kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıkları, aile öyküsünde kolon kanseri veya polip olması, ailesel adenomatöz polipozis ve varyantları, Lynch ile ilişkili sendromlar, Turcot ve Peutz-Jegher gibi kalıtsal sendromlar ve MUTYH (MutY DNA glikozilaz) ile ilişkili polipoz sendromları riskin yüksek olduğu gruplardır (Schmoll vd., 2012; Balmana vd., 2013; Labianca vd., 2013).

Kolon kanserinin belirtileri arasında şunlar yer alır:

- Bağırsak alışkanlıklarının değişmesi ve bu değişimin birkaç günden uzun sürmesi
- Bağırsaklarda tam boşalmama hissi
- Dışkıının renginin değişmesi ve kan görülmesi
- Karında geçmeyen şişkinlik hissi, ağrı ve gaz şikayetleri

- Sebepsiz kilo kaybı, yorgunluk ve halsizlik hissi (Kuipers vd., 2015).

Kolon kanserinin geleneksel tedavisinde cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavi seçenekleri uygulanmaktadır. Cerrahi müdahale ile tümör çıkartılırken tümör çevresinde bulunan sağlıklı doku ve lenf düğümleri de tümörle birlikte çıkarılmaktadır. Sistemik olarak uygulanan kemoterapi ise sadece tümör dokusunun çevresinde değil hastanın bütün vücut hücrelerine etki etmektedir (Kuipers vd., 2015; Daaboul ve El-Siba 2017).

2.2. Klotho'nun Keşfi

Klotho geni ilk defa 1997 yılında Kuro-o ve arkadaşları tarafından farelerle yapılan bir deneyde yaşlanma ile ilgili bir gen olarak tanımlanmıştır. Bu gen, Yunan mitolojisinde üç kader tanrıçasından biri olan ve hayat ipliğini eğiren Klotho'dan esinlenerek isimlendirilmiştir. Yunan mitolojisine göre kişilerin doğmasıyla birlikte hayat ipliği eğilmeye başlar. Zeus'un kızları olan kader tanrıçaları Moira'lardan birincisi Klotho'dur. Klotho hayat ipliğini eğmek anlamına gelir.

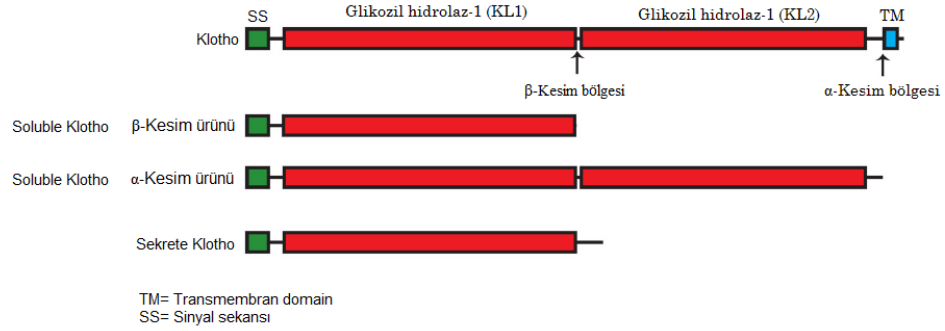
Kuro-o ve arkadaşlarının yaptıkları deneyde, klotho geni sessizleştirildiğinde farelerin 3 haftalık gelişimlerinin normal bir şekilde ilerlediği ancak 8-9 hafta içerisinde farelerin öldüğü tespit edilmiştir. Defektli farelerde ölüm sebebi olarak görülebilecek bir hastalık görülmemiştir. Klotho gen ekspresyonundaki bir hata insanda yaşlanmaya benzer bir hastalık tablosu ile sonuçlanır. Moleküler düzeyde yapılan analizler, farelerde bu fenotipik özelliklerin ortaya çıkmasında 5. kromozom üzerinde lokalize olan klotho geninin normal işlevini yapamadığını göstermiştir (Kuro-o vd., 1997; Kim vd., 2015).

2.2.1. Klotho geninin moleküler özellikleri

Klotho 130 kDa ağırlığında transmembran β -glukuronidaz proteindir. Klotho geni farelerin 5. kromozomu üzerinde bulunur. İnsanda fare ile homoloji gösteren gen, 13. kromozom üzerinde yer almaktadır. 13. kromozomun kısa kolunda bulunan klotho geni 5 ekzon ve 4 introndan oluşmaktadır (Matsumura vd., 1998; Olejnik vd., 2018).

Genin mRNA'larının alternatif işlenmesi sonucunda zarda yer alan ve sekrete edilen olmak üzere iki farklı formda klotho proteini sentezlenir (Şekil 2.2). Yapısal bir protein olan klotho 1014 amino asitten oluşan tek geçişli bir zar proteindir. Karboksi terminalinde 10 aminoasit uzunluğunda transmembran bölgesini taşır (Matsumura vd.,

1998, Kuro-o, 2009). Ekstrasellüler bölgede zayıf homolojiye sahip klotho 1 ve klotho 2 olarak adlandırılan iki domaini vardır. İki domainde β -glukozidaz ailesiyle homoloji gösterir (Kuro-o, 2009; Olejnik vd., 2018).



Şekil 2.2. İnsan klotho geni (Xu ve Sun, 2015).

Sektore formdaki proteinin sentezi, ADAM10 (ADAM metallopeptidaz domain 10) ve ADAM17 (ADAM metallopeptidaz domain 17) proteazlarının membran üzerinde bulunan tek geçişli transmembran proteinini plazma zarının üstünden kesilmesi ile gerçekleşir (Kuro-o, 2009). Sekrete edilen formu 549 amino asitten oluşur. Kan, idrar ve serebrospinal sıvıda bulunur (Matsumura vd., 1998). Klotho proteini ilk keşfedildiği yıllarda üç farklı hipotez ortaya atılmıştır. Bunlar: (1) klotho proteini aktif olmayan öncül bir proteini, aktif bir humoral faktöre dönüştürür. (2) Klotho proteinin kendisi hücre dışı boşluğa salgılanır ve humoral bir faktör olarak işlev görür. (3) Klotho proteini bir reseptör görevi görerek yeni bir humoral salgının oluşmasını başlatmak için gerekli olan sinyale aracılık eder (Shiraki-lida vd., 1998). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki bu protein oksidatif stres, büyüme faktörü, reseptörler ve iyon kanallarının aktivitesini düzenleyen humoral bir faktördür (Matsumura vd., 1998; Yamamoto vd., 2005; Kuro-o, 2010). Klotho geni, sınırlı dokularda ve hücre tiplerinde eksprese edilir. En yüksek ekspresyon, böbrekte distal kıvrımlı tübüllerde ve beyinde koroid pleksusta görülür. Hipofiz bezi, paratiroid bezi, pankreas, yumurtalık, testis, plasenta, iskelet kası, idrar kesesi, iç kulak, meme epiteli ve kolon hücrelerinde ise daha az klotho ekspresyonun olduğu saptanmıştır (Kuro-o, 2018).

Klothonun görevlerinden bir tanesi fibroblast büyüme faktörü 23'ün (FGF23) ko-reseptörü olmasıdır. Klotho aracılı FGF-23 sinyalleşmesi böbrekte fosfat geri emilimini ve D vitamininin metabolizmasını kontrol eder (Urakawa vd., 2006;

Razzaque, 2009; Kuro-o, 2010). Klothonun diğeri bir görevi insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) yolağını inhibe etmesidir. Klotho eksikliği olan farelerin insüline karşı oldukça duyarlı olduğu, klotho ekspresyonu arttırılmış farelerin ise açlık kan şekerinin normal olduğu ve insüline karşı dirençli oldukları gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda sekrete klothonun IGF-1 reseptörünün fosforillenmesini sağlayarak insülin ve IGF-1 yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir (Wolf vd., 2008; Kurosu vd., 2008; Chen, Wang, Zhao & Wu, 2010; Li vd., 2014; Rubinek ve Modan-Moses, 2016). Klotho, IGF-1 sinyal yolağını baskılayarak forkhead box O (FoxO) transkripsiyon faktörlerini aktive eder. FoxO aktifleşmesiyle katalaz ve mitokondriyal mangan süperoksit dismutaz (MnSOD) gibi antioksidan enzimleri düzenler. Bu antioksidan enzimlerin ekspresyonunun artmasıyla reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması ve oksidatif stresin azaltılması sağlanır (Yamamoto vd., 2005; Brobey, Makoto ve Rosenblatt, 2011).

Klothonun bilinen bir diğeri özelliği Wnt sinyal yolağının bir inhibitörü gibi davranmasıdır (Liu vd., 2007; Behera vd., 2017). Wnt sinyal yolağının aşırı aktivasyonu hem yaşlanmayı hem de tümörleşmeyi beraberinde getirir. Yapılan çalışmalarda klothonun, Wnt sinyalinin antagonisti olduğu bulunmuştur. Bu durum klothoyu potansiyel bir tümör baskılayıcı olarak göstermektedir (Chen, Ma, Liu, Zhao ve Wu, 2012). Wnt sinyal yolağında, β kateninin çekirdeğe translokasyonunu inhibe ettiği bunun sonucu olarak da sinyal yolağını inhibe ettiği bulunmuştur (Tang vd., 2016).

Klothonun, hücre içi ve dışı Ca^{+2} seviyesinin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Klotho geni defektli farelerde yapılan bir çalışmada, Ca^{+2} 'un böbrekten atılımının ve beden Ca^{+2} homeostazının düzenlenmesinde bu genin önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (Xuan ve Van Hai, 2018). Klothonun bu etkiyi geçici reseptör potansiyel katyon kanalı (TRPV5) üzerinden yaptığı saptanmıştır. Sekrete klotho TRPV5'in hücre yüzeyindeki ifadesini artırır ve böylece Ca^{+2} 'un hücre içerisine akışını ve renal geri emilimini sağlar (Kuro-o, 2010).

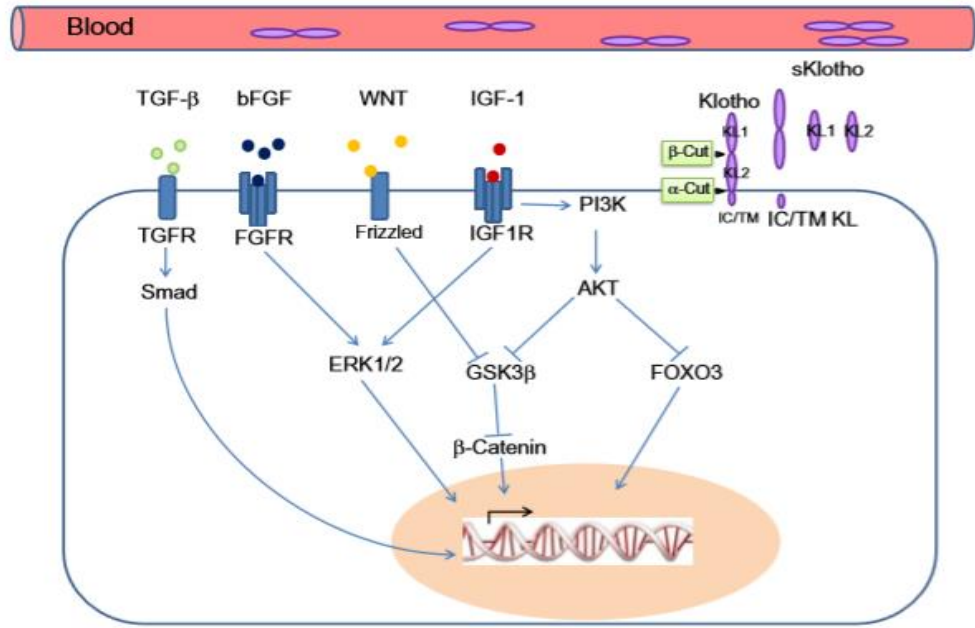
2.2.2. Klothonun kanser ve sinyal yolakları ile ilişkisi

Son yıllardaki çalışmalarda, bozulmuş klotho gen ekspresyonunun sadece yaşlanma sürecine değil, aynı zamanda tümör oluşumuna da katkıda bulunduğu ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalarda klotho gen ekspresyon seviyesinin kanser

hücrelerinde azalmış olduğu belirlenmiştir (Pan vd., 2011). Meme (Wolf vd., 2008; Rubinek vd., 2012), serviks (Lee vd., 2010), ovaryum (Lojkin vd., 2015), melanoma (Camilli vd., 2011), mide (Wang vd., 2011), pankreas (Abramovitz vd., 2011; Jiang, Gu, & Chen, 2014), özofagus (Tang vd., 2014), karaciğer (Shu vd., 2013; Xie vd., 2013a), akciğer (Wang vd., 2013; Ibi, Usuda, Inoue, Sato ve Takegahara, 2017) ve kolon (Pan vd., 2011) kanseri de dahil olmak üzere birçok tümör dokusunda klotho ekspresyonu incelenmiştir. Özellikle tümör dokularında klotho ekspresyonunun, tümör olmayan bölgelere göre daha düşük olduğu ve klotho ekspresyon kaybının kolon da dahil olmak üzere bazı kanserlerde malign oluşuma neden olduğu belirlenmiştir (Li vd., 2014). Ayrıca sekrete klotho ifade eden kanser hastalarında, sekrete klotho ifade etmeyen kanser hastalarına oranla hastalığın mortalite oranının daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden klothonun, hastalığın prognozunu belirlemek açısından bağımsız bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür (Lu vd., 2008). Meme ve hepatosellüler karsinomda klotho geninin mutasyona uğraması ya da hipermetilasyona uğraması, bu genin kanserin erken evresinde bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini düşündürmektedir. Bu nedenle kanserde terapötik girişimlerin geliştirilebilmesi için klotho geni potansiyel bir ajan olarak önerilmektedir (Li vd., 2014; Zhou ve Wang, 2015; Tang vd., 2016).

Klotho, normal hücrelerin doğal apoptotik sürecinde görevli iken, kanser hücrelerinde apoptozun indükleyicisi olarak görev yapar. Klothonun tümör metastazındaki etkisi yoğun bir şekilde araştırılmamış sadece birkaç çalışmada klotho ekspresyonunun tümörün invazyon ve metastazla ilişkisi incelenmiştir. Örneğin klothonun melanoma hücrelerinin invazyonunu azalttığı bulunmuştur (Behera vd., 2017). Klotho geninin ekspresyonunu arttırarak kanser hücreleri üzerinde etkili ve hedefe yönelik tedavi protokolleri oluşturmayı amaçlayan çalışmalar bulunmaktadır. Bu protokollerin bazılarında *in vitro* ya da *in vivo* eksojen klotho uygulanması, bazılarında da hücrenin kendi klotho geninin ekspresyonunu arttırmaya yönelik stratejiler kullanılmış ve fonksiyonu çeşitli sinyal yolları üzerinden çalışılmıştır. Klotho geninin antitümör etkisini, başlıca hücre çoğalmasında görevli olan IGF-1 (Shu vd., 2013; Xie, Chen, Liu ve Zhan 2013b; Ligumsky vd., 2015; Zhou vd., 2017), hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinazlar 1/2(ERK1/2) (Shu vd., 2013), Wnt/ β -katenin (Camilli vd., 2011; Chen vd., 2012; Tang vd., 2016; Behera vd., 2017) ve

fosfatidilinositol 3-kinaz/AKT (PI3K/AKT) (Zhu vd., 2013) sinyal yolları üzerinden kontrol ederek gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Şekil 2.3) (Pan vd., 2011).



Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin klotho geni ile ilişkili sinyal yolları. Klotho hormon olarak görev yaptığı için pek çok hücreye ulaşabilir. Hücre yüzeyinde bulunan reseptörler sayesinde kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerinde etki gösterebilecek sinyal yollarını inhibe edebilir (Rubinek ve Wolf 2016).

Klotho ile ilişkili sinyal yollarından biri olan IGF-1 sağlıklı dokularda eksprese edilir, büyüme ve gelişme gibi fizyolojik fonksiyonlarda önemli rol üstlenir (Yuan, Yin, Tao, Wang ve Gao 2018). Bu önemli rollerden bir tanesi insülin/IGF-1-PI3K-AKT-mTOR sinyal yolağında yer alan büyüme sinyalinin hücre otofajisini düzenlemesidir (Shu vd., 2013). IGF-1 sinyal yolunun kanser oluşum sürecinde ve gelişiminde önemli etkisi olduğu bilinmektedir (Abramovitz vd., 2011). IGF-1 reseptörünün (IGF-1R) ekspresyonun ve aktivitesinin, birçok tümör tipinde arttığı ve kanser hücresi proliferasyonuna ve apoptozun durdurulmasına karşı katkıda bulunduğu bilinmektedir. IGF-1 sinyalinin sağlıklı hücrelerde aşırı ekspresyonu, hücreleri malign dönüşüme teşvik ederek kanser hücrelerinin invazyonu, metastazı ve anjiyogenezine katılır (Yuan vd., 2018). Klotho, IGF-1 reseptörünün aktivasyonunu reseptörü fosforilleyerek baskılar (Kurosu vd., 2005; Wolf vd., 2008). Sinyal kaskadının devamında gelen PI3K/AKT ve ERK sinyal yollarını da dolaylı olarak inhibe etmiş olur (Li vd., 2014; Shu vd., 2013). Kolon (Li vd., 2014), pankreas (Abramovitz vd., 2011), lenfoma (Zhou vd., 2017) ve hepatosellüler karsinoma (Shu

vd., 2013) hücreleriyle yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda klothonun aşırı ekspresyonun IGF-1 sinyal yolunu inhibe ederek hücre proliferasyonunu, tümör invazyonu ve metastazı önlediği bulunmuştur. Bununla birlikte hücre apoptozunu indüklediği gözlenmiştir (Rubinek ve Wolf 2016).

Klothonun etkilediği sinyal yollarından biri de Wnt/ β -katenin sinyal yolağıdır. Wnt, hücrelerin proliferasyonu için gerekli olan bir faktördür (Wang ve Sun, 2009). Wnt sinyalinin yokluğunda β -katenin kararsızlaşmakta ve proteazomlar tarafından yıkılmaktadır. Wnt sinyalinin aktivasyonunda sitoplazmik β -katenin birikerek hücre çekirdeğine transloke olur. β -kateninin çekirdeğe transloke olmasıyla birlikte hücre proliferasyonunu etkileyen c-myc ve siklin D1 gibi genlerin aktivasyonu gerçekleşir (Tang vd., 2016). Klotho kaybının, Wnt sinyalinin anormal aktivasyonuna ve hücrelerin malign oluşumuna etki ettiği bulunmuştur (Chen vd., 2012; Rubinek ve Wolf 2016; Tang vd., 2016). Tümör baskılayıcı bir gen olan klothonun, akciğer (Chen vd., 2012), melanoma (Tang vd., 2016) ve hepatosellüler karsinoma (Behera vd., 2017) hücrelerinde Wnt sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonunu inhibe ederek hücrelerin büyümesini yavaşlattığı ve kanser hücrelerinin invazyonunu azalttığı bulunmuştur (Chen vd., 2012; Behera vd., 2017). Tüm bu çalışmaların sonucunda klothonun, bir Wnt antagonisti olarak da etki ettiği ve Wnt ligandlarına bağlanarak sinyal yolunu inhibe ettiği bulunmuştur (Liu vd., 2007; Tang vd., 2016).

Klothonun antitümör etkisini göstermek için kontrol ettiği bir başka sinyal yolağı ise PI3K/AKT'dır. PI3K aktivitesi, büyüme faktörü reseptörleri tirozin kinaz (RTK) ve insülin reseptör substratı (IRS) tarafından doğrudan veya dolaylı olarak düzenlenir. Tümörleşme sırasında anjiyogenez, hücre döngüsünün teşviki ve metastazda dahil olmak üzere farklı roller üstlenir. Kanser hücrelerinde, pro-anjiyogenik faktörlerin ekspresyonunu arttırıp anti-anjiyogenik faktörlerin baskılanmasını sağlayarak anjiyogenezi teşvik eder. Hücre döngüsünde S-fazına giriş için gerekli olan genlerin transkripsiyonunu artırır ve mRNA'ların translasyonunu başlatır. Pro-apoptotik faktörleri inhibe ederek hücre döngüsünün kontrolsüz ilerlemesini sağlar. Matriks metalloproteinazların (MMP) aktivasyonunu arttırarak hücre dışı matriksi (ECM) parçalayarak metastazı destekler (Owusu-Brackett, Shariati ve Meric-Bernstam 2019). PI3K/AKT sinyal yolunun inhibisyonu sonucunda MMP ekspresyonunun inhibe edildiği ve malign tümör hücrelerinin büyümesi ve metastazının baskılandığı bilinmektedir (Li

vd., 2014). Renal karsinom, akciğer ve kolon kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda klotho geninin aşırı ekspresyonu kanser hücrelerinde PI3K/AKT sinyal yolağının aktivasyonunun, çoğalmayı, invazyonu ve epitelyal mezenkimal geçişi baskıladığı gösterilmiştir. Klothonun renal karsinoma, akciğer ve kolon kanseri için potansiyel terapötik bir ajan olduğu öne sürülmüştür (Wang vd., 2013; Zhu vd., 2013; Li vd., 2014).

2.3. Tümör Nekroz Faktörü ile İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand

Apo-2 ligand (Apo-2L) olarak da bilinen tümör nekroz faktörü (TNF) ile ilişkili apoptoz-indükleyen ligand (TRAIL), TNF sitokin süper ailesinin bir üyesidir (Pitti vd., 1996; De Miguel vd., 2016). TRAIL, Wiley ve arkadaşları tarafından 1995 yılında tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda TRAIL'in sağlıklı hücreleri korurken kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği, yani seçici bir apoptoz indükleyicisi olduğu, bulunmuştur (Bernardi, Secchiero ve Zaulii 2012; Cai, Liu, Huang, Zhang ve Liu 2012; Szliszka vd., 2012; He vd., 2013; Turner vd., 2013; Refaat, Abd-Rabou ve Reda, 2014; De Miguel vd., 2016; Kretz vd., 2018). İnsan tümörlerinin %60 gibi önemli bir oranı TRAIL'e karşı dirençlidir ve bu direncin mekanizması hala belirsizdir (Yildiz vd., 2010). TRAIL, bağışıklık reaksiyonunun bir parçası olarak dokuların çoğunluğu tarafından salgılanan bir sitokindir. Anne sütünde yüksek oranda TRAIL'in bulunduğu ve bu durumun bebeklerde anti-kanser etkilere neden olabileceği gösterilmiştir. TRAIL, kanser tedavisinde kemoterapötik toksisiteye neden olmadan kanser hücrelerinin proliferasyonunu azaltarak kanser hücrelerinde apoptozu indükler (Refaat vd., 2014). TRAIL'in terapötik potansiyeli, lenfositler, dalak, timus, ovaryum, prostat, plasenta ve kolon gibi çeşitli dokularda reseptör ifadesinden kaynaklanır. Bu nedenle TRAIL, umut verici ve etkili bir antitümör ajan olarak kabul edilir (Trivedi ve Mishra, 2015; Wong vd., 2019).

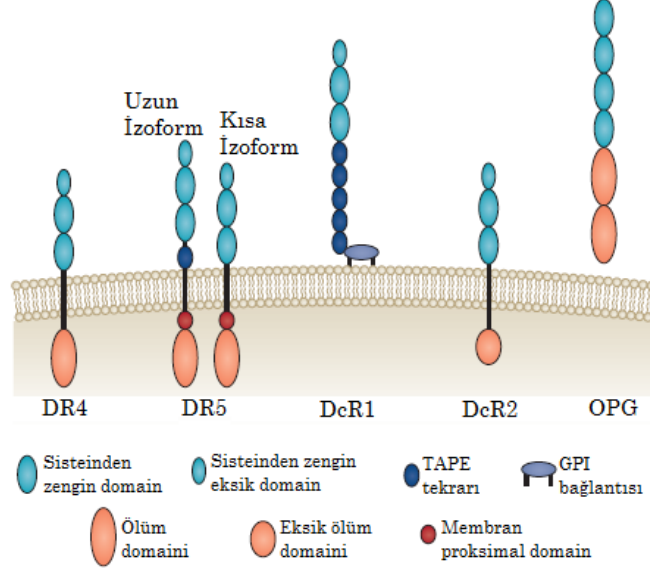
2.3.1. TRAIL reseptör sistemi

TRAIL'in iki agonistik ve üç antagonistik reseptörü olduğu bilinmektedir. Agonistik reseptörleri TRAIL-R1 (DR4/TNFRSF10A), TRAIL-R2 (DR5/TNFRSF10B/TRICK2/killer)'dir. Antagonistik reseptörleri TRAIL-R3 (DcR1/TNFRSF10C/TRID/LIT), TRAIL-R4 (DcR2/TNFRSF10D/TRUNND) ve

soluble reseptör olan osteoprotegerin (OPG/TNFRSF11B)'dir (Pan vd., 1997; Walczak vd., 1997; Emery vd., 1998; LeBlanc ve Ashkenazi,2003; Trivedi ve Mishra, 2015; Kretz vd., 2018) (Şekil 2.4).

TRAIL, hücre zarında bulunan ölüm reseptörlerine bağlanarak apoptotik hücre ölümünü indükleyebilir (Legler vd., 2018). TRAIL, bu beş reseptörden biriyle etkileştiğinde, hangi reseptörle etkileşime girdiğine bağlı olarak apoptozu uyarır veya baskılar (Yıldız vd., 2010). TRAIL, apoptoz kaskatının başlamasını sağlayan ölüm reseptörlerine (DR4 ve DR5) daha yüksek afinite gösterir. DR4 ve DR5 korunmuş sitoplazmik ölüm domainleri sayesinde TRAIL kaynaklı apoptoz kaskatını başlatabilirken, DcR1, DcR2 ve OPG reseptörleri işlevsel sitoplazmik ölüm domainleri bulunmadığı için TRAIL kaynaklı apoptozu başlatamaz (De Miguel vd., 2016; Kretz vd., 2018).

Ölüm domaini içeren iki TRAIL reseptörü arasındaki en belirgin moleküler fark, DR4 için yalnızca tek bir ölüm domain varyantının olması iken, DR5 için iki ölüm domain varyantının bulunmasıdır (Wang ve Jeng 2000). DR5'in uzun ve kısa izoformları vardır. Uzun izoformunda hücre zarının üzerinde 29 amino asit içeren ek bir bölge bulunur. Bu ek polipeptid treonin, alanin, prolin ve glutamin (TAPE) bakımından zengindir (Richter vd., 2012). Bu polipeptid, uzun izoformun glikokaliksten dışarıya doğru çıkıntı yapmasını sağlar (von Karstedt, Montinaro ve Walczak, 2017).



Şekil 2.4. Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) reseptörleri. Hücre içerisinde hücre içi ölüm domainine sahip iki reseptör (DR4 ve DR5) ve işlevsel olmayan ölüm domaini içeren (DcR2) bir reseptör ifade edilir. DR5, TAPE (treonin, alanin, prolin ve glutamin) alanının varlığı veya yokluğuna göre uzun ve kısa izoform olarak ifade edilir. DcR1 hücre membranına glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağlantısıyla tutunur, beş TAPE domaini içerir ancak hücre içi domain içermez. Osteoprotegerin (OPG), TRAIL için düşük afiniteli bir soluble reseptör olarak görev yapar (von Karstedt vd., 2017).

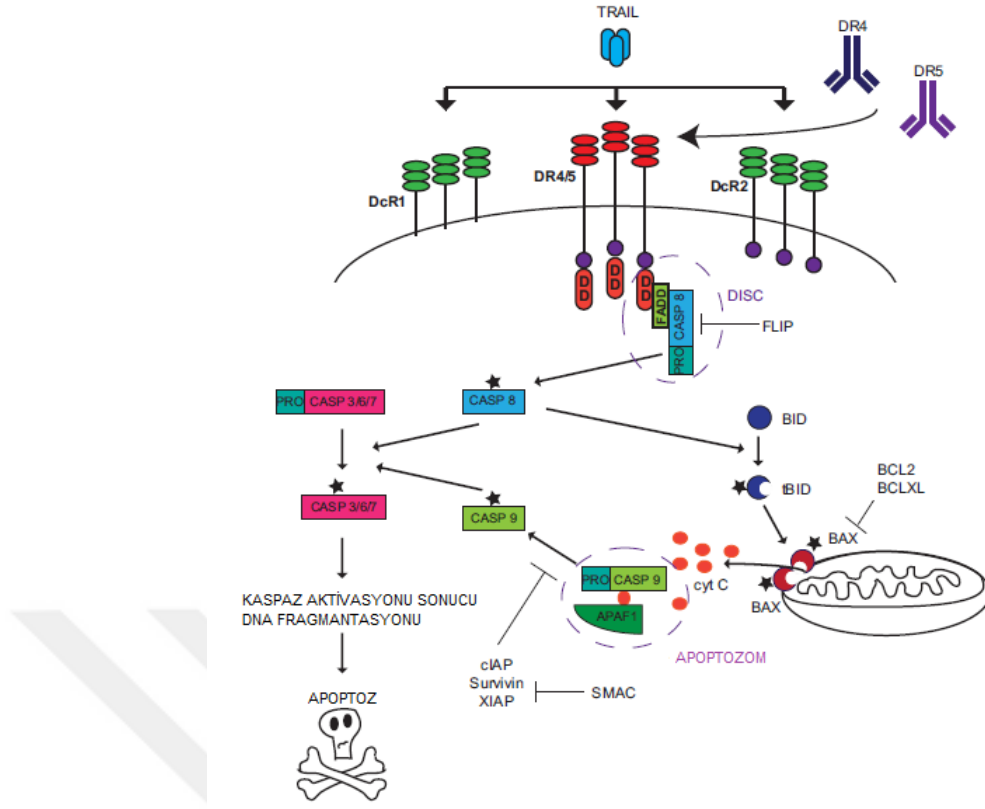
2.3.2. TRAIL sinyal yolu

TRAIL'in ölüm reseptörü DR4 veya DR5'e bağlanmasıyla hücre içi ölüm domainleri FAS ile ilişkili ölüm domain proteini (FADD) ile etkileşir (Trivedi ve Mishra, 2015). FADD, başlatıcı kaspaz-8 ve 10'un ölüm efektör domainleri ile bir araya gelip trimerizasyon oluşturmasını sağlar. Bu etkileşimle oluşan kompleks, ölüm indükleyen sinyalleme kompleksi (DISC) adını alır (von Karstedt vd., 2017). DISC içerisinde yer alan pro-kaspaz-8/10 homodimer oluştururlar. Bu durum DISC'in kaspaz aktivasyona yani pro-kaspaz-8/10 moleküllerinin parçalanmasına neden olan bir yapısal değişime neden olur (De Miguel vd., 2016). Pro-kaspazın, C terminal bölgesi cullin-3 aracılığıyla ubiquitin proteine bağlanır. Bu poli-ubikuitin bağlanmış pro-kaspaz p62'ye bağlanmaya başlar. DISC kompleksi içerisinde bu ubiquitinden zengin bölgeler kesilir ve pro-kaspazlar aktif hale geçerler (Dai vd., 2016; De Miguel vd., 2016; von Karstedt vd., 2017). DISC'de kaspaz-8/10'un aktivasyonu apoptoz sinyalini apoptoz uygulayıcılarına ekstrinsik veya intrinsik olarak aktarır. Bazı hücre tiplerinde, kaspaz-8'in aktivasyonu, efektör kaspaz 3'ün aktivasyonu ve apoptozun uygulanması için yeterlidir. Ancak diğer hücre tiplerinde intrinsik yolun aktivasyonu

gereklidir. TRAIL, kaspaz-8/10'un aktivasyonu ile apoptozun her iki yolunu da aktif hale getirebilir. İnterinsik yol, hücrenin stres durumunda üretilen hücre içi sinyallerle aktive olur. Apoptotik moleküller aktive olduktan sonra mitokondri iç zarından salınır. Ekstrinsik yol ise DISC oluşumuna bağlıdır. Ekstrinsik yol, hücre yüzeyinde yer alan ölüm reseptörlerine hücre dışından gelen ligandların bağlanmasıyla aktive olur (Sprick vd., 2002; Alberts vd., 2015; Trivedi ve Mishra, 2015; Dai vd., 2016; De Miguel vd., 2016).

Kaspaz-8 benzeri inhibitör protein (FLICE) FADD'a bağlanmak için kaspaz-8 ile rekabet halindedir. FLICE katalitik bir bölge içermediğinden aktivite gösteremez. Bu yüzden DISC aktivasyonuna ve apoptozun başlatılmasına karşı sıklıkla kanser hücrelerinde ekspresyonu arttırılır (von Karstedt vd., 2017).

İnterinsik yolda, kaspaz-8'in aktivasyonu, bcl-2 inhibitör BH3-domain etkileşimli proteinin (bid) bölünmesine yol açar. Ardından kesilmiş bid (t-bid), bax ve bak ile etkileşir ve mitokondriyal zarı bozar. Sonuç olarak sitokrom c ve Smac/Diablo salınımına yol açan mitokondriyal zarda oligomerizasyonu uyarır (Trivedi ve Mishra, 2015). Sitozol içerisinde sitokrom c, ATP ve apoptotik peptidaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ile birleşir ve pro-kaspaz-9'u apoptozom olarak adlandırılan bir sinyal kompleksine dahil eder. Aktif kaspaz-9 daha sonra apoptozu indüklemek için efektör kaspazlar olan 3, 6 ve 7'yi aktive eder (Dai vd., 2016). Sonuç olarak hücre apoptozu gerçekleşir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. TRAIL sinyal yolu. TRAIL ligandının DR4 ve/veya DR5 reseptörlerine bağlanması hücre içerisinde FADD ile trimerizasyonu indükler. Bu komplekse pro-kaspaz-8 ölüm domainleri sayesinde bağlanır. DISC oluşumundan sonra kaspaz-8 aktifleşir. Böylece bazı hücrelerde doğrudan bazı hücrelerde ise bid aktivasyonu yoluyla mitokondriyal apoptoz ile efektör kaspazları aktifleştirir. Sonuç olarak DNA fragmentasyonu, nüklear zarfın ve hücre iskeletinin parçalanması gerçekleşir (Dimberg vd., 2013).

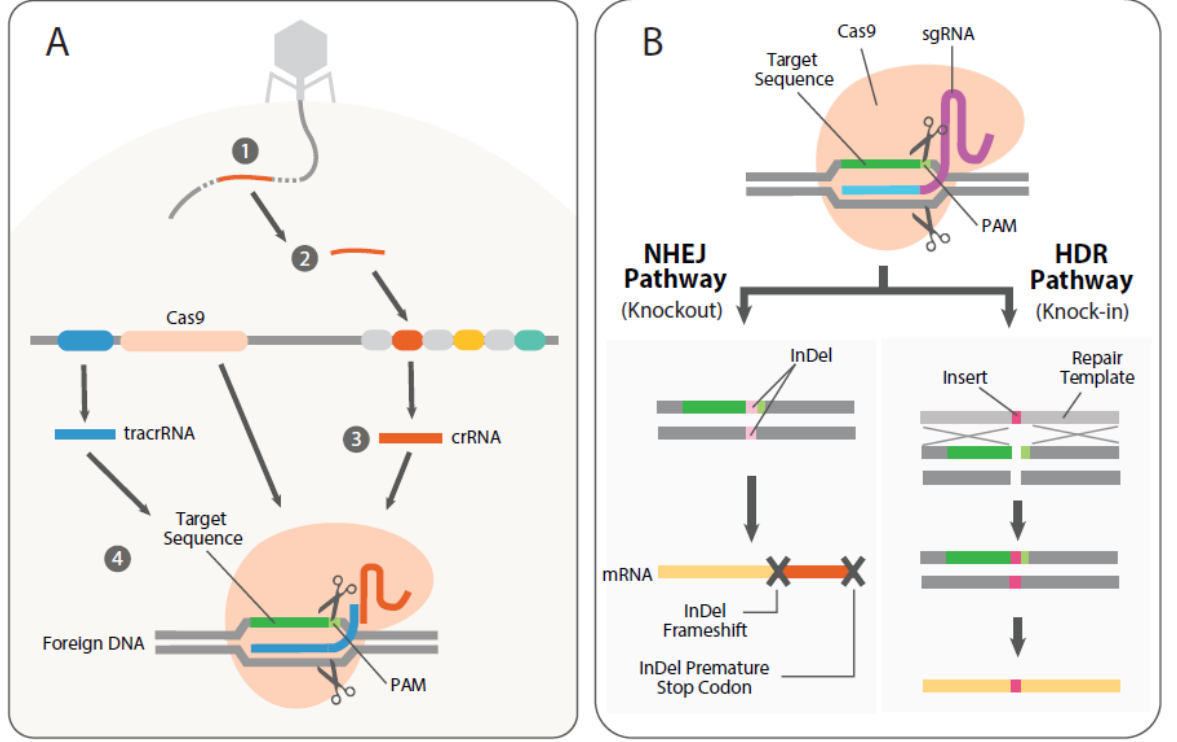
2.4. Gen düzenleme: CRISPR/CAS9

Bakteri ve arkelerin adaptif bağışıklık sistemlerinin temel bileşenlerinden “düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR) ve ilişkili genleri (cas)” nükleik asit tabanlıdır (Wilkinson ve Wiedenheft, 2014). CRISPR ilk olarak 1987 yılında *E.coli* bakterilerinde keşfedildi. Keşfinden sonra bu dizilerin gizemi 2005 yılına kadar saklı kaldı. 2005 yılında üç farklı araştırma grubunun bu dizilerin faj DNA’sında da benzer bölgelerin olduğunu tanımlaması üzerine bu dizilerin bakterilerde adaptif bağışıklık sisteminin bir parçası olduğu ortaya çıktı (Bolotin, Quinquis, Sorokin, Ehrlich, 2005; Pourcel, Salvignol, Vergnaud, 2005; Mojica, García-Martínez, Soria, 2005).

Bugüne kadar pek çok CRISPR/cas sistemi tanımlanmıştır. Bu sistemler CRISPR bölgesinin düzenlenmesine ve Cas genlerinin içeriğine göre üç ana tipe (I,

II ve III) ve 11 alt tipte (I-A'dan I-F'ye, II-A'dan II-C'ye, ve III-A'dan III-B'ye) sınıflandırılmaktadır (Jiang ve Doudna, 2015). Yapılan araştırmalarda Tip II CRISPR sisteminin Cas9 enziminin genom mühendisliği için kullanılabileceği potansiyeli keşfedildi (Barrangou ve Marraffini, 2014). Bu potansiyel Tip II'nin hedef DNA'yı kesen tek bir endonükleaz aktivitesidir (Sapranauskas vd., 2011). DNA molekülünün kesilebilmesi için iki farklı RNA'nın (CRISPR hedefleme (crRNA) ve trans-aktive edici RNA (tracrRNA)) Cas proteinini aktive etmesi gerekir (Deltcheva vd., 2011; Gasiunas, Barrangou, Horvath, Siksnys, 2012; Jinek vd., 2012). crRNA ve tracrRNA'nın tek bir klavuz RNA'da (sgRNA) birleşmesiyle CRISPR-Cas sisteminin gen düzenlemede kullanımını daha da basitleştirildi (Jinek vd., 2012).

Hedef DNA'nın kesilebilmesi için öncelikle sgRNA'nın bağlanması gereklidir. Bu bağlanma sonrasında Cas9 nükleaz konformasyonel değişikliğe uğrar ve hedef bölgeye doğru yönlendirir. sgRNA'nın bağlanma özgülüğu, üç nükleotidden oluşan protoaralık bitişik motifin (PAM sekansı, 5'-NGG-3' veya 5'-NAG-3') transkripsiyon yönüne göre önünde yer alan 20 nükleotidlik bir dizi ile belirlenir. Çift zincirli DNA'nın çözülmesi, PAM ve DNA-sgRNA bağlanmasından sonra Cas9 nükleaz hedef dizide çift iplik kırılmasını (DSB) sağlar (şekil 2.6 A). Hücre DSB'yi iki farklı mekanizma ile onarabilir. Birisi homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ), genellikle insersiyon veya delesyonlara (in-del) yol ačan mutasyonlara sebep olabilir. In-del mutasyonları sonucunda çerçeve kayması mutasyonları, erken durdurma kodonları ve/veya hedef genin bozulmasına neden olabilir. Bu mutasyonlar ile gen ürünlerinin bozulması hedef genin çıkartılması (knock-out, KO) için kullanılır. Onarım mekanizmalarından bir diğerisi ise homolojiye bağlı onarım (HDR)'dir. DNA kırılığının tamiri için donör DNA şablonu kullanılır. Hücre genomuna istenilen genin eklenmesinde kullanılır (şekil 2.6 B) (Jinek vd., 2012; Sternberg, Redding, Jinek, Greene, Doudna, 2014; Zhan, Rindtorff, Betge, Ebert, Boutros, 2019).



Şekil 2.6. CRISPR/Cas9 sistemi. (A) Bakterilerde CRISPR ile adaptif bağışıklığın oluşması.

(B) CRISPR sisteminin gen düzenlenmesi için uygulama yöntemleri

(<https://www.abmgood.com/pub/media/catalog/category/docs/c/r/CRISPR-Quick-Guide-Protocol-V2.pdf>).

CRISPR/Cas9 sistemi hedef bölgeye göre tasarlanarak hedef dışı bölgelerde oluşabilecek olan mutasyonların azaltılmasını sağlaması, gen düzenlemenin kalıcı olması, uygulanabilirliğinin kolay ve hızlı olması sayesinde günümüzde en çok kullanılan gen düzenleme aracıdır. Bu sistem kullanılarak hem memelilerde hem de çok çeşitli organizmalarda gen düzenleme çalışmaları hızla devam etmektedir (Sander ve Joung, 2014; Savic ve Schwank, 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fötal sığır serumu	: FBS-12A, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Penisillin/Streptomisin	: PS-B, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Stabil glutamin	: STA-B, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Dulbecco's modified eagle's medium yüksek glikoz (DMEM-HG-4.5g/L)	: DMEM-HPXA, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Dulbecco's modified eagle's medium düşük glikoz (DMEM-LG-1g/L)	: DMEM-LPXA, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Dulbecco's phosphate buffered saline	: PBS-1A, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Tripsin-EDTA	: 25200056, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD
Klotho CRISPR aktivasyon plazmid	: sc-400970-ACT, Santa Cruz Biotechnology, Teksas, ABD
Kontrol CRISPR aktivasyon plazmid	: sc-437275, Santa Cruz Biotechnology, Teksas, ABD
Klotho CRISPR/Cas9 knock-out plazmid	: sc-400970, Santa Cruz Biotechnology, Teksas, ABD
Klotho HDR plazmid	: sc-400970-HDR, Santa Cruz Biotechnology, Teksas, ABD
Kontrol CRISPR/Cas9 plazmid	: sc-418922, Santa Cruz Biotechnology, Teksas, ABD
Extractme Total RNA kit	: EM09.1, Blirt S.A., Gdańsk, Polonya
Transcriptme RNA kit	: RT31-100, Blirt S.A., Gdańsk, Polonya

SYBR green RT-PCR kit : AM02, Blirt S.A., Gdańsk, Polonya

 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST)-8 : 15705, AAT Bioquest, California, ABD

 Cell Meter™ live cell caspase 3/7 and phosphatidylserine detection kit : 22850, AAT Bioquest, California, ABD

 KL polyclonal antibody : A12028, ABclonal, Massachusetts, ABD

 TNFRSF10A rabbit pAb : A12540, ABclonal, Massachusetts, ABD

 DR5 rabbit mAb : A19043, ABclonal, Massachusetts, ABD

 Casp8 polyclonal antibody : A11324, ABclonal, Massachusetts, ABD

 FITC goat anti-rabbit IgG (H+L) : AAT-16868, AAT Bioquest, California, ABD

 Mouse anti-rabbit IgG-CFL 594 : sc-516250, Santa Cruz Biotechnology, Teksas, ABD

 PE anti-human CD261 (DR4, TRAIL-R1) antibody : 307205, BioLegend Way, California, ABD

 APC anti-human CD262 (DR5, TRAIL-R2) antibody : 307407, BioLegend Way, California, ABD

 PE anti-human DcR1 (TRAIL-R3, CD263) antibody : 307005, BioLegend Way, California, ABD

 Anti-CD264/TRAIL R4 antibody [TRAIL-R4-01] (FITC) : ARG53810, Arigobiolaboratories, Hsinchu, Tayvan

3.2. Kullanılan Cihazlar

Laminar air flow-class II	: Telstar Biovanguard, Tokyo, Japonya
CO ₂ /O ₂ - çok gazlı inkübatör	: Panasonic MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya
-150°C derin dondurucu	: Panasonic MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya
Floresan ataşmanlı inverted araştırma mikroskobu	: Carl Zeiss Ax10 Observer D1, Oberkochen, Almanya
Kantitatif RT-PCR cihazı	: One-Step Thermo Scientific™ Carlsbad, ABD
Flow sitometri cihazı	: FACSCanto II, BD Biosciences, Kaliforniya, ABD
Flow sitometri cihazı	: Accuri™ C6, BD Biosciences, Kaliforniya, ABD
Floresan ataşmanlı araştırma mikroskobu	: Leica DM2500, Wetzlar Almanya
Işık mikroskobu	: Kern, OBL-12/OBL-13, Balingen, Almanya
Otomatik pipet seti	: Eppendorf, Research® plus, Hamburg Almanya
Masaüstü soğutmalı santrifüj	: Hettich Rotina 380R, Westphalian, Almanya
Çalkalamalı su banyosu	: JeioTech BS-11, Seul, Kore
Şarjlı pipetör	: Rainin PX-100 EU, Kaliforniya, ABD
ELISA okuyucu	: Biotek ELx808IU, Winooski, ABD
Kit saklama dolabı (+4/-20°C)	: Panasonic MPR-414F-PE, Kadoma, Japonya
Bilgisayar	: Lenovo Ideapad 310, Çin

3.3. Yöntemlerin Uygulanması

Bu çalışma yalnızca hücre kültürü ortamında (insan ya da hayvan vücudu dışında) ve ticari olarak satın alınan hücreler ile gerçekleştirileceğinden insan ya da hayvan herhangi bir etik kurul izni gerektirmemektedir.

3.3.1. Deney grupları

Çalışmamızda, klothonun insan kolon adenokarsinom hücre hattı (Caco-2) üzerine olası apoptotik etkilerini değerlendirmek için 4 deney grubu oluşturuldu. Bu gruplar:

1. **grup:** İnsan sağlıklı kolon hücreleri (CCD841 CoN)
2. **grup:** İnsan kolon kanseri hücreleri (Caco-2)
3. **grup:** Klotho geni aktive edilmiş kolon kanser hücreleri (klotho+Caco-2)
4. **grup:** Klotho geni silinmiş kolon kanseri hücreleri (KO klotho-Caco-2)

3.3.2. Hücrelerin temini, çözdürülmesi ve kültüre edilmesi

3.3.2.1. Hücrelerin temini

Çalışmada kullanılan Caco-2 (ATCC® HTB-37™, insan kolon adenokarsinoma epitelyal hücre hattı), ve CCD 841 CoN (ATCC® CRL-1790™, sağlıklı kolon epitelyal hücre hattı) hücre dizileri ATCC (Washington, DC, ABD) hücre bankasından satın alındı.

3.3.2.2. Hücrelerin çözümlenmesi ve kültürü

Kolon kanseri hücreleri (Caco-2) ve sağlıklı kolon hücreleri (CCD841 CoN) çözümlenerek deneylerde gerekli olan sayının eldesi için kültür edilip çoğaltıldı. Bunun için hücreler; %10 fetal sıgır serumu (FBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya), %1 penisillin/streptomisin (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ve %1 stabil glutamin (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) içeren Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) besiyerinde, %5 CO₂, %95 bağıl nemde ve 37°C inkübatörde (Panasonic, MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya) çoğaltıldı.

Kültür kabı %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman alt kültürlerle pasajlandı. Bunun için eski besiyeri çekilerek 3mL Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ile 3 kez yıkama yapılarak eski besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından hücreler tripsin-EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) ile muamele edilerek süspansiyon edildi. Tripsin-EDTA'yı nötralize etmek için tripsin miktarının en az iki katı kadar besiyeri eklendi. Süspansiyon hale gelen hücreler santrifüj tüpüne (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) alınarak 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj (Hettich, Rotina 380R, Westphalian, Almanya) edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı. Hücre pelleti tekrar süspansiyon hale getirildi ve tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırılarak Thoma lamında ışık mikroskobu (Kern, OBL-12/OBL-13, Balingen, Almanya) altında sayıldı.

Caco-2 hücreleri $7,5 \times 10^5$ hücre/flask, CCD841 CoN hücreleri 5×10^5 hücre/flask olacak şekilde T75 flaklara ekilerek kültürlerine devam edildi (Tablo 3.1). Hücre pelletinin kalan kısmı dondurulmak üzere 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve hücre pelleti dondurma besiyeri (%60 DMEM, %35 FBS ve %5 DMSO) ile süspansiyon hale getirilerek kriyoviallere aktarıldı. -150°C derin dondurucuda (Panasonic MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya) saklandı.

Tablo 3.1. Hücrelerin kültüründe kullanılan besiyeri içeriği.

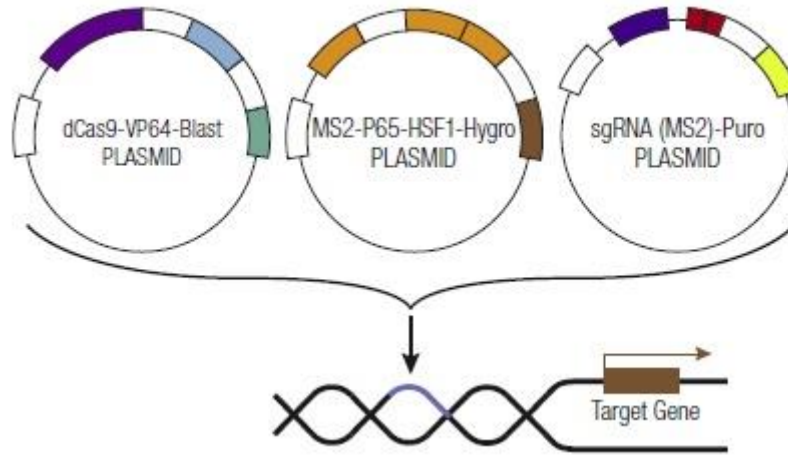
Caco-2 hücreleri için kullanılan besiyeri	CCD841 CoN hücreleri için kullanılan besiyeri
DMEM (HG)	DMEM (LG)
% 10 FBS	% 10 FBS
% 1 Stabil glutamin	% 1 Stabil glutamin
% 1 Penisilin/Streptomisin	% 1 Penisilin/Streptomisin

3.1.1. CRISPR/Cas9 genomik düzenlemeyle Caco-2 hücrelerinde klotho genin aktivasyonu ve silinmesi (knock-out)

3.1.1.1. CRISPR/Cas9 genomik düzenlemeyle Caco-2 hücrelerinde klotho geninin aktivasyonu

Caco-2 hücrelerinde klotho gen ekspresyonunu artırmak için CRISPR aktivasyon plazmid kiti (Santa Cruz Biotechnology, ABD) kullanıldı. Kit içerisinde bulunan dCas9-VP64-Blast, MS2-P65-HSF1-Hygro, sgRNA (MS2)-Puro vektörler klotho genin transkripsiyonel başlangıç sitesinin yaklaşık 200-250 nt üst kısmında

bulunan spesifik bir bölgeye bağlanarak klotho genin endojen transkripsiyonunu aktivasyonunu sağlar (Şekil 3.1).



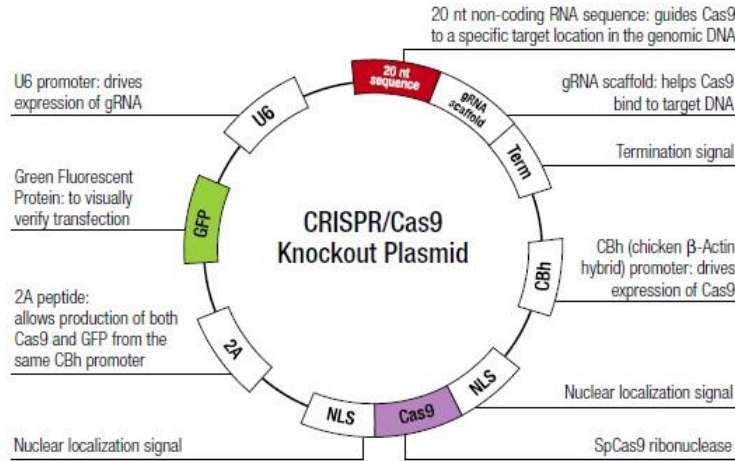
Şekil 3.1. Klotho CRISPR aktivasyon plazmid.

Transfeksiyon için hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarında (SPL Life Science, Gyeonggi, Kore), kuyucuk başına 3 mL antibiyotiksiz besiyeri içerisinde 2×10^5 olacak şekilde ekildi. Hücreler %70-90 konfluensiye ulaştırıldıktan 24 saat sonra transfeksiyon gerçekleştirildi. Liyofilize plazmid; 10 mM TRIS EDTA, 1 mM EDTA tampon çözelti içeren ultra saf, steril, DNaz içermeyen su içerisinde $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ olacak şekilde süspanse edildi.

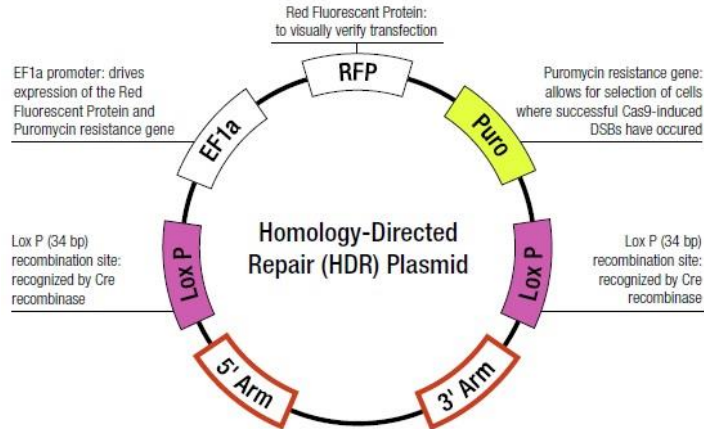
Transfeksiyon öncesinde transfeksiyon solüsyonu oda ısısına getirildi. $2,5 \mu\text{g}$ plazmid serum içermeyen $200 \mu\text{L}$ besiyeri içerisinde çözüldü. Daha sonra içerisine $7,5 \mu\text{L}$ transfeksiyon solüsyonu (Transfectamine™ 5000 Transfection Reagent, AAT Bioquest, California, ABD) eklenerek oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. Hücrelerin üzerinde bulunan eski besiyeri çekilerek 1mL PBS ile yıkandı. Transfeksiyon solüsyonu ve plazmidin inkübasyonun sonunda 2mL taze antibiyotik içermeyen besiyeri ile birlikte hücrelerin üzerine eklendi. 24 saat sonra transfeksiyonun gerçekleştiği hücrelerin seçilebilmesi için eski besiyeri çekildi. Büyüme besiyeri eklendi ve 3 günde bir besiyeri tazelenildi. Transfeksiyon için kullanılan solüsyon üreticinin önerisi doğrultusunda belirlenen 48 ve 72. saatler en yüksek olabilecek ekspresyon zamanı olarak değerlendirildi. Klotho geninin aktivasyonu (klotho+Caco-2) real time RT-PCR analizi ile karakterize edildi.

3.1.1.2. CRISPR/Cas9 genomik düzenlemeyle Caco-2 hücrelerinde klotho geninin silinmesi (knock-out)

Caco-2 hücrelerinde klotho gen silinmesini (knock-out, KO) sağlamak için CRISPR knock-out plazmid ve HDR plazmid kiti (Santa Cruz Biotechnology, ABD) kullanıldı. CRISPR/Cas9 knock-out plazmidi rehber-RNA sayesinde klotho geninin promotor bölgesinde çift zincir kırığı oluşturdu ve HDR plazmidi bu kırıklar ile homoloji göstererek genin inaktive edilmesini sağladı. CRISPR/Cas9 knock-out plazmidi üzerinde bulunan GFP (yeşil floresan protein) geni ve HDR plazmidi üzerinde bulunan RFD (kırmızı floresan protein) geni sayesinde ise görsel olarak seçilimi ve HDR plazmidde bulunan antibiyotik direnç geni sayesinde ise de seçilimi yapıldı (Şekil 3.2 ve 3.3).



Şekil 3.2. Klotho CRISPR/Cas9 KO plazmidi.



Şekil 3.3. Klotho HDR plazmidi.

CRISPR/Cas9 knock-out plazmidinin ve HDR plazmidinin transfeksiyonu üretici önerisi doğrultusunda aynı anda gerçekleştirildi. Transfeksiyon için hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarında (SPL Life Science, Gyeonggi, Kore), kuyucuk başına 3 mL antibiyotiksiz besiyeri içerisinde 2×10^5 olacak şekilde ekildi. Hücreler %70-90 konfluensiye ulaştırıldıktan 24 saat sonra transfeksiyon gerçekleştirildi. Liyofilize plazmid; 10 mM TRIS EDTA, 1 mM EDTA tampon çözelti içeren ultra saf, steril, DNaz içermeyen su içerisinde 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ olacak şekilde süspansiyon edildi.

Transfeksiyon öncesinde transfeksiyon solüsyonu oda ısısına getirildi. 2,5 μg plazmid serum içermeyen 200 μL besiyeri içerisinde çözüldü. Daha sonra içerisine 7,5 μL transfeksiyon solüsyonu (Transfectamine™ 5000 Transfection Reagent, AAT Bioquest, California, ABD) eklenerek oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. Hücrelerin üzerinde bulunan eski besiyeri çekilerek 1mL PBS ile yıkandı. Transfeksiyon solüsyonu ve plazmidin inkübasyonunun sonunda 2mL taze antibiyotik içermeyen besiyeri ile birlikte hücrelerin üzerine eklendi. 24 saat sonra transfeksiyonun gerçekleştiği hücrelerin seçilebilmesi için eski besiyeri çekildi. Büyüme besiyeri eklendi ve 3 günde bir besiyeri tazelenildi. Transfeksiyon için kullanılan solüsyon üreticisinin önerisi doğrultusunda belirlenen 48 ve 72. saatler en yüksek ekspresyon zamanı olan değerlendirildi. Klotho geninin knock-out edilmesi (KO klotho-Caco-2) real time RT-PCR analizi karakterize edildi.

3.1.2. CRISPR/Cas9 genomik düzenlemeyle Caco-2 hücrelerinde apoptozun ve ölüm reseptörlerinin değerlendirilmesi

3.1.2.1. qRT-PCR yöntemi ile mRNA düzeyinde gen ekspresyon analizi

Tüm gruplardaki hücrelerde TRAIL ilişkili apoptozun belirteçlerinin gen ifadesi düzeyindeki değişimleri belirlendi ve klotho+Caco-2 ve KO klotho-Caco-2 hücrelerinin klotho geni açısından karakterizasyonu yapıldı. Hücrelerden total RNA, Extractme Total RNA kiti (Blirt S.A., Gdańsk, Polonya) kullanılarak izole edildi. Tüm gruplardaki hücrelerde önce eski besiyeri çekilerek 3mL Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS ile 3 kez yıkama yapılarak eski besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilerek süspansiyon edildi. Tripsin-EDTA'yı nötralize etmek için tripsin miktarının en az iki katı kadar besiyeri eklendi. Süspansiyon hale gelen hücreler santrifüj tüpüne alınarak 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve PBS ile 2 kez yıkandı. Hücre içerisindeki mRNA'nın

elde edilmesi için santrifüj sonrası oluşan pellet 2mL eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 600µL RLys buffer ve 20µL AFreagent eklenerek 60 saniye vortekslendi. Açığa çıkan hücre artıklarının uzaklaştırılması için 12.000g'de 120 saniye santrifüj edildi. mRNA'nın etrafındaki suyun uzaklaştırmak için süpernatant yeni bir tüpe aktarılarak 600µL %70 ethanol eklenerek vortekslendi. Elde edilen karışım ayrıştırma kolonuna 700-800µL olacak şekilde aktarıldı ve 12.000g'de 15 saniye santrifüjlendi. Ayrıştırma kolonun üzerine 500µL yüksek alkol içeren RW2 buffer eklenerek 12.000g'de 60 saniye santrifüj edildi. Ayrıştırma kolonuna 90µL 10X DNase I reaction buffer ve 10µL reconstituted DNase I eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 600µL RW2 buffer eklenerek 12.000g'de santrifüj edildi. Sonrasında ayrıştırma kolonuna 700µL RW1 buffer eklenerek 12.000g'de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında 500µL RW2 buffer eklenerek 12.000g'de santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Ayrıştırma kolonu 12.000g'de 90 saniye santrifüj edildi ve yeni tüp üzerine yerleştirildi. Ayrıştırma kolonu yeni tüpe yerleştirdikten sonra 1-2 dakika ağzı açık bırakılarak alkolün uçması sağlandı. Son olarak 50µL REB buffer eklenerek 12.000g'de 60 saniye santrifüj edilerek RNA'nın ayrıştırma kolonun filtresinden tüpe aktarılması sağlandı. RNA konsantrasyonu nanodrop spektrofotometre ile ölçüldü. Elde edilen mRNA'lar cDNA sentez kiti (Transcriptme RNA kit, Blirt S.A., Gdansk, Polonya) kullanılarak komplementer DNA elde edildi. cDNA eldesi için 10µL 2xRT master mix, 2µL Transcriptme enzyme mix, nükleaz içermeyen su ve mRNA karıştırıldı. 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 30 dakika, 85°C'de 5 dakika ve 37°C'de 20 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA -20°C'de saklandı.

cDNA elde edilmesiyle birlikte, hedef genlere uygun probe-primerler (Tablo 3.2) ve SYBR Green RT-PCR kiti (Blirt S.A., Gdansk, Polonya) kullanılarak real time qRT-PCR (One-Step Thermo Scientific™ Carlsbad, ABD) cihazında gen amplifikasyonu ile hedef genler çoğaltılarak analizi gerçekleştirildi.

PCR döngüsü 95°C'de 3 dakika süre ile denatürasyon, ardından 95°C'de 5 saniye, 60°C'de 30 saniye süre ile 40 reaksiyon döngüsünden ve 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 1 dakika, 95°C'de 15 saniye süre ile son döngüden oluşuyordu.

qRealTime PCR sonrasında elde edilen Ct değerleri (threshold cycle) ile kontrol olarak GAPDH referans geni kullanılıp ham veri normalizasyonu ile $\Delta\Delta CT$ yöntemine dayalı gerçek zamanlı PCR verileri analiz edildi.

Tablo 3.2. Real time PCR analizi için sense ve antisense primerler.

Primerler	Baz dizilimleri (5' – 3')	
	Forward	Reverse
Klotho	TCAAAAAGTTCATCATGGAAACC	ATGAGGGACCATGCGGTAT
DR4	GGGTCCACAAGACCTTCAAGT	TGCAGCTGAGCTAGGTACGA
DR5	AGACCCTTGTGCTCGTTGTC	TTGTTGGGTGATCAGAGCAG
DcR1	CCCTAAAGTTCGTCGTCGTC	TGGTGGCAGAGTAAGCTAGGA
DcR2	CTTCATCGTCGCGGTTCT	CTGGACACTCCTCCTCCTTG
Kaspaz 3	TGGAATTGATGCGTGATGTT	TCCAAAATTATTCCTTCTTCACC
Kaspaz 8	GGTCACTTGAACCTTGGGAAT	TTTCTGCTGAAGTCCATCTTTTT
Bcl-2	TTGACAGAGGATCATGCTGTAATT	ATCTTTATTTTCATGAGGCACGTT
Bid	CATAAGGAGGAAGCGGGTAGT	TGGAACCGTTGTTGACCA
Bax	AGCAAAGTGGTGCTCAAGG	CTTGGATCCAGCCCAACA
Bad	ACCAGCAGCAGCCATCAT	GGTAGGAGCTGTGGCGACT
GAPDH	GCACAAGAAGAGAGAGACC	AGGGGAGATTCCGGTGTGGTG

3.1.1.2. WST-8 testi ile canlılık ve proliferasyon analizi

Sağlıklı kolon hücreleri (CCD841 CoN), kolon kanseri hücreleri (Caco-2), klotho+Caco-2 ve KO klotho-Caco-2 hücreleri için canlılık ve proliferasyonun değerlendirilmesinde 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST)-8 (AAT Bioquest, California, ABD) testi kullanıldı (Stoddart, 2011). Canlı ve apoptozun erken evresindeki hücrelerde WST-8 tetrazolium halkası mitokondride bulunan dehidrogenaz enzimiyle parçalanarak turuncu renkli formazan kristaller oluşturmaktadır fakat ölü hücreler formazan kristalleri oluşturamaz. Oluşan renk spektrofotometrik yöntemle ölçülerek hücrelerin canlılık ve proliferasyonu belirlenir.

Caco-2 kuyucuk başına 7×10^3 hücre, CCD841 CoN kuyucuk başına 5×10^3 hücre olacak şekilde 100 μ l besiyeri içerisinde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Caco-2 hücreleri klotho aktivasyon plazmidi ve knock-out-HDR plazmidi ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 24, 48ve 72 saat sonra 10 μ L/kuyucuk WST-8 solüsyonu eklendi. Hücreler 3 saat boyunca %5 CO₂, %95 bağıl nem ve 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası absorbans değerleri 460nm'de monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda (BIOTEK ELx808IU, Vermont, ABD) tespit edildi.

3.1.2.3. Annexin V/PI flow sitometri analizi ile apoptozun belirlenmesi

CCD841 CoN, Caco-2 ve genomik düzenleme yapılan hücrelerde apoptozun tespit edilmesinde Annexin V/PI boyaması (Cell Meter™ Live Cell Caspase 3/7 and Phosphatidylserine Detection kit, AAT Bioquest, California, ABD) yapıldı. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilerek süspansiyon edildi ve tripsin-EDTA'yı uzaklaştırmak için iki kez %10 FBS içeren DMEM ile yıkandı. 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek hücre pelleti oluşturuldu. 1:100 oranında dilüe edilmiş Annexin V-iFluor 488™ ve 1:500 oranında dilüe edilmiş propidyum iyodür (PI) eklenerek %5 CO₂, %95 bağıl nemde, 37°C'de ve 1 saat süresince inkübe edildi. Daha sonra hücreler 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. 1mL yıkama solüsyonu eklendi ve tekrar süspansiyon edilerek 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Pellet üzerine 500µL yıkama solüsyonu eklenerek Accuri™ C6 (BD Biosciences) flow sitometri cihazında okutuldu. BD Accuri™ C6 programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi.

3.1.2.4. Flow sitometri analizi ile TRAIL reseptörlerinin belirlenmesi

Tüm deney gruplarında TRAIL sinyal yolağının aktivite ya da inaktivitesi DR4, DR5, DcR1(BioLegend Way, ABD) ve DcR2 (Arigobiolaboratories, Tayvan) reseptörlerinin hücre yüzeyindeki ekspresyon seviyeleri açısından değerlendirildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler tripsin-EDTA ile süspansiyon edildi ve 2 kez PBS ile yıkandı. 100µL PBS içerisine 5µL DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 antikorları veya negatif kontrol fare IgG1 antikorunu eklendi ve karanlıkta 15-20 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Pellet üzerine 500µL PBS eklenerek FACSCanto II (BD Biosciences, Kaliforniya, ABD) flow sitometri cihazında okutuldu. Negatif kontrol temel alınarak pozitif hücre popülasyonu belirlendi. FACSDiva programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi.

3.1.2.5. İmmünohistokimyasal (İHK) analizler

Sağlıklı kolon hücreleri (CCD841 CoN), kolon kanseri hücreleri (Caco-2), klotho+Caco-2 ve KO klotho-Caco-2 hücrelerinde, TRAIL yolağının (aktivite ya da inaktivite) durumunu belirlemek (DR4, DR5) ve ekstrinsik/intrinsik apoptotik yolağın durumunu belirlemek (kaspaz 3 ve kaspaz 8) için immünohistokimyasal boyama yapıldı.

Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra metanolle 20 dakika fikse edildi. Fiksasyon sonrasında hücreler yeniden PBS ile yıkandı ve %1.5 normal blok serum içeren PBS’de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonrasında primer antikolar (DR4 1:100, DR5 1:100, kaspaz 3 1:100, kaspaz 8 1:100 ABclonal, Massachusetts, ABD) eklenip +4°C’de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 3 kez PBS ile yıkandı. Daha sonra immunfloresans boyama için uygun floresans (FITCve CF594) işaretli sekonder antikolarla 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücrelerin çekirdeklerini boyamak için DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) boyasını içeren kapatma solüsyonu (AAT Bioquest, California, ABD) ile kapatıldı. Hücreler floresan mikroskopta (Leica DM2500, Wetzlar Almanya) incelenerek fotoğraflandı.

3.1.2.6. İnvazyon analizi

Hücre motilitesi (hareketliliği) kanserde invazyon ve metastaz için oldukça önemli rol oynar. Klotho gen ekspresyonundaki değişimin Caco-2 hücrelerinde invazyon kapasitesine etkisini değerlendirmek için, in vitro model olarak kabul edilen in vitro yara iyileşme deneyi (scratch wound closure assays) yapıldı.

Sağlıklı kolon hücreleri (CCD841 CoN) $1,6 \times 10^4$ hücre/kuyucuk, kolon kanseri hücreleri (Caco-2), klotho+Caco-2 ve KO klotho-Caco-2 hücreleri 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür kabına ekildi ve % 80 konfluensiye ulaştırıldı. Kültür kabının tabanında göç alanı oluşturmak için bir pipet ucu ile çizildi. Transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra göç alanının fotoğrafları çekildi (Carl Zeiss Microscopy, CO₂ Module S1/Temp Module S1, ABD). Çekilen fotoğraflardan göç alanının alanı hesaplandı. Caco-2 hücrelerinin 24 sonundaki alan referans kabul edilerek yüzde kapanma oranı hesaplandı.

3.1.2.7. Koloni oluşturma potansiyelinin analizi

Sağlıklı kolon hücreleri (CCD841 CoN), kolon kanseri hücreleri (Caco-2), klotho+Caco-2 ve KO klotho-Caco-2 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyeli hesaplandı. Koloni oluşturma potansiyellerinin analizi için Caco-2 hücreleri 6-kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Her kuyucuk transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra kolonileri fikse etmek için soğuk metanolda 20 dakika bekletildi. %1.25 kristal violet ile boyanarak ışık mikroskobu (Carl Zeiss Axio Observer D1, Oberkochen, Almanya) altında sayıldı ve koloni oluşturma oranı hesaplandı.

3.2. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi ANOVA Tukey Post hoc test ve Student's T testi kullanılarak gerçekleştirildi. 0.05'ten kk p değerleri anlamlı olarak kabul edildi ($n = 3$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

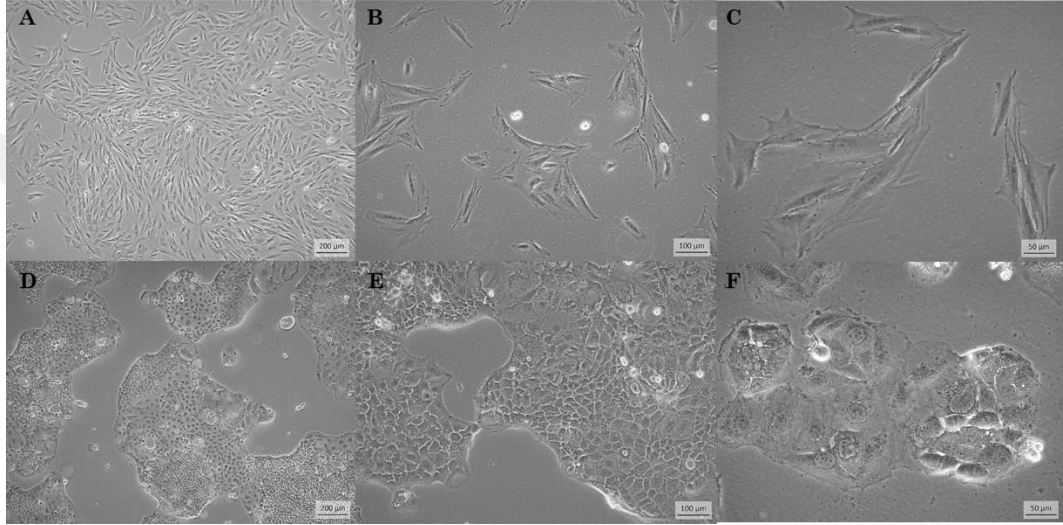
Real-time PCR analizinin istatistiksel değerlendirilmesinde, elde edilen Ct değerlerinden $\Delta\Delta Ct$ değerleri hesaplandı. Referans gen ile hedef gen arasındaki kat değişimi (fold change) gösterildi. Elde edilen verilerin Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk ile normal dağılımları değerlendirildi daha sonra ise ANOVA Tukey Post hoc testi ile istatistiksel anlamlılıkları değerlendirildi.



4. BULGULAR

4.1. Caco-2 ve CCD841CoN Hücrelerinin Kültürü

Hücreler kültür süresi boyunca günlük olarak faz-kontrast mikroskobu ile incelenerek fotoğraf çekimleri yapıldı. Yapılan mikroskobik incelemelerde Caco-2 hücreleri epitelyal şekilli kaldırım taşı dizilimli bir morfolojiye sahip iken CCD841 CoN hücreleri, içsi ve yıldızimsı şekilleri ile fibroblastik tipte morfoloji sergilediler. CCD841 CoN hücreleri arasında yer yer epitelyal şekilli hücre grupları varlığını korudu (Şekil 4.1).



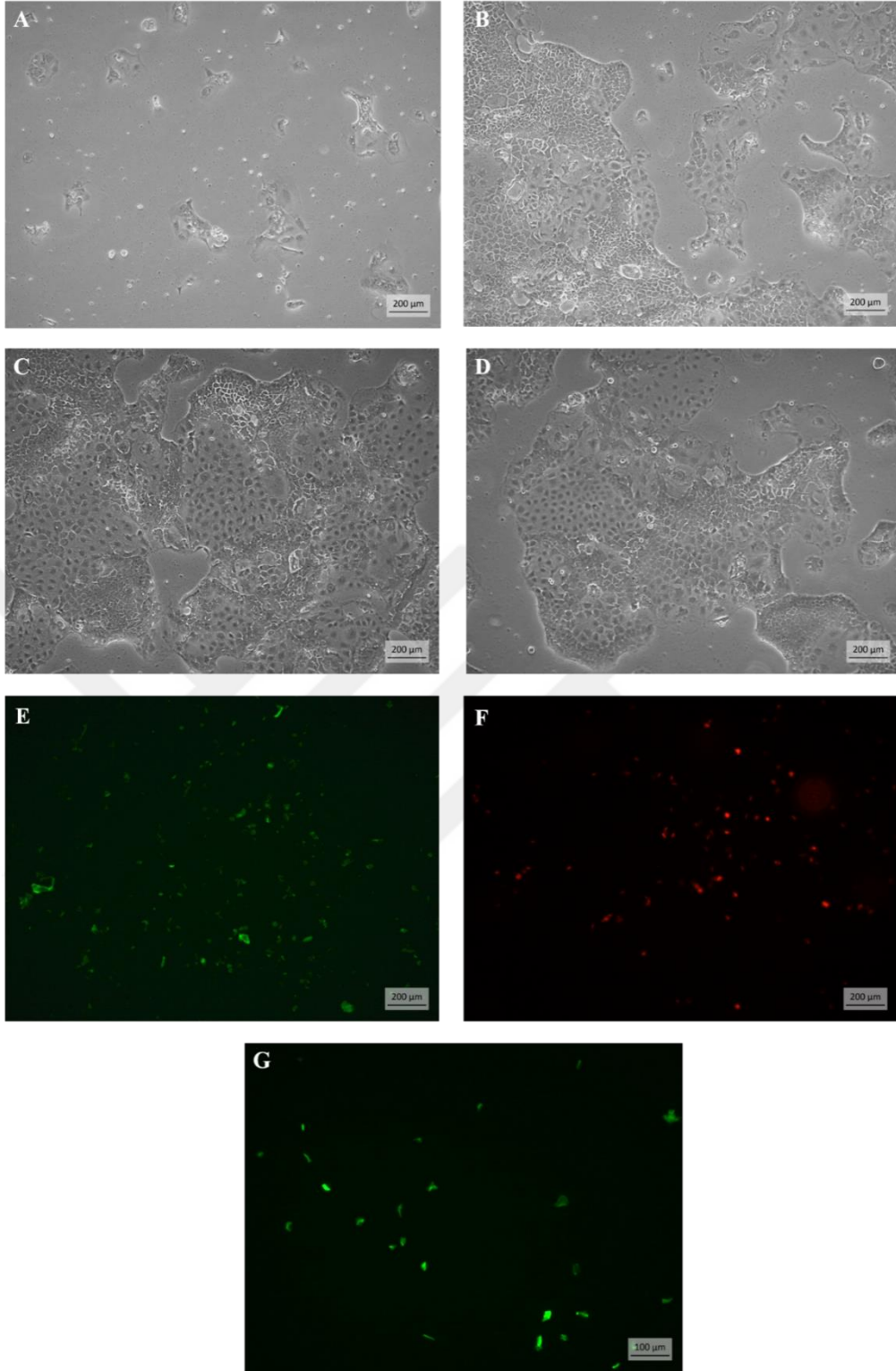
Şekil 4.1. Kültürdeki CCD841 CoN ve Caco-2 hücrelerinin morfolojik özellikleri (A-F). CCD841 CoN hücrelerinin kültürdeki erken ve ileri pasajlardaki faz-kontrast mikroskobik görünümleri izlenmektedir: (D) 11. pasaj, 6. gün. (E) 4. pasaj, 2. gün. (F) 9. pasaj, 6. gün.

Caco-2 hücrelerinin kültürdeki erken ve ileri pasajlardaki faz-kontrast mikroskobik görünümleri izlenmektedir: (A) 13. pasaj, 2.gün. (B) 2. pasaj, 9. gün. (C) 5. pasaj, 6.gün.

(Barlar: A-D 50 µm, B-E 100 µm, C-F 200 µm).

4.2. CRISPR/Cas9 Genomik Düzenlemeyle Caco-2 Hücrelerinde Klotho Geninin Aktivasyonu ve Silinmesinin (Knock-Out) Karakterizasyonu

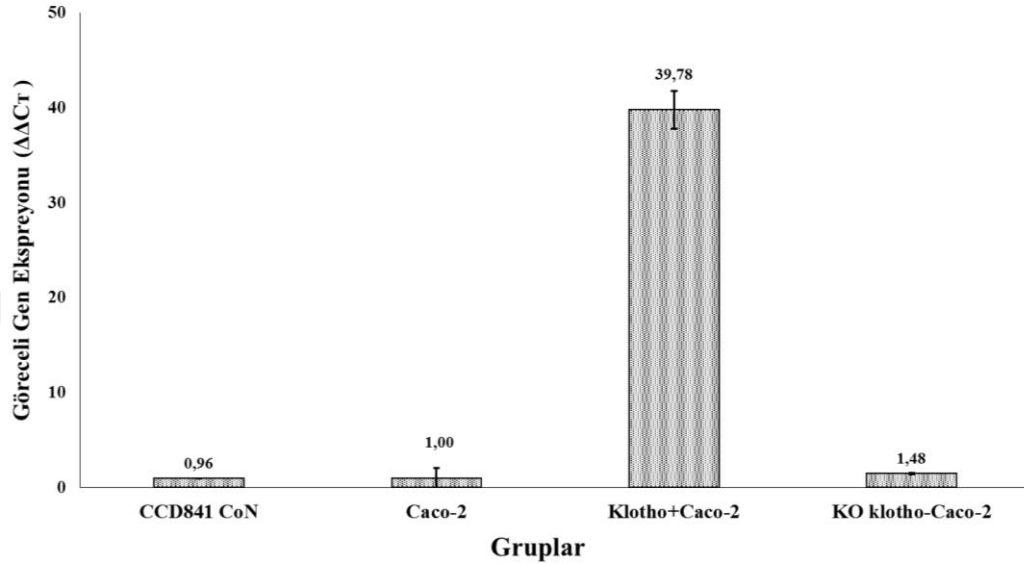
Caco-2 hücreleri; klotho ekspresyon vektörü, kontrol ekspresyon vektörü, KO (knock-out) kontrol vektörü ve KO klotho vektörü ile transfekte edildikten sonra faz-kontrast mikroskobu ile incelenerek fotoğraf çekimleri yapıldı. Caco-2 hücrelerine KO kontrol vektörü ve KO klotho vektörü transfekte edildikten sonra, GFP (yeşil floresans proteini) ve RFP (kırmızı floresans proteini) ekspresyonları floresans mikroskobu ile incelendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Caco-2 hücrelerine; klotho ekspresyon vektörü, kontrol ekspresyon vektörü knock-out kontrol vektörü ve knock-out klotho vektörü transfekte edildikten sonraki faz-kontrast ve floresans mikroskoptaki görüntüleri. **(A)** Klotho ekspresyon vektörü ile transfekte edilen Caco-2 hücreleri, **(B)** kontrol ekspresyon vektörü ile transfekte edilen Caco-2 hücreleri, **(C)** KO klotho vektörü ile transfekte edilen Caco-2 hücreleri, **(D)** KO kontrol vektörü ile transfekte edilen Caco-2 hücreleri, **(E-F)** KO klotho vektörü ile transfekte edilen Caco-2 hücrelerinin GFP ve RFP pozitif görüntüleri, **(G)** KO kontrol vektörü ile transfekte edilen Caco-2 hücrelerinin GFP pozitif görüntüleri (Barlar: A-F 200µm, G 100µm).

4.2.1. qRT-PCR analizi

Caco-2 hücrelerinde klotho geninin aktivasyonu ve silinmesinin (knock-out) karakterizasyon analizi yapıldı. Caco-2 hücrelerinde klotho geninin aktivasyonu ve knock-out edilmesinden hücrelerdeki klotho ekspresyon düzeyi transfeksiyon yapılmamış Caco-2 kolon kanser hücresine göre karşılaştırıldı.



Şekil 4.3. Tüm gruplardaki klotho geninin hücre içi gen ekspresyon değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir. Kontrol grubu olarak gen aktarılmamış Caco-2 hücreleri kullanıldı (n=3, $p>0.05$).

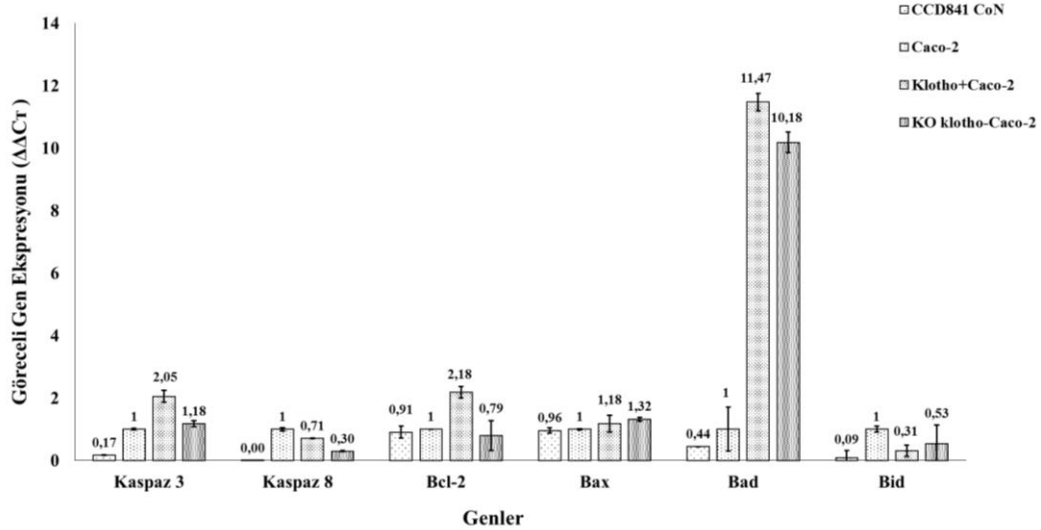
Caco-2 hücrelerinde klotho geninin aktivasyonu ve knock-out edilmesi ile Caco-2 hücrelerindeki klotho ekspresyon düzeyi sırasıyla 39,78 ve 1,48 kat artmış olarak bulundu. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,361$) (Şekil 4.3).

4.3.Caco-2 Hücrelerinde Klotho Geninin Aktivasyonu ve Knock-Out Edilmesi İle Apoptozun Belirlenmesi

4.3.1. qRT-PCR analizi

Gen aktarılmamış Caco-2 hücrelerine göre klotho+Caco-2 hücrelerinde kaspaz 3, kaspaz 8, bcl₂, bid, bax ve bad genlerinin ekspresyon seviyelerinin sırasıyla 2.05, 0.71, 2.18, 0.31, 1.18 ve 11.47 kat arttığı görüldü. KO klotho-Caco-2 hücrelerinde ise kaspaz 3 (1.18 kat), kaspaz 8 (0.30 kat), bcl-2 (0.79 kat), bid (0.53 kat), bax (1.32 kat) ve bad (10.18 kat) genlerinin ekspresyon seviyelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,361$).

Klotho+Caco-2 hücrelerinde KO klotho-Caco-2 hücrelerine göre kaspaz 3, kaspaz 8, bcl-2, bad genlerinin ekspresyonları artarken, bid ve bax genlerinin ekspresyonu azaldı. Caco-2 hücrelerinde kaspaz 3 geninin ekspresyonunun artması klothonun apoptozu ekstrinsik yoldan tetiklediğini gösterir (Şekil 4.4).

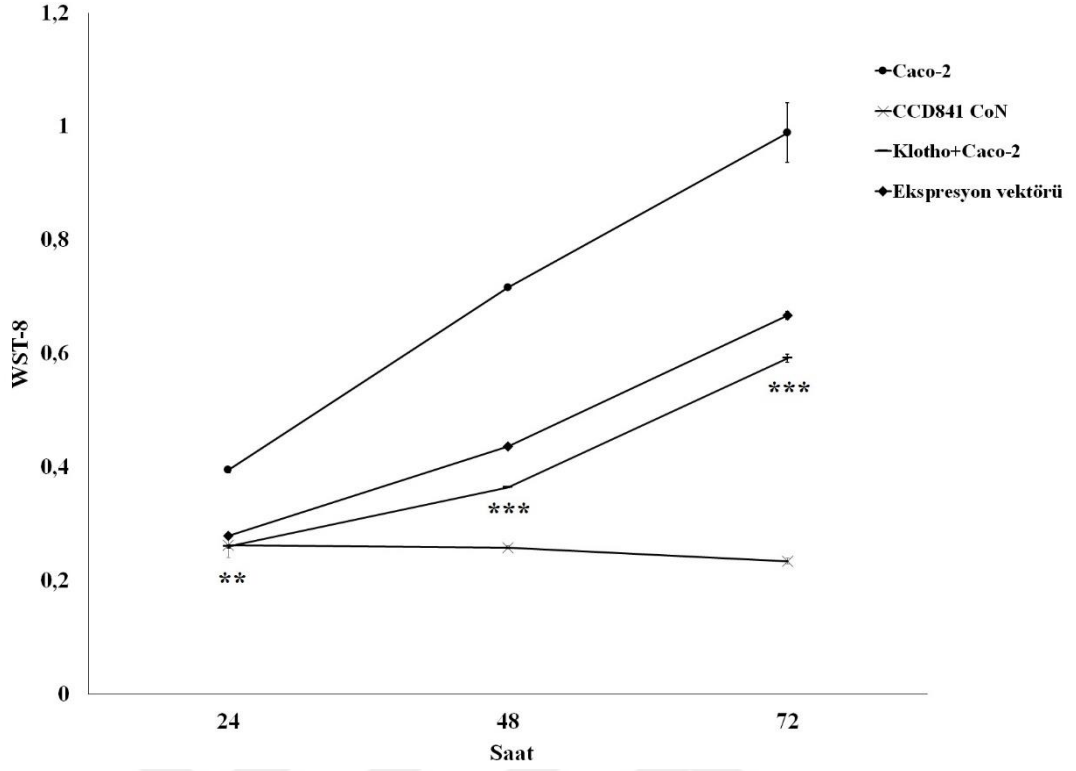


Şekil 4.4. Kaspaz 3, kaspaz 8, bcl-2, bid, bax ve bad genleri tüm gruplardaki hücelere göre hücre içi gen ekspresyon değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir. Kontrol grubu olarak gen aktarılmamış Caco-2 hücreleri kullanıldı (n=3, $p>0.05$).

4.3.2. WST-8 testi

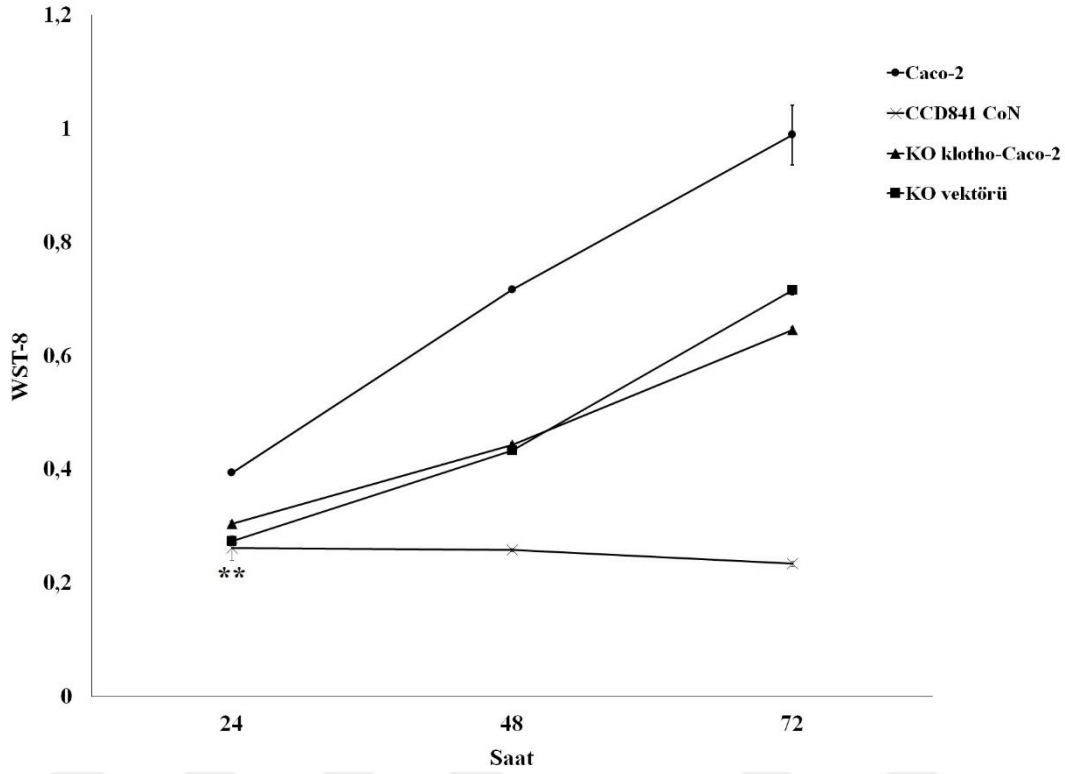
Klothonun kolon kanser hücrelerinde (Caco-2) canlılık ve proliferasyona etkisi WST-8 testi ile analiz edildi. Caco-2 hücrelerinde klotho gen ekspresyonu CRISPR/Cas9 genomik düzenleme tekniği ile klotho geninin aktivasyonu ve knock-out yapıldı.

Transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra Caco-2 hücrelerinin canlılığı analiz edildi. Klotho gen ekspresyonunun artırılması sonucunda 24 (** $p<0.01$), 48 (***) $p<0.001$) ve 72 (***) $p<0.001$) saat sonra hücre canlılığı ekspresyon vektörünün hücre canlılığına göre ileri derecede anlamlı oranda azaldı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Caco-2 hücrelerine klotho ekspresyon vektörü ve kontrol ekspresyon vektörü ile transfeksiyonundan 24, 48 ve 72 saat sonra hücrelerin canlılık sonuçları. Kontrol ekspresyon vektörü ile transfekte edilen hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı (n=3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$).

Klotho geninin knock-out'u sonucunda, 24 saat sonunda Caco-2 hücre canlılığı knock-out vektörüne göre artarken (** $p<0.01$), 48 ve 72 saat sonunda hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Caco-2 hücrelerine klotho knock-out vektörü ve kontrol knock-out vektörü ile transfeksiyonundan 24, 48 ve 72 saat sonra hücrelerin canlılık sonuçları. Kontrol knock-out vektörü ile transfekte edilen hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı (n=3, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ *** $p<0.001$).

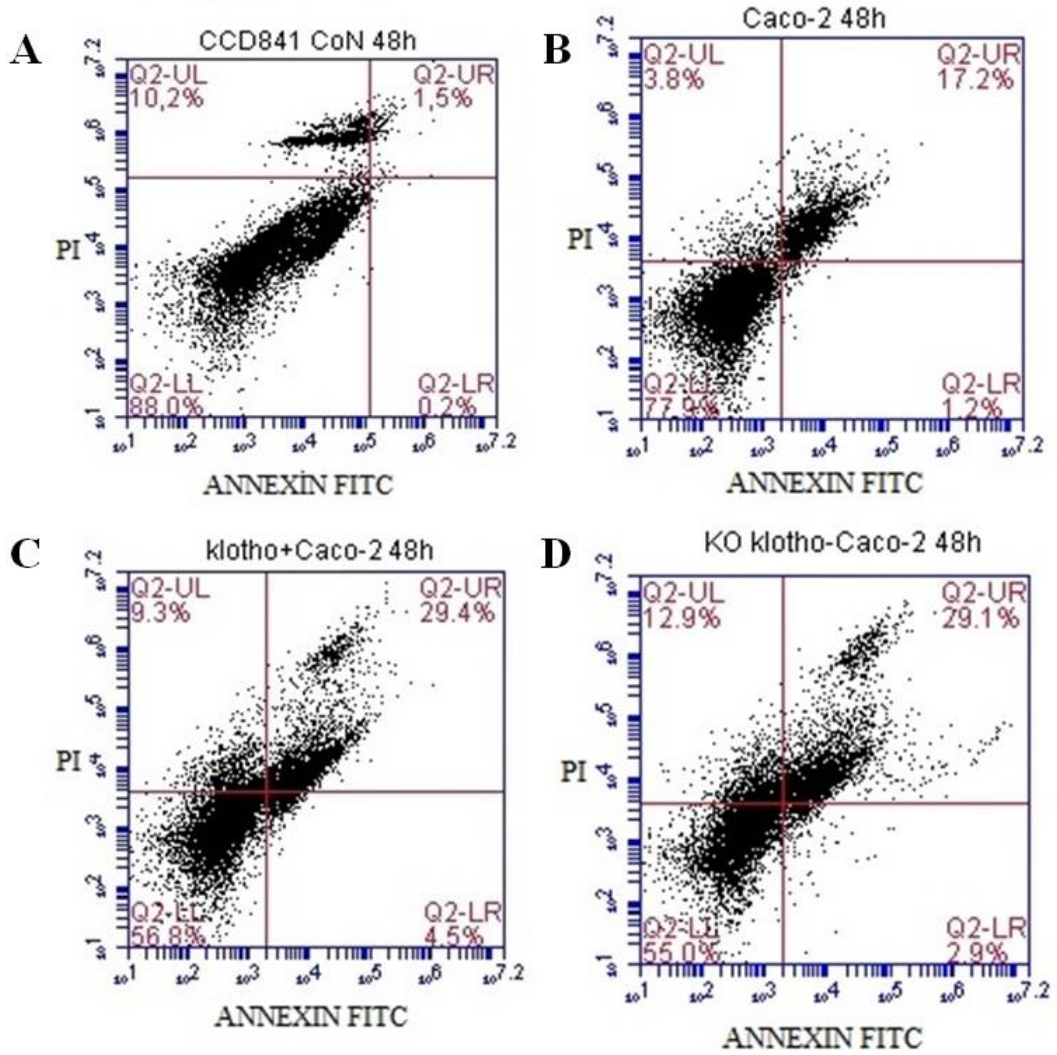
4.3.3. Annexin V/PI flow sitometri analizi

Gen transfeksiyonu yapılmayan sağlıklı kolon hücreleri (CCD841 CoN) 48 saat sonunda flow sitometri yöntemiyle analiz edildi. Bu hücrelerdeki hücre canlılığı %88.0, erken apoptoz %0.2, geç apoptoz %1.5, nekroz ise %10.2 oranında idi.

Klotho gen transfeksiyonunun 48 saat sonra kolon kanser hücreleri üzerindeki canlılığa etkisi AnnexinV/PI flow sitometri yöntemiyle analiz edildi. Kolon kanser hücrelerinde (Caco-2) hücre canlılığı %77.9, erken apoptoz %1.2, geç apoptoz %17.2, nekroz ise %3.8 oranındaydı.

48 saat sonunda klotho geni aktive edilmiş kolon kanser hücrelerinde (Klotho+Caco-2) hücre canlılığı %56.8, erken apoptoz %4.5, geç apoptoz %29.4, nekroz ise %9.3 oranında idi. Klotho geni silinmiş kolon kanseri (KO Klotho-Caco-2)

hücrelerinde hücre canlılığı %55.0, erken apoptoz %2.9, geç apoptoz %29.1, nekroz ise %12.9 oranındaydı (Şekil 4.7).



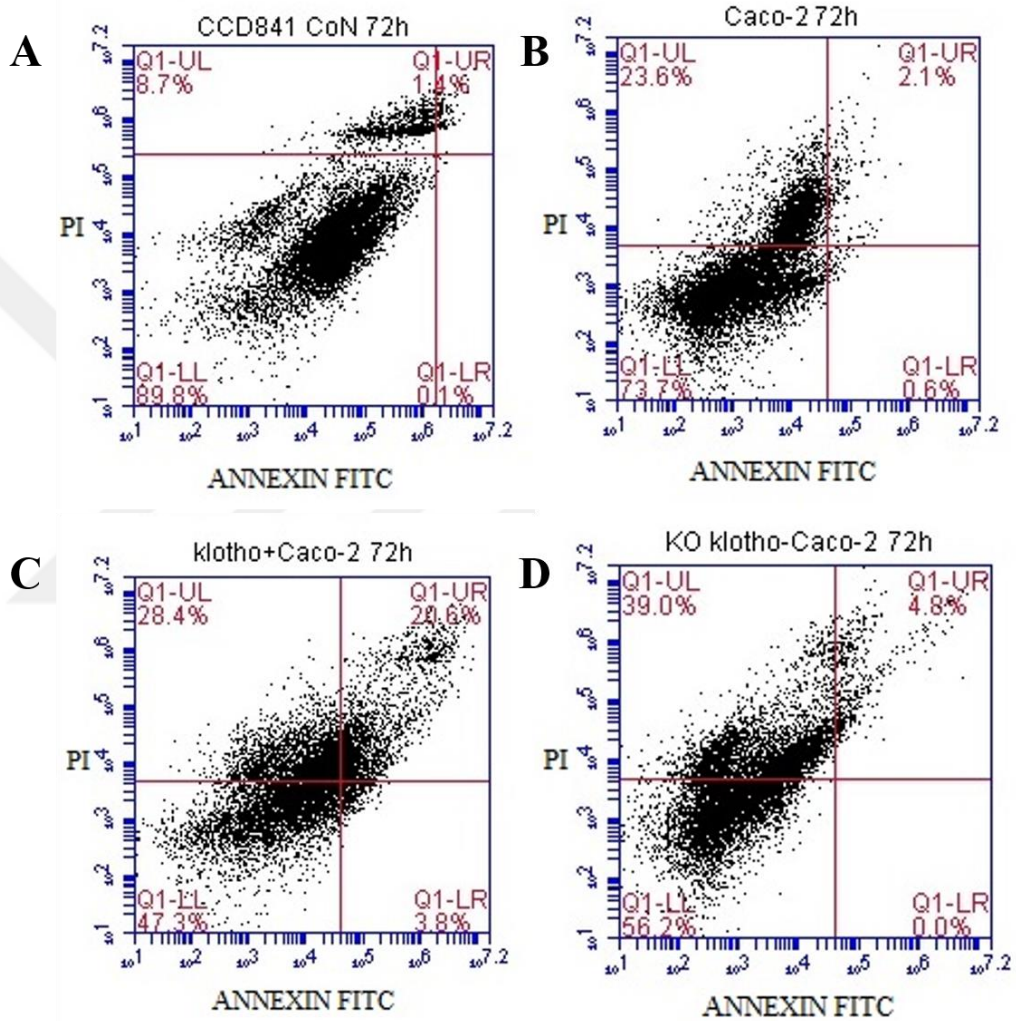
Şekil 4.7. Caco-2 hücrelerine transfeksiyondan 48 saat sonra klotho gen ekspresyonundaki değişimin apoptotik etkisinin Annexin V/PI flow sitometri yöntemi ile analizi. (A) CCD841 CoN, (B) Caco-2, (C) klotho+Caco-2, (D) KO klotho-Caco-2 hücreleri. (LL: Canlılık, LR: Erken apoptoz, UR: Geç apoptoz, UL: Nekroz).

Gen transfeksiyonu yapılmayan sağlıklı kolon hücreleri (CCD841 CoN) 72 saat sonunda flow sitometri yöntemiyle analiz edildi. Bu hücrelerdeki hücre canlılığı %89.8, erken apoptoz %0.1, geç apoptoz %1.4, nekroz ise %8.7 oranında idi.

Klotho gen transfeksiyonunun 72 saat sonra kolon kanser hücreleri üzerindeki canlılığa etkisi flow sitometri (AnnexinV/PI) yöntemiyle analiz edildi. Kolon kanser

hücrelerinde (Caco-2) hücre canlılığı %73.7, erken apoptoz %0.6, geç apoptoz %2.1, nekroz ise %23.6 oranındaydı.

72 saat sonunda klotho+Caco-2 hücre canlılığı %47.3, erken apoptoz %3.8, geç apoptoz %20.6, nekroz ise %28.4 oranında idi. KO klotho-Caco-2 hücrelerinde hücre canlılığı %56.2, erken apoptoz %0.0, geç apoptoz %4.8, nekroz ise %39.0 oranında idi (Şekil 4.8).



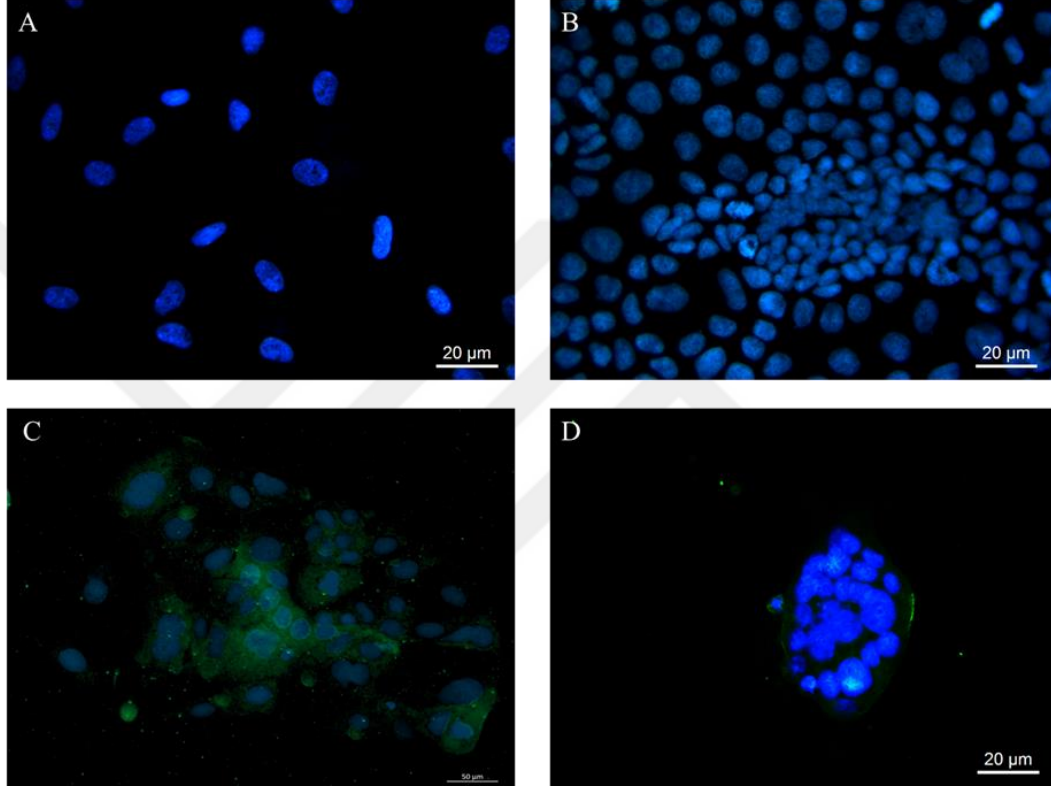
Şekil 4.8. Caco-2 hücrelerine transfeksiyondan 72 saat sonra klotho gen ekspresyonundaki değişimin apoptotik etkisinin Annexin V/PI flow sitometri yöntemi ile analizi. (A) CCD841 CoN, (B) Caco-2, (C) klotho+Caco-2, (D) KO klotho-Caco-2 hücreleri. (LL: Canlılık, LR: Erken apoptoz, UR: Geç apoptoz, UL: Nekroz).

4.3.4. İmmünohistokimya analizi

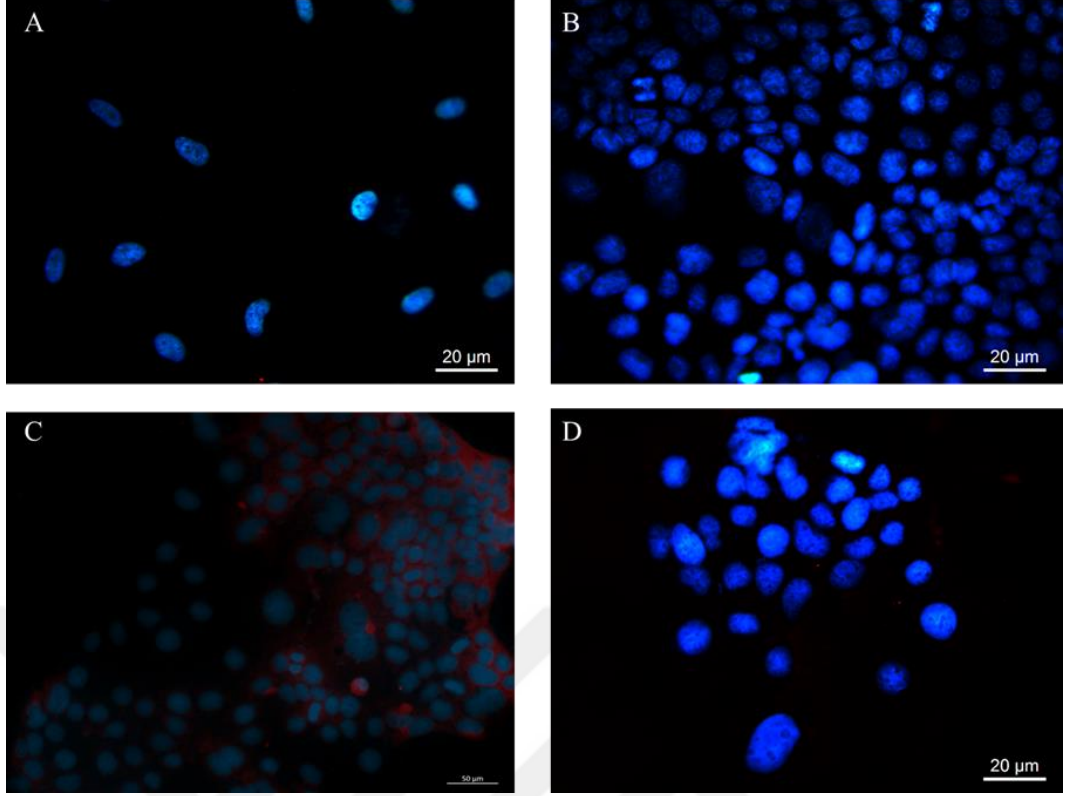
Hücrelerde apoptoz belirteçleri kaspaz 3 ve kaspaz 8 antikoları ile boyanarak gösterildi (Şekil 4.9 ve 4.10). Kaspaz 3 ekspresyon aktivitesini gösteren hücreler FITC

ile işaretlenerek yeşil, kaspaz 8 ekspresyon aktivitesini gösteren hücreler CFL-594 ile boyanarak kırmızı ile gösterildi. Çekirdek boyası için DAPI kullanılarak mavi olarak gösterildi.

Klotho geninin ekspresyon değişimi sonucunda CCD841 CoN ve Caco-2 hücrelerinde kaspaz 3 ve kaspaz 8 belirteçlerinin negatif immunreaktivitesi gösterildi. Kaspaz 3 ve kaspaz 8 belirteçleri için pozitif immunreaktivite klotho+Caco-2 hücrelerinde daha fazla iken KO klotho+Caco-2 hücrelerinde de görüldü.



Şekil 4.9.Caco-2 hücrelerinde klotho geninin aktivasyonu ve knock-out edilmesi sonucunda kaspaz 3 aktivitesini gösteren hücreler FITC ile boyanarak yeşil renkte gösterilmiştir. Çekirdek boyası olarak DAPI kullanılmıştır. (A) CCD841 CoN, (B) Caco-2, (C) klotho+Caco-2, (D) KO klotho-Caco-2 hücrelerinin immunfloresans boyama görüntüleri izlenmektedir (barlar A-B-D 20µm, C 50µm).



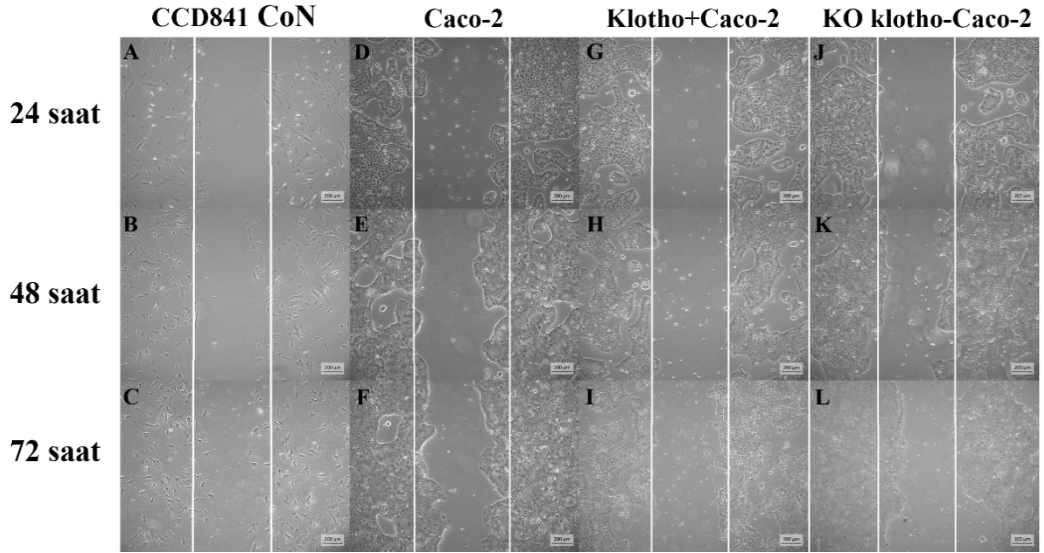
Şekil 4.10. Caco-2 hücrelerinde klotho geninin aktivasyonu ve knock-out edilmesi sonucu kaspaz 8 aktivitesini gösteren hücreler CFL-594 ile boyanarak kırmızı renkte gösterilmiştir. Çekirdek boyası olarak DAPI kullanılmıştır. (A) CCD841 CoN, (B) Caco-2, (C) klotho+Caco-2, (D) KO klotho-Caco-2 hücrelerinin immünfloresans boyama görüntüleri izlenmektedir (barlar A-B-D 20µm, C 50µm).

4.3.5. İnvazyon analizi

Klotho gen ekspresyonundaki değişimin Caco-2 hücrelerinde invazyon kapasitesine etkisi in vitro yara iyileşme deneyi ile değerlendirildi. Serum içeren besiyerinde 24, 48 ve 72 saat sonunda yara bölgesinin kapanması gözlemlendi.

CCD841 CoN hücrelerinde yara iyileşmesi 24 saat sonunda yoktu fakat 48 ve 72 saat sonunda yara bölgesinin çevresinden yara bölgesine doğru hücre göçü başladı (Şekil 4.11).

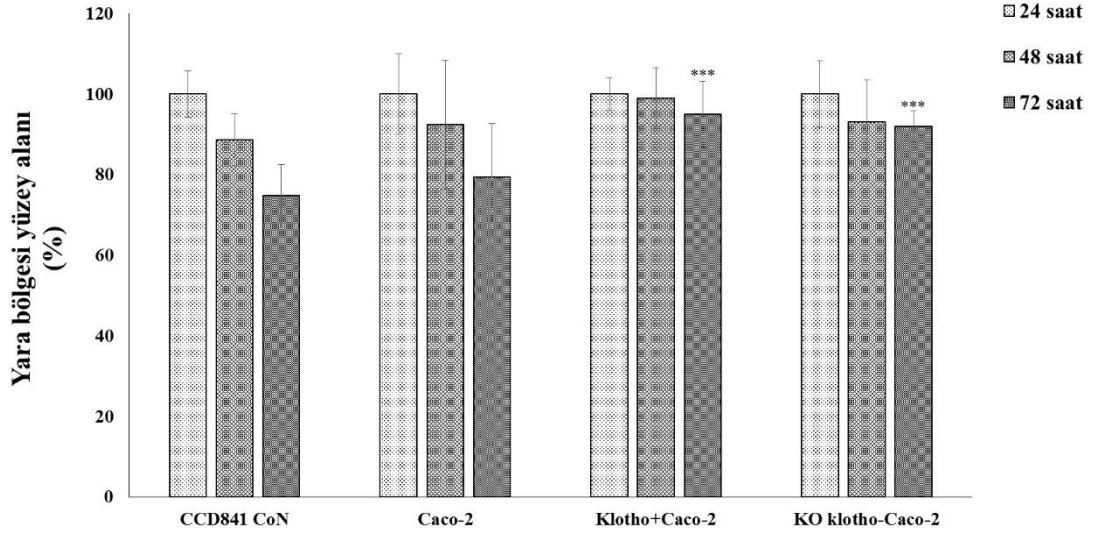
24 saat sonunda Caco-2 hücrelerinde iyileşme (hücre göçü) görülürken diğer iki grupta (klotho+Caco-2 ve KO klotho-Caco-2) iyileşme gözlenmedi. 48 ve 72 saat sonunda Caco-2 hücrelerindeki yara iyileşmesi diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksekti. Klotho+Caco-2 hücrelerinde ise yara iyileşmesi görülmedi (Şekil 4.11 ve 4.12).



Şekil 4.11.Sağlıklı kolon hücreleri, kolon kanser hücreleri ve klotho ekspresyonu değiştirilen kolon kanser hücrelerinde in vitro yara iyileşme analizi. (A-C) Yara oluşturulduktan 24, 48 ve 72 saat sonra CCD841 CoN hücreleri, (D-F) Yara oluşturulduktan 24, 48 ve 72 saat sonra Caco-2 hücreleri, (G-I) Yara oluşturulduktan ve klotho vektörü ile transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra klotho+Caco-2 hücreleri, (J-L) Yara oluşturulduktan ve klotho knock-out vektörü ile transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra KO klotho-Caco-2 hücreleri (Barlar:200µm).

Sağlıklı kolon hücrelerinde 48 saat sonundaki yara iyileşme oranı %11 iken 72 saat sonunda %25'ti. Kolon kanser hücrelerinde 48 saat sonunda yara iyileşme oranı %8 iken 72 saat sonunda %21'di. Klotho+Caco-2 hücrelerinde 48 saat sonundaki yara iyileşme oranı %1 iken 72 saat sonunda %5'ti. KO klotho-Caco-2 hücrelerinde 48 saat sonundaki yara iyileşme oranı %7 iken 72 saat sonunda %8'di.

48 saat sonunda Caco-2 hücrelerindeki yara iyileşme oranı klotho+Caco-2 hücrelerine göre %7, 72 saat sonunda ise %16 (***) $p < 0.001$) oranında daha fazlaydı. Caco-2 hücreleri KO klotho-Caco-2 hücrelerine göre 48 saat sonunda %1 oranında, 72 saat sonunda %13 (***) $p < 0.001$) oranında yara iyileşme oranına sahipti. Klotho+Caco-2 hücrelerinde KO klotho-Caco-2 hücrelerine göre 72 saatin sonunda yara iyileşme oranı %3 daha azdı (Şekil 4.12).

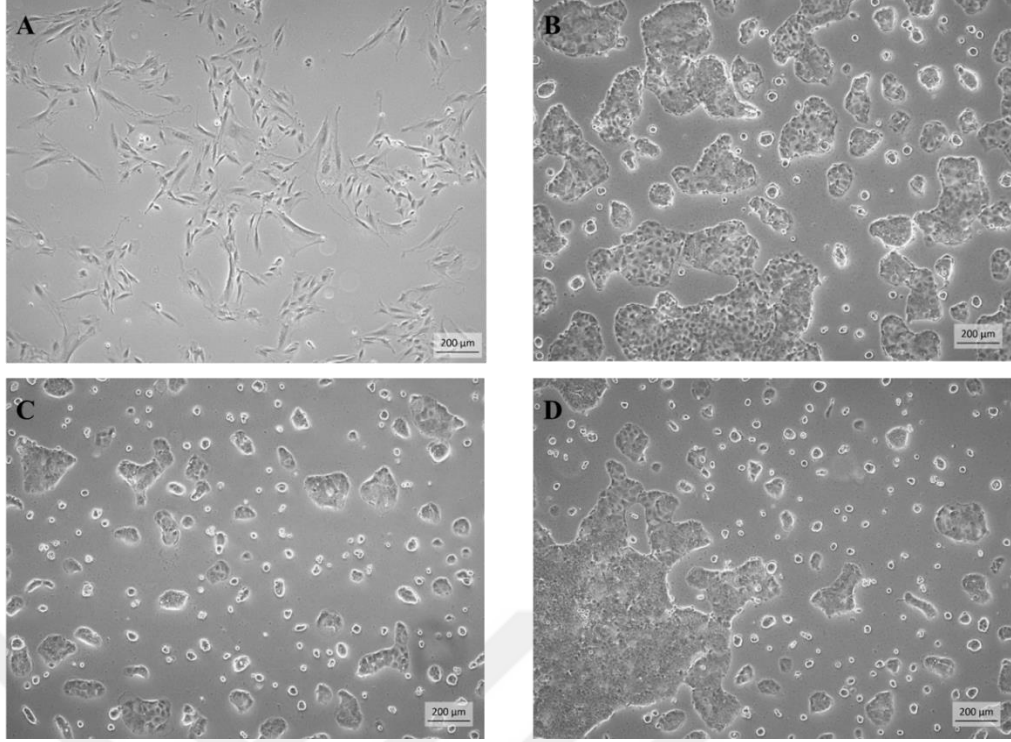


Şekil 4. 12. Klotho gen ekspresyonundaki değişimin (klotho geninin aktivasyonu ve knock-out) Caco-2 hücrelerinde invazyon kapasitesine etkisi. Yara bölgesi oluşturulduktan 24, 48 ve 72 saat sonunda çekilen fotoğraflarda yara bölgesindeki alan hesaplandı. Caco-2 hücreleri kontrol olarak kabul edildi. (n=3, * p <0.05, ** p <0.01 *** p <0.001).

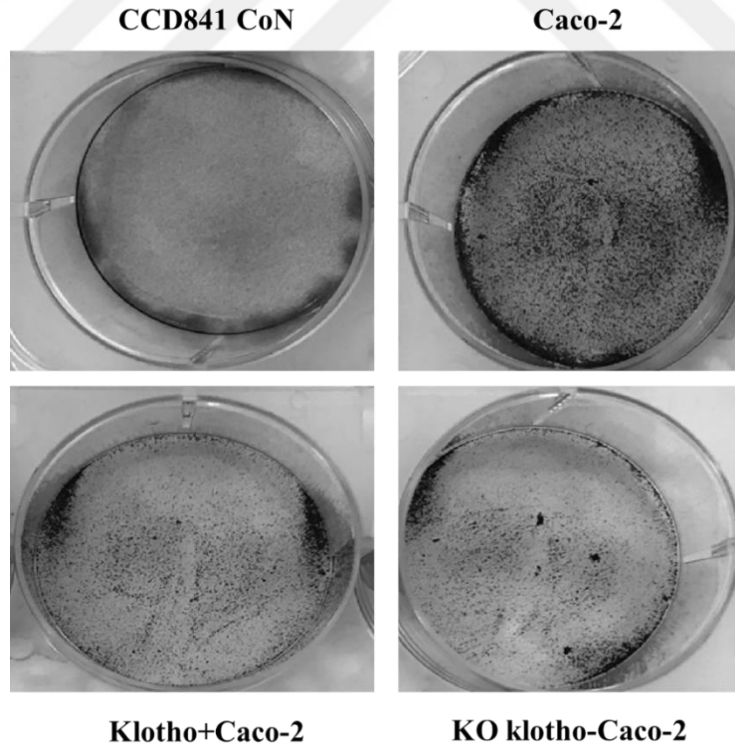
4.3.6. Koloni oluşturma potansiyeli analizi

Kolon kanser hücrelerine (Caco-2) klotho geni transfekte edildikten 24, 48 ve 72 saat sonra hücrelerin koloni oluşturma potansiyelleri analiz edildi.

Transfeksiyondan 48 saat sonra klotho+Caco-2 hücrelerinde oluşan koloni sayısı kontrol grubuna göre düşüktü (Şekil 4.13 ve 4.14).



Şekil 4.13. Transfeksiyondan 48 saat sonra klotho geninin aktivasyonu ve knock-out edilmesiyle oluşan Caco-2 hücre kolonilerinin faz kontrast mikroskopik görüntüleri. (A) CCD841 CoN, (B) Caco-2, (C) klotho+Caco-2, (D) KO klotho-Caco-2 (Barlar: 200µm).



Şekil 4.14. Transfeksiyondan 48 saat sonra klotho geninin aktivasyonu ve knock-out edilmesiyle oluşan Caco-2 hücre kolonilerinin kristal violet ile boyama sonrası makroskopik görüntüleri.

4.4. Caco-2 Hücrelerine Klotho Geninin Aktivasyonu ve Knock-Out Edilmesinin TRAIL Reseptörlerine Etkisi

4.4.1. Flow sitometri analizi

Klotho gen ekspresyonundaki değişimin TRAIL reseptörlerine etkisi flow sitometri analizi ile değerlendirildi (Şekil 4.15). TRAIL reseptörlerinden DR4 reseptörünün sağlıklı kolon hücrelerindeki (CCD841 CoN) oranı %60.29, kolon kanser hücrelerinde (Caco-2) %72.98, klotho gen ekspresyonu artırılmış kolon kanser hücrelerinde (klotho+Caco-2) %63.55 ve klotho geni knock-out edilmiş kolon kanser hücrelerinde (KO klotho-Caco-2) %60.70'ti.

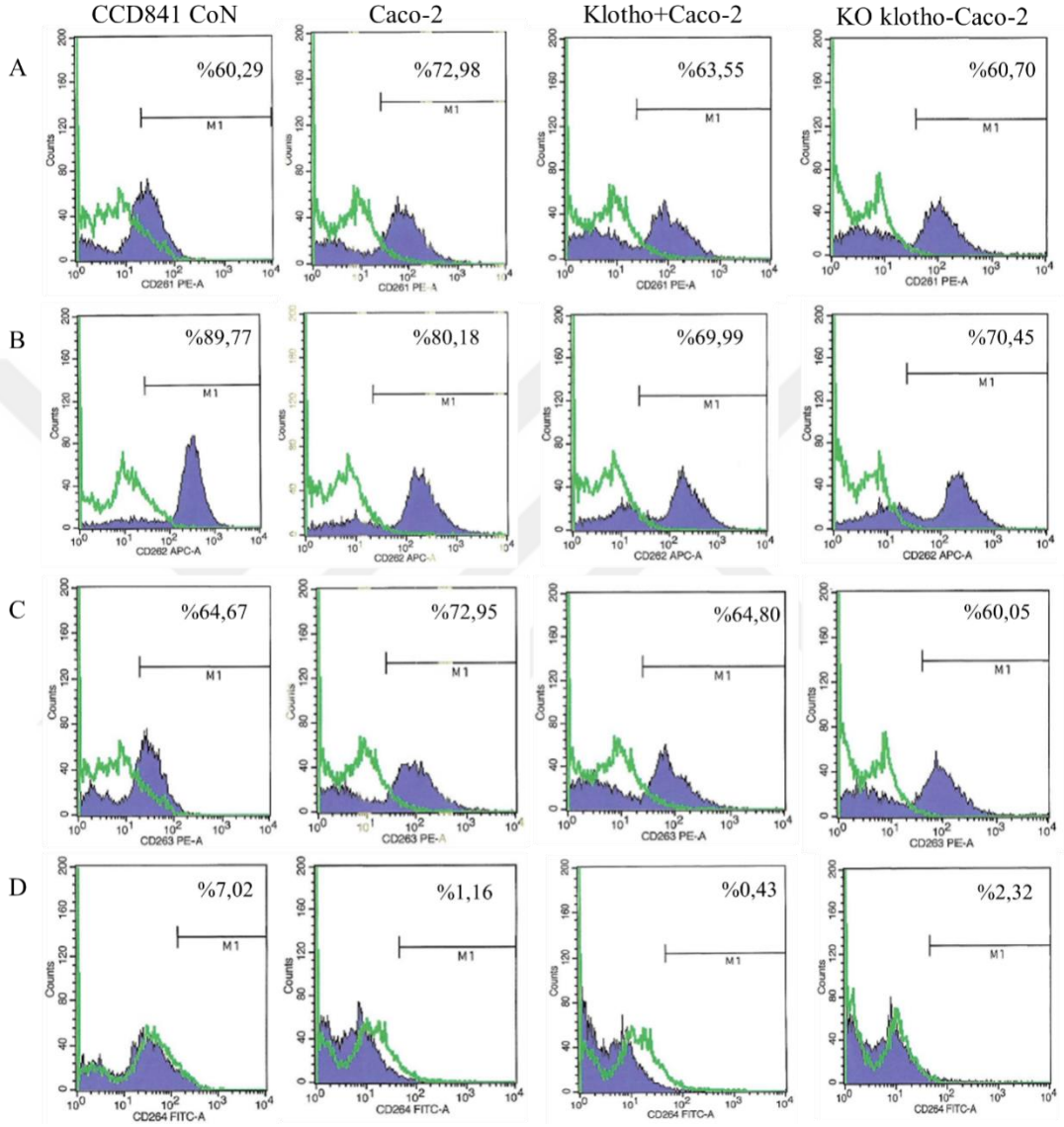
CCD841 CoN hücrelerinde bulunan DR4 reseptörü Caco-2 hücrelerine göre %12.69 oranında daha azdı. Klotho+Caco-2 uygulanan hücrelerdeki DR4 reseptör sayısı gen aktarılmamış Caco-2 hücrelerine (kontrol) göre azaldı (% 9.43). KO klotho-Caco-2 uygulanan hücrelerdeki DR4 reseptörleri gen aktarılmamış Caco-2 hücrelerine göre %12.28 oranında azaldı.

DR5 reseptör sayısı CCD841 CoN hücrelerinde %89.77, Caco-2 hücrelerinde %80.18, klotho+Caco-2 hücrelerinde %69.99, KO klotho-Caco-2 hücrelerinde ise %70.45 oranındaydı. CCD841 CoN hücrelerinde bulunan DR5 reseptörü Caco-2 hücrelerine göre %9.59 oranında daha fazlaydı. Klotho+Caco-2 uygulanan hücrelerdeki DR5 reseptör sayısı Caco-2 hücrelerine göre %10.19 oranında azalmıştı. KO klotho-Caco-2 uygulanan hücrelerdeki DR5 reseptör sayısı Caco-2 hücrelerine göre %9.73 oranında azaldı.

DcR1 tuzak reseptörü CCD841 CoN hücrelerinde %64.67, Caco-2 hücrelerinde %72.95, klotho+Caco-2 hücrelerinde %64.80, KO klotho-Caco-2 hücrelerinde ise %60.05 oranındaydı. CCD841 CoN hücrelerinde bulunan DcR1 reseptörü Caco-2 hücrelerine göre %8.28 daha azdı. Klotho+Caco-2 uygulanan hücrelerdeki DcR1 reseptör sayısı Caco-2 hücrelerine göre %8.15 oranında azaldı. KO klotho-Caco-2 uygulanan hücrelerdeki DcR1 reseptör sayısı gen aktarılmamış Caco-2 hücrelerine göre %12.09 oranında azaldı.

DcR2 tuzak reseptör sayısı CCD841 CoN hücrelerinde %7.02, Caco-2 hücrelerinde %1.16, klotho+Caco-2 hücrelerinde %0.43, KO klotho-Caco-2 hücrelerinde ise %2.32 oranında idi. CCD841 CoN hücrelerinde bulunan DcR2

reseptörü Caco-2 hücrelerine göre %5.86 oranında daha fazlaydı. Klotho+Caco-2 uygulanan hücrelerdeki DcR2 reseptör sayısı Caco-2 hücrelerine göre %0.73 oranında azaldı. KO klotho-Caco-2 uygulanan hücrelerdeki DcR2 reseptör sayısı gen aktarılmamış Caco-2 hücrelerine göre %1.16 oranında arttı.



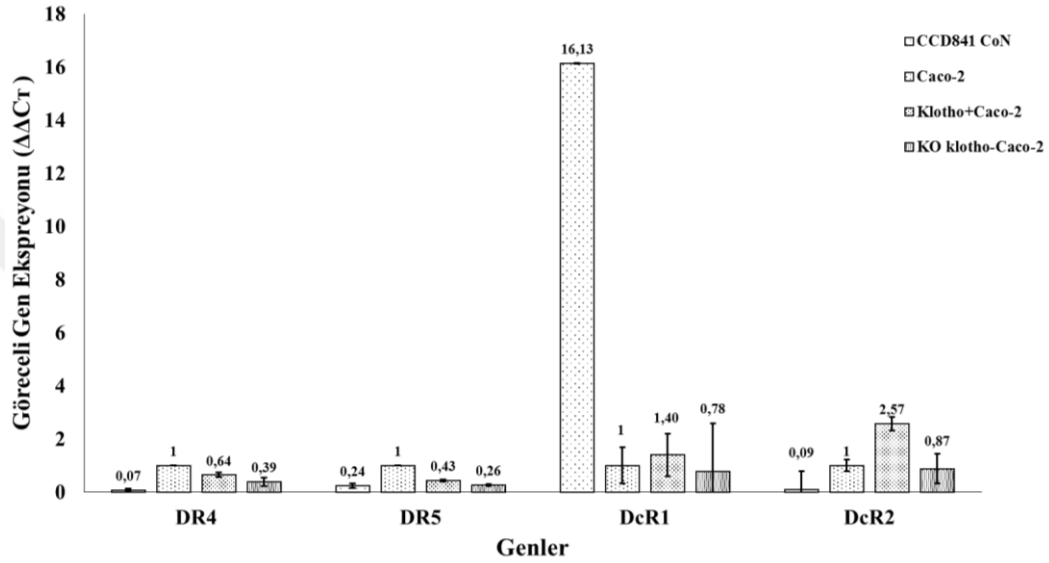
Şekil 4.15. Caco-2 hücrelerinde klotho gen ekspresyonundaki değişimin (klotho geninin aktivasyonu ve knock-out) TRAIL reseptörlerine etkisinin flow sitometri yöntemiyle analizi. Ölüm reseptör antijenleri (A) CD261; DR4 ve (B) CD262; DR5. Tuzak reseptör antijenleri (C) CD263; DcR1 ve (D) CD264; DcR2. Histogram üzerinde antijenler mor renk ile izotip antikoları (negatif kontrol) ise yeşil renk ile gösterildi.

4.4.2. qRT-PCR analizi

Klotho+Caco-2 hücrelerindeki DR4 (0.64 kat), DR5 (0.43 kat), DcR1 (1.40 kat) ve DcR2 (2.57 kat) genlerinin ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre arttı. KO

klotho-Caco-2 hücrelerinde DR4 geninin 0.39, DR5 geninin 0.26, DcR1 geninin 0.78 ve DcR2 geninin ise 0.87 kat arttığı tespit edildi. CCD841 CoN hücrelerindeki DcR1 geni Caco-2 hücrelerindeki göre 16.13 kat artmış bulundu. Gen ekspresyon değişimindeki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,361$).

Klotho+Caco-2 hücrelerinde bulunan DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerinin ekspresyon seviyelerindeki artışın KO klotho-Caco-2 hücrelerine göre fazla olduğu görüldü (Şekil 4.16).

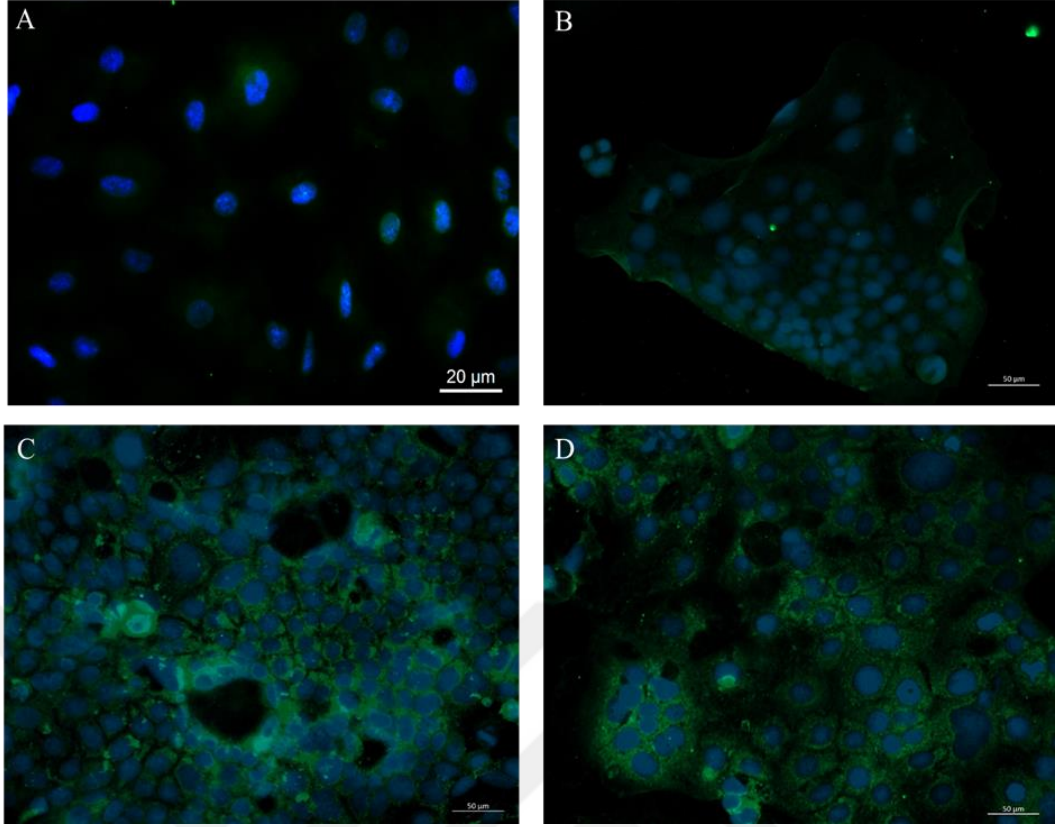


Şekil 4.16. DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerinin tüm gruplardaki hücelere göre hücre içi gen ekspresyon değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir. Kontrol grubu olarak gen aktarılmamış Caco-2 hücreleri kullanıldı ($n=3$, $p>0,05$).

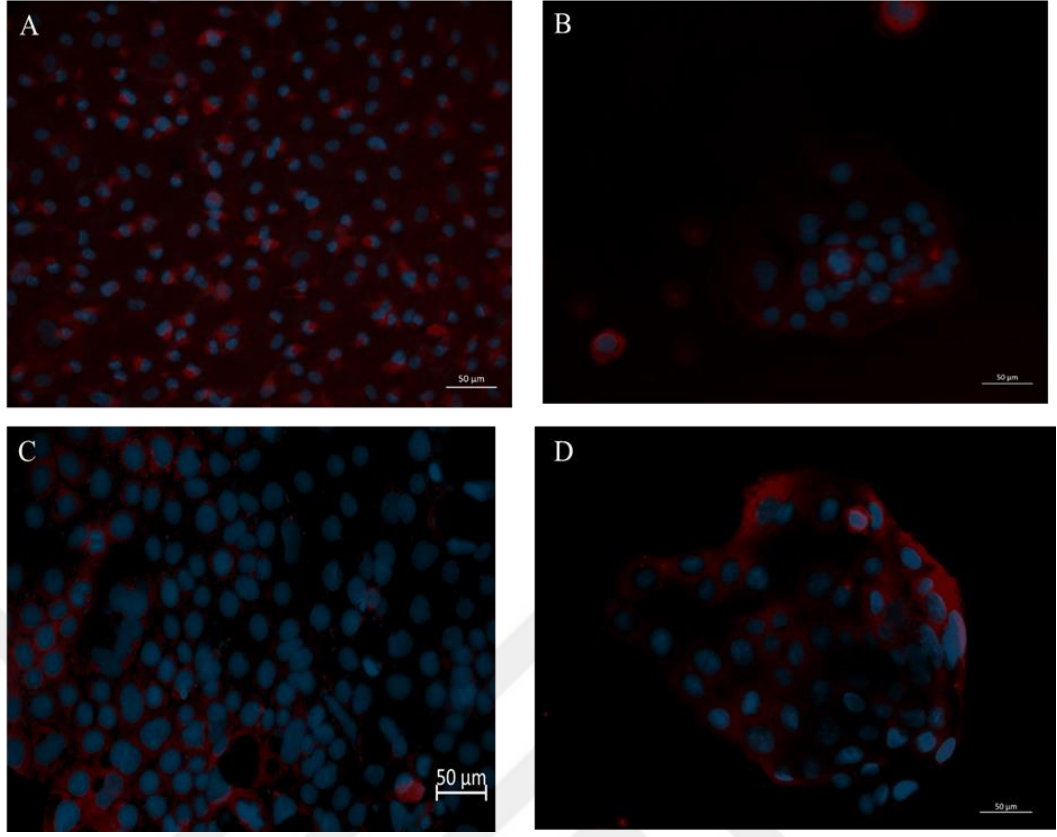
4.4.3. İmmünohistokimya analizi

Hücrelerde ölüm reseptör belirteçleri DR4 ve DR5 antikorları ile boyanarak pozitiflikler gösterildi (Şekil 4.17 ve 4.18). DR4 ekspresyon aktivitesini gösteren hücreler FITC ile işaretlenerek yeşil, DR5 ekspresyon aktivitesini gösteren hücreler CFL-594 ile boyanarak kırmızı ile gösterildi. Çekirdek boyası için DAPI kullanılarak mavi olarak gösterildi.

DR4 ve DR5 belirteçleri için klotho geninin ekspresyon değişimi sonucunda CCD841 CoN, Caco-2, klotho+Caco-2 ve KO klotho-Caco-2 hücrelerindeki pozitif immunreaktivite gösterildi.



Şekil 4.17. Caco-2 hücrelerinde klotho gen ekspresyon değişimi sonucunda DR4 aktivitesini gösteren hücreler FITC ile boyanarak yeşil renkte gösterilmiştir. Çekirdek boyası olarak DAPI kullanılmıştır. (A) CCD841 CoN, (B) Caco-2, (C) klotho+Caco-2, (D) KO klotho-Caco-2 hücrelerinin görüntüleri izlenmektedir (Barlar A 20µm, B-D50µm).



Şekil 4.18. Caco-2 hücrelerinde klotho gen ekspresyonundaki değişimin sonucunda DR5 aktivitesini gösteren hücreler CFL-594 ile boyanarak kırmızı renkte gösterilmiştir. Çekirdek boyası olarak DAPI kullanılmıştır. (A) CCD841 CoN, (B) Caco-2, (C) klotho+Caco-2, (D) KO klotho-Caco-2 hücrelerinin görüntüleri (Barlar A-D 50µm).

5. TARTIŞMA

Klotho gen ekspresyonundaki değişim; hücre olgunlaşması, hücre farklılaşması, proliferasyon ve apoptoz ile ilgili hücre fonksiyonlarını etkiler. Klotho geni ile yapılan araştırmalarda klotho genindeki DNA hipermetilasyonunun yaşlanma, çeşitli hastalıklar ve kanser için en önemli risk faktörlerinden biri olduğu ortaya konmuştur. Klotho geni yaşlanma ve inflamatuvar ile ilişkili hastalıklara ve kansere karşı korunmada önemli rol oynar (Xuan ve Van Hai, 2018).

Klotho geni karaciğer, ince bağırsak, böbrek, dalak ve kolon dokularında eksprese edilir. Özellikle tümör dokularında klotho geninin ekspresyonu, tümör olmayan bölgelerdekenden daha düşüktür. Yumurtalık ve akciğer kanserinde %50 oranında klotho gen ekspresyon kaybı görülürken meme, pankreas ve rahim ağzı kanserlerinde %80 oranında olduğu gösterildi (Lee vd., 2010; Abramovitz vd., 2011; Usuda vd., 2011; Rubenik vd., 2012; Lojkin vd., 2015). Bu durum bazı kanserlerde klotho gen ekspresyon kaybının malign oluşumlara neden olabileceğini düşündürür (Li vd., 2014). Klothonun tümör baskılayıcı özelliği ilk kez Wolf ve arkadaşlarının (2008) meme kanserinde yaptığı çalışmada gösterilmiştir. Daha sonrasında klothonun aşırı ekspresyonunun; tiroid (Dai vd., 2016), karaciğer (Shu vd., 2013; Tang vd., 2016), akciğer (Chen vd., 2010), böbrek (Zhu vd., 2013) ve kolon (Pan vd., 2011) kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan dirençli insan adenokarsinom kolon kanser (Caco-2) hücrelerinde klotho geni aktive edildi ve knock-out edildi. Klotho geninin ekspresyonu arttırıldığında süreye paralel olarak (24, 48 ve 72. saatlerde) Caco-2 hücrelerinin canlılığının azaldığı görüldü (** $p < 0.001$) (Şekil 4.5). Klotho geninin Caco-2 hücrelerinde knock-out edilmesinin hücre canlılığına etkisinin olmadığı görüldü ($p > 0.05$). Transfeksiyon işleminin hücre canlılığını gen ekspresyonundan bağımsız olarak azalttığı tespit edildi (Şekil 4.6). Bu sonuçlar klotho gen ekspresyon artışının kanser hücrelerinde proliferasyonu azalttığını desteklemektedir (Chen vd., 2010; Pan vd., 2011; Shu vd., 2013; Zhu vd., 2013; Dai vd., 2016; Tang vd., 2016).

Caco-2 hücrelerinde CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak oluşturulan klotho gen ekspresyonundaki değişimin apoptoza etkisinin incelendiği flow sitometri analizlerimizde, klotho+Caco-2 hücrelerinde 48 saat sonunda apoptoz %33.9, nekroz

ise %9.3 oranında tespit edildi. Caco-2 hücrelerinde klotho geni knock-out edildiğinde ise apoptoz %32, nekroz ise %12.9 oranında bulundu. Klotho+Caco-2 hücrelerinde 72 saat sonunda apoptoz %24.4, nekroz ise %28.4 oranında idi. KO klotho-Caco-2 hücrelerinde apoptoz %4.8, nekroz ise %39.0 oranında bulundu (Şekil 4.7 ve 4.8). Sonuçlarımız lenfoma, akciğer, karaciğer ve kolon kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarla benzerdi (Chen vd., 2010; Pan vd., 2011; Sun vd., 2015; Zhou vd., 2017).

Kanserde hücre motilitesi invazyon ve metastaz için oldukça önemlidir. Çalışmamızda invazyon sırasında epitel hücre göçünü değerlendirmek için *in-vitro* model olarak kabul edilen *in-vitro* yara iyileşme deneyi (scratch wound closure assays) ile klotho ekspresyonundaki değişimin kolon kanser hücrelerinde invazyon kapasitesine etkisini değerlendirdik. Sonuçlarımız Caco-2 hücrelerinde klotho gen ekspresyon artışının yara bölgesinin kapanmasına etki etmediğini gösterdi (** $p < 0.001$). Hücrelerde klotho geni knock-out edildiğinde ise yara bölgesinin kapanmaya başladığı ancak transfeksiyon yapılmayan Caco-2 hücrelerine göre bu kapanmanın daha az olduğu görüldü (** $p < 0.001$) (Şekil 4.11 ve 4.12). Diğer taraftan yapılan araştırmalarda akciğer (Chen vd., 2012) ve böbrek (Zhu vd., 2013) kanser hücrelerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde klotho ekspresyon artışının koloni oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (Abramovitz vd., 2011; Sun vd., 2015). Pan ve arkadaşları (2011) HCT-116 ve HT-29 kolon kanser hücreleri ile yaptıkları çalışmada klotho gen ekspresyonunun artırılmasının kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve koloni oluşturma potansiyelini azalttığını gösterdiler. Li ve arkadaşları SW480 ve HT-29 kolon kanser hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada virüs aracılı transfeksiyonla klotho geninin ekspresyonunu artırdılar ve klotho gen ekspresyonunun artışına bağlı olarak kolon kanser hücrelerinde koloni oluşumunun azaldığını gösterdiler. Çalışmamızda ise benzer şekilde Caco-2 hücrelerinde klotho ekspresyonu arttırıldığında kontrol grubuna göre oluşan koloni sayısının düşük olduğunu tespit ettik (Şekil 4.13 ve 4.14).

Bcl-2 gen ailesinden olan proapoptotik bax, bad, bid genleri ve antiapoptotik bcl-2 geni kolon kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde önemli rol oynamaktadır. Apoptotik yanıt için bilinen bir bekçi olan bcl-2 geni apoptozu engelleyen bir proteindir. Özellikle apoptozun bağırsak döngüsünde çok önemli bir

süreç olduğu düşünüldüğünde bax/bcl-2 oranı kritik bir öneme sahiptir. Kolorektal kanserin de dahil olduğu pek çok kanser türünde bax/bcl-2 oranı potansiyel olarak prognostik öneme sahip olabilir (Khodapasand vd., 2015; Huang vd., 2017; Bhardwaj, Mardi, Kaushal, Sharma ve Rao 2020; Ramesh ve Medema 2020). Ayrıca kolon kanserinde kaspaz 3 ve 8 ekspresyonları kanserle ilgili prognostik öneme de sahiptir. Apoptozda en iyi bilinen uyarıcı kaspaz olan kaspaz 3, kolon kanserindeki aktivitesi kemoterapi ve radyoterapiye duyarlılığı artırmanın yanında kanser hücrelerinde invazyonu da inhibe ettiği bulunmuştur. Kolon kanser dokusunda kaspaz 3'ün ekspresyonun sağlıklı dokudakine göre oldukça düşükken kaspaz 8'de bu durum söz konusu değildir (Asadi vd., 2018; Zhou vd., 2018).

Akciğer kanser hücreleri ile yapılan çalışmada klotho geninin ekspresyonunun artırılmasıyla bcl-2'nin ekspresyonunun azaldığı, bax'ın ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Klotho geni susturulduğunda ise bcl-2 geninin ekspresyonu artarken bax geninin azaldığı tespit edilmiştir (Chen vd., 2010). Lenfoma hücreleri ile yapılan çalışmada klotho geninin artırılmasıyla antiapoptotik mcl-1 geninin azaldığı aktif kaspaz 3 geninin arttığı gösterilmiştir (Zhou vd., 2017).

Çalışmamızda kolon kanser hücrelerinde klotho gen ekspresyon değişimine bağlı olarak apoptozun belirlenmesinde kaspaz 3, kaspaz 8, bid, bad, bcl-2 ve bax genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendi. Klotho+Caco-2 hücrelerinde KO klotho-Caco-2 hücrelerine kıyasla kaspaz 3, kaspaz 8, bcl-2, bad genlerinin ekspresyonları artarken, bid ve bax genlerinin ekspresyonu azaldı. Caco-2 hücrelerinde kaspaz 3 geninin ekspresyonunun artması klothonun apoptozu ekstrinsik yoldan tetiklediğini gösterir (Şekil 4.4). Çalışmamız Zhou ve arkadaşlarının (2017) lenfoma hücreleri ile yaptığı çalışmada kaspaz 3 ekspresyonunun artması ile benzerdir ancak Chen ve arkadaşlarının (2010) akciğer kanser hücreleri ile yaptığı çalışmada bcl-2 geninin ekspresyonunun azalması ile farklılık gösterir.

İmmunfloresans boyamalarımızda sağlıklı kolon hücreleri (CCD841 CoN) ve kolon kanseri hücrelerinde (Caco-2) kaspaz 3 ve 8'in negatif immunreaktivite, klotho+Caco-2 hücrelerinin pozitif immunreaktivite gösterdiği tespit edildi. KO klotho-Caco-2 hücrelerinde ise klotho+Caco-2 grubuna kıyasla daha az pozitiflik görüldü (Şekil 4.9 ve 4.10). KO klotho-Caco-2 hücrelerindeki kaspaz 3 ve 8'deki

pozitif immunreaktivite transfeksiyon işleminden kaynaklı olabilir. İmmunfloresans boyama sonuçlarımız qRT-PCR sonuçlarımızı desteklemektedir.

TRAIL seçici bir apoptoz indükleyicisi olarak kanser tedavisinde umut verici kemoterapötik bir ajandır. Kolorektal kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda bu hücrelerin %50'sinin TRAIL'e dirençli olduğunu gösterilmiştir (Zhang vd.,2019). Özellikle kolorektal kanserde kemoterapiye karşı dirençli hücrelerin TRAIL'in neden olduğu apoptozun sitotoksik etkilerine karşı nasıl duyarlılık kazanabileceği konusunda bir boşluk vardır.

TRAIL apoptozu DR4 ve DR5 reseptörleri aracılığıyla başlar. Kolorektal kanser hücrelerinin apoptoza gidebilmesi için DR4 ve DR5 arasındaki etkileşimin TRAIL yolağının aktifleştirilmesinde oldukça önemli olduğu gösterilmiştir (Zhang vd., 2015). Nahacka ve arkadaşlarının (2018) HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde DR4 ve DR5 reseptörlerinin verimliliği ile ilgili yaptıkları çalışmada bu reseptörler uyarılarak trimerizasyon gerçekleştirilmiş ve ardından kaspazlar kesilerek aktifleştirilmiştir. Uyarılan bu reseptörlerden DR5 reseptörünün DR4'e göre daha fazla kaspaz aktifleştirilmesinde rol aldığı gösterilmiştir. Doğal antioksidan olan resveratrolün DLD-1 kolon kanser hücrelerinde DR5'in ekspresyonunu artırdığı ve kanser hücrelerinde apoptozu teşvik ettiği ortaya konmuştur (Li vd., 2015). Yapılan başka bir çalışmada kolon kanser hücresi olan HCT-116'da antimitotik etkisi olduğu bilinen diaminotiyazoller grubu ilaçlardan DAT1'in MEK/ERK sinyal yolunu aktive ederek p53'ten bağımsız olarak DR5 reseptörünün ekspresyonunu artırdığı bulunmuştur (Thamkachy, Kumar, Rajasekharan ve Sengupta, 2016). Qiao ve arkadaşlarının (2018) yaptığı başka bir çalışmada ise klinikte yaygın olarak kullanılan azitromisin HCT-116 ve SW480 kolon kanser hücrelerinde DR4 ve DR5 ekspresyonunu artırarak kanser hücrelerini TRAIL'a karşı duyarlı hale getirdiği ortaya konmuştur. Kemoterapötik ilaçlar olan siklofosfamid, gemitabin ve oksaliplatinin ile yapılan çalışmada akciğer (A549), kolon (HCT116) ve meme (MCF-7) kanser hücrelerinde gemitabinin ölüm reseptörlerinin ekspresyonunu artırdığı böylece kanser hücreleri kemoterapi tedavisinden sağ çıkmasına rağmen ölüm reseptörlerinin ekspresyonunun artmasıyla immün hücreler tarafından öldürülmeye duyarlı hale geldiği ortaya konmuştur (Gravett, Dalgleish ve Copier, 2019).

Çalışmamızda klotho gen ekspresyonundaki değişimin TRAIL ölüm reseptörlerine etkisi flow sitometri yöntemiyle incelendiğinde, Caco-2 kolon kanser hücrelerinde DR4 ve DcR1 reseptörlerinin sayısı CCD841 CoN sağlıklı kolon hücrelerindeki göre daha fazlaydı. Ancak DR5 ve DcR2 reseptör sayılarının sağlıklı kolon hücrelerinde daha fazla görüldü. Klotho geni Caco-2 hücrelerinde klotho geninin aktivasyonu ve knock-out edildiğinde ise transfeksiyon yapılmamış Caco-2 hücrelerine göre incelenen tüm reseptörlerde azalma vardı. Bu durumun transfeksiyon işleminin hücrelerdeki canlılığı azaltmasından dolayı olabileceğini düşünmekteyiz. Klotho geninin aktivasyonu Caco-2 hücrelerinde (klotho+Caco-2) klotho knock-out edilen Caco-2 hücrelerine (KO klotho-Caco-2) göre DR4 ve DcR1 reseptörleri daha fazla bulunmaktadır. DR5 ve DcR2 reseptörlerinin ise KO klotho-Caco-2 hücrelerinde daha fazla olduğu bulunmuştur (Şekil 4.15). DR4 ve DR5'in immunfloresans boyamaları sonucunda görülen pozitif immunreaktivite flow sitometri analiz sonuçlarımıza paralellik gösterdi (Şekil 4.17 ve 4.18). Klotho gen ekspresyonundaki değişimin TRAIL ölüm reseptörlerine etkisinin belirlenmesi için yapılan qRT-PCR analizinde klotho+Caco-2 hücrelerindeki DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 genlerindeki ekspresyon seviyelerindeki artışın KO klotho-Caco-2 hücrelerine göre fazla olduğu görüldü (Şekil 4.16).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda klotho geninde yapılan ekspresyon değişikliklerinin dirençli kolon kanser hücresinde TRAIL sinyal yolağını aktifleştirerek apoptoza duyarlı hale getirdiğini tespit ettik. Sonuçlarımız klotho gen ekspresyon artışının kanser hücrelerinin motilitesini, çoğalmasını ve koloni oluşturma potansiyelini baskıladığı, kaspaz aktivitesini artırarak apoptozu indüklediğini gösterdi. Bu etkinin klotho gen aktivasyonuna bağlı olup olmadığı klotho geninin knock-out edilmesiyle test edildi. Klotho gen ifadesindeki azalmanın Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisinin olmadığı belirlendi. Bu sonuçlar klotho geninin aktivasyonu ile apoptoza dirençli kanser hücresinde antitümör etkili olduğunu göstermektedir. Bu nedenle klothonun kolon kanserinin tedavisinde güçlü bir belirteç olacağını öngörüyoruz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abramovitz, L., Rubinek, T., Ligumsky, H., Bose, S., Avivi, C., Barshack, I., Kaufman, B., & Wolf, I. (2011) KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-1 signaling in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*. 1;17(13):4254-66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2749
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015) *Molecular Biology of The Cell*. Schanck D, Boicchio A (Eds.), Sixth edition s.1021-1034. Garland Science, Taylor & Francis Group. ISBN 978-0-8153-4464-3.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015) *Cancer as a Microevolutionary Process In Molecular Biology of The Cell*. Schanck D, Boicchio A (Eds.), Sixth edition s.1091-1103. Garland Science, Taylor & Francis Group. ISBN 978-0-8153-4464-3.
- Asadi, M., Shanebandi, D., Kermani, T. A., Sanaat, Z., Zafari, V., & Hashemzadeh, S. (2018). Expression level of caspase genes in colorectal cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 19(5), 1277. doi:10.22034/APJCP.2018.19.5.1277
- Balmana, J., Balaguer, F., Cervantes, A., & Arnold, D., ESMO Guidelines Working Group. (2013). Familial risk-colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines. *Annals of oncology*, 24(suppl_6), 73-80. doi:10.1093/annonc/mdt209
- Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular cell*, 54(2), 234-244. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.011
- Behera, R., Kaur, A., Webster, M. R., Kim, S., Ndoye, A., Kugel, C. H., Alicea, G. M., Wang, J., Ghosh, K., Cheng, P., Marchbank, K., Dang, V., Levesque, M., Dummer, R., Xu, X., Herlyn, M., Aplin, A. E., Roesch, A., Caino, C., Altieri, D. C., Weeraratna, A. T., & Lisanti, S. (2017) Inhibition of age-related therapy resistance in melanoma by rosiglitazone-mediated induction of Klotho. *Clinical Cancer Research*, 2017 June 15; 23(12): 3181–3190. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0201

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Bernardi, S., Secchiero, P., & Zauli, G. (2012) State of art and recent developments of anti-cancer strategies based on TRAIL. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 7(2), 207-217. doi:10.2174/157489212799972927
- Bhardwaj, M., Mardi, K., Kaushal, V., Sharma, M., & Rao, M. (2020). Bcl-2 expression in colorectal carcinoma and its correlation with clinicopathological parameters. *Clinical Cancer Investigation Journal*, 9(5), 182. doi: 10.4103/ccij.ccij_51_17
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551-2561. doi: 10.1099/mic.0.28048-0
- Brobey, R., Makoto, K., & Rosenblatt, K. (2011) Klotho protects against oxidative stress through antioxidant and apoptotic signaling pathways. *Biochemistry/Molecular Biology*, (25). Published Online:1 Apr 2011. https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.25.1_supplement.528.3
- Cai, Y., Liu, X., Huang, W., Zhang, K., & Liu, X. Y. (2012) Synergistic antitumor effect of TRAIL and IL-24 with complete eradication of hepatoma in the CTGVT-DG strategy. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44(6), 535-543. doi:10.1093/abbs/gms031
- Camilli, T. C., Xu, M., O'connell, M. P., Chien, B., Frank, B. P., Subaran, S., Indig, F. E., Morin, P. J., Hewitt, S. M., & 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.
- Chen, B., Ma, X., Liu, S., Zhao, W., & Wu, J. (2012) Inhibition of lung cancer cells growth, motility and induction of apoptosis by Klotho, a novel secreted Wnt antagonist, in a dose-dependent manner. *Cancer biology & therapy*, 13(12), 1221-1228. doi: 10.4161/cbt.21420
- 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), 99. doi: 10.1186/1756-9966-29-99

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

CRISPR Cas9 An Introductory Guide for Gene Knockout. Erişim tarihi: 04.01.2021
<https://www.abmgood.com/pub/media/catalog/category/docs/c/r/CRISPR-Quick-Guide-Protocol-V2.pdf>

Daaboul, H.E., & El-Sibai, M. (2017). Treatment Strategies in Colorectal Cancer. In *Colorectal Cancer-Diagnosis, Screening and Management*. IntechOpen.

Dai, X., Zhang, J., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M. E., Alharbi, S. A., Kumar, A. P., Ahn, K. S., & Sethi, G. (2016) 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. doi:10.1177/1535370215579167

Davis, D. M., Marcet, J. E., Frattini, J.C., Prather, A. D., Mateka, J. J., & Nfonsam, V. N. (2011) Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer? *Journal of the American College of Surgeons* 213(3):352-61. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2011.04.033

De Miguel, D., Lemke, J., Anel, A., Walczak, H., & Martinez-Lostao, L. (2016). Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell death and differentiation*, 23(5), 733-747. doi:10.1038/cdd.2015.174

Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602-607. doi:10.1038/nature09886

Dimberg, L. Y., Anderson, C. K., Camidge, R., Behbakht, K., Thorburn, A., & Ford, H. L. (2013) On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene*, 32(11), 1341. doi:10.1038/onc.2012

Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deeni, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichmani, C., DiPrinzioi, R., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C., Young, P. R., & Dodds, R.A. (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14363-14367. doi:10.1074/jbc.273.23.14363

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), E2579-E2586. doi: 10.1073/pnas.1208507109
- Gravett, A. M., Dalgleish, A. G., & Copier, J. (2019). In vitro culture with gemcitabine augments death receptor and NKG2D ligand expression on tumour cells. *Scientific reports*, 9(1), 1-9. doi: 10.1038/s41598-018-38190-2
- He, Y., Wang, J. S., Zhang, P., Zhang, W. J., Huang, Q. L., & Hua, Z. C. (2013) Synergistic apoptotic effect of the combination of diosgenin and TRAIL on non-small-cell lung cancer cell line A549 evaluated with the Chou-Talalay method. *Acta pharmaceutica Sinica*, 48(1), 45-51.
- Huang, Q., Li, S., Cheng, P., Deng, M., He, X., Wang, Z., Yang, C., Zhao, X., & Huang, J. (2017). High expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 is a good prognostic factor in colorectal cancer: Result of a meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 23(27), 5018. doi: 10.3748/wjg.v23.i27.5018
- 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. doi:10.1016/j.humpath.2012.04.014
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2015). The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Structural Biology*, 30, 100-111. doi: 10.1016/j.sbi.2015.02.002
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. doi: 10.1126/science.1225829
- Khodapasand, E., Jafarzadeh, N., Farrokhi, F., Kamalidehghan, B., & Houshmand, M. (2015). Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer?. *Iranian biomedical journal*, 19(2), 69. doi: 10.6091/ibj.1366.2015
- Kim, J. H., Hwang, K. H., Park, K. S., Kong, I. D., & Cha, S. K. (2015). Biological role of anti-aging protein Klotho. *Journal of lifestyle medicine*, 5(1), 1. doi: 10.15280/jlm.2015.5.1.1

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Kretz, A.L., von Karstedt, S., Hillenbrand, A., Henne-Bruns, D., Knippschild, U., Trauzold, A., & Lemke, J. (2018) Should We Keep Walking along the Trail for Pancreatic Cancer Treatment? Revisiting TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand for Anticancer Therapy. *Cancers*, 10(3), 77. doi:10.3390/cancers10030077
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J. H., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 15065. doi:10.1038/nrdp.2015.65
- 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., ShirakiIida, T., Nishikawa, S., Nagai, R., & Nabeshima, Y. I. (1997) Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 390, 45-51.
- Kuro-o, M. (2009) *Klotho* and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(10), 1049-1058.
- Kuro-o, M. (2010) *Klotho* Pflugers Arch - *European Journal of Physiology* 459:333–343. doi:10.1007/s00424-009-0722-7
- Kuro-o, M. (2018) Molecular Mechanisms Underlying Accelerated Aging by Defects in the FGF23-Klotho System. *International Journal of Nephrology*. 9679841, 6. doi:10.1155/2018/9679841
- 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, 1829-1833 doi:10.1126/science.1112766
- Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G. D., Mosconi, S., Mandalà, M., Cervantes, A., Arnold D, & ESMO Guidelines Working Group. (2013). Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*, 24(suppl_6), 64-72. doi:10.1093/annonc/mdt354
- LeBlanc, H. N., & Ashkenazi, A. (2003) Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death and Differentiation*, 10(1), 66-75. doi:10.1038/sj.cdd.4401187

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Lee, J., Jeong, D. J., Kim, J., Lee, S., Park, J. H., Chang, B., Jung, S. I., Yi, L., Han, Y., Yang, Y., Kim, K. I., Lim, J. S., Yang, I., Jeon, S., Bae, D. H., Kim, C. J., & Lee, M. S. (2010) The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Molecular Cancer*, 9: 109. doi:10.1186/1476-4598-9-109
- Legler, K., Hauser, C., Egberts, J. H., Willms, A., Heneweer, C., Boretius, S., Röcken, C., Glüer, C., Becker, T., Kluge, M., Hill, O., Gieffers, C., Fricke, H., Kalthoff, H., Lemke, J., & Trauzold, A. (2018) The novel TRAIL-receptor agonist APG350 exerts superior therapeutic activity in pancreatic cancer cells. *Cell Death and Disease*, 9:445. doi:10.1038/s41419-018-0478-0
- Li, X. B., Deng, Y. G., Hu, J. P., Wang, Z., Xie, R. Z., Luo, H., & Hu, X. Y. (2015). Resveratrol overcomes TRAIL resistance in human colon cancer cells. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(3), 568-576. doi:10.3329/bjp.v10i3.21208
- 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. doi:10.3892/ijo.2014.2430
- Libutti, S. K., Saltz, L. B., Willett, C. G., & Levine, R. A. (2015) Cancer of the Colon. In DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA (Eds.) *Cancer Principles & Practice of Oncology* 10th Edition s.768-812.
- Ligumsky, H., Rubinek, T., Merenbakh-Lamin, K., Yeheskel, A., Sertchook, R., Shahmoon, S., Aviel-Ronen, S., & Wolf, I. (2015). Tumor suppressor activity of Klotho in breast cancer is revealed by structure–function analysis. *Molecular Cancer Research*, 13(10), 1398-1407.
- Liu, H., Fergusson, M. M., Castilho, R. M., Liu, J., Cao, L., Chen, J., Malide, D., Rovira, I. I., Schimel, D., Kuo, C. J., Hwang, P. M., Finkel, T., & Gutkind, J. S. (2007) Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science*, 317(5839), 803-806. doi:10.1126/science.1143578

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Kriger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., & Matsudaira, P. (2011) *Tümör Hücreleri ve Kanserin Başlangıcı. 6. Bakıdan Çeviri, Geçkil H, Özmen M, Yeşilada Ö (Eds.) Moleküler Hücre Biyolojisi içinde (s.1107-1116)* Ankara, Palme Yayıncılık.
- 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.
- Lu, L., Katsaros, D., Wiley, A., Rigault de la Longrais, I. A., Puopolo, M., & Yu, H. (2008) Klotho expression in epithelial ovarian cancer and its association with insulin-like growth factors and disease progression. *Cancer investigation*, 26(2), 185-192. doi:10.1080/07357900701638343
- Macrae, F. A., Goldberg, R. M., Seres, D., & Savarese, D. M. F. (2019) Colorectal cancer: Epidemiology, Risk Factors and Protective Factors. <https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors>
- Matsumura, Y., Aizawa, H., Shiraki-Iida, T., Nagai, R., Kuro-o, M., & Nabeshima, Y. I. (1998) Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 242(3), 626-630
- Mencke, R., Olauson, H., & Hillebrands, J. L. (2017). Effects of Klotho on fibrosis and cancer: A renal focus on mechanisms and therapeutic strategies. *Advanced drug delivery reviews*, 121, 85-100. doi: 10.1016/j.addr.2017.07.009
- Mojica, F. J., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174-182. doi: 10.1007/s00239-004-0046
- Nahacka, Z., Svadlenka, J., Peterka, M., Ksandrova, M., Benesova, S., Neuzil, J., & Andera, L. (2018). TRAIL induces apoptosis but not necroptosis in colorectal and pancreatic cancer cells preferentially via the TRAIL-R2/DR5 receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1865(3), 522-531. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.12.006

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Olejnik, A., Franczak, A., Krzywonos-Zawadzka, A., Kałużna-Oleksy, M., & Bil-Lula, I. (2018). The biological role of klotho protein in the development of cardiovascular diseases. *BioMed research international*, 2018. doi: 10.1155/2018/5171945
- Owusu-Brackett, N., Shariati, M., & Meric-Bernstam, F. (2019) *Role of PI3K/AKT/mTOR in Cancer Signaling. In: Badve S., Kumar G. (Eds.) Predictive Biomarkers in Oncology (s. 263-270). Springer, Cham. Online ISBN 978-3-319-95228-4. doi: 10.1007/978-3-319-95228-4_20*
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G. L., Gentz, R., & Dixit, V. M. (1997) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 277(5327), 815-818. doi:10.1126/science.277.5327.815
- 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. doi:10.1007/s13277-011-0174-5
- Pitti, R.M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., & Ashkenazi, A. (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *Journal of Biological Chemistry*, 271(22), 12687-12690.
- Pourcel, C., Salvignol, G., & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151(3), 653-663. doi: 10.1099/mic.0.27437-0
- Qiao, X., Wang, X., Shang, Y., Li, Y., & Chen, S. Z. (2018). Azithromycin enhances anticancer activity of TRAIL by inhibiting autophagy and up-regulating the protein levels of DR4/5 in colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Communications*, 38(1), 43. doi: 10.1186/s40880-018-0309-9
- Ramesh, P., & Medema, J. P. (2020). BCL-2 family deregulation in colorectal cancer: potential for BH3 mimetics in therapy. *Apoptosis*, 25(5), 305. doi: 10.1007/s10495-020-01601-9

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Razzaque, M. S. (2009) The FGF23–Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(11), 611. doi:10.1038/nrendo.2009.196
- Refaat, A., Abd-Rabou, A., & Reda, A. (2014) TRAIL combinations: The new ‘trail’ for cancer therapy. *Oncology letters*, 7(5), 1327-1332. doi:10.3892/ol.2014.1922
- Richter, C., Messerschmidt, S., Holeiter, G., Tepperink, J., Osswald, S., Zappe, A., Branschädel, M., Boschert, V., Mann, D. A., Scheurich, P., & Krippner-Heidenreich, A. (2012) The tumor necrosis factor receptor stalk regions define responsiveness to soluble versus membrane-bound ligand. *Molecular and Cellular Biology*, 32(13), 2515-2529. doi:10.1128/MCB.06458-11
- Rubinek, T., Shulman, M., Israeli, S., Bose, S., Avraham, A., Zundeleovich, A., Evron, E., Gal-Yam, E. N., Kaufman, B., & Wolf, I. (2012) Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 133: 649-657. doi: 10.1007/s10549-011-1824-4.
- Rubinek, T., & Modan-Moses, D. (2016) *Klotho and the Growth Hormone/Insulin-Like Growth Factor 1 Axis: Novel Insights into Complex Interactions*. Litwack G. (Eds.), *In Vitamins & Hormones (Vol. 101, pp. 85-118)*. Academic Press. ISSN 0083-6729. doi:10.1016/bs.vh.2016.02.009
- Rubinek, T., & Wolf, I. (2016) *The role of alpha-klotho as a universal tumor suppressor*. Litwack G. (Eds.), *In Vitamins & Hormones (Vol. 101, pp. 197-214)*. Academic Press. ISSN 0083-6729. doi:10.1016/bs.vh.2016.03.001
- Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 32(4), 347-355. doi:10.1038/nbt.2842
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 39(21), 9275-9282. doi: 10.1093/nar/gkr606
- Savić, N., & Schwank, G. (2016). Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research*, 168, 15-21. doi: 10.1016/j.trsl.2015.09.008

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62-67. doi:10.1038/nature13011
- Schmoll, H. J., Van Cutsem, E., Stein, A., Valentini, V., Glimelius, B., Haustermans, K., Nordlinge, B., van de Velde, C.J., Balmana, J., Regula, J., Beets-Tan, R. G., Arnold, D., Ciardiello, F., Hoff, P., Kerr, D., Köhne, C. H., Labianca, R., Price, T., Scheithauer, W., Sobrero, A., Tabernero, J., Aderka, D., Barroso, S., Bodoky, G., Douillard, J. Y., El Ghazaly, H., Gallardo, J., Garin, A., Glynne-Jones, R., Jordan, K., Meshcheryakov, A., Papamichail, D., Pfeiffer, P., Souglakos, I., Turhal, S., Cervantes, A., & Nagtegaal, I. D. (2012). ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Annals of oncology*, 23(10), 2479-2516. doi:10.1093/annonc/mds236
- Shiraki-Iida, T., Aizawa, H., Matsumura, Y., Sekine, S., Iida, A., Anazawa, H., Nagaic, R., Kuro-o, M., & Nabeshima, Y. I. (1998). Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein 1. *FEBS letters*, 424(1-2), 6-10.
- Shu, G., Xie, B., Ren, F., Liu, D. C., Zhou, J., Li, Q., Chen, J., Yuan, L., & Zhou, J. (2013) Restoration of klotho expression induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Cellular Oncology*. 36: 121-129. doi:10.1007/s13402-012-0118-0
- Sprick, M. R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M. A., & Walczak, H. (2002) Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *The EMBO journal*, 21(17), 4520-4530. doi:10.1093/emboj/cdf441
- Stoddart, M. J. (2011). WST-8 Analysis of Cell Viability During Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells. *Mammalian Cell Viability*, 21–25. doi:10.1007/978-1-61779-108-6_4
- Sudhakar, A. (2009) History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 1(2), 1-4. doi:10.4172/1948-5956.100000e2

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- 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), 307.
- Szliszka, E., Czuba, Z. P., Kawczyk-Krupka, A., Sieron-Stoltny, K., Sieron, A., & Krol, W. (2012) Chlorin-based photodynamic therapy enhances the effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bladder cancer cells. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 18(1), BR47-53. doi:10.12659/msm.882203
- 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.
- Tang, X., Fan, Z., Wang, Y., Ji, G., Wang, M., Lin, J., & Huang, S. (2014). Expression of klotho and β -catenin in esophageal squamous cell carcinoma, and their clinicopathological and prognostic significance. *Diseases of the Esophagus*, 29(3), 207–214. doi:10.1111/dote.12289
- Tang, X., Wang, Y., Fan, Z., Ji, G., Wang, M., Lin, J., Huang, S., & 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. doi:10.1038/labinvest.2015.86
- Thamkachy, R., Kumar, R., Rajasekharan, K. N., & Sengupta, S. (2016). ERK mediated upregulation of death receptor 5 overcomes the lack of p53 functionality in the diaminothiazole DAT1 induced apoptosis in colon cancer models: efficiency of DAT1 in Ras-Raf mutated cells. *Molecular cancer*, 15(1), 1-17. doi: 10.1186/s12943-016-0505-7
- Thrumurthy, S. G., Thrumurthy, S. S., Gilbert, C. E., Ross, P., & Haji, A. (2016). Colorectal adenocarcinoma: risks, prevention and diagnosis. *bmj*, 354, i3590. doi:10.1136/bmj.i3590
- Trivedi, R., & Mishra, D. P. (2015) Trailing TRAIL resistance: novel targets for TRAIL sensitization in cancer cells. *Frontiers in Oncology*, 5, 69. doi:10.3389/fonc.2015.00069

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Turner, A., Li, L. C., Pilli, T., Qian, L., Wiley, E. L., Setty, S., Christov, K., Ganesh, L., Maker, A. V., Li, P., Das Gupta, T. K., Prabhakar, B. S., & Kanteti, P. (2013) MADD knock-down enhances doxorubicin and TRAIL induced apoptosis in breast cancer cells. *PLoS one*, 8(2), e56817. doi:10.1371/journal.pone.0056817
- Urakawa, I., Yamazaki, Y., Shimada, T., Iijima, 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(7120), 770. doi:10.1038/nature05315
- Usuda, J., Ichinose, S., Ishizumi, T., Ohtani, K., Inoue, T., Saji, H., Kakihana M, Kajiwara N, Uchida O, Nomura M, Ikeda N, & Ohira, T. (2011). Klotho predicts good clinical outcome in patients with limited-disease small cell lung cancer who received surgery. *Lung Cancer*, 74(2), 332-337. doi: 10.1016/j.lungcan.2011.03.004
- van der Sijp, M. P., Bastiaannet, E., Mesker, W. E., van der Geest, L. G., Breugom, A. J., Steup, W. H., Marinelli, A. W. K. S, Tseng, L. N. L., Tollenaar, R. A. E. M., van de Velde, C. J. H., & Dekker, J. W. T. (2016). Differences between colon and rectal cancer in complications, short-term survival and recurrences. *International journal of colorectal disease*, 31(10), 1683-1691. doi:10.1007/s00384-016-2633-3
- von Karstedt, S., Montinaro, A., & Walczak, H. (2017) Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(6), 352. doi:10.1038/nrc.2017.28
- Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., Rauch, C. T., & Goodwin, R. G. (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *The EMBO journal*, 16(17), 5386-5397. doi:10.1093/emboj/16.17.5386
- Wang, L., Wang, X., Jie, P., Lu, H., Zhang, S., Lin, X., Lam, E. K., Cui, Y., Yu, J., & Jin, H. (2011) Klotho is silenced through promoter hypermethylation in gastric cancer. *American Journal of Cancer Research*, 1: 111-119. 45.
- Wang, T. T., & Jeng, J. (2000) Coordinated regulation of two TRAIL-R2/KILLER/DR5 mRNA isoforms by DNA damaging agents, serum and 17 β -estradiol in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 61(1), 87-96. doi:10.1023/a:1006432201432

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Wang, Y., Chen, L., Huang, G., He, D., He, J., Xu, W., Zou, C., Zong, F., Li, Y., Chen, B., Wu, S., Zhao, & W., Wu, S. (2013) Klotho sensitizes human lung cancer cell line to cisplatin via PI3k/Akt pathway. *PloS One*, 8(2), e57391. doi:10.1371/journal.pone.0057391
- Wang, Y., & Sun, Z. (2009) Current understanding of klotho. *Ageing Research Reviews*, 8(1), 43-51. doi:10.1016/j.arr.2008.10.002
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. F., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., & Goodwin, R. G. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3(6), 673-682.
- Wilkinson, R., & Wiedenheft, B. (2014). A CRISPR method for genome engineering. *F1000prime reports*, 6. doi: 10.12703/P6-3
- Wolf, I., Levanon-Cohen, S., Bose, S., Ligumsky, H., Sredni, B., Kanety, H., Kuro-o, M., Karlan, B., Kaufman, B., Koeffler, H. P., & Rubinek, T. (2008) Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene*. 27:7094–105. doi:10.1038/onc.2008.292
- Wong, S. H. M., Kong, W. Y., Fang, C. M., Loh, H.-S., Chuah, L.-H., Abdullah, S., & Ngai, S. C. (2019). The TRAIL to Cancer Therapy: Hindrances and Potential Solutions. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 143(2019)81-94. doi:10.1016/j.critrevonc.2019.08.008
- World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 2018 raporu <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>
- Xie, B., Zhou, J., Yuan, L., Ren, F., Liu, D. C., Li, Q., & Shu, G. (2013a) Epigenetic silencing of Klotho expression correlates with poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Human Pathology*, 44(5), 795-801.
- Xie, B., & Chen, J., Liu, B., Zhan, J. (2013b) Klotho acts as a tumor suppressor in cancers. *Pathology & Oncology Research*, 19(4), 611-617. doi:10.1007/s12253-013-9663-8
- Xu, Y., & Sun, Z. (2015) Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. *Endocrine Reviews*, 36(2), 174-193. doi:10.1210/er.2013-1079

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Xuan, N. T., & Van Hai, N. (2018) Changes in expression of klotho affect physiological processes, diseases, and cancer. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(1), 3.
- Yamamoto, M., Clark, J. D., Pastor, J. V., Gurnani, P., Nandi, A., Kurosu, H., Nandi, A., Miyoshi, M., Ogawa, O., Castrillon, D. H., Rosenblatt, K. P., & Kuro-o, M. (2005) Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *Journal Biology Chemistry*, 280(45), 38029-38034. doi:10.1074/jbc.M509039200
- Yildiz, Y., Yaylim-Eraltan, I., Arıkan, S., Ergen, H. A., Küçük, S., & Isbir, T. (2010) Is there any correlation between TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) genetic variants and breast cancer? *Archives of Medical Science: AMS*, 6(6), 932. doi:10.5114/aoms.2010.19304
- Yuan, J., Yin, Z., Tao, K., Wang, G., & Gao, J. (2018) Function of insulin-like growth factor 1 receptor in cancer resistance to chemotherapy. *Oncology Letters*, 15(1), 41-47. doi:10.3892/ol.2017.7276
- Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P., & Boutros, M. (2019). CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 55, pp. 106-119). *Academic Press*. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.04.001
- Zhang, Z., Li, Z., Wu, X., Zhang, C. F., Calway, T., He, T C., Du, W., Chen, J., Wang, C. Z., & Yuan, C S. (2015). TRAIL pathway is associated with inhibition of colon cancer by protopanaxadiol. *Journal of pharmacological sciences*, 127(1), 83-91. doi:10.1016/j.jphs.2014.11.003
- Zhang, B., Liu, B., Chen, D., Setroikromo, R., Haisma, H. J., & Quax, W. J. (2019). Histone Deacetylase Inhibitors Sensitize TRAIL-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cells. *Cancers*, 11(5), 645. doi:10.3390/cancers11050645
- Zhou, M., Liu, X., Li, Z., Huang, Q., Li, F., & Li, C. Y. (2018). Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *International journal of cancer*, 143(4), 921-930. doi: 10.1002/ijc.31374
- Zhou, X., Fang, X., Jiang, Y., Geng, L., Li, X., Li, Y., Lu, K., Li, P., Lv, X., & 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), 37. doi:10.1186/s13045-017-0391-5

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Zhou, X., & Wang, X. (2015) Klotho: a novel biomarker for Cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141:961–969. doi:10.1007/s00432-014-1788-y

Zhu, Y., Xu, L., Zhang, J., Xu, W., Liu, Y., Yin, H., Lv, T., An, H., Liu, L., He, H., Liu, J., Xu, J., Lin, Z., & Zhang, H. (2013) Klotho suppresses tumor progression via inhibiting PI3K/Akt/GSK 3 β /Snail signaling in renal cell carcinoma. *Cancer Science*, 104(6), 663-671. doi:10.1111/cas.1213

