

# Klotho Geni, Yaşlanma ve DNA Metilasyonu

Elif Çağlayan<sup>1</sup>, Kadir Turan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul - Türkiye  
<sup>2</sup>Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, İstanbul - Türkiye

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Kadir Turan  
Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, 34668, Üsküdar, İstanbul - Türkiye  
Elektronik posta adresi / E-mail address: kadirturan@marmara.edu.tr  
Kabul tarihi / Date of acceptance: 26 Ağustos 2014 / Augst 26, 2014

## ÖZET

### Klotho geni, yaşlanma ve DNA metilasyonu

Doğal bir süreç olan yaşlanma, zamanın akışı içerisinde canlı organizmada görülen anatomik ve fizyolojik değişiklikler olarak kendini gösterir. Yaşlanma sürecinde hem çevresel hem de genetik faktörler etkili olur. Genetik faktörler arasında farklı metabolik yolları kontrol eden birçok gen yer alır. Bu derlemede ele alınan *Klotho (kl)* geni bunlardan sadece biridir. *Kl* geni ilk kez farelerde saptanmış ve bu genin işlev görememesi halinde erken yaşlanma belirtilerinin ortaya çıktığı ve farelerin kısa ömürlü olduğu görülmüştür. Yakın tarihli çalışmalar *kl* geni anlatımının DNA metilasyonu ile epigenetik olarak kontrol edildiği yönünde sonuçlar ortaya koymaktadır. Henüz yayınlanmamış bir çalışmamızda da DNMT enzimlerinin insan *kl* geni anlatımı üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olduğu saptanmıştır. İnsan *kl* geninin işleyiş mekanizmasının aydınlatılmasının, *Kl* proteininin anlatım düzeyine bağlı olarak ortaya çıkabilecek sağlık problemlerinin giderilmesinde daha güvenilir yöntemlerin izlenmesine olanak sağlayacağı kanısındayız.

**Anahtar sözcükler:** Klotho, yaşlanma, DNA metilasyonu, DNMT enzimleri

## ABSTRACT

### Klotho gene, aging and DNA methylation

Aging is a natural process, which shows itself as anatomical and physiological changes in living organisms in the course of time. There are both environmental and genetic factors affecting the aging process. Within the genetic factors, several genes controlling different metabolic pathways involve in the aging process. *Klotho (kl)* gene, that is the subject of this review, is just one of genetic factors. *Kl* gene was first identified in mice and it was shown that dysfunction of this gene causes premature aging symptoms and short-lived of the mice. Recently, it was reported that *kl* gene could be epigenetically controlled by DNA methylation. In our unpublished study, we showed that DNMT enzymes have down-regulatory effects on human *kl* gene expression. We believe that elucidating the regulation mechanism of the human *kl* gene allows us more reliable methods to be followed for eliminating health problems that may arise due to low expression of *Kl* protein.

**Key words:** Klotho, aging, DNA methylation, DNMT enzymes

## GİRİŞ

Yaşlanma, zaman içerisinde canlıların çevre ile olan ilişkilerinde dengelerinin çevre lehine sonuçlandığı bir süreçtir. Bu sürecin ilerleyiş hızı canlıların çevre ile olan etkileşimi ve kendi kalıtsal özelliklerine bağlı olarak değişir. Bu nedenle, yaşlanma olayı ortalama belirli bir süreç içerisinde ilerlese de, söz konusu çevresel ve kalıtsal faktörlere bağlı olarak kimi bireyler daha hızlı, kimisi ise daha geç yaşlanır. İnsanlar için yaşlanma sürecini etkileyen çevresel faktörlerin başında beslenme alışkanlığı ve kalitesi, içki ve sigara alışkanlığı, yaşanılan ortamın kalitesi (hava ve su gibi) gelmektedir. Genetik faktörler ise oldukça karmaşıktır. Farklı metabolik yollarla ilgili birçok gen bu süreci pozitif ya da negatif yönde etkilemektedir. Genetik faktörler insan ömrünü yaklaşık %25 oranında etkileyebilmektedir. Bu da 60 yıl olan minimal yaşam limitinin 75 yıla çıkması anlamına gelmektedir (1). Yaşam süresinin uzamasında etkili olan genleri; lipid-

protein metabolizmasında rol alan proteinleri kodlayan genler (*Apolipoprotein E-APOE geni*), büyüme faktörü/insülin-benzeri büyüme faktörü 1/insülin (*GH/IGF-1/INS*) sinyal yolağında iş gören genler, DNA hasarı sinyalizasyonu ve onarımı ile ilgili genler ve pro/antioksidan yollarında iş gören genler olarak gruplandırmak mümkündür (2).

Çeşitli hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar sonucunda *GH*, *GPX1*, *Foxo*, *KL*, *GHRHR*, *POLB*, *RAD52*, *INS* ve *TP53* gibi aday genlerin ekspresyonundaki artış ya da azalmanın organizmanın ömrünü etkilediği ortaya konmuştur (3-11). İnsanlarda, bazı genetik varyasyonların insan ömrü ile ilişkili olduğu rapor edilmektedir. Bu genler *GH/IGF-1/INS* yolağı ile ilişkili *IGF1R*, *GHR* ve *FOXO3A*; DNA hasarı sinyali ve onarım yolağı ile ilişkili *WRN*, *MLH1* ve *TP53* ve pro/antioksidan yolağı ile ilişkili *SOD1*, *SOD2* ve *PON1* gibi genlerdir (12-18). Yaşlanma süreci ile ilişkili olabilecek genler Tablo 1'de verilmiştir. Bu derlemede, yaşlanma ile ilgili olduğu saptanan genetik faktörlerden sadece *Kl* geni ele alınmıştır.

**Tablo 1:** Yaşlanma süreci ile dolaylı ya da direkt ilişkilendirilen genler

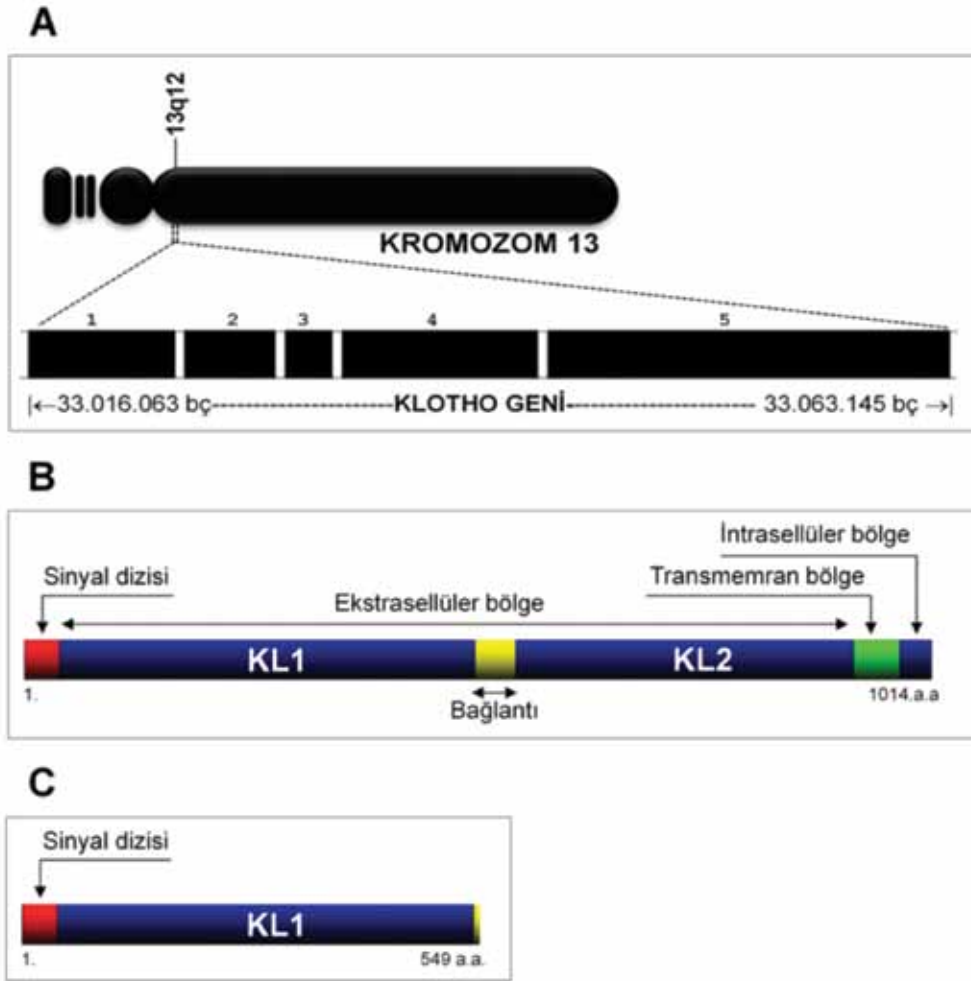
Gen Sembolleri	Genlerin Açık Adı
APOE	Apolipoprotein E
DNMT	DNA Metil Transferaz
FGF23	Fibroblast Büyüme Faktörü 23 / (ing. Fibroblast Growth Factor 23)
FGFR	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü / (ing. Fibroblast Growth Factor Receptor)
FOXO	(ing. Forkhead Box O)
GH	Büyüme Hormonu / (ing. Growth Hormone)
GHR	Büyüme Hormonu Reseptörü / (ing. Growth Hormone Receptor)
GHRHR	Büyüme Hormonu Serbestleştirici Faktör Reseptörü / (ing. Growth Hormone Releasing Hormone Receptor)
GPX1	Glutasyon Peroksidaz 1 / (ing. Glutathione Peroxidase 1)
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1/(ing. Insulin-like Growth Factor 1)
IGF1R	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 Reseptörü / (ing. Insulin-like Growth Factor 1 Receptor)
INS	İnsülin
KI	Klotho
MLH	(ing. MutL Homolog)
POLB	Polimeraz Beta
PON	Paraoksonaz / (ing. Paraoxonase)
PTH	Paratiroid Hormonu
RAD52	(ing. Radiation Sensitive 52)
SAM	S-Adenosil Metiyonin
SOD	Süperoksit Dismutaz
TP53	Tümör Protein 53
WRN	Werner Sendromu (ing. Werner Syndrome)

### Klotho Geni ve Bu Gen Üzerinden Kodlanan Proteinler

*Kl* geni ilk kez 1997 yılında Kuro-o ve arkadaşları (19) tarafından farelerde tanımlanmıştır. Bu gen bakımından kusurlu ve Klotho olarak tanımlanan bu fareler 3 haftaya kadar normal gelişme göstermekte daha sonra gelişmeleri yavaşlamakta ve yaşlanma belirtilerindeki artışla birlikte 8-9 hafta içerisinde ölmektedir. Klotho fareler, tipik yaşlanma fenotipleri olan ateroskleroz, ektoptik kalsifikasyon, pulmoner amfizem, deride atropi ve osteoporoz gibi özellikler göstermektedir (19). Moleküler düzeyde yapılan analizler, farelerde bu fenotipik özelliklerin ortaya çıkmasında 5. kromozom üzerinde lokalize olan genin (*kl* geni) normal işlevini yapamadığını göstermiştir (19). Bu gen, Yunan mitolojisinde üç kader tanrıçasından biri olan ve hayat ipliğini eğiren Klotho'dan esinlenerek *kl* geni olarak isimlendirilmiştir (19). Eski Yunanlılara göre, kişi doğar doğmaz kader onun ömür ipliğini bükmeye başlar, günün birinde de keser ve o anda da kişi ölür. Zeus ile Themis'in kızları olan kader tanrıçaları Moira'lar (Moira: pay ya da pay veren anlamına gelir) olarak adlandırılır (Şekil 1). Üç kız kardeş olan kader tanrıçalarından birincisi Klotho'dur. Klotho sözcüğü fiil olarak "yaşam ipliğini eğirmek" anlamına gelir. İkincisi Lakhesis'tir ve anlamı "yazgı"dır. Üçüncüsü Atropos ise "geri adım



**Şekil 1:** Yunan mitolojisinde hayat ipliğini eğiren Moira'lar. ([http://en.wikipedia.org/wiki/File:Fates\\_tapestry.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Fates_tapestry.jpg)) Erişim tarihi: 10.04.2014



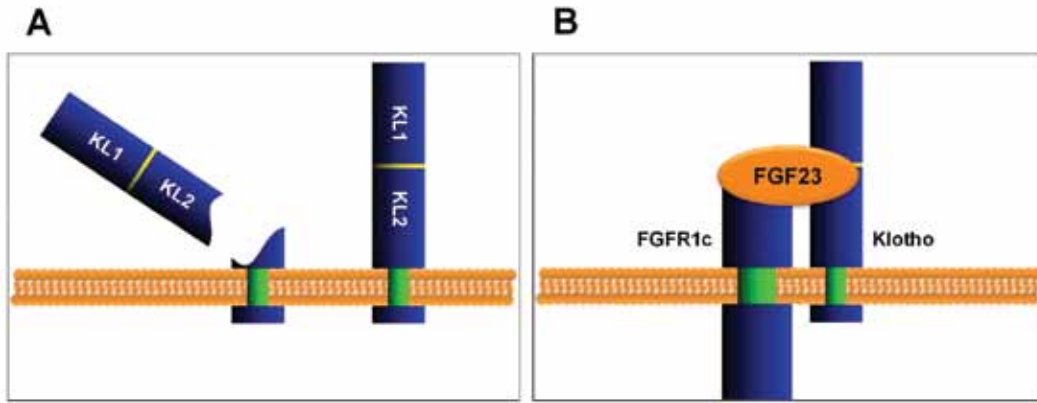
**Şekil 2:** İnsan *kl* geni (A) ve bu gen üzerinden alternatif işleme sonucu kodlanan membran bağlı Kl proteini (B) ve salgılanan Kl proteini (C) yapısı. Klotho geninin lokasyonu 'LocusID-NCBI' göre verilmiştir.

atmaz,"bildiğinden şaşmaz","bükülmez" anlamlarına gelir.

İnsanda, fare *kl* geni ile homoloji gösteren genin, genomda 13. kromozomun q kolunda yer aldığı saptanmıştır (20). Bu gen tarafından kodlanan insan Kl proteini fare proteini ile % 86 oranında aynı amino asitlerden oluşmaktadır (20). Günümüze kadar bu bölge ile bağlantılı olarak herhangi bir erken yaşlanma sendromu tanımlanmamıştır. Bununla birlikte insan yaşam uzunluğu ve koroner arter hastalığını da kapsayan yaş ile ilgili hastalıkların *kl* geni polimorfizmi ile bağlantı gösterdiği rapor edilmiştir (21,22).

İnsan *kl* geni 5 ekzon ve 4 introndan oluşmakta ve 13. kromozom üzerinde yaklaşık 50 kilobaz çift'lik (kbç) bir bölgeyi işgal etmektedir (20) (Şekil 2A). *Kl* geni üzerinden sentez edilen mRNA'ların alternatif işlenmesi sonucunda membrana bağlı ve salgılanan formda iki farklı Kl proteini

sentez edilir. Bunlardan membrana bağlı Kl proteini 130 kD ağırlığında 1012 amino asitten oluşan tek-geçişli bir membran proteindir. Diğeri ise hücrelerden ekstraselüler bölgeye salınan çözünür formda Kl proteindir (20,23,24) (Şekil 2B ve 2C). Çözünür formda Kl proteini 549 amino asitten oluşur ve yaklaşık 70 kD ağırlığındadır. Membran Kl proteini aminoterminalinde kısa bir sinyal dizisi, karboksi-terminalinde ise transmembran bölgesi taşır. Bu proteininin yaklaşık 980 amino asitlik bir kısmı ekstraselüler bölgeye oluşturur. Hücre içerisinde kalan intraselüler bölge ise sadece 21 amino asitlik kısımdır (19). Kl proteinin ekstraselüler kısmı, Kl-1 ve Kl-2 olarak adlandırılan iki internal tekrar bölgesinden oluşur. Kl-1 ve Kl-2 bölgeleri bakteri ve bitkilere ait  $\beta$ -glukuronidaz enzimlerine homolog dizilere sahiptirler (25). Kl-1 ve Kl-2 tekrarları arasında kalan bölgede dört bazik amino asitler



**Şekil 3:** Transmembran Kl proteininin ekstraselüler bölgesinin ADAM metaloproteaz enzimleri tarafından kesilmesi sonucu çözünür formda Kl proteininin oluşması (A). FGF23 hormonu için Kl proteininin ko-faktör olarak işlev görmesi (B).

den oluşan (Lys-Lys-Arg-Lys), proteolitik kesim için potansiyel hedef dizi yer alır (26).

Kl proteinin salgılanan formu ekstraselüler KL2 tekrarı, transmembran bölge ve intaselüler bölgeyi taşımaz. Yapılan son çalışmalarda kan ve serebrospinal sıvılarda alternatif işleme sonucu oluşan çözünür formdaki Kl proteinine göre daha büyük bir Kl proteini saptanmıştır (27). Bunun membran Kl proteininin ekstraselüler bölgesinin ADAM10 ve ADAM17 metaloproteaz enzimleri tarafından kesilmesi sonucu oluştuğu rapor edilmiştir (26) (Şekil 3A).

Çeşitli immünolojik testler ile Kl proteinlerinin farklı organ ve doku hücrelerindeki ekspresyonları ve vücut sıvılarındaki varlıkları araştırılmıştır. Farelerde yapılan çalışmalar sonucunda, Kl proteininin baskın olarak böbrek hücrelerinde ve beyinde koroid pleksus epitel hücrelerinde sentez edildiği, bununla birlikte hipofiz bezi, plasenta, iskelet kası, idrar kesesi, pankreas, testis, yumurtalık ve kolon hücrelerinde de düşük düzeyde eksprese edildiği saptanmıştır (19,28,29). İnsan Kl proteininin de böbrek dokularında bol miktarda sentez edildiğini, diğer taraftan plasenta, prostat ve ince bağırsak dokularında da *kl* gen ekspresyonunun gerçekleştiği ortaya konmuştur (26). Kl proteinin alternatif işleme ya da ADAM metaloproteaz enzimleri ile kesim sonucu oluşan salgı formu serebrospinal sıvıda, kanda ve ürede tespit edilmiştir (30).

### Klotho Proteininin Fonksiyonları

Araştırma sonuçları *kl* geninin, memelilerde yaşlılık sürecinde ve yaşlanma ile ilgili hastalıklarda önemli rol

oyndığını göstermiştir. Kl proteini seviyesinin azalması ile yaşlılık benzeri fenotipler ortaya çıkar (19). *Kl* geninin fazla eksprese edilmesiyle yaşam süreci %20-30 oranında artmaktadır (6). İlginç olan ise *kl* geni sınırlı sayıda dokularda sentez edilmesine rağmen *kl* geni hasarı bütün doku ve organlarda, birçok yaşlılık benzeri fenotipin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (19). Kl proteininin fazla miktarda sentez edilmesi anlamlı olarak oksidatif strese direnç kazandırarak yaşlanma sürecini yavaşlatmakta ve yaşam süresini uzatmaktadır (31).

*Kl* geni üzerinden alternatif işleme sonucunda sentez edilen transmembran Kl ve çözünür formdaki Kl proteininin farklı işlevlere sahip olduğu saptanmıştır. Transmembran Kl proteini hücre membranlarında bulunan fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR) ile kompleks oluşturarak fibroblast büyüme faktörü-23 (FGF23) hormonu için ko-faktör görevi görür (32,33) (Şekil 3B). FGF23 hormonu fosfat metabolizmasından sorumlu FGF protein ailesinin bir üyesidir. Kemik-iyon homeostazında, paratiroid hormonu (PTH)/D vitamini ekseninin temel düzenleyici etkenidir. Fakat son bulgular FGF23-kemik/böbrek ekseninin de iyon homeostazında büyük önem taşıdığını ortaya koymuştur. FGF23 en fazla kemik iliği hücrelerinde sentez edilmektedir. Buna ek olarak timüs bezi, beyin, dalak ve kaslarda da önemli ölçüde FGF3 eksprese olduğu saptanmıştır (34). FGF23 hormonu yüksek düzeyde 1,25-dihidroksikolekalsiferol'e (kalsitriol) tepki olarak özellikle kemik hücreleri tarafından salgılanan FGF23 hormonu, renal fosfat atılımını hızlandırarak ve 1,25 dihidroksi vitamin D3 (1,25 - (OH) 2VD3)'ün serum düzeyini düşürerek negatif fosfat dengesine yol açar. Bu noktada

kemik hücreleri (osteositler) de mineral dengesi açısından önemli bir işlev üstlenirler. FGF23 işlev görebilmesi için fonksiyonel ko-faktör olarak membran bağlı Kl proteinine bağlıdır. Dolayısıyla Kl proteini ya da FGF23 hormonu sentezi ile ilgili defektler farelerde fosfat birikimine ve buna bağlı gelişen iyon dengesinin bozulması sonucunda erken yaşlanmaya ve ölüme yol açmaktadır (35).

Yapılan çalışmalar, dolaşım hormonu gibi davranan çözünür formdaki Kl proteinin de değişik işlevlere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Çözünür Kl proteininin iyon transportu (36,37), Wnt sinyal yolağı (38), anti-renin/anjyotensin sistemi (39) üzerinde etkili olduğu, yaşlanmayı önleyici (40) ve anti-oksidan (41) özellik taşıdığı ileri sürülmektedir. Bunlara ek olarak, böbreklerde 1 $\alpha$ -hidroksilazı baskılayarak böbreklerde kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesinde (42) ve paratiroid bezinde PTH sentezinin düzenlenmesinde (43) de rol almaktadır.

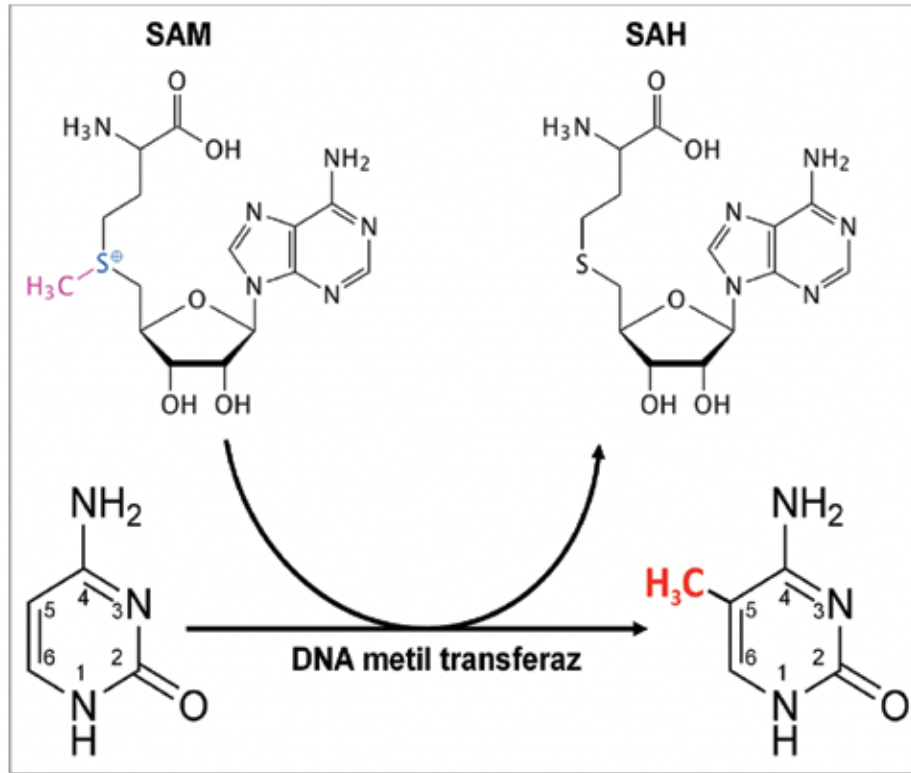
### **Klotho Geni ve Metilasyon**

Özellikle farelerde yapılan araştırmalar Kl proteininin etki mekanizmaları hakkında önemli ipuçları vermiştir. Diğer taraftan Kl proteinini kodlayan *kl* geninin işleyişini düzenleyen mekanizmalar hakkındaki çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Bu bağlamda, Turan ve Ata'nın (44) yaptığı çalışmada, lusiferaz ve yeşil floresan protein (GFP) genlerinin insan *kl* geni promotör bölgesini de kapsayan yaklaşık 2 kb'lik yukarı bölgesinin kontrolünde klonlanarak belirteç (reporter) vektörler oluşturulmuş ve bu modeller üzerinde hücre dışı faktörlerin (iyon konsantrasyonundaki değişimler, çeşitli büyüme faktörleri ve hormonlar) ve özellikle apoptozda rol alan hücre içi faktörlerden p16, p21 ve p53 proteinlerinin *kl* gen anlatımına etkileri araştırılmıştır. Bununla birlikte *kl* geninin regülasyonu hakkında çok fazla bilgi mevcut değildir. Yakın tarihte yayınlanan bir çalışmada, CpG adaları bakımından çok zengin olan promotör bölgesinin metilasyonu ile epigenetik olarak bu genin kontrol edilebileceği yönünde bulgular rapor edilmiştir (45). Bu bakımdan *kl* geninin regülasyonunda DNA metil transferaz (DNMT) enzimlerinin önemli olacağı düşünülmektedir. Buna karşın somut olarak hücre içerisinde DNMT enzimlerinin aktivitesinin artırılmasının *kl* gen anlatımını etkileyip etkilemediğini ortaya koyan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu konudaki eksikliklerin giderilmesine katkı sağlayacak bir Yüksek Lisans tez çalışması tarafımızca gerçekleştirilmiştir

(46). Bu çalışma kapsamında, yaşlanma ile ilişkisi kanıtlanmış önemli bir genetik faktör olan *kl* geni anlatımı üzerine epigenetik faktörlerden DNMT3A ve DNMT3B enzimlerinin etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, DNMT3A ve DNMT3B enzimlerinin insan orijinli HEK-293 hücrelerinde, *kl* geni anlatımına etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucu elde edilen veriler, DNMT enzimlerinin kromatin halinde organize olmuş *kl* geni promotörü üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olduklarını ortaya koymuştur.

Epigenetik, DNA'da nükleotid dizilerinde değişikliğe yol açmadan, kalıtım yoluyla aktarılabilen genlerin aktiviteleindeki değişiklikleri ifade eder. Çok hücreli canlılarda, her bir hücredeki DNA'nın yapısı ve nükleotidlerin dizilişi aynıdır. Hücreler arasındaki farklılıkların temel sebebi, gen anlatımındaki farklılıklardır. Gen anlatımı iki temel mekanizma ile kontrol edilir. Bunlar, transkripsiyon düzeyinde, genlerin RNA kopyalarının çıkartılması ya da baskılanması ve transkripsiyon sonrası devreye giren kontrol mekanizmalarıdır. Kromatinin yapısını oluşturan histon proteinlerinin kovalent modifikasyonları transkripsiyon sonrası gen anlatımını kontrol eden mekanizmalar kapsamında değerlendirilebilir. Bunların dışında gen anlatımının kontrolünde etkili olan bir üçüncü mekanizma olarak DNA moleküllerinde gerçekleştirilen kovalent modifikasyonlar sayılabilir. Özellikle histon proteinleri ve DNA moleküllerinde meydana gelen kovalent değişiklikler, gen anlatımı üzerinde etkili olan epigenetik faktörlerdir.

Waddington 1942 yılında, epigenetiği genotiplerin fenotipi geliştirmesi olarak tanımlamıştır (47). Günümüzde DNA dizisindeki değişimlerle açıklanamayan, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile döllere aktarılabilen, gen fonksiyonlarındaki değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, epigenetik olayların özellikle yüksek organizasyonlu canlılarda etkili olduğu ortaya konmuştur. Epigenetik mekanizmalar iki yönlüdür, değişebilir ve yeni oluşan profili bir sonraki nesle aktarabilir. Epigenetik olaylar, canlıların embriyodan yetişkin bireye doğru ilerleyen gelişim sürecinde hücre farklılaşmasının temelini oluşturan gen anlatımlarında değişikliklere neden olur. Aynı ortamda büyüyen ve aynı genetik bilgiye sahip olan iki bireyin farklı fenotipik özellikler taşıması epigenetik ile açıklanabilmektedir. Kardeş kromatitler üzerindeki epigenetik farklılıkların gen anlatımında farklılıklara sebep olduğu düşünülmektedir. Son çalışmalarda epigenetik faktörler çeşitli kanser türleri ile de ilişkilendirilmiştir (48-55). Epige-



**Şekil 4:** DNA Metilasyonu. DNA metil transferazlar, DNA'daki sitozin bazının 5. karbon atomuna SAM'den metil grubunun transferini kataliz eder, 5-metil sitozin ve SAH oluşur. SAM; S-adenosilmetiyonin, SAH; S-adenosilhomosistein.

netik mekanizmaların başında DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gelmektedir.

İlk keşfedilen ve üzerinde en fazla çalışılan epigenetik mekanizma DNA metilasyonudur (56,57). DNA metilasyonu uzun süreli gen suskunluğuna neden olur. Moleküler düzeyde histon proteini ve DNA molekülündeki sitozin bazında metilasyonlar ve nükleozomdaki pozisyon değişiklikleri genellikle epigenetik mekanizmaların sürdürülmesi olarak kabul edilmektedir. Bunlar temel olarak birçok hücrel sürecin düzenlenmesinde, DNA-protein etkileşimleri, hücrel farklılaşma, embriyogenez, X kromozomu inaktivasyonu ve genomik imprinting gibi durumlarda etkilidir. Epigenetik faktörler ile gen anlatımının kontrolünün temelini transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşmasını engelleyecek ya da kolaylaştıracak etkiler oluşturmaktadır. Bu etki geri dönüşümlü olması açısından mutasyonlardan farklıdır (48).

Yüksek organizasyonlu canlılarda tipik olarak DNA metilasyonu sitozin bazının 5. pozisyonundaki karbon atomunda (C-5) gerçekleşir. Metil grubu eklenen sitozin bakiyesini çoğunlukla bir guanin bakiyesi takip eder (CpG dinükleotid-

leri) (58,59). Genellikle genlerin 5'-ucunda kümelenen CpG bölgeleri, "CpG adaları" olarak adlandırılır ve bu bölgeler gen anlatımının düzenlenmesi açısından büyük önem taşır (60).

Genel olarak hücrelerde DNA metilasyonu iki şekilde gerçekleşir. Bunlardan birincisi, hiç metillenmemiş bir DNA molekülünün yeniden metillenmesi, "de novo metilasyon", diğeri ise metillenmiş olan DNA bölgelerinin replikasyon sonrasında da devam ettirilmesi, "sürdürme metilasyonu" ya da diğeri bir ifade ile "hemi-metilasyondur" (61). DNA'nın metilasyonu, "metil transferaz" olarak adlandırılan trans-etkili enzimler tarafından gerçekleştirilir. Metillenecek DNA molekülünün durumuna göre ya *de novo* metillenir, ya da yarı-metillenmiş ise komplementer zincir de metillenir. Bilinen tüm DNMT enzimleri sitozin bakiyelerini C-5 pozisyonuna metil grubu transfer etme yeteneğine sahiptirler. DNA metilasyonu, tüm canlılarda görülen ve çok geniş bir yelpazede biyolojik işlevlerde etkili olan bir olaydır.

Bilinen tüm DNMT enzimleri metil grubu vericisi olarak S-adenosilmetiyonin (SAM) molekülünü kullanır (62). SAM hücrelerde metiyonin adenosil transferaz enzimi katalizör-lüğünde metiyonin üzerinden sentez edilir. İnsanları da

kapsayacak şekilde memeli organizmalarda üç farklı DNMT enzimi karakterize edilmiştir. Bunlar; DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B enzimleridir. Bu enzimler SAM'den gelen metil gruplarının DNA'da CpG dizilerinde sitozin bazının 5. karbon atomuna aktarılmasını katalize ederler. Reaksiyon sonucunda 5-metilsitozin (m5C) ve S-adenosilhomosistein oluşur (Şekil 4).

1982 yılında Greunbaum ve arkadaşları (63) tarafından memelilerde karakterize edilen ilk DNA metil transferaz enzimi DNMT1 olarak adlandırılmıştır. Memelilerde baskın olarak bulunan DNMT1 enzimi, beklenen aksine *de novo* metilasyon aktivitesi yarı-metillenmiş DNA'ları metilleme aktivitesine göre 10-100 kat daha düşük bulunmuştur. Dolayısıyla, DNMT1 enzimi daha çok mevcut metilasyon kalıbının sürdürülmesinden sorumlu olan enzimdir (64). DNMT1 geni üzerinden kodlanan mRNA'ların alternatif işlenmesi sonucunda hücrelerde dört farklı DNMT enzim varyantı sentez edilmektedir. Bu enzimler; DNMT1s, DNMT1o, DNMT1b ve DNMT1<sup>ΔE3-6</sup> enzimleridir (64,65).

DNMT3A ve DNMT3B enzimleri hem *de novo* hem de yarı-metillenmiş DNA'ları metilleme aktivitelerine sahiptirler (66). İnsanda DNMT3A ve DNMT3B enzimlerini kodlayan genler, genom üzerinde 2 ve 20 no'lu kromozomlar üzerinde yer almaktadır (Şekil 5A). DNMT3A geni 23 ekzon ve 22 introndan oluşur ve 2 no'lu kromozomun kısa (p) kolunda, p23.22 segmenti üzerinde yer alır. Genom üzerinde yaklaşık 115 kb'lık bir alanı kapsar (67). Bu gen üzerinden alternatif işleme ile oluşan mRNA moleküllerinden bilinen dört farklı DNMT3A enzim varyantları sentez edilir. İnsan DNMT3B geni, 20 no'lu kromozomun uzun kolunda (q) p11.22 segmentinde yer almaktadır. Bu gen de 23 ekzon ve 22 intron bölgesinden oluşur (Şekil 5B). Genom üzerinde yaklaşık 47 kb'lık bir alan kaplamaktadır (67). DNMT3B geni üzerinden tüm ekzonları kapsayan 853 amino asitlik DNMT3B-v.1 polipeptidi kodlanır. DNMT3B enzimi özellikle embriyonik kök hücrelerde fazla miktarda sentez edilir. Farklılaşma ile bu enzimin sentez düzeyi düşer (67). Erişkinlerde DNMT3B enzimi testis, kemik iliği ve tiroid bezi dışındaki bir çok organda düşük seviyede sentez edilir (67). *DNMT3B* geninden alternatif işleme sonucunda bilinen sekiz farklı DNMT3B varyantı sentez edilmektedir.

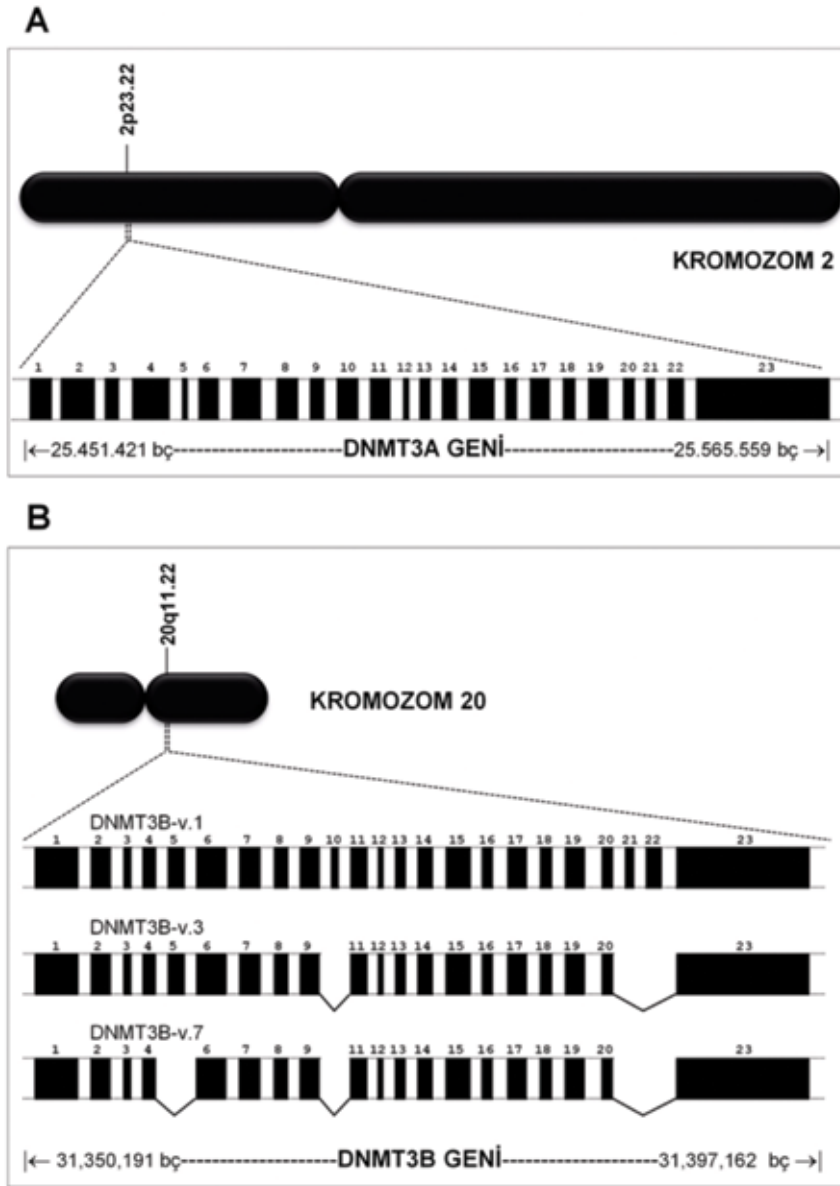
İnsan *kl* geninin yukarı (upstream) bölgesi incelendiğinde bu bölgenin CpG dizileri bakımından çok zengin olduğu görülür (45). Bu durum, *kl* geni anlatımının kontrolünde epigenetik faktörlerin etkili olabileceğini akla getirmektedir.

Diğer taraftan, DNA metilasyonunun kanserleşmede önemli olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (49,50, 52-55). Son zamanlarda yapılan çalışmalar *kl* geninin, IGF-1 yolunu inhibe ederek kanser gelişimini etkileyebileceğini göstermiştir (68). Klotho'nun insan serviks ve meme kanserinde tümör baskılayıcı olduğu ileri sürülmektedir (45,68). Mide kanseri olan hastalarla yapılan bir çalışmada, kanser hastalarının% 46'sında *kl* geni promotöründe metilasyon gözlenirken, kanser olmayan kontrol grubunda normal mide dokusunda metilasyona rastlanmamıştır (69). Bu sebeple mide kanserinde *kl* geni, inaktive edilmiş yeni epigenetik tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda rahim, serviks, mide mukozası, kolon ve meme bezlerinde normal hücrelerde *kl* geni promotör metilasyonu normal iken malign dönüşüm sırasında metilasyon oranının arttığı görülmüştür (45,51,69,70). Sun ve arkadaşları (71) üremik hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, üremik toksinlerdeki artışa paralel olarak DNMT enzimlerinde artış olduğunu ve *kl* geninin CpG adacıklarındaki metilasyon oranındaki artışa bağlı olarak da Kl protein sentezinin azaldığını rapor etmişlerdir. Tümör baskılayıcı genlerin DNMT enzimleri ile epigenetik olarak anlatım düzeylerinin düşürülmesi ya da inaktivasyonu kanser gelişiminde önemli bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır (72). Çeşitli kanser türleri ile ilişkilendirilen ve eksikliğinde yaşlanmaya benzer belirtilerin ortaya çıkmasına neden olan Kl proteininin sentezinin regüle edilmesi bir kısım hastalıkların tedavisine olanak sağlayabilir (73-75).

İnsan beyinde yaşa bağlı olarak protein sentezinde meydana gelen değişikliklerin arkasında yatan mekanizmalardan biri, gen anlatımının kontrolünde kilit rol oynayan promotör bölgenin metilasyonudur (76,77). *kl* geni, metilasyon sonucunda beyinde ekspresyonu azalan genler arasında yer almaktadır (78). Yaşlanmaya bağlı olarak genlerin anlatımlarında değişikliklere yol açan mekanizmaların daha iyi anlaşılması, normal yaşlanma ve nörolojik hastalıkların gelişimi arasındaki ilişkinin belirlenmesinde ve bu tür hastalıkların önüne geçilmesinde büyük önem taşımaktadır (78).

Sonuç olarak, yaşlanma, bilinen tüm yaşam formlarında olduğu gibi insanlar için de kaçınılmaz bir süreçtir. Bu sürecin ilerleyiş hızını belirleyen temel faktörler canlının çevre ile etkileşimi ve kendi kalıtsal özellikleridir. İlk kez farelerde ortaya konan *kl* geninin, yaşlanma ile yakından ilişkili en önemli kalıtsal faktörlerden biri olduğu saptanmıştır. Bu genin kodladığı Kl proteininin hücrelerde sentez edilme-



**Şekil 5:** DNMT3A (A) ve DNMT3B (B) genlerinin genom lokalizasyonu ve ekzon-intron yapıları. (Gen lokasyonu 'LocusID-NCBI'ya göre verilmiştir)

mesi ya da düşük düzeylerde sentezlenmesi ateroskleroz, osteoporoz, deride atropi gibi birçok yaşlanma benzeri fenotipin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Son yapılan çalışmalarda *kl* geni çeşitli kanser türlerinin gelişmesi ile de ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla, insan *kl* geni düzenlenme mekanizması konusunda elde edilecek bulgular bu proteinin anlatım düzeyine bağlı olarak ortaya çıkacak hastalıkların tedavisinde alternatif yaklaşımlar sunabilir. Bununla birlikte *kl* genin kontrolüne dayalı yaşlanmayı geciktirici ve yaşam kalitesini arttırıcı etkenlerin geliştirebilmesi için

moleküler düzeyde ilgili genlerin düzenlenme mekanizmalarının ortaya konması büyük önem taşımaktadır.

### Teşekkür

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından "DNA Metil Transferaz Enzimlerinin Yaşlanma ile İlgili İnsan *Kltho* Geni Anlatımı Üzerine Etkilerinin Araştırılması" konulu ve "SAG-C-YLP-130313-02064" numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.



## KAYNAKLAR

1. Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sorensen TI, Harvald B, Vaupel J W. The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. *Hum Genet.* 1996;97:319-323.
2. Christensen K, Johnson TE, Vaupel JW. The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights. *Nat Rev Genet.* 2006;7:436-448.
3. de Magalhaes JP, Cabral JA, Magalhaes D. The influence of genes on the aging process of mice: a statistical assessment of the genetics of aging. *Genetics.* 2005;169:265-274.
4. Masternak MM, Al-Regaiey KA, Del Rosario Lim MM, Jimenez-Ortega V, Panici JA, Bonkowski MS, Bartke A. Effects of caloric restriction on insulin pathway gene expression in the skeletal muscle and liver of normal and long-lived GHR-KO mice. *Exp Gerontol.* 2005;40:679-684.
5. Cabelof DC, Raffoul JJ, Ge Y, Van Remmen H, Matherly LH, Heydari AR. Age-related loss of the DNA repair response following exposure to oxidative stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006;61:427-434.
6. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science.* 2005;309:1829-1833.
7. Flurkey K, Papaconstantinou J, Miller RA, Harrison DE. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:6736-6741.
8. Giannakou ME, Goss M, Junger MA, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L. Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science.* 2004;305:361.
9. Dupont J, Holzenberger M. IGF type 1 receptor: a cell cycle progression factor that regulates aging. *Cell Cycle* 2003;2:270-272.
10. Dupont J, Holzenberger M. Biology of insulin-like growth factors in development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003;69:257-271.
11. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Park SH, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower L.A. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature.* 2002;415:45-53.
12. Barbieri M, Bonafe M, Franceschi C, Paolisso G. Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285:E1064-1071.
13. Castro E, Edland SD, Lee L, Ogburn CE, Deeb SS, Brown G, Panduro A, Riestra R, Tilvis R, Louhija J, Penttinen R, Erkkola R, Wang L, Martin GM, Oshima J. Polymorphisms at the Werner locus: II. 1074Leu/Phe, 1367Cys/Arg, longevity, and atherosclerosis. *Am J Med Genet.* 2000;95:374-380.
14. Flachsbarb F, Caliebe A, Kleindorfer R, Blanche H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, Schreiber S, Nebel A. Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:2700-2705.
15. van Heemst D, Beekman M, Mooijaart SP, Heijmans BT, Brandt BW, Zwaan BJ, Slagboom PE, Westendorp RG. Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell.* 2005;4:79-85.
16. Donehower LA. p53: guardian AND suppressor of longevity? *Exp Gerontol.* 2005;40:7-9.
17. Willcox BJ, Donlon TA, He Q, Chen R, Grove JS, Yano K, Masaki KH, Willcox DC, Rodriguez B, Curb JD. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:13987-13992.
18. Kim JY, Jung KJ, Choi JS, Chung HY. Modulation of the age-related nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) pathway by hesperetin. *Aging Cell.* 2006;5:401-411.
19. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-lida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 1997;390:45-51.
20. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-lida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;242:626-630.
21. Arking DE, Krebsova A, Macek M, Macek M, Arking A, Mian IS, Fried L, Hamosh A, Dey S, McIntosh I, Dietz HC. Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:856-861.
22. Arking DE, Becker DM, Yanek LR, Fallin D, Judge DP, Moy TF, Becker LC, Dietz HC. KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1154-1161.
23. Ohyama Y, Kurabayashi M, Masuda H, Nakamura T, Aihara Y, Kaname T, Suga T, Arai M, Aizawa H, Matsumura Y, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R. Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;251:920-925.
24. Shiraki-lida T, Aizawa H, Matsumura Y, Sekine S, Iida A, Anazawa H, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett.* 1998;424:6-10.
25. Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, Henrissat B, Fujimori T, Nabeshima Y. Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J Biol Chem.* 2004;279:9777-9784.
26. Wang Y, Sun Z. Current understanding of klotho, *Ageing Res Rev* 2009; 8: 43-51.
27. Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:19796-19801.
28. Kamemori M, Ohyama Y, Kurabayashi M, Takahashi K, Nagai R, Furuya N. Expression of Klotho protein in the inner ear. *Hear Res.* 2002;171:103-110.

29. Li SA, Watanabe M, Yamada H, Nagai A, Kinuta M, Takei K. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell Struct Funct.* 2004;29:91-99.
30. Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, Fujimori T, Nabeshima Y. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett.* 2004;565:143-147.
31. Kuro-o, M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol Chem.* 2008;389:233-241.
32. Zhu D, Mackenzie NC, Millan JL, Farquharson C, MacRae VE. A protective role for FGF-23 in local defence against disrupted arterial wall integrity? *Mol Cell Endocrinol.* 2013;372:1-11.
33. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature.* 2006;444:770-774.
34. Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:1637-1647.
35. Kuro-o M. A potential link between phosphate and aging--lessons from Klotho-deficient mice. *Mech Ageing Dev.* 2010;131:270-275.
36. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-o M, Moe OW. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J.* 2010;24:3438-3450.
37. Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science.* 2005;310:490-493.
38. Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, Malide D, Rovira II, Schimel D, Kuo CJ, Gutkind JS, Hwang PM, Finkel T. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science.* 2007;317:803-806.
39. Mitani H, Ishizaka N, Aizawa T, Ohno M, Usui S, Suzuki T, Amaki T, Mori I, Nakamura Y, Sato M, Nangaku M, Hirata Y, Nagai R. In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension.* 2002;39:838-843.
40. de Oliveira RM. Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Lett.* 2006;580,5753-5758.
41. Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, Tomita N, Namikoshi T, Sasaki T, Fujimori T, Xie P, Kanwar YS. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:2331-2336.
42. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol.* 2003;17:2393-2403.
43. Silver J, Naveh-Many T. FGF23 and the parathyroid glands. *Pediatr Nephrol.* 2010;25:2241-2245.
44. Turan K, Ata P. Effects of intra- and extracellular factors on anti-aging klotho gene expression. *Genet Mol Res.* 2011;10:2009-2023.
45. Lee J, Jeong DJ, Kim J, Lee S, Park JH, Chang B, Jung SI, Yi L, Han Y, Yang Y, Kim KI, Lim JS, Yang I, Jeon S, Bae DH, Kim CJ, Lee MS. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer.* 2010;9:109.
46. Çağlayan E. (2014) DNA Metil Transferaz Enzimlerinin Yaşlanma İle İlgili İnsan Klotho Geni Anlatımı Üzerine Etkilerinin Araştırılması. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü YLT, İ., (Danışman: Prof. Dr. K.Turan).
47. Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol.* 2012;41:10-13.
48. Ducasse M, Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer.* 2006;5:60.
49. Gigek CO, Chen ES, Calcagno DQ, Wisnieski F, Burbano RR, Smith MA. Epigenetic mechanisms in gastric cancer. *Epigenomics.* 2012;4:279-294.
50. Chin SP, Dickinson JL, Holloway AF. Epigenetic regulation of prostate cancer. *Clin Epigenetics.* 2011;2:151-169.
51. Rubinek T, Shulman M, Israeli S, Bose S, Avraham A, Zundelovich A, Evron E, Gal-Yam EN, Kaufman B, Wolf I. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133:649-657.
52. Catalano MG, Fortunati N, Boccuzzi G. Epigenetics modifications and therapeutic prospects in human thyroid cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 40.
53. Enokida H, Nakagawa M. Epigenetics in bladder cancer. *Int J Clin Oncol.* 2008;13:298-307.
54. Dubuc AM, Mack S, Unterberger A, Northcott PA, Taylor MD. The epigenetics of brain tumors. *Methods Mol Biol.* 2012;863:139-153.
55. Khare S, Verma M. Epigenetics of colon cancer. *Methods Mol Biol.* 2012;863:177-185.
56. Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009;462:315-322.
57. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell.* 2007;128:635-638.
58. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem.* 2011;12:206-222.
59. Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:596-612.
60. Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell.* 1992;70:5-8.
61. Otto SP, Walbot V. DNA methylation in eukaryotes: kinetics of demethylation and de novo methylation during the life cycle. *Genetics.* 1990;124:429-437.
62. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem.* 1999;274:33002-33010.
63. Gruenbaum Y, Cedar H, Razin, A. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase. *Nature.* 1982;295:620-622.
64. Spada F, Haemmer A, Kuch D, Rothbauer U, Schermelleh L, Kremmer E, Carell T, Langst G, Leonhardt H. DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells. *J Cell Biol.* 2007;176:565-571.

65. Robertson KD. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene*. 2002;21:5361-5379.
66. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*. 1998;19:219-220.
67. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*. 1999;236:87-95.
68. Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, Ligumsky H, Sredni B, Kanety H, Kuro-o M, Karlan B, Kaufman B, Koeffler HP, Rubinek T. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene*. 2008;27:7094-7105.
69. Wang L, Wang X, Wang X, Jie P, Lu H, Zhang S, Lin X, Lam EK, Cui Y, Yu J, Jin H. Klotho is silenced through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Am J Cancer Res*. 2011;1:111-119.
70. Pan J, Zhong J, Gan LH, Chen SJ, Jin HC, Wang X, Wang LJ. Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Tumour Biol*. 2011;32:729-735.
71. Sun CY, Chang SC, Wu MS. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int*. 2012;81:640-650.
72. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet*. 2010;70:27-56.
73. Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Nino MD, Suarez-Alvarez B, Lopez-Larrea C, Jakubowski A, Blanco J, Ramirez R, Selgas R, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A, Sanz AB. The inflammatory cytokines TWEAK and TNFalpha reduce renal klotho expression through NFKappaB. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:1315-1325.
74. Zhang H, Li Y, Fan Y, Wu J, Zhao B, Guan Y, Chien S, Wang N. Klotho is a target gene of PPAR-gamma. *Kidney Int*. 2008;74:732-739.
75. King GD, Chen C, Huang MM, Zeldich E, Brazee PL, Schuman ER, Robin M, Cuny GD, Glicksman MA, Abraham CR. Identification of novel small molecules that elevate Klotho expression. *Biochem J*. 2012;441:453-461.
76. Hernandez DG, Nalls MA, Gibbs JR, Arepalli S, van der Brug M, Chong S, Moore M, Longo DL, Cookson MR, Traynor BJ, Singleton AB. Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Hum Mol Genet*. 2011;20:1164-1172.
77. Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TI, Weisenberger DJ, Biniszkiwicz D, Jaenisch R, Laird PW, Akbarian S. DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS One*. 2007;2:e895.
78. King GD, Rosene DL, Abraham CR. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. *Age (Dordr)*. 2012;34:1405-1419.