

Aus dem Center for Cardiovascular Research
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Molekulare Mechanismen der fetalen Programmierung.
Erste Einblicke in den Einfluss von plazentarem Klotho auf
mütterliche und kindliche biologische Parameter

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Reichetzedler

aus Wien

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. Thiemo Pfab
 2. Prof. Dr. J.-P. Stasch
 3. Prof. Dr. med. Florian Lang

Datum der Promotion: 03.06.2012

Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Rolle von plazentarem Klotho, einem Typ-1 *singlepass* Transmembranprotein, welches vielfältige Effekte entfaltet und mit der Inhibition von Alterungsprozessen in Zusammenhang gebracht wird, näher charakterisiert werden. Dies geschah unter mehreren Gesichtspunkten. Die Idee zu diesem Projekt entstammte einem bisher nicht publizierten Tierexperiment an Mäusen von Professor Dr. med. Florian Lang (in freundlicher Korrespondenz mit Professor Lang), welcher das Überleben homozygot Klotho-defizienter Nachkommenschaft heterozygot Klotho-defizienter Mütter durch eine während der Schwangerschaft und Stillzeit eingehaltenen Vitamin-D-defizienten Diät drastisch erhöhen konnte. Normalerweise versterben homozygot Klotho-defiziente Mäuse einige Monate nach der Geburt. Diese Beobachtung ließ stattgefundenen Effekte von fetaler Programmierung vermuten. Unter fetaler Programmierung versteht man epigenetische Modifikationen im Genom des ungeborenen Kindes, welche durch ein aberrierendes intrauterines Milieu hervorgerufen werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob variierende Konzentrationen von plazentarem Klotho einen Einfluss auf den gebräuchlichsten Parameter der fetalen Programmierung, das Geburtsgewicht, haben. Ferner wurde neben Klotho in dieser Arbeit auch die Konzentration des plazentaren Vitamin-D-Rezeptors bestimmt und Interaktionen zwischen diesem und Klotho untersucht. In gleicher Weise wurden andere plazentare, von weiteren Doktoranden bestimmte Proteine auf Interaktionen mit Klotho analysiert.

Die Plazentaprobe wurden während des Zeitraums von Januar 2000 bis Dezember 2004 an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Charité Campus Mitte, Universitätsklinikum der Humboldt- und Freien Universität Berlin, gesammelt. Aus der Kohorte wurden im Rahmen dieser Arbeit 343 Proben zur weiteren Analyse aufgearbeitet. Vier davon erzielten keine verlässlichen Resultate, drei weitere wurden auf Grund unterschiedlicher ethnischer Herkunft ausgeschlossen, womit 336 Proben in die statistische Auswertung eingeschlossen wurden. Mit allen partizipierenden Müttern wurde auch ein strukturiertes Interview durchgeführt, von den Neugeborenen wurden biometrische und klinischen Daten im Rahmen der postnatalen Routineuntersuchung erhoben, etwaige vorhandene Krankenakten ausgewertet und all diese Informationen in eine Datenbank eingebracht.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration bediente man sich dem sehr gut etablierten Western Blot Verfahren. Alle Experimente wurden zumindest zweimal wiederholt.

Die statistische Auswertung der Daten konnte die Hypothese, wonach eine unterschiedliche Expression von plazentarem Klotho durch Modifikation des intrauterinen Milieus zu programmierenden Effekten beim Neugeborenen führt, nicht bestätigen. Die bestimmten Proteinkonzentrationen von Klotho ließen sich nicht mit Effekten auf das Geburtsgewicht assoziieren.

Die Assoziation von Klotho mit anderen plazentaren Proteinen erbrachte mehrere signifikante Resultate. Es konnte demonstriert werden, dass Klotho positiv mit dem Vitamin-D-Rezeptor ($r^2=0,101$; $p<0,0001$), der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase ($r^2=0,080$; $p<0,0001$), dem Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor ($r^2=0,064$; $p<0,0001$) und dem Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2 ($r^2=0,059$; $p<0,0001$) korreliert. Darüber hinaus konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen positiver Rauchanamnese ($p=0,0122$), Rauchen während der Schwangerschaft ($p=0,013$) und einer verringerten plazentaren Expression von Klotho hergestellt werden. Die Anzahl an gerauchten Packyears zeigte ferner eine inverse Korrelation mit plazentarem Klotho ($r^2=0,021$; $p=0,0091$). Die Proteinkonzentration von Klotho korrelierte auch invers mit der eine Woche prä- ($r^2=0,176$; $p=0,0009$) bzw. postnatal ($r^2=0,025$; $p=0,0042$) bestimmten Leukozytenzahl.

Aus der vorliegenden Arbeit konnten mehrere Hypothesen generiert werden, die weiterer Forschungsarbeit bedürfen. Es konnten Assoziationen zwischen Klotho und anderen plazentaren Proteinen hergestellt werden, die die Vermutung zulassen, dass Klotho viele seiner putativen Funktionen in der Plazenta in ähnlicher Weise wie im übrigen Organismus ausübt. Zusätzlich konnten weitere, bis dato noch nicht bekannte Assoziationen aufgezeigt werden, wie der negative Einfluss von Rauchen und erhöhter Leukozytenzahl auf die plazentare Expression von Klotho.

Abstract

Klotho is a singlepass transmembrane protein predominantly expressed in the kidney. However, expression in the placenta was likewise reputed. It is considered as a putative major player in the development of cardiovascular diseases and was inversely associated with aging. The objective of this thesis was to analyze placental Klotho expression and to investigate Klotho in the context of fetal programming. Fetal programming is a constantly emerging field as the intrauterine environment seems to be an important factor for an initial setting of various biological nominal values. Placenta samples were collected at the clinic for gynecology and obstetrics, Charité Campus Mitte. Structured interviews were performed with all partaking mothers, postnatal biometric and clinical data of the neonates were collected during the routine postnatal physical examination and existing clinical records were examined. We then analyzed the expression of Klotho and other placental proteins by Western Blot in 343 samples.

In the placenta Klotho correlated positively with the Vitamin D receptor ($r^2=0,101$; $p<0,0001$), the endothelial nitric oxide synthase ($r^2=0,080$; $p<0,0001$), the peroxisome proliferator activated receptor- γ ($r^2=0,064$; $p<0,0001$) and the angiotensin II type 2 receptor ($r^2=0,059$; $p<0,0001$). In addition placental Klotho could be associated with clinical data gathered during the sample collection: Leukocyte count performed one week before ($r^2=0,176$; $p=0,0009$) and one week after delivery ($r^2=0,025$; $p=0,0042$) correlated negatively with placental Klotho concentrations. Smoking before ($p=0,0122$) and during pregnancy ($p=0,013$) resulted in lower placental Klotho levels compared to non smoking mothers. Furthermore smoked pack years also correlated negatively with placental Klotho concentrations ($r^2=0,021$; $p=0,0091$). Variations in placental Klotho expression had no significant impact on the most commonly used surrogate parameter of fetal programming, birthweight.

In conclusion, we could demonstrate that placental Klotho is part of a complex paracrine network of cardiovascular related proteins. In addition we were able to show associations between smoking status or leukocyte count and altered placental Klotho concentrations. However, in the studied cohort variations in placental Klotho expression did not show an impact on birthweight.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Fetale Programmierung.....	1
1.2 Klotho.....	6
1.2.1 Funktionen von Klotho	8
1.2.1.1 Klotho fungiert als zirkulierendes Hormon.....	10
1.2.1.2 Klotho besitzt enzymatische Funktion	12
1.2.1.3 Klotho wirkt als Cofaktor/Corezeptor für FGF23 und reguliert den Phosphat- und Vitamin-D-Haushalt.....	15
1.2.1.4 Klotho schützt vor endothelialer Dysfunktion und reguliert die Produktion von Stickstoffmonoxid.....	18
1.2.1.5 Klotho supprimiert Wnt-Signalgebung	19
2. Methoden	21
2.1 Charakteristika der Kohorte und Datenerhebung.....	21
2.2 Verwendete Chemikalien	22
2.3 Verwendete Geräte und Materialien	23
2.4 Verwendete Lösungen.....	23
2.5 Proteinextraktion	24
2.6 Western Blot.....	25
2.6.1 Vorbereitung	25
2.6.2 Elektrophorese	25
2.6.3 Blotten	26
2.6.4 Protein-Nachweis und -Identifizierung.....	26
2.6.5 Auswertung.....	28
2.7 Statistik.....	29
2.8 Aufgabenstellung	30
3. Ergebnisse	33
3.1 Charakterisierung der Studienpopulation.....	33
3.2 Klotho und biologische Parameter der fetalen Programmierung.....	34

3.3	Interaktionen zwischen Klotho und anderen plazentaren Proteinen	35
3.3.1	Interaktion zwischen VDR und Klotho	35
3.3.2	Interaktion zwischen Klotho und eNOS	36
3.3.3	Klotho und das Renin-Angiotensin-System	37
3.3.3.1	Interaktion zwischen Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1 und Klotho ...	37
3.3.3.2	Interaktion zwischen Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2 und Klotho ...	38
3.3.4	Interaktion zwischen PPAR- γ und Klotho.....	39
3.4	Der Einfluss von maternalen Parametern auf die plazentare Klotho-Konzentration.....	40
3.4.1	Der maternale Raucherstatus, oxidativer Stress und Klotho	40
3.4.1.1	Der mütterliche Raucherstatus hat einen negativen Einfluss auf die plazentare Klotho Konzentration.....	41
3.4.1.2	Rauchen während der Schwangerschaft hat einen negativen Einfluss auf die plazentare Klotho Konzentration.....	42
3.4.1.3	Die Anzahl der Packyears korreliert negativ mit der plazentaren Klotho-Konzentration.....	43
3.4.1.4	Negative Korrelation zwischen Leukozytenzahl und Klotho.....	44
4.	Diskussion	47
4.1	Zusammenfassung der zu diskutierenden Ergebnisse.....	47
4.1.1	Klotho und Parameter der fetalen Programmierung.....	47
4.1.2	Interaktionen zwischen Klotho und anderen plazentaren Proteinen.....	47
4.1.3	Interaktionen zwischen maternalen Parametern und Klotho	48
4.2	Limitationen der Arbeit.....	49
4.3	Klotho und biologische Parameter der fetalen Programmierung.....	50
4.4	Positive Korrelation zwischen Klotho und dem Vitamin-D-Rezeptor	52
4.5	Positive Korrelation zwischen Klotho und eNOS.....	55
4.6	Klotho und das Renin-Angiotensin-System (RAS)	56
4.7	Positive Korrelation zwischen PPAR- γ und Klotho	58
4.8	Der maternale Raucherstatus, oxidativer Stress und Klotho.....	60
4.8.1	Rauchen und Klotho	60
4.8.2	Leukozytenzahl und Klotho.....	63
	Literaturverzeichnis	66
	Curriculum vitae	74
	Selbständigkeitserklärung.....	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der negative Feedbackloop zur Kontrolle des Calcitriol-Metabolismus.....	18
Abbildung 2: Beispielbild	28
Abbildung 3: Nicht statistisch signifikante Interaktion zwischen Klotho und dem Geburtsgewicht (Gramm)	35
Abbildung 4: Positive Korrelation zwischen VDR und Klotho.....	36
Abbildung 5: Positive Korrelation zwischen Klotho und eNOS.....	37
Abbildung 6: Nicht statistisch signifikante Interaktion zwischen AT-1 und Klotho.....	38
Abbildung 7: Positive Korrelation zwischen AT-2 und Klotho.....	39
Abbildung 8: Positive lineare Korrelation zwischen PPAR- γ und Klotho	40
Abbildung 9: Der Einfluss des Raucherstatus auf die plazentare Klotho Konzentration.....	42
Abbildung 10: Rauchen während der Schwangerschaft und Klotho	43
Abbildung 11: Negative Korrelation zwischen der Anzahl der Packyears und der plazentaren Klotho-Konzentration	44
Abbildung 12: Negative Korrelation zwischen der Leukozytenzahl und Klotho (Eine Woche präpartum).....	45
Abbildung 13: Negative Korrelation zwischen der Leukozytenzahl und Klotho (Eine Woche postpartum)	46
Abbildung 14: Hypothese zur negativen Beeinflussung der plazentaren Klotho-Expression durch Rauchen bzw. einer erhöhten Leukozytenzahl.....	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Liste verwendeter Chemikalien	22
Tabelle 2:	Liste verwendeter Geräte und Materialien.....	23
Tabelle 3:	Basischarakteristika der Studienpopulation	33
Tabelle 4:	Anzahl und relative Proteinkonzentrationen der untersuchten Plazenten.....	34

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ACE	angiotensin converting enzyme
ADAM	Akronym (a disintegrin and metalloproteinase); Sheddase
AGII	Angiotensin 2
Akt	Serin/Threonin Protein Kinase der Akt Familie
APGAR	Punkteschema von Dr. Virginia Apgar; Akronym (appearance, pulse, grimace, activity, respiration);
AT-1 Rezeptor	Angionensin 2 Rezeptor Typ 1
AT-2 Rezeptor	Angionensin 2 Rezeptor Typ 2
BACE	β -APP cleaving enzyme
BADGE	Bisphenol-A Diglycidil Ether
BCA-Assay	Bicinchoninsäure Assay
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CHIP	chromatin immunpräzipitation assay
CHO Zellen	chinese hamster ovaries Zellen
CpG Insel	Cytosin-/Guanosin-reiche DNA Abschnitte
CRP	C-reaktives Protein
CYP24A1	24-Hydroxylase
CYP27B1	1- α -Hydroxylase
DANA	2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid; Sialidaseinhibitor
DSAL	D-saccharic acid-1,4-lactone Glucuronidase Inhibitor
ECL	enhanced chemiluminescence
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
eNOS	endothelialen NO synthase
FGF-23	fibroblast growth factor 23
HDAC-HMT	histone deacetylase - histone methyltransferase complex
HDAC2	histon deacetylase 2; wichtiger Co Repressor
HEK293	human embryonic kidney-Zellen
IDV	integrated density value
IMCD	inner medullary collecting duct cells
KG	Körpergewicht
L-NAME	L-Nitro-Arginin Methyl Ester
LacNAc	N-acetyllactosamin
LGA	large for gestational age
LRC	label-retaining cells auf; 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) Einlagerung stellt eine etablierte Methode zur Stammzelldetektion in der jeweiligen Nische dar

MAO-B	Monoamino Oxidase B
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCT	proximal tubular epithelial cells
MDCK	distal tubule cells
MeCP29	methyl CpG-binding protein
mIMCD3 Zellen	mouse inner medullary collecting duct 3
MQ-H ₂ O	Milli-Q Purification System; aufbereitetes Wasser;
NaPi	Natrium Phosphat Transporter
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
OLETF Ratten	Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats
PAA	polyacryl acid
PPAR- α	peroxisome proliferator-activated receptor α
PPAR- γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PPARE	peroxisome proliferator-activated receptor responsive elements
PTH	Parathormon
RAS	Renin Angiotensin System
RNS	reactive nitrogen species; reaktive Stickstoffspezies;
ROMK-1	renal Outer Medullary Potassium channel
ROS	reactive oxygen species; reaktive Sauerstoffspezies;
SDS	Natriumaurylsulfat
SGA	small for gestational age
siRNA	small interfering RNA
SIRT-1	nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase sirtuin-1
TACE	tumor necrosis factor α converting enzyme
TBS-T	Tris buffered Saline–Tween
TGF- β 1	transforming growth factor beta 1
TRIS	tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPV5	transient receptor potential vanilloid 5 Rezeptors
VDR	Vitamin D receptor
VDREs	Vitamin D-responsive elements

1. Einleitung

1.1 Fetale Programmierung

Es existieren viele Momente im Leben eines Menschen, in welchen Umwelteinflüsse eine entscheidende Rolle für den Gesundheitszustand eines Individuums spielen. In keiner Phase des Lebens ist man aber mehr von dem umgebenden Milieu abhängig als während der Embryo- und Fetogenese. Wachstum und Entwicklung *in utero* sind komplexe und dynamische Prozesse, welche die Interaktion einer Vielzahl von maternalen und fetalen Komponenten für einen reibungslosen Ablauf benötigen. Diese komplexe Interaktion zwischen Mutter, Plazenta und Kind gewährleistet eine optimale Versorgung mit Nährstoffen, Sauerstoff und endokrinen Signalen, allesamt Voraussetzungen für eine normale Entwicklung. Störungen in diesem Versorgungssystem können nicht nur unmittelbare Auswirkungen haben, wie etwa veränderte fetale Wachstumsmuster, sondern sind, wie die derzeitige Beweislage suggeriert, mit im späteren Leben auftretenden Krankheiten assoziiert.

Epidemiologische Daten sprechen zweifelsfrei für das Phänomen der fetalen Programmierung. *Barker et al.* waren zwar nicht die ersten, die sich mit dieser Thematik auseinandersetzten, aber es waren ihre in England und Wales in den späten achtziger Jahren durchgeführten epidemiologischen Untersuchungen, die einen geografischen Zusammenhang zwischen Fällen ischämischer Herzkrankheit in den Jahren 1968-1978 und den Kindersterblichkeitsraten zwischen 1921-1925 herstellten.¹ Eine Folgestudie von Männern und Frauen in Hertfordshire zeigte, dass jene Individuen, die ein geringes Geburtsgewicht aufwiesen, im späteren Leben relativ häufiger an koronarer Herzkrankheit verstarben.² Weitere Studien belegten, dass es für die spätere Entwicklung von koronarer Herzkrankheit relevant ist, ob man aufgrund einer uterinen Wachstumsretardierung reduzierte Körpermaße aufweist oder ob diese einfach nur durch Frühgeburtlichkeit bedingt sind.³ *Hales et al.* konnten in einer weiteren Folgestudie der von *Barker et al.* untersuchten Kohorte, wobei dieses Mal nur Männer im Alter von 64 Jahren eingeschlossen wurden, zeigen, dass eine ähnliche inverse Korrelation zwischen dem Geburtsgewicht, Glukosetoleranz und Insulinresistenz besteht.⁴ Zusätzlich konnten sie demonstrieren, dass Individuen mit dem niedrigsten Geburtsgewicht, im Vergleich zu schwereren Neugeborenen, ein sechsfach erhöhtes Risiko aufwiesen, im weiteren Leben eine eingeschränkte Glukosetoleranz bzw. Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln. Diese Entdeckungen sind mittlerweile in verschiedenen Populationen

unterschiedlicher Ethnien repliziert worden.⁵ Basierend auf diesen Beobachtungen, formulierten Hales und Barker die sogenannte *Thrifty-Phenotype*-Hypothese, ein Erklärungsmodell, wie fetale Malnutrition eine Reihe von physiologischen und metabolischen Adaptionsvorgängen in die Wege leitet, die den Fetus auf eine nährstoffarme Postnatalphase vorbereiten, um so die Überlebenschancen zu maximieren.^{5,6} Ähnlich der Kreislaufzentralisation beim Schock, sorgen diese Adaptionsmechanismen für eine optimale Entwicklung von absolut lebensnotwendigen Organen (z.B. Gehirn), diese Fokussierung bewirkt jedoch eine suboptimale Genese anderer Gewebe und Organe (z.B. endokrines Pankreas).⁷ Solche Anpassungsvorgänge erhöhen die Überlebenschancen des Nachwuchses in einer nährstoffarmen postnatalen Umgebung, sind aber völlig maladaptiv in einem nährstoffreichen postnatalen Milieu.⁶

Die *Thrifty-Phenotype-Hypothese* wird durch eine Reihe von Humanstudien belegt. Sehr eindrucksvoll bewiesen wurde der Zusammenhang zwischen schlechtem intrauterinen Milieu, eingeschränktem fetalen Wachstum und erhöhtem adulten Krankheitsrisiko durch eine Studie der sogenannten „Kinder des holländischen Hungerwinters“ zwischen 1944 und 1945. Während dieser Hungersnot, die von Dezember 1944 bis April 1945 andauerte, war die tägliche Kalorienaufnahme auf 400 bis 800 kcal pro Tag beschränkt, ungefähr halb soviel wie vor und nach dieser Periode. Der Vergleich von Individuen, die sich während dieser Zeit *in utero* befanden mit ein Jahr zuvor oder danach Geborenen, zeigte bei den „Hungerwinter Kindern“ ein erniedrigtes Geburtsgewicht und eine erhöhte Prävalenz von eingeschränkter Glukosetoleranz im Alter von 50 Jahren.⁸

Auch in Zwillingsstudien konnte man die *Thrifty-Phenotype-Hypothese* bestätigen. In einer dänischen Studie untersuchte man ein- und zweieiige Zwillinge, bei denen ein diskordantes Auftreten von Typ 2 Diabetes vorlag. Man konnte sehen, dass der diabetische Zwilling ein signifikant niedrigeres Geburtsgewicht hatte, im Vergleich zu seinem euglykämischen Co-Zwilling.⁹ Vor allem Studien, bei denen ein Augenmerk auf eineiige Zwillinge gelegt wurde, unterstreichen die tragende Rolle des intrauterinen Milieus in der Assoziation von niedrigem Geburtsgewicht und späterem Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2, da man im Rahmen von Zwillingsstudien klarstellen kann, dass sich die Zusammenhänge unabhängig vom Genotyp zeigen.¹⁰

Zusätzlich zu dem Zusammenhang eines suboptimalen Milieus *in utero*, gestörten fetalen Wachstumsmustern und einer Krankheitsprädisposition im Erwachsenenalter wiesen mehrere Studien auch auf die Bedeutung der postnatalen Ernährung hin, einer weiteren kriti-

schen Komponente der *Thrifty-Phenotype-Hypothese*. Es erscheint plausibel, dass auch das Wachstum in der frühen postnatalen Phase programmierende Effekte haben kann. Eine Studie von *Crowther et al.* zeigte innerhalb einer Kohorte von 7 jährigen südafrikanischen Kindern, dass jene, die mit einem niedrigen Geburtsgewicht geboren wurden und eine rapide postnatale Gewichtszunahme aufwiesen, bereits in diesem Alter eine schlechtere Glukosetoleranz hatten.¹¹ Weitere Studien in Finnland und Indien bekräftigten diese Beobachtung.^{12,13} Verschiedene Studien zeigten, dass die rapide postnatale Gewichtszunahme vor allem durch eine verstärkte Fettgewebszunahme und nicht über eine Zunahme an Muskelmasse zustande kommt.^{14,15} Diesen Phänotyp, genannt *catch-up fat*, konnte man in unterschiedlichen Kohorten von SGA- (*small for gestational age*)^{16,17} Kindern beobachten, und man konnte auch demonstrieren, dass diese Fett vermehrt in viszeralen und weniger in subkutanen Depots speichern.^{18,19} Zusätzlich zu diesem Phänomen stellte man in mehreren Studien fest, dass auch eine maternale Überernährung und LGA- (*large for gestational age*) Geburtlichkeit negative Auswirkungen auf den Nachwuchs haben. LGA-Nachwuchs, typischerweise mit mütterlichem Übergewicht, Gestationsdiabetes und, unabhängig von diesen Faktoren, mit prägestationalem Diabetes mellitus assoziiert, zeigt einen erhöhten Körperfettanteil und besitzt ein erhöhtes Risiko, im späteren Leben Pathologien aus dem Formenkreis des metabolischen Syndroms zu entwickeln.²⁰⁻²³ Obwohl man zuerst ein niedriges Geburtsgewicht als Risikofaktor für das metabolische Syndrom bestimmt hat, ist es nun offensichtlich, dass eine U-förmige Beziehung zwischen Geburtsgewicht und einem erhöhtem Risiko, im weiteren Leben eine metabolische Störung zu entwickeln, existiert.^{24,25}

Wie man sehen kann, sind die Umstände, die einen programmierenden Effekt auf den Fetus haben können, recht heterogen. Mehr und mehr Studien zeigen, dass auch andere, über die Ernährung hinausgehende Faktoren, denen ein Individuum pränatal bzw. in der frühen postnatalen Phase ausgesetzt ist, unter Verdacht stehen, das Auftreten von Pathologien im späteren Leben vorzubestimmen, und dass eine Vielzahl von veränderten intrauterinen Milieubedingungen Adaptionsmechanismen beim Fetus evozieren, allesamt Hinweise auf eine anscheinend hohe biogenetische Plastizität. (*developmental plasticity*).²⁶

Wie erwähnt sind mittlerweile aber auch Mechanismen abseits von Unter- und Überernährung bekannt, die, bedingt durch veränderte intrauterine Milieubedingungen, zu lebenslang persistierenden funktionellen und strukturellen Veränderungen des fetalen Organismus führen können.²⁷ Hier zu nennen seien die Exposition des Fetus gegenüber mütterlichen

Glucocorticoiden auf Grund einer Defizienz der plazentaren 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase,²⁸ Einflüsse des maternalen Genotyps auf den fetalen Phänotyp, unabhängig vom fetalen Genotyp,²⁷ und Veränderungen der renalen Ontogenese bzw. Abnahme der Nephronanzahl durch erhöhte Konzentrationen von maternalem Corticosteron.²⁹ Darüber hinaus mehren sich auch Beobachtungen, dass nicht alle Formen von fetaler Programmierung zwingend einen Einfluss auf den bis dato herangezogenen Surrogatparameter Geburtsgewicht haben müssen, weil manche stattgefundenen strukturellen Veränderungen keine Änderung des Gewichts bewirken. Als Beispiel sei hier die Erhöhung der maternalen Glucocorticoidspiegel zu nennen.²⁹

Obwohl man die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bis heute noch unzureichend versteht, nimmt man mittlerweile an, dass all diese verschiedenen Formen der fetalen Programmierung auf epigenetische Modifikationen der DNA zurückzuführen sind.

Es ist unbestritten, dass unser Genom durch das Epigenom programmiert wird, welches sich aus Chromatin und dessen Alterationen, kovalenter Modifikation von DNA durch Methylierung, und nichtkodierender RNA zusammensetzt. Modelliert wird das Epigenom während der Gestation, was die Diversität von Genexpressions-Programmen in den verschiedenen Zelltypen eines Organismus zur Folge hat. Wie schon beschrieben, suggeriert die momentane Datenlage, dass die epigenetische Programmierung unter anderem durch das intrauterine Milieu beeinflusst werden kann.³⁰

Unser Genom gestaltet sich auf zwei Ebenen: einerseits durch die DNA-Sequenz, die von unseren Eltern vererbt wurde und zeitlebens unverändert bleiben sollte, andererseits durch das Epigenom, welches zellspezifisch organisiert ist. Ein gutes Beispiel für epigenetischen Anomalien, die zur Entwicklung von Krankheiten führen, sind Neoplasien. Tumor-Suppressor-Gene können durch Mutationen der DNA-Sequenz oder durch epigenetische Hypermethylierung ausgeschaltet werden.³¹ Obwohl die Konsequenzen solcher genetischen bzw. epigenetischen Fehlfunktionen die gleichen sind, gibt es doch wichtige Unterschiede zwischen genetischen und epigenetischen Pathomechanismen.³⁰

Epigenetische Muster werden während der Zelldifferenzierung durch einen programmierten und gut organisierten Prozess generiert. Nichtsdestotrotz ist die epigenetische Modifikation ein sehr dynamischer und reaktionsfähiger Vorgang, welcher, besonders in frühen Entwicklungsphasen, sensibel auf Umweltereignisse reagiert. Unsere Umwelt ist somit in der Lage, über epigenetische Modifizierungen Einfluss auf das Genom zu nehmen.³⁰

Zu den epigenetischen Mechanismen zählt die koordinierte Methylierung bzw. Demethylierung von CpG-Inseln (Cytosin/Guanosin-reiche-DNA-Abschnitte) in der Promotorregion von bestimmten Genen, was eine erschwerte bzw. vereinfachte Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie bewirken kann. Dies geschieht einerseits durch direkte Blockade von Transkriptionsfaktoren, andererseits durch die Bindung von *methyl CpG-binding protein* (MeCP2) an methylierte Cytosine, welche wiederum in der Lage sind, den *histone deacetylase - histone methyltransferase complex* (HDAC-HMT) zu rekrutieren. Die Bindung von MeCP2-HDAC-HMT an methylierte CpGs bewirkt eine Histon-Deacetylierung und Methylierung spezifischer Lysin-Reste, was eine Suppression der Transkription mit sich zieht.³² Kovalente Modifikationen der Chromatinstruktur durch Acetylierung und Methylierung und auch die posttranskriptionelle Kontrolle der Translation durch microRNA zählen zu Mechanismen der epigenetischen Regulation. Epigenetische Modifikationen sind gen- und zelltypspezifisch, und da nur eine kleine Gruppe von Enzymen diese Prozesse katalysiert, ist es wahrscheinlich, dass eine Spezifität durch eine Interaktion von DNA und kleinen RNA-Oligonukleotiden hergestellt wird. Epigenetische Modifizierungen großen Ausmaßes finden zum Beispiel nach der Befruchtung statt, um die Totipotenz des sich entwickelnden Embryos zu gewährleisten, obwohl jedoch Methylierungsmuster, die mit genetischen Imprinting assoziiert sind, erhalten bleiben. Frühe, im Zuge der Entwicklung induzierte epigenetische Veränderungen der DNA sind zumeist sehr stabil und können ein Leben lang anhalten.³⁰

Besondere Milieubedingungen während der Schwangerschaft, bzw. kurz nach der Geburt, können in experimentellen Modellen der fetalen Programmierung zu Veränderungen der Methylierung von Promotoren führen, dadurch direkt und indirekt die Expression einer Vielzahl von Genen beeinflussen. Bei Ratten, zum Beispiel, bewirkte eine proteinarme Diät während der Trächtigkeit Änderungen der Promotor-Methylierung und Genexpression des hepatischen Glucuronidrezeptors und *peroxisome proliferator-activated receptor α* (PPAR- α)³² Ähnliche epigenetische Veränderungen konnten an p53 in der Niere,³³ mit Beeinflussung renaler Apoptosevorgänge, dem suprarenalen Angiotensin-II-Typ-1b-Rezeptor,³⁴ was eine Modifikation der Blutdruckregulation bewirkte, und an dem hypothalamischen Glucokorticoidezeptor gezeigt werden, dessen Modifikation zu veränderten Stressantworten führte.³⁵ Effekte am Phänotyp eines Individuums weisen bei während der Entwicklung stattgefundenen epigenetischen Modifizierungen mitunter eine sehr lange Latenz auf und können sich auch erst im Laufe eines Lebens manifestieren. Noch ist nicht

genau bekannt, wann und für wie lange das Zeitfenster für epigenetische Veränderungen geöffnet ist, man nimmt jedoch an, dass dies von der perikonzeptionellen Periode bis in die postnatale Phase möglich ist.^{35,36} Aus Studien an genetisch identen eineiigen Zwillingen ist sogar bekannt, dass Umwelteinflüsse zeitlebens epigenetische Modifikationen bewirken können.³⁷ Epigenetische Effekte maternaler Ernährung und des Verhaltens (Stress) zeigen, dass es nicht zu allgemeinen Veränderungen kommt, sondern je nach verursachendem Agens auch nur sehr spezifische Zielstrukturen Modifikationen erfahren. Proteinarme Ernährung während der Trächtigkeit führt bei Ratten zu einer geänderten Expression und Promotor-Methylierung von hepatischem PPAR- α , hat jedoch keinen Effekt auf den nahe verwandten PPAR- γ (einem Regulator der Adipogenese). Weitere Studien dieses Rattenmodells konnten zeigen, dass die veränderte Promotor-Methylierung aus der eingeschränkten Kapazität der Dnmt-1-DNA-Methyltransferase, welche während der Mitose Methylierungsmuster aufrecht erhält, resultiert. Ferner können Variationen der Genexpression und Promotor-Methylierung an die F₂-Generation vererbt werden, ohne dass es irgendeine Restriktion der F₁-Generation gegeben hätte.³⁸

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Variation der Expression des Genoms zu phänotypischen Veränderungen führt und epigenetische Mechanismen, allen voran DNA-Methylierung, eine zentrale Rolle in der Generierung und lebenslangen Aufrechterhaltung dieser neuen Phänotypen spielen. Forschung auf dem Gebiet der epigenetischen fetalen Programmierung wird intensiv vorangetrieben. Es ist unbestritten, dass Veränderungen im Phänotyp auf epigenetischen Modifikationen beruhen können, und sehr wahrscheinlich, dass diese nur sekundäre Reaktionen auf intrauterine Milieubedingungen darstellen, wobei das intrauterine Milieu für den Embryo bzw. Fetus gleichbedeutend mit den nach der Geburt zu erwartenden Anforderungen an den Organismus ist, was bei einer Diskrepanz zwischen prä- und postnatalen Bedingungen entsprechend zu Maladaptation führt. Die Aufgabe, die jedoch noch offen bleibt, ist eine genaue Entschlüsselung der beteiligten Prozesse, was die Voraussetzung für das bessere Verständnis und die etwaige Beeinflussung der intrauterinen Programmierung von Erkrankungen des späteren Lebens darstellt.

1.2 Klotho

1997 identifizierte Makoto Kuro-o am *National Institute for Neuroscience* in Tokio ein neues Gen, welches in der Maus die Lebensspanne verlängert, wenn es vermehrt exprimiert wird. Ein Defekt in diesem Gen führt zu einem Syndrom, das dem menschlichen

Altern ähnelt. Die Wahl des Namens ist sehr treffend, Klotho, eine der drei Moiren aus der griechischen Mythologie, ist die Spinnerin des Lebensfadens. Diese Entdeckung war, wie viele andere medizinische Meilensteine, ein reiner Zufall.

Zum Studium der essentiellen Hypertonie sollten eigentlich Mäuse gezüchtet werden, die einen vom Hasen stammenden Typ-1-Natrium-Wasserstoff-Austauscher überexprimieren. Durch Mikroinjektion wurden 28 voneinander unabhängige transgene Mäuse produziert. Von diesen 28 exprimierten nur drei das Transgen, die restlichen 25 taten dies nicht. Alle das Transgen nicht exprimierenden Tiere wurden verpaart in der Hoffnung, Mäuse zu generieren, die homozygot für die Insertationsmutation sind, und all diese wurden im Hinblick auf neu entstandene Phänotypen untersucht. Eine dieser Mäuse, nun Klotho-Maus genannt, zeigte einen sehr interessanten, an menschliches Altern erinnernden Phänotyp, welcher sich nur bei Homozygotie des Transgens in vollem Ausmaß zeigte, dann aber mit einer Penetranz von 100 Prozent. Da diese Klotho-defizienten Mäuse bis zum Alter von drei Wochen eine makroskopisch wie mikroskopisch ganz normale Entwicklung zeigten, konnte dieser Phänotyp nicht einfach durch eine Entwicklungsstörung erklärt werden.^{39,40}

Durch die konventionelle Pronukleus-Mikroinjektion des exogenen Gens wurde das Klotho-Gen von seinem 5' flankierendem Promotor getrennt (ca 6kb upstream). Die kodierende Struktur des Klotho-Gens blieb erhalten, aber die Genexpression wurde sehr stark reduziert, man hatte also einen hypomorphen Mutanten geschaffen. Um auszuschließen, dass etwaige, sehr basale Klotho-Spiegel doch noch Effekte entfalten, wurde einige Jahre später auch eine Linie amorpher, also echter Klotho-Knockout-Mäusen gezüchtet, was aber nichts am Phänotyp änderte.⁴¹

Das ungefähr 50 Kilobasen umfassende Klotho-Gen, lokalisiert auf Chromosom 13q12, setzt sich aus fünf Exons und vier Introns zusammen und kodiert ein Typ-1 *singlepass* Transmembranprotein, welches 1014 Aminosäuren lang und circa 130 kDa schwer ist. Die intrazelluläre Domäne ist mit einer Länge von zehn Aminosäuren sehr kurz, und es finden sich hier bis dato keine funktionellen Domänen. Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei *internal repeats*, KL1 und KL2, welche Homologien zu 1- β Glykosidasen aufweisen.

Interessanterweise existiert in der Promotor-Region keine TATA- oder CAAT Box, sondern es finden sich hier fünf potentielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor SP1.⁴²

Das dritte Exon beinhaltet eine interne Spleiss-Donor-Stelle, an welcher alternativ gespleißt werden kann. Somit existieren zwei verschiedene Transkripte des Klotho-Gens. Erstens eine circa 130 kDa schwere Typ-1 *singlepass* transmembrane Form, zweitens eine 68 kDa schwere, alternativ gespleisste Variante, welche sezerniert wird und nur eine, nämlich die N-terminale KL1 Domäne der zwei extrazellulären Domänen der transmembranären Form aufweist. Trotz starker Homologien des Klotho-Gens innerhalb verschiedener Spezies gibt es Unterschiede im Expressionsmuster der zwei verschiedenen Formen. Bei der Maus wird überwiegend die transmembranäre Form exprimiert, beim Menschen überwiegt die sezernierte.⁴²

Exprimiert wird humanes Klotho vor allem in der Niere, der Plazenta, im Dünndarm und der Prostata. Es sei hier zu erwähnen, dass die Expressionsmuster von Klotho beim Menschen aber erst teilweise entschlüsselt sind. Murines Klotho findet sich vor allem in Niere, Glandula parathyroidea und Plexus choroideus, geringfügig auch in Hypophyse, Plazenta, Skelettmuskel, Harnblase, Pankreas, Hoden, Ovar, Kolon und Innenohr. Bei der Maus zeigt sich sehr eindrucksvoll, dass eine *loss of function*-Mutation im Klotho-Gen, verschiedenste altersassoziierte Pathologien in nahezu allen Organen verursacht, obwohl Klotho selbst nur in einer geringen Zahl von Organen exprimiert wird.⁴²

1.2.1 Funktionen von Klotho

Maßgeblich beteiligt an der Charakterisierung der Funktionen dieses Proteins waren Beobachtungen an Klotho-defizienten und später auch an Klotho-überexprimierenden Mäusen. Klotho-defiziente Mäuse entwickeln ab einem Alter von ungefähr drei Wochen diverse Pathologien, die interessanterweise nicht an murine, sondern humane Alterungsprozesse erinnern. Anfänglich zeigt sich eine Wachstumsretardierung, die Tiere werden hypoaktiv und marantisch. Es entwickelt sich eine schwere Hyperphosphatämie bei gleichzeitiger Hypercalcämie und stark erhöhten Spiegeln an Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). Die wichtigsten phänotypischen Eigenschaften Klotho-defizienter Mäuse sind, abgesehen von der stark reduzierten Lebenserwartung, artherosklerotische Gefäßveränderungen vom Mönckeberg-Typ, ektope Calcifizierung der Niere, Magenwand, Trachea, Weichteile und der Epiphysen. Weitere zu beobachtende Pathologien sind gonadale Dys- bzw. Hypoplasie, Infertilität, Haut- und Muskelatrophie, Ataxie, kognitive Einschränkung, Gehörverlust, eine vorzeitige Involution des Thymus und eine Reduktion der endothelialen NO-Synthese mit

konsekutiver endothelialer Dysfunktion. Klotho-defiziente Mäuse sind hypoglykämisch bei gleichzeitig bestehender Hypoinsulinämie und gesteigerter Insulinsensitivität. Das maximal beobachtete Alter von Klotho-defizienten Mäusen lag bei 100 Tagen (die Lebenserwartung einer Wildtyp-Maus liegt bei 2,5 bis 3 Jahren).⁴³

Tsujikawa et al. konnten zeigen, dass eine Vitamin-D-restriktive Diät die meisten Phänotypen Klotho-defizienter Mäuse retten kann, unter anderem Wachstum, ektope Calcifizierungen, Serumparameter und Fertilität und auch die Lebensspanne dieser Tiere erhöht, was zu der Schlussfolgerung führte, dass vor allem die erhöhte Konzentration an Calcitriol die Hauptursache für die zu beobachtenden Pathologien darstellt. Ferner stellte man fest, dass bei Klotho-defizienten Mäusen ein Missverhältnis zwischen Vitamin-D-Vorstufen und aktivem Vitamin D besteht. Niedrigere Konzentrationen von 25(OH)D₃ und 24,25(OH)₂D₃ zeigen, dass die Vorstufen vorzugsweise in die aktive Form metabolisiert werden und diese unbalancierte Aktivierung zu den hohen Spiegeln an aktivem Vitamin D führt. Klotho-defiziente Mäuse zeigen in der Tat eine erhöhte Expression der 1- α -Hydroxylase, dem anabolen Schlüsselenzym der Calcitriol Synthese, was die Vermutung nahe legte, dass Klotho eine Rolle in der negativen Regulation von aktivem Vitamin D spielt.⁴¹

Kurosu et al. generierten zwei verschiedene Klotho-überexprimierende Mausmodelle, deren Phänotyp sich sehr stark von dem Klotho-defizienter Mäuse unterschied, da diese Tiere gesund waren und um circa 20-30 Prozent länger als Wildtyp-Mäuse lebten. Die transgenen Mäuse wurden durch Mikroinjektion eines cDNA-Fusionsgens, einer Kombination aus dem *human elongation factor 1a* Promotor und dem murinen, für die transmembranäre Form von Klotho codierenden Gen, in befruchteten Eizellen generiert. Eine dieser zwei Linien exprimierte Klotho in allen untersuchten Geweben die andere exprimierte das Transgen nur in manchen Geweben wie Gehirn und Hoden, aber interessanterweise nicht in den Nieren, wahrscheinlich auf Grund eines Positionseffektes des Transgens an dem Integrationsort. Obwohl in der Niere, wo es normalerweise am meisten exprimiert wird, kein Klotho nachweisbar war, war dieses Allel, wenn es Klotho-defizienten Mäusen via exogenem Gentransfer zugeführt wurde, in der Lage, alle altersassoziierten Phänotypen aufzuheben. Dies ist ein Hinweis dafür, dass auch den zirkulierenden Formen von Klotho eine große Bedeutung zukommt.³⁹

1.2.1.1 Klotho fungiert als zirkulierendes Hormon

Wie soeben erwähnt wird Klotho nicht ubiquitär exprimiert, sondern nur sehr beschränkt in einigen Organen. Ein Ausfall von Klotho bewirkt aber systemische Störungen, auch in Organen, die eigentlich kein Klotho exprimieren, was darauf hindeutet, dass Klotho in nicht-zellautonomer Weise agiert. Die Tatsache, dass beim Menschen vor allem die sezernierte Klotho-Form exprimiert wird, bekräftigt dies.⁴² Ferner lässt sich Klotho in Serum, Urin und Liquor cerebrospinalis nachweisen.⁴⁴

Auch mittels diverser Tierversuche konnte gezeigt werden, dass Klotho Effekte fern von seinem Expressionsort entfaltet. Heterozygot Klotho-defiziente Mäuse haben einen recht unauffälligen Phänotyp, jedoch ist bei diesen Tieren eine endotheliale Dysfunktion feststellbar. Parabiosis-Experimente, also die chirurgische Verknüpfung der Blutkreisläufe zweier Tiere, zwischen Klotho-heterozygoten und Wildtyp-Mäusen, bewirkte ein komplettes Verschwinden der endothelialen Dysfunktion.⁴⁵

Eine andere Forschungsgruppe induzierte bei Sprague-Dawley-Ratten durch chronische Angiotensin-II-Infusion funktionelle und morphologische Schäden der Niere, welche auch von einer reduzierten renalen Klotho-Expression begleitet waren. Manchen Tieren wurde vor der Angiotensin-II-Infusion ein, murines Klotho-Gen beherbergendes Adenovirus intravenös injiziert, was zu einer starken Induktion von Klotho-Protein in der Leber führte und bei diesen Tieren den Angiotensin-II-verursachten Nierenschaden milderte, erkenntlich an einer signifikant verbesserten Kreatinin-Clearance und Reduktion der Proteinurie.⁴⁶

Rezente Studien zeigen, dass Klotho auf drei verschiedenen Wegen in die Zirkulation gelangen kann.

1. Alternatives Spleißen:

Die alternativ gespleißte Variante setzt sich wie die Normvariante auch aus fünf Exons zusammen, besitzt aber eine 50 bp Insertion, welche ein *in-frame* Stop-Codon enthält. Das so entstandene Protein besteht nur aus dem ersten *internal repeat* KL1. KL2, die transmembranäre und intrazelluläre Domäne werden nicht translatiert. Somit erscheint es aber sehr plausibel, dass diese gekürzte Isoform für ein putativ sezerniertes Protein codiert. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde auch festgestellt, dass die kurze, direkt sezernierte Isoform beim Menschen die vorherrschende Form darstellt und im Vergleich zur transmembranären Form vermehrt exprimiert wird.⁴²

2. Proteolytische Abschilferung:

Die 130 kDa schwere Klotho-Form setzt sich aus einer amino-terminalen-Signal-Sequenz, einer extrazellulären Domäne und der nahe des carboxyl-Terminus lokalisierten transmembranären Domäne zusammen. Die extrazelluläre Domäne beinhaltet einen kurzen Abschnitt basischer Aminosäuren (KKRK), ein potentieller Angriffspunkt für proteolytische Abschilferung. Es konnte gezeigt werden, dass die transmembranäre Form von Klotho in Analogie zu anderen Typ-1-singlepass Transmembranproteinen wie APP, Notch et cetera prozessiert werden kann. Klotho kann durch die Metalloproteasen/Disintegrine ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 10 und ADAM 17 abgeschilfert werden, wobei ADAM 10 und 17 zwei verschiedenen Schnitte durchführen können, einerseits den sogenannten α -cut, durch welchen ein 130 kDa schweres Fragment entsteht, andererseits einen β -cut, der ein 68 kDa schweres Fragment generiert. Hauptprodukt dieser proteolytischen Abschilferung ist jedoch das 130 kDa schwere Fragment. Das Resultat dieser Studie passt auch zu vorhergehenden Beobachtungen, wonach der Hauptanteil des in Niere, Serum, Liquor und Plexus choroideus zu findenden Klotho-Proteins ein Molekulargewicht von 130 kDa aufweist und andere Klotho-Fragmente unterrepräsentiert waren.⁴⁷ Auch der Sheddase BACE-1 (β -APP cleaving enzyme) kommt eine Bedeutung in der proteolytischen Abschilferung von Klotho zu, ferner auch den Gamma-Sekretasen, die schlussendlich den übergebliebenen transmembranären Klotho-Anteil via regulierter transmembranärer Proteolyse entfernen. Ob dem sehr kleinen intrazellulären Rest auch eine physiologische Funktion zukommt, ist momentan noch fraglich. Bisherige Versuche, dieses 5kDa schwere Protein nachzuweisen, misslingen, wahrscheinlich bedingt durch eine sehr kurze Halbwertszeit.⁴⁸

3. Klotho-Rekrutierung zusammen mit Na⁺ K⁺ ATPase:

Obwohl man bei Klotho davon ausging, dass der Hauptanteil dieses Proteins extrazellulär präsent ist, lässt es sich auch in beträchtlichem Ausmaß im Cytoplasma nachweisen. *Imura et al.* konnten zeigen, dass cytoplasmatisches Klotho (sowohl eine unreife 120 kDa schwere als auch die reife, 130 kDa umfassende Form), die α -1-Untereinheit der Na⁺K⁺ATPase binden kann und die β -Untereinheit der Na⁺K⁺ATPase, welche eine tragende Rolle in der Rekrutierung der Na⁺K⁺ATPase zur Plasmamembran spielt, in dem Klotho- α -1-Untereinheit-Komplex enthalten ist. Formierte Komplexe aus 120 kDa-Klotho und der Na⁺K⁺ATPase konnte man im endoplasmatischen Retikulum nachwei-

sen, hingegen fanden sich Komplexe aus 135 kDa-Klotho und $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ in *early endosomes* und im Golgi-Apparat/Zellmembran-Fractionen, die dort für eine rasche Rekrutierung zur Plasmamembran gespeichert werden. Die Expression der $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ variiert von Gewebe zu Gewebe, ist aber im distalen Konvolut der Niere, im Plexus choroideus und in der Nebenschilddrüse besonders hoch, was die Vermutung zulässt, dass die stark exprimierte $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ in diesen Klotho-exprimierenden Geweben eine spezifische Rolle in der Kooperation mit Klotho einnimmt. Im Plexus choroideus korrelieren extrazelluläre Calcium-Spiegel invers mit der Aktivität der $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, niedrige Calcium-Konzentrationen bewirken einen rapiden Anstieg der $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ -Aktivität und umgekehrt. Analog zu dieser Beobachtung ändert sich auch der Gehalt an $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ in der Zellmembran. Bemerkenswerterweise geschieht dies sehr rasch, veränderte Dichte an $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ in der Zellmembran lässt sich circa 30 Sekunden nach Änderungen der extrazellulären Calcium-Konzentration nachweisen. Ferner reagiert auch Klotho auf extrazelluläre Calcium Konzentrationen, die Sekretion von Klotho nimmt bei fallenden Calcium-Konzentrationen zu. Es erscheint somit naheliegend, dass die extrazelluläre Calcium-Konzentration eine Sekretion von Klotho zusammen mit der Rekrutierung der $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ mediiert.⁴⁹

Zusätzlich zu dem konventionellen, zwischen Rekrutierung und Internalisierung ausbalancierten Pathway der $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ -Rekrutierung, existiert also in Klotho-exprimierenden Zellen noch ein zusätzlicher, Klotho-abhängiger Pathway, welcher in Abhängigkeit der extrazellulären Calciumkonzentration durch eine rapide $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ Rekrutierung charakterisiert ist.⁴⁹

Zusammenfassend muss man aber erwähnen, dass der Hauptursprungsort des sezernierten Klothos bis dato nicht bekannt ist.⁵⁰

1.2.1.2 Klotho besitzt enzymatische Funktion

Sezerniertes renales Klotho ist in der Lage, in Zellen des distalen Convoluts die Membrankonzentration des *transient receptor potential vanilloid 5* Rezeptors (TRPV5), einem Calciumkanal, zu erhöhen.⁵¹ *Cha et al.* konnten an CHO-Zellen zeigen, dass die Behandlung mit β -Glukuronidase, Klotho und bakteriellen Sialidasen nur eine Aktivitätssteigerung von TRPV5 mit sich brachte, wenn diese Zellen die Sialtransferase ST6Gal-1 exprimierten, und dass ein *knockdown* von endogener ST6Gal-1 mittels siRNA in HEK293 Zellen ebenso jegliche Effekte auf TRPV-5 inhibierte. Sie schlussfolgerten, dass Klotho in der Lage

sei, α 2,6 Sialsäure von TRPV-5-Glykanketten abzuspalten. Des Weiteren wurde auch versucht, den weiteren Klotho-medierten Mechanismus der Konzentrationssteigerung von TRPV-5 in der Zellmembran aufzudecken. In vorhergehenden Studien konnten *Cha et al.* zeigen, dass die Membrankonzentration von TRPV-5 Dynamin-abhängiger-Endocytose unterliegt,⁵² da eine Störung der Endocytose durch ein dominant-negatives Dynamin (K44A *rat dynamin*) den basalen TRPV-5-Fluss erhöht und durch Zugabe von Klotho keine weitere Steigerung desselben erreicht werden kann. Diese Ergebnisse suggerierten, dass Klotho die Dynamin-abhängige-Endocytose inhibieren kann. Die Lyse von terminalen Sialsäuren an typischen Komplex-Typ Asparagin verknüpften Glykanen legt terminales N-acetyllactosamin (LacNAc) frei, welches als Ligand für Galectine fungiert. Galectine gehören zu der Familie der Galactose-bindenden tierischen Lektine, werden sezerniert und interagieren mit Proteinen der Zellmembran. Generell kann man sagen, dass die Bindung von Galectinen an membranöse Glykoproteine eine kritische Rolle in deren Abundanz an der Zelloberfläche spielt. Wichtig für eine Interaktion mit Galectinen ist, dass das Glykoprotein viele extrazelluläre Asparagin-Reste und somit mehrere N-Glykan-Ketten aufweist, da die Affinität von Galectinen zu einzelner N-acetyllactosamin sehr schwach ist. Die Anzahl der N-Glykane, die N-acetyllactosamin für die Bindung an Galectine enthalten, determiniert die Konzentration und Verweildauer eines Glykoproteins in der Zellmembran.⁵³ *Cha et al.* untersuchten mehrere von HEK293 Zellen exprimierte Galectine, ob diese eine Rolle in der von Klotho auf TRPV-5 ausgeübten Modifikation spielen. Es zeigte sich, dass das ubiquitär exprimierte Galectin-1⁵⁴ über eine Verknüpfung an von Klotho freigelegtes N-acetyllactosamin zu einer Akkumulation von TRPV-5 an der Zelloberfläche führt. Zu diesem Schluss kam man, da ein *knockdown* von Galectin-1, nicht aber von anderen Galectinen, einen Anstieg der Zellmembran-Konzentration von TRPV-5 inhibierte und man diesen Effekt auch durch eine extrazelluläre Applikation eines Antikörpers gegen Galectin-1 nach der Behandlung mit Klotho erzielen konnte. Co-Immunopräzipitation-Experimente zeigten auch, dass Galectin-1 nur nach Klotho-Applikation an TRPV-5 binden kann. Der Anstieg an TRPV-5-medierte Ionenfluss konnte auch via Entfernung von Galactose durch gleichzeitige Zugabe von Klotho und β -Galctosidase verhindert werden, jedoch nicht, wenn β -Galctosidase vor Klotho hinzugefügt wird. Dieses Ergebnis zeigt, dass die von Klotho vermittelte Abspaltung der terminalen Sialsäure und die Freilegung von darunter liegender Galactose essentiell für die Galectin-1-Bindung an TRPV-5 ist.⁵² In einer anderen Studie von *Cha et al.* wurde der Einfluss von Klotho auf die Aktivität des renalen ROMK-1-Kaliumkanals untersucht, wobei man zu sehr ähnlichen Resultaten kam. Obwohl

die Endocytose von ROMK-1 und TRPV-5 unterschiedlichen Pathways folgt, konnte auch hier gezeigt werden, dass Klotho in der Lage ist, die Konzentration an ROMK-1 in der Zellmembran zu erhöhen. Der Mechanismus hierzu ist der gleiche, der auch schon bei der Interaktion zwischen Klotho und TRPV-5 beobachtet wurde. Auch von ROMK-1 wird durch Klotho α 2,6-Sialinsäure abgespalten und darunterliegendes N-acetyllactosamin für die Bindung an Galectin-1 freigelegt. Diese Galectinbindung verhindert die endozytotische Aufnahme von ROMK-1 und führt zu einer erhöhten Konzentration in der Zellmembran.⁵⁵

Enzymatische Modifikationen durch Klotho beschränken sich, wie man aus ganz aktuellen Studien weiß, aber nicht nur auf diverse Ionenkanäle. *Camilli et al.* untersuchten den Zusammenhang zwischen einem Neoplasie-bedingten Verlust der Klotho-Expression, einer dadurch bedingten gesteigerten Expression des zum Wnt-Signalweg zählenden Transkriptionsfaktors Wnt5A und einer Zunahme der Mobilität von Melanomzellen. Wnt-Transkriptionsfaktoren sind sezernierte Mediatoren, welche bedeutsam für Proliferation und Fortbestand von Stammzellen sind.⁵⁶ *Liu et al.* zeigten zuvor schon, dass es eine Interaktion zwischen Klotho und dem Wnt-Signalweg gibt, was sowohl an Klotho-hypomorphen Tieren als auch in Zellkultur Experimenten demonstriert werden konnte. Sie postulierten, dass sezerniertes Klotho mit verschiedenen löslichen Stammzellmediatoren interagieren kann und diese Interaktion zu einer Suppression des Wnt-Signalweges führt.⁵⁷ *Lee et al.* konnten nachweisen, dass es während der Tumorprogression von Cervixkarzinomen zu einer epigenetisch mediierten Blockierung der Expression von Klotho kommt und der Verlust dieses funktionellen Wnt-Antagonisten zu der aberranten Aktivierung des Wnt-Signalweges in diesen Neoplasien führt.⁵⁸ In der Studie von *Camilli et al.* konnte genauer gezeigt werden, wie Klotho antagonistisch auf den Wnt-Pathway wirkt. Es wurde eine inverse Korrelation zwischen Klotho und dem Wnt-Agonisten Wnt5a nachgewiesen, wobei man feststellte, dass Wnt5a in der Lage ist, die Expression von Klotho herabzuregulieren, und Klotho umgekehrt in der Lage ist, auf posttranslationellem Weg Wnt5a zu modifizieren. Die Zugabe von rekombinantem Klotho zum Kulturmedium bewirkte einen Anstieg der im Medium vorhandenen Wnt5a-Konzentration, was eine reduzierte Internalisierungsrate von Rezeptor-Liganden-Komplexen vermuten ließ. Die Autoren schlussfolgerten, dass Klotho die Glykosylierung von Wnt5a unbeeinträchtigt lässt, da der Transkriptionsfaktor weiterhin sezerniert werden kann, vermuteten aber eine Rolle der Sialidasefunktion Klothos in der beobachteten veränderten Internalisierung von Wnt5a. Wnt5a benötigt, um internalisiert zu werden und eine Signalkaskade auszulösen, Heparan-Sulfat-

Proteoglykane, im besonderen Syndecan 1 und 4.⁵⁹ Die Zugabe von rekombinanten löslichen Klotho bewirkte eine reduzierte Proteinkonzentration von Syndecan 1 und 4, wobei man gleichzeitig eine gesteigerte Sialidaseaktivität im Medium nachweisen konnte. Da die mRNA-Konzentrationen von Syndecan 1 und 4 unverändert blieben, schlossen die Autoren auf einen posttranslationellen, Klotho-bedingten Prozess, wobei eine Desialylierung von Syndecanen am wahrscheinlichsten schien. Die Sialidaseaktivität konnte Klotho zugeschrieben werden, da die gleichzeitige Gabe von rekombinantem Klotho und des spezifischen Sialidaseinhibitors 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid (DANA)^{52,55} zu einer vermehrten Syndecan-Bindung von Wnt5a und anschließender Internalisierung dieser Komplexe führte. Die Autoren schlossen daraus, dass Klotho die Bindung von Wnt5a an Syndecane in dosisabhängiger Weise inhibiert.⁶⁰ *Liu et al.* hatten in einer vorhergehenden Arbeit schon untersucht, ob die β -Glucuronidase-Funktion Klothos zur Inhibition des Wnt-Signalweges benötigt wird, und modifizierten deswegen putative, für diese enzymatische Aktivität verantwortliche Aminosäuren des Klotho-Proteins. Dies bewirkte jedoch keine Veränderung in der Klotho-medierten Inhibition des Wnt-Signalweges, aber es konnte gezeigt werden, dass strukturelle Modifikationen von Klotho, die zu einer fehlenden physischen Interaktion mit Wnt-Agonisten führen, keinen Einfluss auf Wnt-Signalgebung bewirken.⁵⁷

Zusammenfassend kann man sagen, dass Klotho enzymatische Aktivität aufweist und in der Lage ist, das Glykosylierungsmuster von Proteinen zu modifizieren. *Cha et al.* konnten zeigen, dass nicht die β -Glucuronidase-Funktion, sondern die Sialidase-Aktivität von Klotho über die Freilegung von N-acetylglucosamin und Bindung an Galectin-1 zu einer erhöhten Konzentration an membranösen Glykoproteinen führt. Über eine Desialylierung nimmt Klotho auch Einfluss auf die Konzentration von Heparan-Sulfat-Proteoglykanen und inhibiert so eine Bindung und Signalgebung des Transkriptionsfaktors Wnt5a.

1.2.1.3 Klotho wirkt als Cofaktor/Corezeptor für FGF23 und reguliert den Phosphat- und Vitamin-D-Haushalt

Die Phosphat-Konzentration im Blut wird durch ein Equilibrium aus Phosphatresorption im Darm, Phosphatmobilisation aus dem Knochen und Phosphatausscheidung über die Niere bestimmt. Diese Prozesse werden durch mehrere endokrine Faktoren reguliert. Erbliche Formen von renalen Phosphatverlust mit konsekutiver Hypophosphatämie, wie autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis, wurden in den letzten Jahren intensiv

untersucht, und man stellte fest, dass eine Störung der ursprünglich als Phosphatonine bezeichneten Mediatoren den kausalen Faktor für diese Erkrankungen darstellen. Im Falle der autosomal-dominanten hypophosphatämischen Rachitis konnte durch das ADHR-Consortium mittels eines *positional cloning*-Zugangs und darauffolgender Genidentifizierung durch *exon prediction*-Programme, gezeigt werden, dass bei diesen Patienten eine *missense*-Mutation im FGF-23-Gen (*fibroblast growth factor 23*) vorliegt.⁶¹ Das Gen war bei der Maus zuvor schon mittels auf Homologien basierender PCR identifiziert worden.⁶² Durch andere Gruppen konnte gezeigt werden, dass es sich um eine *gain of function*-Mutation handelt, welche FGF-23 resistent gegenüber proteolytischer Spaltung macht und so dessen Serumkonzentration und hierdurch biologische Aktivität erhöht.⁶³ Auch bei tumorinduzierter Osteomalazie finden sich eine Hypophosphatämie und sehr niedrige Spiegel von Calcitriol. Bei dieser paraneoplastischen Erkrankung wird von verschiedenen Tumoren unkontrolliert FGF-23 ausgeschüttet, nach Tumorresektion normalisieren sich alle pathologisch veränderten Parameter.⁶⁴

FGFs regulieren Stammzelldifferenzierung, Organogenese, Skelettwachstum, Gewebereparatur und den Phosphat-Haushalt. Obwohl bis dato 22 verschiedene FGF-Gene bekannt sind, die für über 30 verschiedene FGFs codieren, existieren nur vier Gene für FGF-Rezeptoren, allesamt Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wobei jedoch durch alternatives Spleißen mehr als 48 Isoformen entstehen. FGF-23 ist ein im Knochen synthetisiertes phosphaturisches Hormon, welches zu der FGF-19-Subfamilie gezählt wird. Die FGF-19 Subfamilie ist eine neuartige Subgruppe der FGF-Familie und unterscheidet sich von anderen, parakrin wirkenden FGFs in der Topologie der Heparin-bindenden Regionen dieser Faktoren. Die FGF-19-Subfamilie zeichnet sich durch eine sehr schwache Affinität für Heparin-/Heparan-Sulfat aus, wodurch verhindert wird, dass diese Mediatoren an die extrazelluläre Matrix gebunden werden und somit als endokrine Faktoren agieren können. Andererseits reduziert diese schwache Interaktion auch die Kapazität von Heparin, eine direkte Interaktion zwischen FGFs und deren Rezeptoren zu ermöglichen, was bewirkt, dass FGFs der Subfamilie 19 alleine eine sehr schwache Affinität zu ihrem Rezeptor aufweisen.⁶⁵

Diese Beobachtungen implizierten, dass FGFs der Subfamilie 19 noch zusätzliche Cofaktoren benötigen, um stabil an ihren Rezeptor binden zu können. *Razzaque et al.* und andere Gruppen generierten FGF-23-Null-Mäuse, welche einen Phänotyp entwickelten, der sich morphologisch wie auch biochemisch kaum von Klotho-defizienten Mäusen unterschied. Auch bei diesen Tieren konnte man eine drastisch verkürzte Lebenserwartung, Arterioskle-

rose, weitreichende Weichteil-Calcifizierung, Hypogonadismus, Hypoglycämie, Haut-, Muskel- und Thymusatrophie und eine stark erhöhte Vitamin-D-Aktivität beobachten. Interessanterweise konnten die meisten dieser Phänotypen durch genetische Ablation der 1- α -Hydroxylase gerettet werden, wie dies auch bei Klotho-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte,⁶⁶ was den Schluss nahelegte, dass FGF-23 seine Wirkung zusammen mit Klotho entfaltet und dass die unreguliert hohe Vitamin-D-Aktivität die Hauptursache für die diversen zu beobachtenden Pathologien darstellt.^{67,68}

Eine der Hauptaufgaben von FGF-23 bzw. Klotho ist die Kontrolle des Phosphathaushaltes. Infusion bzw. Überexpression von FGF-23 resultiert immer in Hypophosphatämie und erhöhter renaler Phosphatausscheidung.

Anorganisches Phosphat wird für die Skelettmineralisation, den Energiehaushalt, zelluläre Signalgebung und die Regulation von Proteinfunktionen benötigt. Die Homöostase des Serum-Phosphats wird durch eine komplexe Interaktion zwischen intestinaler Resorption, Austausch mit intrazellulären und im Knochen vorhandenen Speichern und renaler tubulärer Reabsorption gewährleistet. Diese Prozesse werden durch Vitamin D, Parathormon und FGF-23 gesteuert. FGF-23 und Klotho sind als übergeordnete Regulatoren des Phosphathaushaltes zu betrachten, was mehrere Gründe hat: Erstens entfalten FGF-23 und Klotho direkt phosphaturische Effekte. Dies geschieht über eine Reduktion der von Zellen des proximalen Tubulus auf der apikalen Seite exprimierten NaPi-2a- und NaPi-2c-Natrium-Phosphat-Cotransporter und auch über eine Reduktion des intestinalen NaPi-2b-Transporters.⁶⁹ Zweitens agieren FGF-23 bzw. Klotho als Regulatoren in einem die Calcitriol-Produktion kontrollierenden negativen Feedback-Mechanismus. Drittens sind FGF-23 bzw. Klotho dem Parathormon (PTH), einem weiteren wichtigen Vertreter im Calcium-Phosphathaushalt, übergeordnet, da FGF-23 zum einen die PTH Exkretion senken und dessen Funktion in der Phosphatausscheidung übernehmen kann, zum anderen jedoch, im Gegensatz zu PTH, gleichzeitig auch die 1- α -Hydroxylase (CYP27B1) und somit die Konzentration an aktivem Vitamin D zu senken vermag. (siehe *Abbildung 1*)

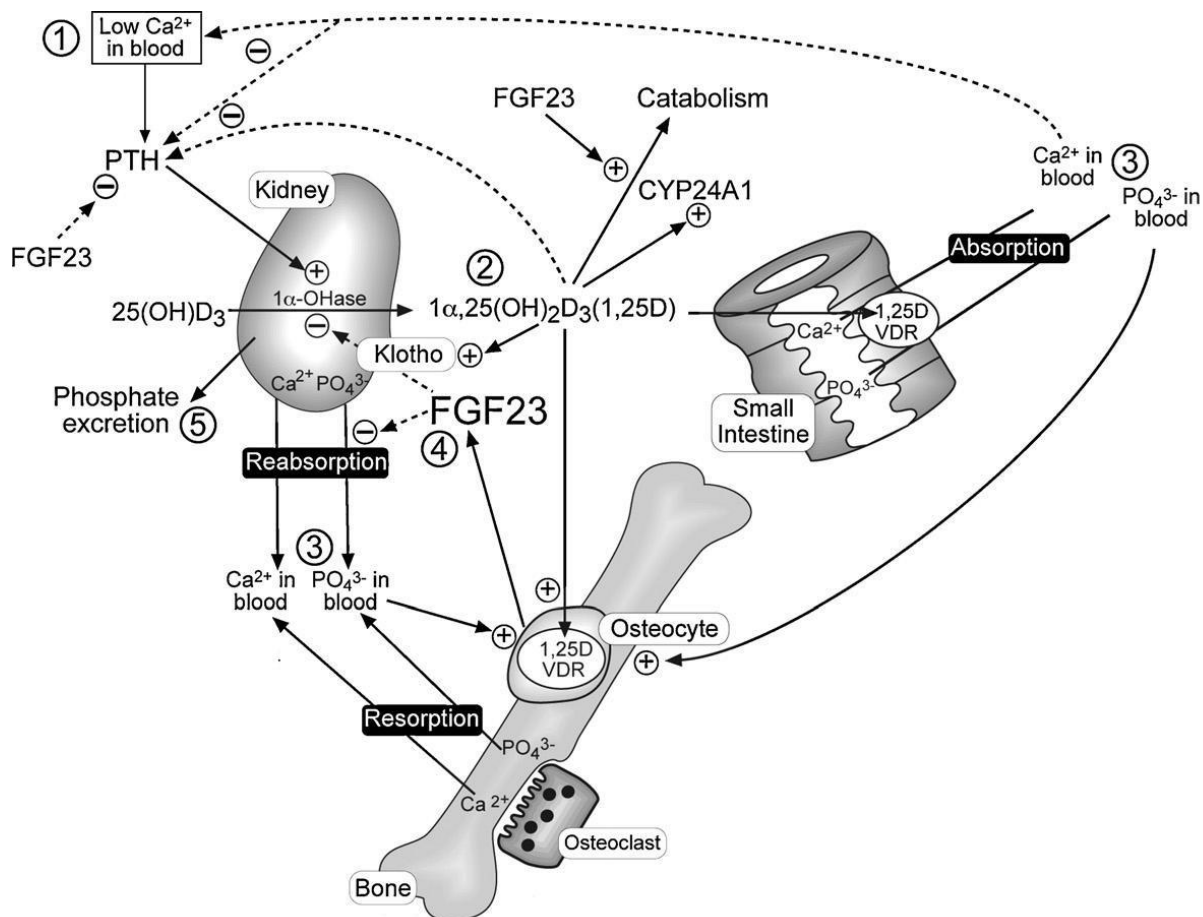


Abbildung 1: Der negative Feedbackloop zur Kontrolle des Calcitriol-Metabolismus.

Die eingekreisten Zahlen repräsentieren die Sequenz an physiologischen Regulationsmechanismen nach einer Reduktion der Calciumkonzentration im Blut (1) wie folgt: PTH medierte Steigerung der Expression von CYP27B1 und konsekutiver Anstieg von Calcitriol (2); Calcitriol-VDR Wirkung führt zur Calcium- und Phosphat-Absorption, Reabsorption und Resorption (3), was zu einem Anstieg von Calcium und Phosphat im Blut führt; Calcium und Calcitriol wirken negativ auf die PTH-Produktion und schließen so die calcemische Schleife, wobei Phosphat und Calcitriol im Knochen eine gesteigerte Expression von FGF-23 bewirken (4) und Calcitriol alleine die Expression von Klotho steigert; Calcitriol steigert auch die Expression von CYP24A1; FGF-23 vermittelt durch Inhibition der Npt2a/Npt2c-vermittelten Phosphatreabsorption eine Phosphatexkretion und schützt so vor Hyperphosphatämie und Hypercalcämie (5).^{*70}

1.2.1.4 Klotho schützt vor endothelialer Dysfunktion und reguliert die Produktion von Stickstoffmonoxid

Klotho wird, wie schon abgehandelt, auch als humoraler Faktor betrachtet, und Gefäßendothelzellen sind somit ständig zirkulierendem Klotho ausgesetzt. Es ist bekannt, dass Endothelzellen eine tragende Rolle in der Kontrolle des Gefäßtonus spielen. Als Reaktion auf spezifische Agonisten, wie Acetylcholin, sind sie in der Lage NO zu synthetisieren.^{71,72} Aus Studien an heterozygot Klotho-defizienten Mäusen weiß man, dass bei diesen die Acetylcholin-bedingte, über Endothelzellen vermittelte Vasodilation in Aorta und Arterio-

len signifikant abgeschwächt ist, was die Vermutung nahelegte, dass Klotho Einfluss auf die NO-Produktion hat.⁴⁵ Diese Hypothese wird durch mehrere Fakten untermauert. Zum einen konnte man durch Parabiosis zwischen heterozygot Klotho-defizienten und Wildtyp-Mäusen die bei den Klotho-defizienten Tieren ausgebildete endotheliale Dysfunktion aufheben, weshalb vermutet wurde, dass Klotho selbst oder ein Klotho-assoziiertes zirkulierendes Faktor von Wildtyp-Mäusen in die Zirkulation der Klotho-defizienten Tiere gelangt.⁴⁵ Ferner ist die Menge an über den Harn ausgeschiedenen NO-Metaboliten (NO₂-, NO₃-) bei Klotho-defizienten Mäusen signifikant erniedrigt.⁴⁵ Die Gabe von L-NAME (L-Nitro-Arginin Methyl Ester), einem Inhibitor der NOS (nitric oxide synthase), reduzierte die Harnexkretion von NO₂- und NO₃- sowohl in heterozygot Klotho-defizienten als auch in Wildtyp-Mäusen im gleichen Ausmaß,⁴⁵ woran man erkennen kann, dass die Klothodefizienz-induzierte Reduktion von NO aus einer Supprimierung endogener NO Produktion resultiert.⁴⁵

1.2.1.5 Klotho supprimiert Wnt-Signalgebung

Der Wnt-Signalweg erfüllt wichtige Funktionen während der Embryogenese⁷³ und sorgt im adulten Organismus für Proliferation und Fortbestand von Stammzellen. Dies geschieht durch die spezifische Steuerung bestimmter Gene, welche, zeitlich und räumlich streng begrenzt, Wachstum, Mobilität und Überleben von Zellen regulieren. Ruhende und zirkulierende Stamm- und Progenitorzellen sind unerlässlich für Instandhaltung und Reparatur von Geweben, und es wurde schon oft postuliert, dass Stammzell-Depletion bzw. -Dysfunktion an Alterungsprozessen beteiligte Mechanismen darstellen. *Liu et al.* untersuchten etwaige Modifikationen des Wnt-Signalweges in Klotho-hypomorphen Mäusen. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen wiesen Klotho-hypomorphe Tiere im Alter von zweieinhalb Monaten eine deutlich reduzierte Anzahl von *label-retaining cells* auf (LRC; 5-bromo-2'-deoxyuridine Einlagerung stellt eine etablierte Methode zur Stammzelldetektion in der jeweiligen Nische dar). Färbungen mit dem Seneszenzmarker SA β -Galactosidase von Gewebearealen mit bekannt hoher Teilungsrate von Progenitorzellen (Haarfollikel, intestinale Krypten im Dünndarm, Hoden) zeigten bei Klotho-hypomorphen Mäusen eine intensivere Anfärbung als bei Wildtyp-Mäusen. Mittels Zellkultur-Experimente konnte ferner gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Stimulation des Wnt-Signalweges zu einer intrazellulären Zunahme an Seneszenzmarkern führt. Hämatopoetische Stammzellen Klotho-hypomorpher Tiere befanden sich in signifikant gesteigertem Maße in der G₁-

Phase, ergo in Teilung. Da viele Agonisten des Wnt-Signalweges frei zirkulieren, untersuchten Liu et al., ob die lösliche Form von Klotho Komplexe mit Wnt3 eingehen kann. Mittels Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass die KL1-Domäne von Klotho genügt, um an Wnt3 zu binden. Die vollständige lösliche Form von Klotho vermag außerdem auch Wnt1, Wnt4 und Wnt5a zu binden. Die vergleichende Untersuchung der Aktivität des Wnt-Signalweges, zeigte eine Überaktivität bei Klotho-defizienten Tieren, welche vermutlich für den beschleunigten Umsatz von Stammzellen bei diesen verantwortlich ist, da man in einem Zellkulturmodell durch forcierte ektope Expression von Klotho die Aktivität von endo- und exogenen Wnt-Agonisten drosseln konnte.⁵⁷

Die von *Liu et al.* beobachtete Inhibition des Wnt-Signalweges durch Klotho konnte auch in anderen Studien beobachtet werden. *Lee et al.* zeigten, dass eine epigenetisch bedingte Blockade der Klotho-Expression in Cervixkarzinomen zu einer Überaktivität des Wnt-Signalweges führt.⁵⁸ *Camilli et al.* konnten nachweisen, dass auch der enzymatischen Funktion, genauer der Sialidaseaktivität, von Klotho eine Rolle in der Inhibition des Wnt-Signalweges zukommt. Sie schlussfolgerten, dass Klotho durch Desialylierung von Syndecanen eine Bindung von Wnt-Agonisten an diese, eine anschließende Internalisierung und somit die Signalgebung antagonisiert.⁶⁰

2. Methoden

2.1 Charakteristika der Kohorte und Datenerhebung

Während des Zeitraums von Januar 2000 bis Dezember 2004 wurden alle Frauen, die in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Charité Campus Mitte, Universitätsklinikum der Humboldt- und Freien Universität Berlin, in diesem Zeitraum entbunden haben, eingeladen, an dieser prospektiven Kohortenstudie teilzunehmen. Die lokale Ethikkommission bewilligte diese Studie. 6,3 Prozent der Frauen lehnten die Teilnahme ab. Nach Einholen einer schriftlichen Einverständniserklärung wurde ein strukturiertes Interview durchgeführt, wodurch folgende Merkmale erhoben wurden: Gewicht vor der Schwangerschaft, Größe, Nationalität, Nikotinkonsum vor und während der Schwangerschaft, Familienanamnese, insbesondere hinsichtlich primärer Hypertonie und metabolischen Erkrankungen, Auftreten eines Schwangerschaftshypertonus in vorherigen Schwangerschaften, Vorliegen und gegebenenfalls medikamentöse Therapie von Hypertonus, Diabetes, wobei zwischen präexistentem Diabetes und Gestationsdiabetes differenziert wurde, Fettstoffwechselstörungen und andere mütterliche Risikofaktoren wie z.B. renale Erkrankungen. Zusätzlich wurden folgende Daten aus dem Mutterpass erfasst: Alter der Mutter, Größe, Gewicht während der Schwangerschaft, Anzahl der Schwangerschaften und Geburten, der berechnete und der korrigierte Geburtstermin, Vorliegen von Ödemen und Blutdruckwerte, die bei den Vorsorgeuntersuchungen gemessen wurden. Alle Kinder wurden postpartal einer pädiatrischen Untersuchung unterzogen, biometrische und klinische Daten des Neugeborenen, wie Länge, Geburtsgewicht, Kopfumfang, Geschlecht, Gestationsalter, Geburtsgewicht, APGAR-Score et cetera, erfasst und in die Datenbank aufgenommen. Auch wurden mütterliche und kindliche Krankenakten examiniert und verschiedenste Parameter aufgezeichnet, wie pränatale Vorsorgeuntersuchungen, Schwangerschaftskomplikationen, Schwangerschafts-Outcome (z.B. Geburtsmodus, Lage, APGAR-Score) und maternale Laborparameter. Für diese Arbeit wurden Proteinkonzentrationen in 343 Proben bestimmt. Um etwaige Effekte durch unterschiedliche ethnische Herkunft zu vermeiden, wurden in die statistische Analyse der Daten nur kaukasische Frauen eingeschlossen, was zum Ausschluss von drei Proben von Patientinnen nicht-kaukasischer Herkunft führte. Vier Plazentaprobe erbrachten auch nach mehrmaliger Wiederholung keine Resultate und wurden daraufhin ausgeschlossen. Insgesamt wurden 336 Proben in die weitere statistische Aus-

wertung eingeschlossen. Da an dieser Studie mehrere Doktoranden über einen Zeitraum von einigen Jahren beschäftigt waren und im Laufe dieser Zeit noch weitere Plazentaprobe hinzugefügt wurden variiert die Anzahl der Proben je nach analysiertem Protein. Abgesehen davon, dass die Fallzahlen erhöht wurden, existiert je nach untersuchtem Protein ein gewisser Anteil an Proben, in welchen man, auch nach mehrmaliger Wiederholung, keine aussagekräftigen Ergebnisse produzieren konnte, was zu einer weiteren Variation der Fallzahlen führte.

2.2 Verwendete Chemikalien

Tabelle 1: Liste verwendeter Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
25x complete protease inhibitor	Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland;
Ammoniumpersulfat	Fluka, Hamburg, Deutschland;;
BSA bovine serum albumin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;;
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;;
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland;
Ethanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;;
Glycin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;;
Isopropanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;;
Milchpulver	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;;
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland;
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;
Natriumazid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;
p-Comarinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA;
PAA Polyacryl Säure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland;
Pierce BCA Protein Assy Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA;
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA;
Rotiload 1	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;
SDA (Natriumdiacetat)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;
SDS (Natriumaurylsulfat)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Bio Rad, München, Deutschland;;
Tetramethylethylendiamin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;
Triton X-100	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;
Tween 20	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;

2.3 Verwendete Geräte und Materialien

Tabelle 2: Liste verwendeter Geräte und Materialien

Gerät	Hersteller
Biometra standard power pack P25	Biometra, Göttingen, Deutschland;
Elektrophoresekammer TV200	Biotop, Jahnsdorf, Deutschland;
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien;
Feinwaage BL1500S	Sartorius, Göttingen, Deutschland;
Film Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland;
Inkubator Thermomix 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland;
Milli Q Wasseraufbereiter	Milli-Q Purification System, Billerica, MA, USA;
Nitrozellulosemembran	Whatman, Dassel, Deutschland;
pH-Meter WTW pH537	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland;
Präzisionswaage Scaltec SBC22	Scaltec Instruments, Göttingen, Deutschland
Schüttler WT-17	Biometra, Göttingen, Deutschland;
Safelock-Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland;
Semidry Blotter	SD Transblot Biorad, München, Deutschland
Spectrophotometer Du530 UV/ Vis	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland;
Ultraschallstab Sonoplus	Bandelin, Berlin, Deutschland;
Vortex Genie 2 Mixer	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Whatman Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland;
Whatman Nitrozellulosemembran	Whatman, Dassel, Deutschland;

2.4 Verwendete Lösungen

Alle nachfolgend genannten Lösungen wurden selbst hergestellt.

Trenngelpuffer (1,5M Tris, pH 8,8)

36,6 g Tris in 200 ml MQ-H₂O, pH 8,8 einstellen und anschließend autoklavieren; gekühlt lagern;

Sammelgelpuffer (1,0 M Tris, pH 6,8)

12,12 g Tris in 100 ml MQ-H₂O, pH 6,8 einstellen und anschließend autoklavieren; gekühlt lagern;

Tris buffered Saline–Tween (20mM Tris, 140mM NaCl, 0,1% v/v Tween 20, pH 7,6)

Ein Liter 10 fach TBS: 24,2g Tris, 80g NaCl, pH 7,6 einstellen, auf 1 Liter auffüllen, mischen; 10 Liter TBS-T: 1 Liter 10 fach TBS, 9 Liter destilliertes Wasser, 10 ml Tween 20;

Elektrophorese Puffer (25mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% SDS)

Ein Liter 5 fach Elektrophorese Puffer: 15,25g Tris, 94g Glycin, 50 ml 10% SDS, auf 1 Liter auffüllen;

Transfer Puffer (184mM Glycin, 24mM Tris, 20% v/v Methanol)

Ein Liter 5 fach Transfer Puffer: 69,2g Glycin, 14,5g Tris auf einen Liter auffüllen; Vor dem Transfer im Verhältnis 3:1:1 mit Wasser und Methanol mischen;

Stripping Puffer (25mM Glycin, 1% (w/v) SDS, pH 2)

0,5 Liter Stripping Puffer: 0,935g Glycin, 50ml 10% (w/v) SDS, pH 2 einstellen und auf 0,5 Liter auffüllen;

Ponceau Lösung (0,1% (w/v) Ponceau-S, 2ml 100% (v/v)Essigsäure)

40ml Ponceau Lösung: 0,04 g Ponceau-S, 2ml 100% (v/v) Essigsäure, 38ml H₂O;

Enhanced Chemiluminescence (ECL) Solution 1

100 ml ECL Solution 1: 1 ml Luminol (0,8858g in 20 ml Dimethylsulfoxid, 1ml Aliquots; bei minus 20°C lagern; beim Auftauen/Weiterverarbeiten vor Licht schützen), 440 µl p-Comarinsäure (0,2956g in 20 ml Dimethylsulfoxid, 0,5ml Aliquots; bei minus 20°C lagern), 88,5 ml H₂O; in einem lichtundurchlässigen Gefäß aufbewahren;

Enhanced Chemiluminescence (ECL) Solution 2

100 ml ECL Solution 2: 64 µl H₂O₂, 10 ml 1 M Tris pH 8,5 (Lösung autoklavieren), 90 ml H₂O; in einem lichtundurchlässigen Gefäß aufbewahren;

2.5 Proteinextraktion

Es wurde versucht, von allen Plazenten in noch tiefgefrorenem Zustand mittels eines Skalpells möglichst idente, makroskopisch gewebereiche und blutarm erscheinende Proben zur weiteren Aufarbeitung zu entnehmen. Die Proben wurden, nach vorhergehender Behandlung mit flüssigem Stickstoff, unter Zuhilfenahme eines Metallmörser pulverisiert. 1,5 ml Safelock-Tubes wurden leer und gefüllt gewogen und die Differenz berechnet. Pro 100 mg pulverisierter Probe setzte man 1 ml Lysepuffer mit Proteinaseinhibitor hinzu, welcher eigens angemischt wurde. 5 ml dieses Puffers beinhalten 0,25ml 1-molarer TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan;) Puffer eingestellt auf pH 8,5, 0,5ml 1,5-molarer Nat-

riumchloridlösung (NaCl;), 0,025g SDA (Natriumdiacetat;), 0,05ml 10% (w/v) SDS (Natriumaurylsulfat;), 0,05 ml Triton X-100 , 0,2ml 25x *complete protease inhibitor*, 0,5 ml 0,3% (w/v) Natriumazid, 3,45 ml MQ-H₂O (mittels Milli-Q Purification System aufbereitetes Wasser). Die Proben wurden mittels Vortex gut durchgemischt und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen (5 Durchgänge; pro Durchgang 3 mal 10 Sekunden), danach inkubierte man 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Proben wurden bei 12000 upm für 12 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mittels BCA Assay die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt und eingefroren. Anhand der bestimmten Proteinkonzentration stellte man Aliquots mit 5 µg/ml Protein her, welche bei minus 20°Celsius eingefroren wurden.

Ferner wurde ein Probenmix aus allen Proben hergestellt, auch auf 5 µg Protein pro ml Probe verdünnt und für die spätere Verwendung als Standard bei minus 20°Celsius eingefroren.

2.6 Western Blot

2.6.1 Vorbereitung

Reinigung der Glasplatten, Spacer, Kämme (48 Geltaschen), Gießhalterung (*wide format mini gels*) mit Ethanol. 25ml eines 10% v/v PAA Trenngels wurde unter Verwendung von 9,9 ml MQ-H₂O, 8,3 ml 30% PAA Polyacryl Säure, 6,3 ml 1,5 M pH 8,8 Tris, 0,25 ml 10% w/v SDS, 0,25 ml 10% w/v Ammoniumpersulfat, und 0,01 ml TEMED (Tetramethylethylendiamin) hergestellt. Um eine glatte Gelkante zu erhalten, überschichtete man das Gel mit 0,5 ml Isopropanol. Nach einstündiger Polymerisation bei Raumtemperatur wurde das Isopropanol abgossen, die Kämme eingesetzt, mit 15 ml 5% v/v PAA Sammelgel aufgefüllt (10,2 ml MQ-H₂O, 2,53 ml 30%; PAA-Polyacrylsäure, 1,88 ml 1,0 M, pH 6,8 Tris, 0,15 ml 10% w/v SDS, 0,15 ml 10% w/v Ammoniumpersulfat, und 0,015 ml Tetramethylethylendiamin) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auspolymerisiert.

2.6.2 Elektrophorese

Die Gelhalterung wurde in die Elektrophoresekammer eingebracht und circa 0,7 Liter Elektrophoresepuffer in die äußere Kammer eingebracht, etwaige Luftblasen an der unteren Gelkante entfernt und dann der restliche Elektrophoresepuffer in die innere Kammer

eingbracht. Der 5 µg/ml Ansatz der einzelnen Proben wurde schonend auf Eis aufgetaut. Von den zu untersuchenden Proben wurden 15 µl entnommen, mit 7,5 µl MQ-H₂O und 7,5 µl reduzierendem Ladepuffer (Rotiload 1) versetzt. Aus dem Standardmix wurde eine Probenreihe ansteigender Konzentration hergestellt (20, 25, 30, 35 und 40 µg Protein/ml) und diese auch mit Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden 5 Minuten bei 95,0°C inkubiert, auf Eis transferiert und nach dem Abkühlen kurz zentrifugiert. Mit Hilfe von selbst autoklavierten langen Pipettenspitzen wurden je 12 µl der Proben aufgetragen. Zur besseren Orientierung verwendete man in jedem Gel auch einen Molekulargewicht-Marker (Fermentas, PageRuler Prestained Protein Ladder;). Durch Einsatz eines 48 Zinken tragenden Kamms konnte man pro Gel die Standardreihe und je 15 Proben auftragen, wobei jede Probe in einem Gel immer doppelt aufgetragen wurde. Die anschließende Elektrophorese wurde im Kühlraum bei 4,0°C durchgeführt, zuerst 30 Minuten bei einer Spannung von 80 Volt und danach ungefähr 2 Stunden 30 Minuten bei einer Spannung von 110 Volt.

2.6.3 Blotten

Pro Gel bereitete man sich vier Lagen Whatman Filter Papier und eine Nitrozellulosemembran in den Maßen 5,5 x 18 cm vor. Die Nitrozellulosemembranen wurden für zwei Minuten in destilliertem H₂O aktiviert. Whatman Papier, Nitrozellulosemembranen und die aus der Elektrophoresekammer entnommenen Gele wurden für zehn Minuten in Transferpuffer gelegt. Danach konstruierte man einen „Sandwich“ auf dem Semidry Blotter aus zwei Lagen Whatman Papier, gefolgt von einer Nitrozellulosemembran, dem in einer Bewegung (zur Reduktion von sich unter dem Gel befindlichen Luftblasen) aufgelegten Gel und abschließend zwei Lagen Whatman Papier. Geblottet wurde eine Stunde bei einer konstant eingestellten Spannung von 25 Volt.

2.6.4 Protein-Nachweis und -Identifizierung

Eine Blot-Kontrolle mittels einer Ponceau-S Färbung wurde durchgeführt. Die Nitrozellulosemembran wurde für drei Minuten in 20ml Ponceau-S geschwenkt, anschließend drei mal in destilliertem H₂O gewaschen. Auf Grund der guten Sichtbarkeit der einzelnen Banden wurde die Membran entsprechend der Molekularmassen der zu detektierenden Proteine auf zwei Streifen zugeschnitten (Streifen 1: 116 kDa Klotho; Streifen 2: 55 kDa VDR und 40 kDa Aktin). Danach wurde dreimal 5 Minuten in TBS-T gewaschen, 1 Stunde in 5% (w/v)

TBS-T-Milch bei Raumtemperatur geblockt, dreimal 5 Minuten in TBS-T gewaschen und über Nacht mit den primären Antikörper bei 4°C inkubiert (VDR: Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, Kalifornien, USA, sc-1008 rabbit polyclonal IgG, 1:10000 in 5% (w/v) TBS-T-Milch; Klotho: Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, AB75023 rabbit polyclonal, 1:1000 in 5%(w/v) TBS-T-Milch). Da der Klotho Antikörper mehrmals verwendet werden sollte enthielt das hier verwendete TBS-T 0,05% (w/v) Natriumazid.

Tags darauf wurde zweimal kurz, danach dreimal zehn Minuten in TBS-T gewaschen, für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, Kalifornien, USA, goat anti rabbit 1: 10000) bei Raumtemperatur in 4% (w/v) TBS-T-BSA (*bovine serum albumin*) inkubiert, zweimal kurz und dreimal zehn Minuten in TBS-T gewaschen.

ECL Solution 1 und ECL Solution 2 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membranen anschließend für drei Minuten darin inkubiert. Die Membranen wurden zusammen mit dem Film in eine Kodak® Filmkassette eingelegt und belichtet. Der Film wurde mit Hilfe eines vollautomatischen Entwicklers entwickelt.

Die Membran mit dem 55 kDa schweren VDR und dem 40 kDa schwere Aktin wusch man zweimal kurz und dreimal zehn Minuten in TBS-T, danach wurde die Membran nach Zugabe von ca. 50ml Stripping Puffer für 30 Minuten in einem 50,0°C heißen Wasserbad gestrippt, zweimal kurz und dreimal zehn Minuten in TBS-T gewaschen. Hierauf blockte man für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% (w/v) TBS-T-Milch, wusch man dreimal 5 Minuten in TBS-T und inkubierte die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (Sigma, München, Deutschland, anti Aktin A5060 polyclonal anti rabbit, 1: 100000) in 5% (w/v) TBS-T-Milch. Im Anschluss wurde zweimal kurz und dreimal zehn Minuten in TBS-T gewaschen, mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, Kalifornien, USA, goat anti rabbit 1: 10000 in 4% (w/v) TBS-T-BSA), zweimal kurz und dreimal zehn Minuten in TBS-T gewaschen, in ECL für drei Minuten inkubiert und Fotos angefertigt.

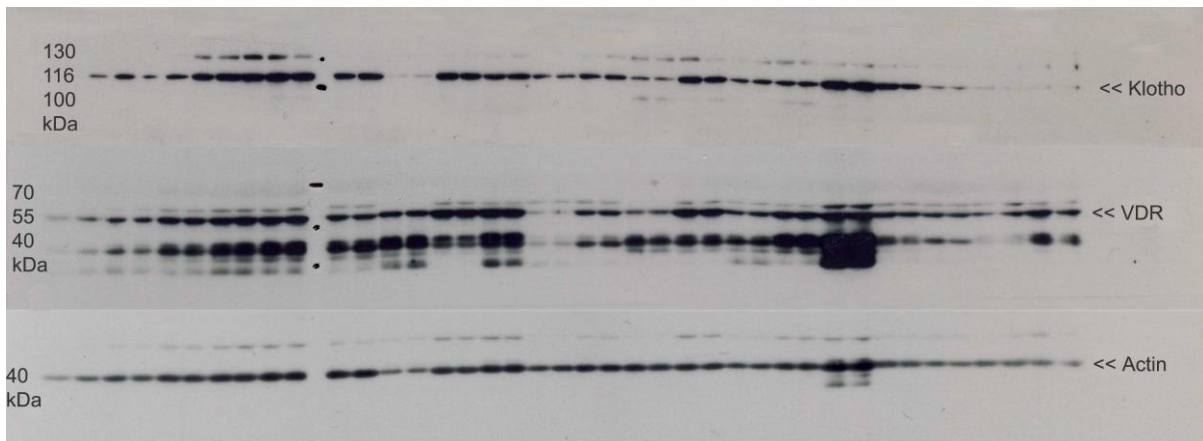


Abbildung 2: Beispielbild

Belichtetes, entwickeltes und eingescanntes Photo der zu bestimmenden Proteinbanden. Von oben nach unten, Klotho bei 116 kDa, VDR bei 55 kDa und Aktin bei 40 kDa.

2.6.5 Auswertung

Die angefertigten Fotos wurden mit einem Canon (Tokyo, Japan) CanoScan 4400F Scanner bei einer Auflösung von 600 dpi eingescannt. Mittels AlphaEaseTM Version 3.1.2 wurden sowohl von Klotho als auch von VDR die Signalintensität der am Film erkenntlichen, Protein-spezifischen Banden ermittelt. Der gleiche Vorgang wurde auch mit Aktin durchgeführt. Mit Open OfficeTM wurden Tabellen erstellt und die gemessenen Werte (*IDV*, *Area* und *Background*) eingefügt. Aus den bei jedem Western-Blot-Durchgang in ansteigender Konzentration aufgetragenen, standardisierten Proben wurde eine Referenzgerade generiert. Im ersten Schritt wurde von dem bestimmten *integrated density value* (*IDV*; Signalintensität der vermessenen Bande) der Zielproteinbande das Produkt aus der Fläche der vermessenen Bande und der durchschnittlichen Intensität des Hintergrundes abgezogen. Anschließend subtrahierte man von dem erhaltenen Wert den *y*-Achsenabschnitt *n* und dividierte durch den linearen Faktor *m* der Geradengleichung ($y = mx + n$). Auf diese Art und Weise wurden die absoluten Werte der Einzelproben mit der Standardreihe abgeglichen, eine Methode, die es ermöglicht unterschiedliche Bedingungen der Experimente auszugleichen. In einem zweiten Schritt dividierte man das erhaltene Ergebnis durch die Signalintensität der Aktinbande. Auch bei Aktin wurde in einem vorausgehenden Schritt vom erhaltenen *integrated density value* das Produkt aus Fläche der Proteinbande und durchschnittlicher Hintergrundintensität subtrahiert und über die Referenzgerade abgeglichen. Da der Aktingehalt von Probe zu Probe ident sein sollte, dient dieser Abgleich dazu, eine relative Proteinkonzentration des Zielproteins zu bestimmen. Ferner erlaubt diese Praxis auch eine Fehlerkorrektur der Gesamtmenge an Protein, im Falle von

Fehlern bzw. inkompletter Übertragung während eines Blots. Die erhaltenen Daten stellen somit eine zum Aktinhalt der Probe relative Proteinkonzentration dar. Alle Messungen wurden mindestens zweimal durchgeführt, wobei die durchschnittliche Versuchswiederholung bei circa drei liegt. Der Variationskoeffizient der Einzelmessungen vom Gesamtmittelwert beträgt bei Klotho 0,192 (19,2%) und bei VDR 0,17 (17%).

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit SPSS® Version 17 durchgeführt. Grafiken wurden mit Graph Pad Prism® 5 erstellt. Herkömmliche univariate Ausreißer werden in Boxplots als Werte plus/minus (\pm) des 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR) definiert.⁷⁴ Extremwerte sind Werte, die sich außerhalb des dreifachen Interquartilsabstand befinden. Synonym spricht man auch von „milden“ ($\pm 1,5x-3x$ IQR) bzw. „extremen“ Ausreißern ($>\pm 3x$ IQR).⁷⁴ Univariate Ausreißer müssen jedoch nicht zwingend Ausreißer in linearen Regressionsanalysen darstellen,⁷⁵ weshalb in dieser Arbeit vor den statistischen Analysen keine Ausreißer entfernt wurden. In einfachen linearen Regressionsanalysen existieren drei Arten von Ausreißern. Beobachtungen ($x_i; y_i$) können x_i Werte aufweisen, die sich stark von anderen x -Werten unterscheiden, umgekehrt können y_i Werte existieren, die stark von anderen y -Werten differieren und es gibt Beobachtungen, in welchen sowohl x_i - als auch y_i -Werte anders geartet sind als die restlichen Beobachtungen. Es gibt somit drei verschiedene Arten von statistisch-diagnostischen Werten, die als *Distance*, *Leverage* und *Influence* bezeichnet werden.⁷⁵ *Distance* beschreibt potentielle Ausreißer der abhängigen Variablen (y), *Leverage* der unabhängigen Variablen (x), und *Influence* kombiniert *Distance* und *Leverage*, um einflussreiche Beobachtungen zu identifizieren. Als einflussreiche Beobachtung bezeichnet man jene, die in Anwesenheit bzw. Abwesenheit zu merkwürdigen Veränderungen der Regressionsgeraden führen. Das am weitesten verbreitete Maß um *Distance* zu beschreiben ist das Residuum, welches den vertikalen Abstand eines Punktes (y_i) zu der Regressionsgeraden misst. *Leverage* bestimmt das Ausmaß, wie ungewöhnlich ein Fall im Vergleich zu anderen unabhängigen Variablen ist. Wenn nur eine unabhängige Variable vorhanden ist, beschreibt *Leverage* die Abweichung einer ungewöhnlichen unabhängigen Variablen vom Mittelwert aller unabhängigen Variablen.⁷⁵ Werte, die entweder eine große *Distance* oder große *Leverage* aufweisen, müssen nicht unbedingt auch einen starken Einfluss auf die Regressionsgerade ausüben.⁷⁵ Eine Kombination von großer *Distance* und großer *Leverage* hat jedoch potentiellen Einfluss auf die Regressionsgerade, da

die *Influence* das Produkt aus *Distance* und *Leverage* darstellt.⁷⁶ Zur Detektion von einflussreichen Ausreißern in linearen Regressionsanalysen existieren verschiedene mathematische Modelle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei linearen Regressionsanalysen immer die Cook'sche Distanz bestimmt, ein weit verbreitetes, die *Influence* von Beobachtungen messendes Verfahren. Die Cook'sche Distanz beschreibt die Differenz zwischen dem berechneten Korrelationskoeffizienten und einem Korrelationskoeffizienten, den man bei Ausschluss einer gegebenen Beobachtung erhalten hätte.⁷⁷ Die so berechneten Werte sollten ziemlich gleich groß sein. Falls nicht, hat man Grund zur Annahme, dass eine gegebene Beobachtung die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten beeinflusst. Die Cook'sche Distanz ist ein optional bestimmbarer Parameter bei mit SPSS kalkulierten linearen Regressionsanalysen.

SPSS generierte im Zuge einer linearen Regressionsanalyse eine neue Variable für die bestimmte Cook'sche Distanz, in welcher man die bestimmten Distanzen der einzelnen Beobachtungen ablesen konnte. Diese neue Variable wurde daraufhin in einem Boxplot aufgetragen. Als Definition von Extremwerten bzw. Ausreißern wurde einerseits der vorher schon erwähnte Interquartilenabstand herangezogen (die grafische Darstellung der Cook'schen Distanz wird von manchen Autoren empfohlen⁷⁷), andererseits auch der in der Literatur empfohlene Cut-Off von $4/n$ (n = Anzahl der untersuchten Proben) eingehalten.⁷⁸

Integration weiterer Daten

Von anderen Doktoranden wurden weitere plazentare Proteine unter den gleichen Bedingungen und Einsatz der selben Methoden bestimmt. PPAR- γ wurde von Ewelina Sceplik bestimmt, eNOS von Tim Andermann, AT-1 von Marcel Schwietzer und AT-2 von Christian Krause. Als Antikörper für PPAR- γ wurde Santa Cruz (Santa Cruz, Kalifornien, USA) sc-7196 (H-100) rabbit, für eNOS BD biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA) clone3 610297 mouse, für AT-1 Santa Cruz (Santa Cruz, Kalifornien, USA) sc-1173-G (N-10) goat und für AT-2 Santa Cruz (Santa Cruz, Kalifornien, USA) sc-9040 (H-143) rabbit verwendet.

2.8 Aufgabenstellung

Die Idee, die Funktion von plazentarem Klotho und VDR näher zu beleuchten, entstammt einem bisher nicht publizierten Tierexperiment von Professor Dr.med. Florian Lang (in

freundlicher Korrespondenz mit Professor Lang). *Lang et al.* verpaarten heterozygot Klotho-defiziente Mäuse, um homozygot defiziente Tiere zu züchten. Aus diversen anderen Versuchen ist bekannt, dass homozygot Klotho-defiziente Tiere eine signifikante Steigerung der normalerweise deutlich reduzierten Lebenserwartung erfahren, wenn auf die eine oder andere Weise (alimentär, direkte Ablation der 1- α -Hydroxylase) die Spiegel an aktivem Vitamin D gesenkt werden.^{66,79} *Lang et al.* ernährten die trächtigen Muttertiere mit einer Vitamin-D-defizienten Diät, welche jedoch nur bis zu dem Zeitpunkt des Abstillens beibehalten wurde. Interessanterweise war eine Vitamin-D-defiziente Ernährung während dieses Zeitfensters ausreichend, um die Entwicklung des normalerweise bei homozygot Klotho-hypomorphen Tieren ab einem Alter von 3 Wochen anzutreffenden, an menschliche Alterungsprozesse erinnernden Phänotyps zu supprimieren. Diese Beobachtung ließ relativ eindeutig auf während der Trächtigkeit stattgefundene programmierende Effekte schließen.

Für diese Doktorarbeit wurden mehrere Fragestellungen formuliert. Einerseits sollte untersucht werden, ob die relativen plazentaren Proteinkonzentrationen von Klotho auf etwaige programmierende Effekte schließen lassen, ergo ob diese Einfluss auf momentan bekannte biologische Parameter der fetalen Programmierung nehmen (Geburtsgewicht, Körperlänge, Kopfumfang, Ponderal Index;).

Ferner sollte die Rolle von plazentarem Klotho näher charakterisiert werden. Diese Doktorarbeit stellt Teil einer Studie dar, in welcher die plazentare Expression verschiedener Proteine untersucht wurde, um zu sehen, ob das plazentare Protein-Expressionsmuster, durch welches das intrauterine Milieu mitbestimmt wird, mit Effekten der fetalen Programmierung assoziierbar ist. Abgesehen vom Vitamin-D-Rezeptor, der zusätzlich zu Klotho vom Verfasser dieser Arbeit bestimmt wurde, wurden diverse andere Proteine von weiteren Doktoranden analysiert und alle Daten durch einen in unserer Arbeitsgruppe tätigen Biotechnologen (Dipl. Ing. Jan Rahnenführer) validiert. Da durch Tier- und Zellkulturversuche schon eine Reihe von Interaktionen Klothos mit diversen anderen Proteinen beschrieben waren, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob diese putativen Pathways auch in der humanen Plazenta ähnlichen Regeln folgen. Folgende Systeme wurden analysiert:

1. Interaktionen zwischen Klotho und Vitamin D anhand der relativen, plazentaren Vitamin-D-Rezeptor Konzentration.

2. Interaktionen zwischen Klotho und der endothelialen NO Synthase (relative plazentare eNOS Konzentration).
3. Interaktionen zwischen Klotho und dem Renin Angiotensin System (relative plazentare Konzentrationen von AT1 und AT2).
4. Interaktionen zwischen Klotho und dem Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor Gamma (relative plazentare PPAR- γ Konzentration).

Darüber hinaus wurde auch untersucht, ob manche erhobenen Variablen der sehr umfangreichen Mutter-Kind-Datenbank mit der bestimmten plazentaren Proteinkonzentration von Klotho assoziiert sind. Der Fokus lag hierbei auf Lifestylefaktoren der Mutter und einer Woche prä-, bzw. einer Woche postpartal erhobenen Laborparametern.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Tabelle drei stellt die Basischarakteristika der untersuchten Studienpopulation dar. Tabelle vier zeigt die Anzahl der untersuchten Plazenten und Mittelwerte der bestimmten zur Aktinkonzentration der untersuchten Proben relativen Proteinkonzentrationen.

Tabelle 3: Basischarakteristika der Studienpopulation

Alter (Jahre)	30,5 ± 5,8
Größe der Mutter (cm)	167,6 ± 6,8
BMI zu Beginn der Schwangerschaft (kg/m ²)	23,6 ± 4,2
Gestationsalter zur Geburt (Wochen)	38,8 ± 2,1
Geburtsgewicht des Kindes (kg)	3427,8 ± 619,0
Geburtsgewicht < 2500g (%)	6,85
APGAR 5min	9,34 ± 0,87
APGAR 10min	9,69 ± 0,58
Primigravida (%)	47,3
Sectio (%)	31,64
Hypertension vor/während der Schwangerschaft (%)	2,7/2,1
Familienanamnese Hypertension (%)	38
Diabetes mellitus vor/während der Schwangerschaft (%)	1,0/4,5
Familienanamnese Diabetes mellitus (%)	36
Rauchen vor der Schwangerschaft	56 (16,7%)
Rauchen während der Schwangerschaft	57 (17,0%)
Rauchen vor/während der Schwangerschaft	113 (33,6%)
Packyears vor Schwangerschaft	3,12 ± 6,44
Konsumierte Zigaretten während der Schwangerschaft	1,1 ± 3,1
Leukozytenzahl 1 Woche präpartal (Anzahl x Giga pro Liter) n = 62	10,9 ± 3,0
Leukozytenzahl 1 Woche postpartal (Anzahl x Giga pro Liter) n = 330	13,4 ± 3,5
Geschlecht des Kindes männlich/weiblich (%)	51,6/48,4

AGA, appropriate for gestational age; BMI, body mass index; LGA, large for gestational age; Daten ± Mittelwert der Standardabweichung oder Prozent;

Tabelle 4: Anzahl und relative Proteinkonzentrationen der untersuchten Plazenten.

Relative Proteinkonzentrationen der untersuchten Plazenten*
(abgleich über den Akttingehalt der Probe)

Klotho	1,04 ± 0,22 (n = 336)
VDR	1,11 ± 0,28 (n = 336)
eNOS	1,26 ± 0,56 (n = 254)
AT-1	1,04 ± 0,28 (n = 255)
AT-2	1,24 ± 0,51 (n = 268)
PPAR-gamma	1,08 ± 0,30 (n = 322)

Daten ± Mittelwert der Standardabweichung; N, Anzahl der Plazenten mit positiver Proteinbestimmung;

*Variation von N in Abhängigkeit von Protein, Proteingehalt der Probe, Funktion des Antikörpers etc.;

3.2 Klotho und biologische Parameter der fetalen Programmierung

Es wurde untersucht, ob die plazentare Klotho-Konzentration mit biologischen Parametern des Neugeborenen korreliert und ob man auf etwaige programmierende Effekte schließen kann. Der Standardparameter, der bei Abweichung von der Norm mit einem erhöhten Risiko verbunden ist, im späteren Leben eine metabolische- bzw. eine dadurch bedingte kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln, ist das Geburtsgewicht.^{2,26}

Es konnten jedoch keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der plazentaren Klotho-Konzentration und dem Geburtsgewicht des Neugeborenen festgestellt werden. Auch die Untersuchung anderer, ähnlicher biologischen Parameter wie Körperlänge, Kopfumfang und Ponderal-Index zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit der plazentaren Klotho-Konzentration.

Die lineare Regressionsanalyse mit der plazentaren Klotho-Konzentration als unabhängige und dem Geburtsgewicht des Neugeborenen als abhängige Variable soll hier beispielhaft vorgestellt werden. Im Rahmen der ersten linearen Regressionsanalyse ($r^2=0,00009$; $p=0,8655$; $n=336$) wurde die Cook'sche Distanz mitbestimmt und via *Box-Plot* 31 Extremwerte aus einer weiteren linearen Regressionsanalyse ausgeschlossen ($r^2=0,0075$; $p=0,1267$; $n=313$; *Abb. 3*)

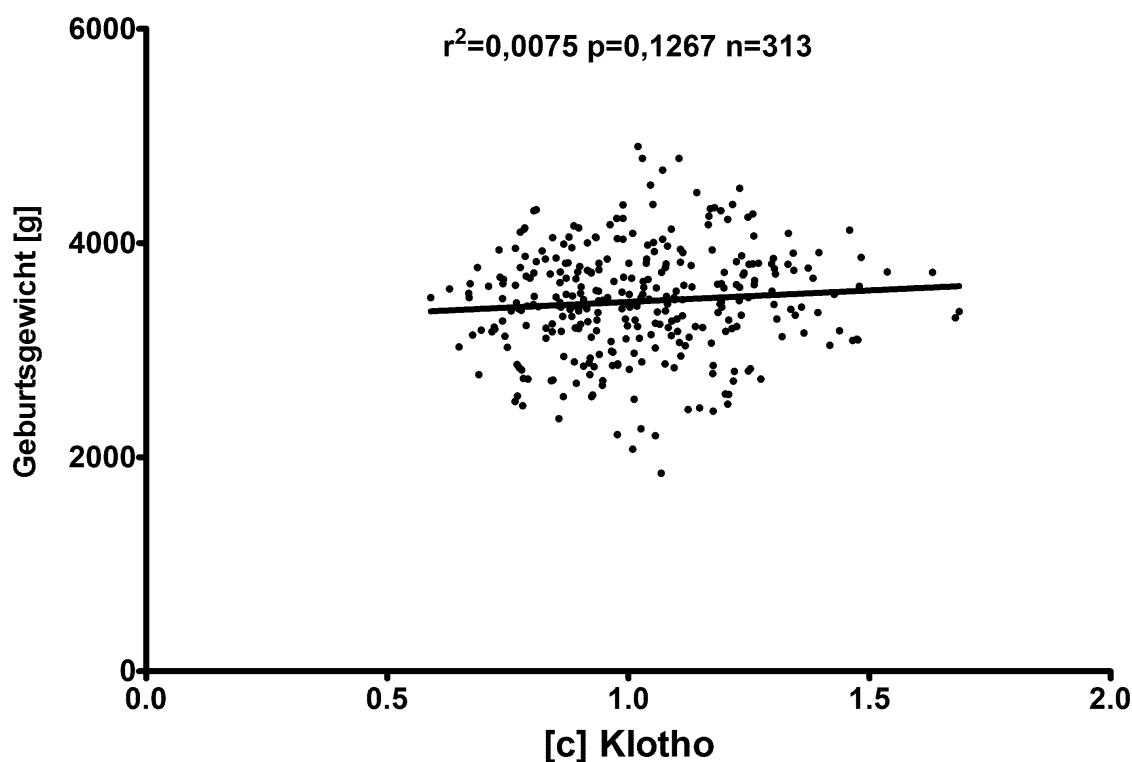


Abbildung 3: Nicht statistisch signifikante Interaktion zwischen Klotho und dem Geburtsgewicht (Gramm)

Die angegebene Klotho-Konzentration stellt eine zum Aktinhalt der Probe relative Proteinkonzentration dar.

3.3 Interaktionen zwischen Klotho und anderen plazentaren Proteinen

3.3.1 Interaktion zwischen VDR und Klotho

Da Klotho in seiner Funktion als Cofaktor für FGF23 negativ regulatorisch auf die Produktion von Calcitriol wirkt,^{41,80} wurde überprüft, ob auch eine Korrelation zwischen dem plazentaren Vitamin-D-Rezeptor und Klotho besteht. Hierzu wurde vorab eine lineare Regressionsanalyse ($r^2=0,089$; $p<0,0001$; $n=336$) durchgeführt, mittels Kalkulation der Cook'schen Distanz 13 Extremwerte definiert und via *Box-Plot* ausgeschlossen. Die nachfolgende Regressionsanalyse zeigte eine hochsignifikante Korrelation zwischen VDR und Klotho ($r^2=0,101$; $p<0,0001$; $n=323$; *Abb. 4*).

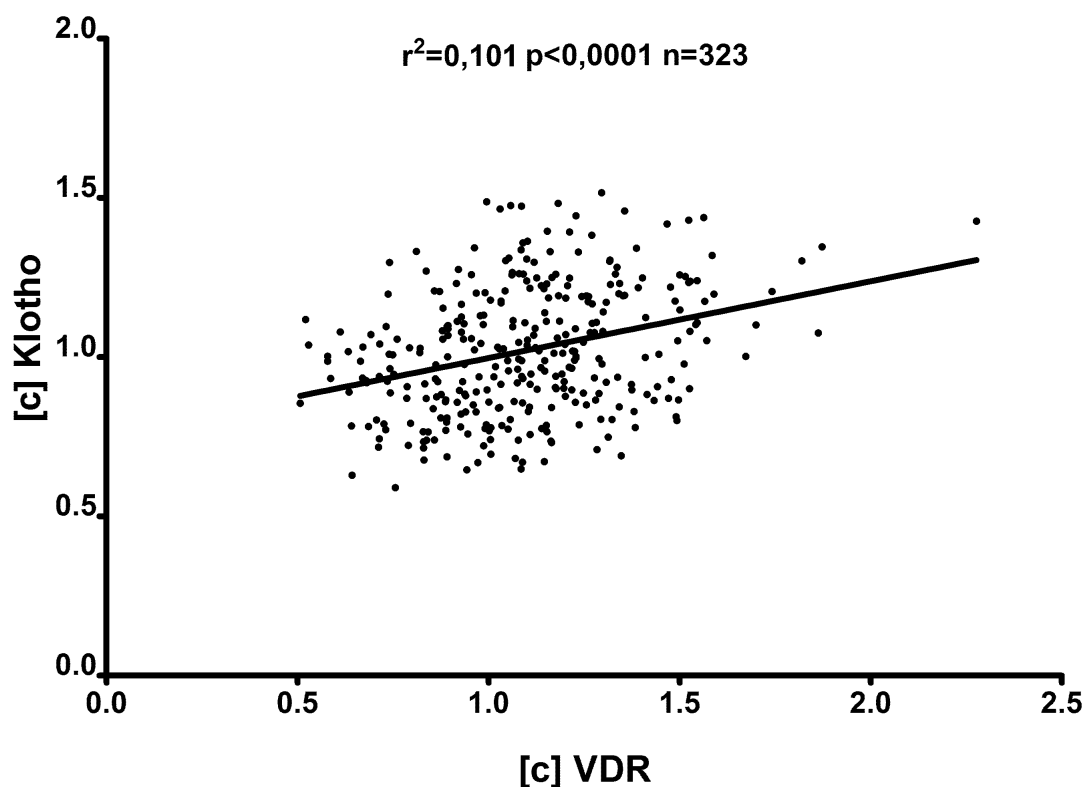


Abbildung 4: Positive Korrelation zwischen VDR und Klotho

Die angegebene Klotho-Konzentration stellt eine zum Akt Gehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar

3.3.2 Interaktion zwischen Klotho und eNOS

Abgesehen von Klotho und dem Vitamin-D-Rezeptor wurden von anderen medizinischen Doktoranden noch weitere plazentare Proteine nachgewiesen und in der gleichen Art ausgewertet. Da Klotho eine Vielzahl von putativen Funktionen ausübt, wurden etwaige Interaktionen mit anderen in der Plazenta exprimierten Proteinen untersucht.

Da aus Tierexperimenten bekannt ist, dass Klotho einen Einfluss auf das endotheliale NO-System hat,^{45,81} sollte untersucht werden, ob plazentare eNOS mit Klotho assoziierbar ist. Auch bei dieser Untersuchung wurde eine anfängliche lineare Regressionsanalyse zur Ermittlung der Cook'schen Distanz durchgeführt ($r^2=0,027$; $p=0,0092$; $n=254$), 21 Extremwerte bestimmt und mittels Box-Plot aus der Analyse ausgeschlossen. Es zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen Klotho und der endothelialen NO-Synthase ($r^2=0,080$; $p<0,0001$; $n=233$; Abb. 5).

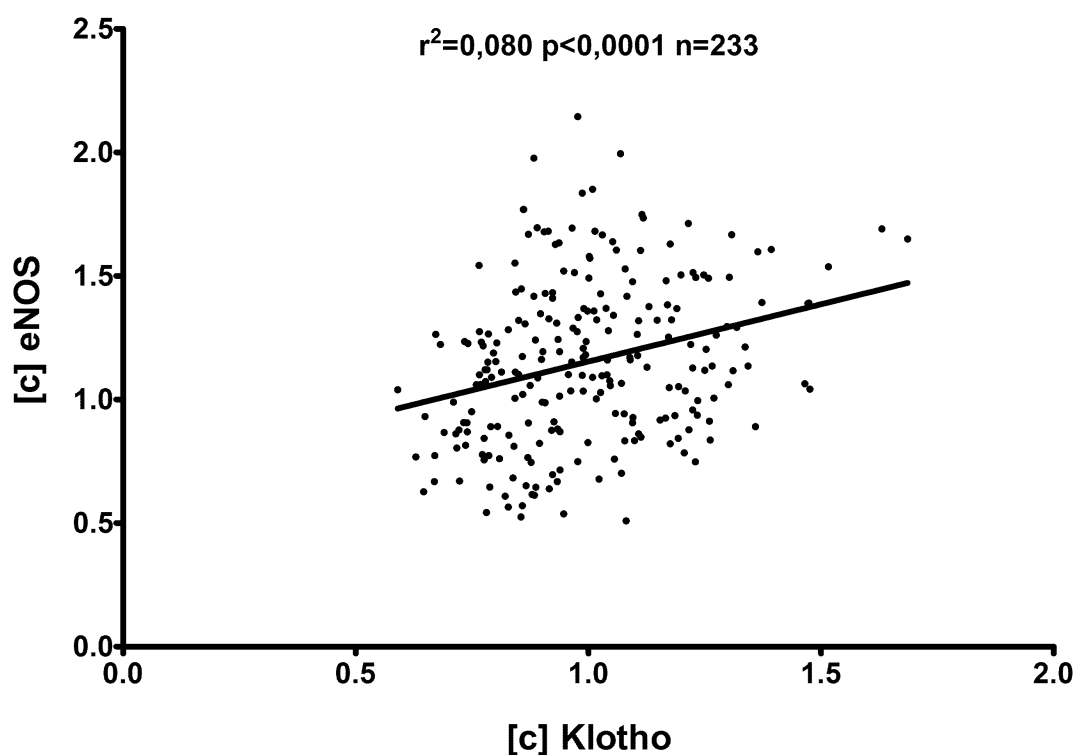


Abbildung 5: Positive Korrelation zwischen Klotho und eNOS

Die angegebene Klotho-Konzentration stellt eine zum Aktgehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar;

3.3.3 Klotho und das Renin-Angiotensin-System

Weitere Proteine, die im Zuge der Studie in Plazentagewebe bestimmt wurden, stellen der Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1 und -2 dar. Aus Experimenten an Ratten ist bekannt, dass Angiotensin-II eine Rolle in der Expression von renalem Klotho spielt.^{46,82,83} Aus diesem Grund wurde untersucht, ob Interaktionen zwischen Angiotensin-II Rezeptor-Typ-1 und -2 und plazentarem Klotho bestehen.

3.3.3.1 Interaktion zwischen Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1 und Klotho

Zwischen dem Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1 und Klotho konnte im Rahmen einer linearen Regressionsanalyse keine signifikante Interaktion festgestellt werden ($r^2=0,001$; $p=0,5594$; $n=255$). Es wurde die Cook'sche Distanz bestimmt und vier Extremwerte ausgeschlossen. Danach zeichnete sich ein negativen Trend in der Korrelation zwischen AT-1 und Klotho ab, welcher jedoch nicht statistisch signifikant war. ($r^2=0,004$; $p=0,2992$; $n=251$; Abb. 6).

3.3.3.2 Interaktion zwischen Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2 und Klotho

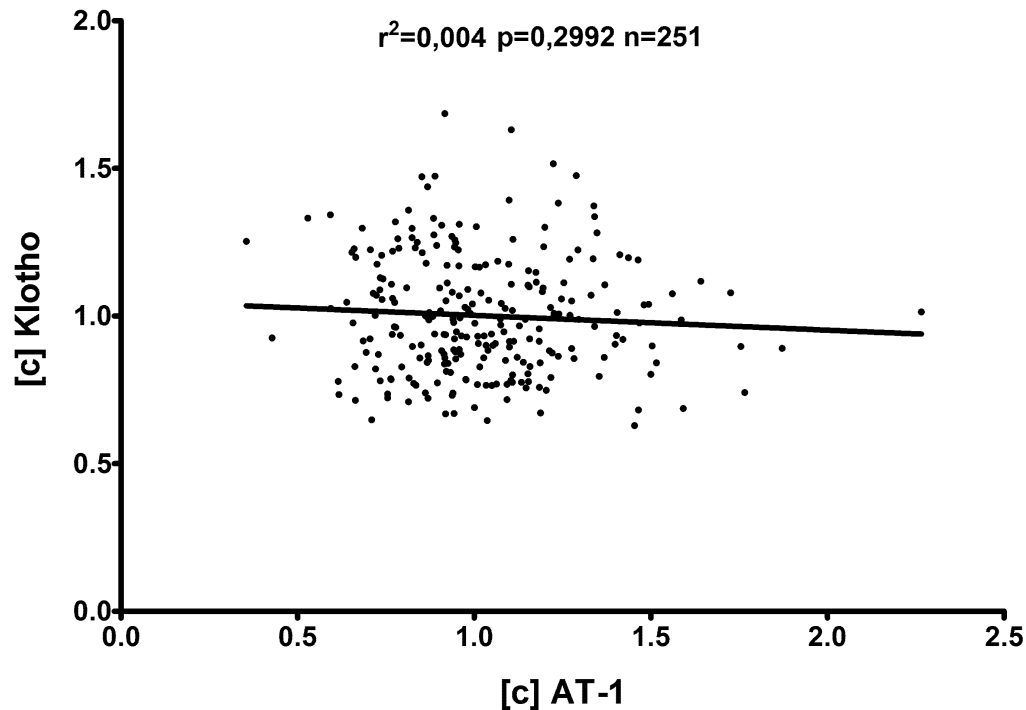


Abbildung 6: Nicht statistisch signifikante Interaktion zwischen AT-1 und Klotho

Die angegebene Klotho-Konzentration stellt eine zum Aktgehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar;

Zwischen dem Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-2 und Klotho besteht eine im Rahmen einer linearen Regressionsanalyse festgestellte signifikante Interaktion. ($r^2=0,021$; $p=0,0169$; $n=268$). Wieder wurde auch die Cook'sche Distanz gemessen und elf Extremwerte aus der folgenden linearen Regressionsanalyse entfernt, was sowohl einen erhöhten Korrelationskoeffizienten als auch einen verminderten p-Value bewirkte. ($r^2=0,059$; $p < 0,0001$; $n=257$;

Abb. 7)

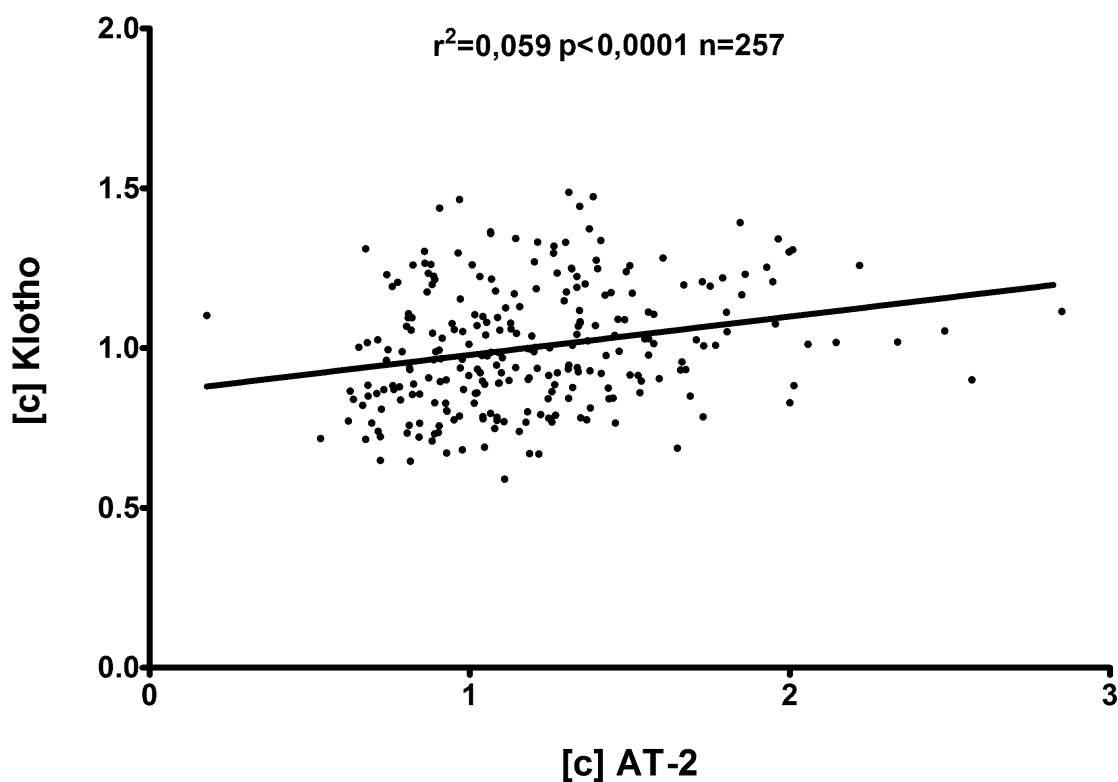


Abbildung 7: Positive Korrelation zwischen AT-2 und Klotho

Die angegebene Klotho-Konzentration stellt eine zum Aktinhalt der Probe relative Proteinkonzentration dar;

3.3.4 Interaktion zwischen PPAR- γ und Klotho

PPAR- γ stellt ein weiteres Protein da, welches im Rahmen dieser Studie in Plazentagewebe bestimmt wurde. Basierend auf vorhergehenden Experimenten wurde untersucht, ob auch in der Plazenta eine Interaktion zwischen PPAR- γ und Klotho besteht.^{84,85}

Eine anfängliche lineare Regressionsanalyse, in deren Rahmen auch die Cook'sche Distanz gemessen wurde, zeigte eine hochsignifikante Interaktion von PPAR- γ und Klotho. ($r^2 = 0,055$; $p < 0,0001$; $n = 322$). Zwölf über die Cook'sche Distanz ermittelte Extremwerte wurden aus einer weiteren linearen Regressionsanalyse ausgeschlossen, wodurch ein noch deutlicherer Zusammenhang erkennbar wurde. ($r^2 = 0,064$; $p < 0,0001$; $n = 310$; Abb.8).

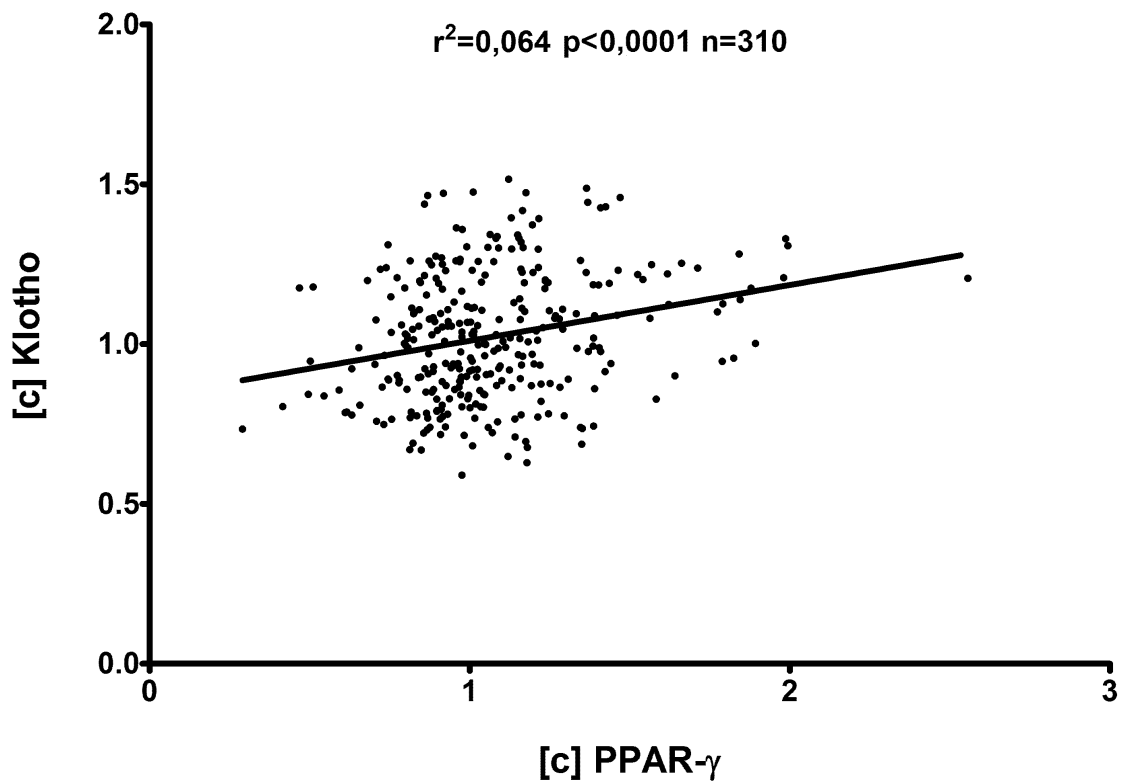


Abbildung 8: Positive lineare Korrelation zwischen PPAR- γ und Klotho

Die angegebene Klotho-Konzentration stellt eine zum Aktinhalt der Probe relative Proteinkonzentration dar;

3.4 Der Einfluss von maternalen Parametern auf die plazentare Klotho-Konzentration

Wie zuvor schon erwähnt, wurden zusätzlich zu den gesammelten Plazentaprobe auch mütterliche und kindliche Krankenakten ausgewertet. Verschiedene Parameter wurden auf etwaige Zusammenhänge mit den analysierten Proteinen untersucht.

3.4.1 Der maternale Raucherstatus, oxidativer Stress und Klotho

Aus Tier- und Zellkulturexperimenten ist bekannt, dass oxidativer Stress die Expression von Klotho reduzieren kann.^{86,87} Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch andere Formen von oxidativem Stress negativ auf Klotho einwirken können. Rauchen stellt bei der Zusammenstellung der Kohorte zwar keine unmittelbare Quelle oxidativen Stresses dar, da auch Mütter, welche während der Schwangerschaft rauchten, dies nur zu Beginn der Schwangerschaft taten. Es ist jedoch mittlerweile bekannt, dass Rauchen zu persistierenden Veränderungen im Organismus führt, welche auch nach Aufgabe des Rauchens

anhalten. Raucher entwickeln eine niederschwellige chronische Entzündung, was sich an veränderten CRP- (C-reaktives Protein), Fibrinogen-, Interleukin-6-Werten und einer relativen Leukozytose erkennen lässt.⁸⁸ Eine erhöhte Anzahl an Leukozyten lässt sich wiederum mit erhöhten Konzentrationen an ROS (reaktive Sauerstoff Spezies) in Verbindung bringen⁸⁹, weswegen es wichtig erschien zu untersuchen, ob sowohl der Raucherstatus als auch die Leukozytenzahl mit der plazentaren Expression von Klotho assoziierbar sind.

3.4.1.1 Der mütterliche Raucherstatus hat einen negativen Einfluss auf die plazentare Klotho Konzentration

Der Raucherstatus wurde im Rahmen einer Befragung der an der Studie teilnehmenden Mütter erhoben. Es wurde unterschieden, ob man vor bzw. vor und während der Schwangerschaft geraucht hatte. In dieser ersten Analyse wurden alle 113 vor bzw. vor und während der Schwangerschaft rauchenden Frauen untersucht. Zur Detektion von Extremwerten wurde eine sich zunächst nicht signifikant zeigende ($r^2=0,01040$; $p=0,0619$; $n=336$) lineare Regressionsanalyse durchgeführt, die *Cook'sche Distanz* bestimmt und vier Extremwerte aus der Gruppe der Raucher und zwei aus der Gruppe der Nichtraucher ausgeschlossen. ($r^2=0,019$; $p=0,0122$; $n=330$) Anschließend wurde mit diesen Daten zur besseren grafischen Darstellung ein ungepaarter zweiseitiger T-Test durchgeführt ($p=0,0122$; $n=330$; Abb. 9;).

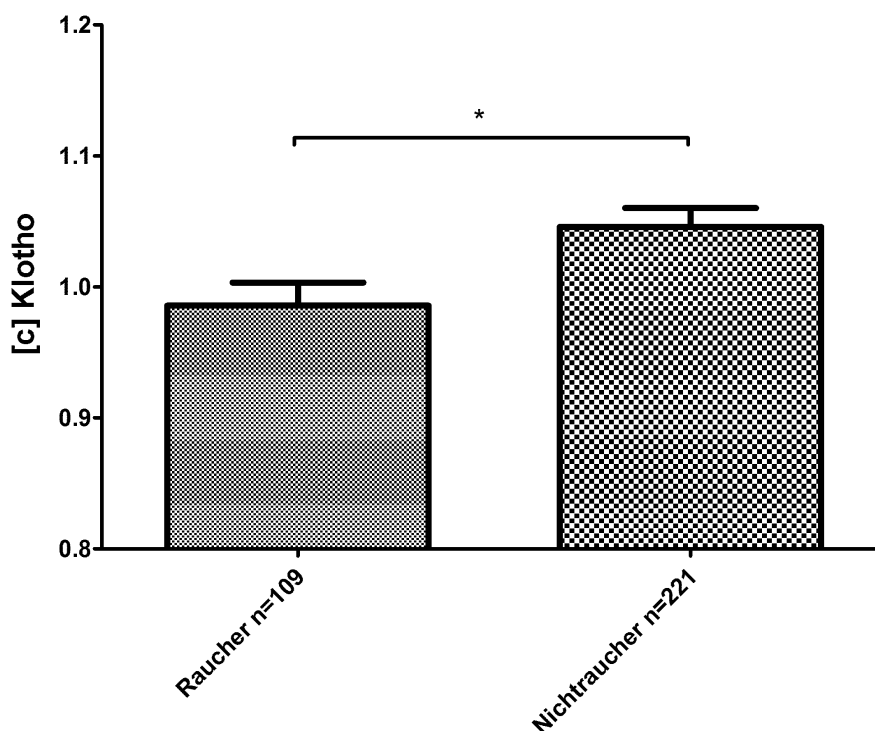


Abbildung 9: Der Einfluss des Raucherstatus auf die plazentare Klotho Konzentration

Raucher ($0,99 \pm 0,018$ [zum Aktgehalt der Probe relative Proteinkonzentration]; Mittelwert \pm SEM; $n=109$;) versus Nichtraucher ($1,05 \pm 0,014$ [zum Aktgehalt der Probe relative Proteinkonzentration]; Mittelwert \pm SEM; $n=221$); $p=0,0122$; $n=330$; ungepaarter zweiseitiger T-Test;

3.4.1.2 Rauchen während der Schwangerschaft hat einen negativen Einfluss auf die plazentare Klotho Konzentration

An der Studie teilnehmende Frauen wurden auch befragt, ob sie während der Schwangerschaft geraucht hatten. 57 Frauen bejahten diese Frage. Alle Frauen, die eine positive Raucheranamnese hatten, aber das Rauchen während der Schwangerschaft verneinten, wurden aus dieser Analyse ausgeschlossen. Es wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt, welche sich nicht signifikant zeigte ($r^2=0,0095$; $p=0,1033$; $n=280$) und gleichzeitig die Cook'sche Distanz bestimmt. Via Boxplot wurden vier Extremwerte aus der Gruppe der Raucher ausgeschlossen und eine weitere lineare Regressionsanalyse durchgeführt, welche sich statistisch signifikant zeigte. ($r^2=0,022$; $p=0,0130$; $n=276$). Zur besseren Veranschaulichung wurde mit den erhaltenen Daten ein ungepaarter zweiseitiger T-Test durchgeführt ($p=0,013$; $n=276$; Abb. 10).

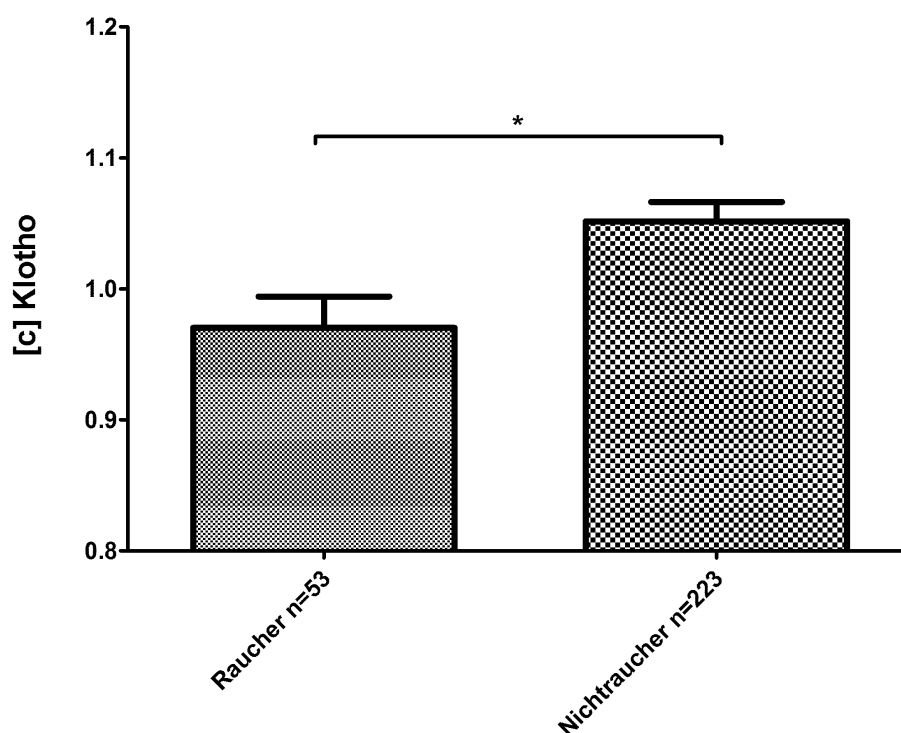


Abbildung 10: Rauchen während der Schwangerschaft und Klotho

Während der Schwangerschaft rauchende Frauen (Raucher; $0,97 \pm 0,024$ [zum Aktingehalt der Probe relative Proteinkonzentration]; Mittelwert \pm SEM; $n=53$;) versus Nichtraucher ($1,05 \pm 0,015$ [zum Aktingehalt der Probe relative Proteinkonzentration]; Mittelwert \pm SEM; $n=223$); $p=0,013$; $n=276$; ungepaarter zweiseitiger T-Test;

3.4.1.3 Die Anzahl der Packyears korreliert negativ mit der plazentaren Klotho-Konzentration

Der Raucherstatus wurde anamnestisch bei den an der Studie teilnehmenden Müttern erhoben und die inhalierte Rauchdosis wurde durch Berechnung der Packyear-Einheit ermittelt. Es wurde eine lineare Regressionsanalyse ($r^2=0,019$; $p=0,0118$; $n=332$). durchgeführt, die Cook'sche Distanz berechnet und drei Extremwerte aus einer weiteren linearen Regressionsanalyse ausgeschlossen. Hiernach zeigten sich die Zusammenhänge noch deutlicher. ($r^2=0,021$; $p=0,0091$; $n=329$; *Abb.11*).

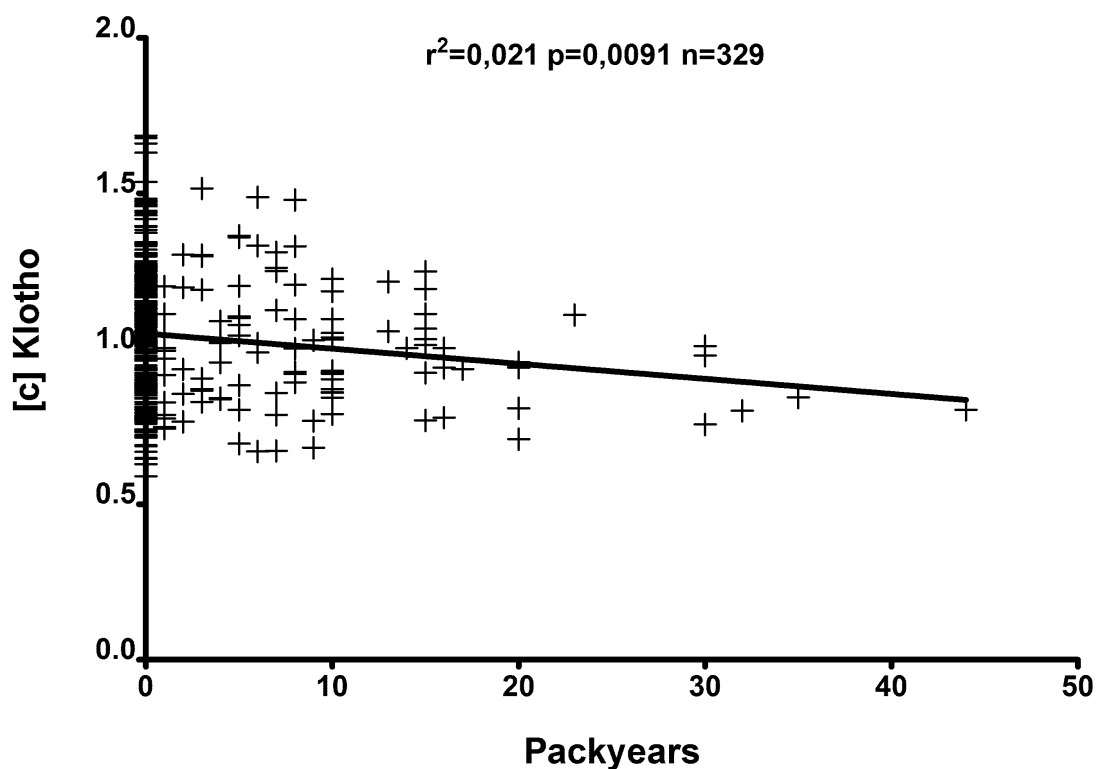


Abbildung 11: Negative Korrelation zwischen der Anzahl der Packyears und der plazentaren Klotho-Konzentration

Die angegebene Klotho-Konzentration stellt eine zum Aktinhalt der Probe relative Proteinkonzentration dar;

3.4.1.4 Negative Korrelation zwischen Leukozytenzahl und Klotho

Von einem Teil der an der Studie teilnehmenden Mütter flossen auch erhobene Laborparameter in die Studiendatenbank ein. Da Leukozyten in der Lage sind, Reaktive-Sauerstoff-Spezies (ROS) zu generieren, ist die Vermutung zulässig, dass man mit steigender Leukozytenzahl auch vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt ist.^{90,89}

Von 62 Patientinnen wurde die Leukozytenzahl ungefähr eine Woche vor der Geburt erhoben. Mit diesen Daten wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und dabei auch die Cook'sche Distanz bestimmt ($r^2=0,124$; $p=0,0049$; $n=62$). Ein Extremwert und ein Ausreißer wurden entfernt und eine weitere lineare Regressionsanalyse durchgeführt, was zu einer drastischen Verdeutlichung der zu beobachtenden Zusammenhänge führte ($r^2=0,176$; $p=0,0009$; $n=60$; *Abb. 12*).

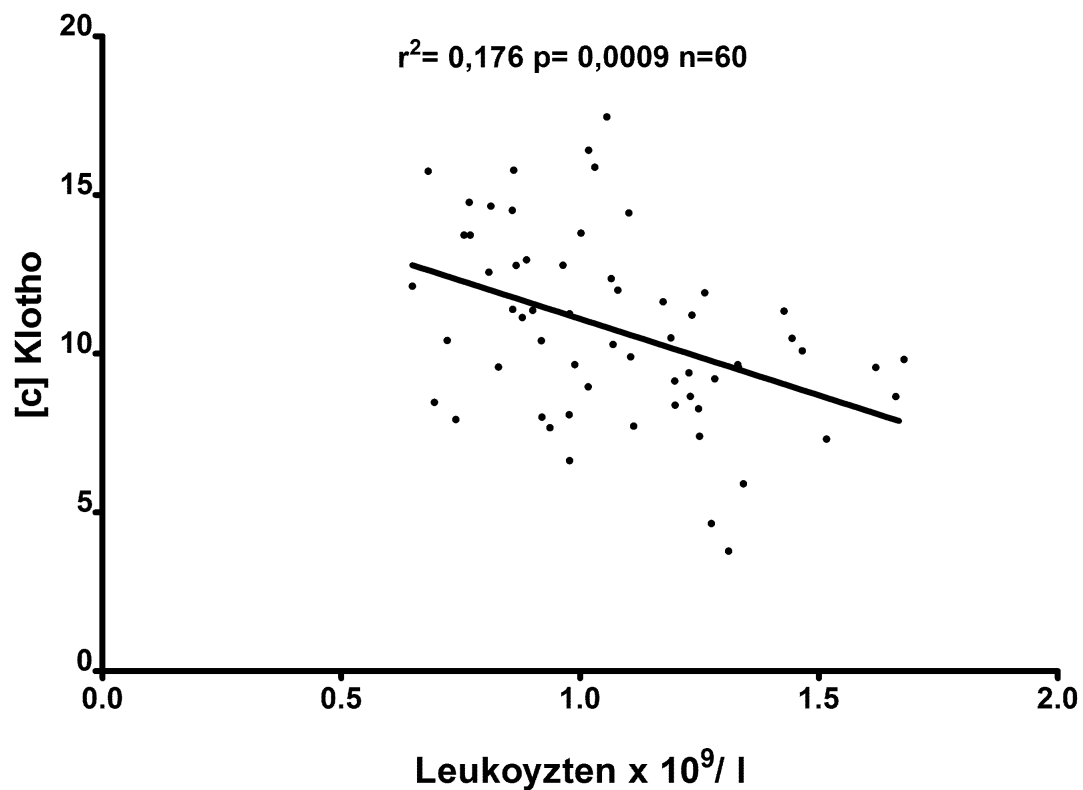


Abbildung 12: Negative Korrelation zwischen der Leukozytenzahl und Klotho (Eine Woche präpartum)

Die angegebene Klotho-Konzentration stellt eine zum Aktgehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar;

Auch circa eine Woche nach der Geburt wurde bei 330 Studienteilnehmerinnen die Leukozytenzahl bestimmt. Wieder wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und die Cook'sche Distanz bestimmt ($r^2 = 0,015$; $p = 0,0269$; $n = 330$). Nach Ausschluss von drei so definierten Extremwerten ($r^2 = 0,025$; $p = 0,0042$; $n = 327$; *Abb. 13*) konnte man die Zusammenhänge noch deutlicher erkennen.

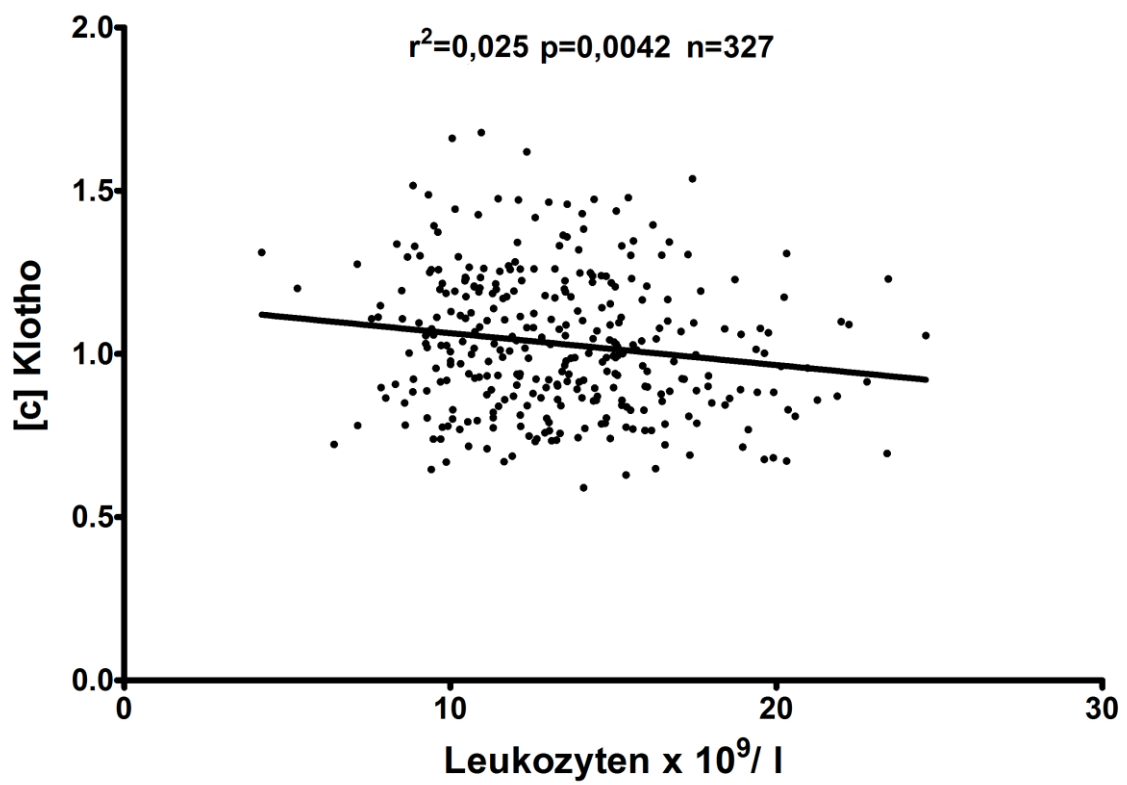


Abbildung 13: Negative Korrelation zwischen der Leukozytenzahl und Klotho (Eine Woche postpartum)

Die angegebene Klotho-Konzentration stellt eine zum Akt Gehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar;

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der zu diskutierenden Ergebnisse

4.1.1 Klotho und Parameter der fetalen Programmierung

Interaktionen zwischen plazentarem Klotho und dem Geburtsgewicht (4.1. bzw. 3.1.1.; Abb. 3)

Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine statistisch signifikanten Interaktionen zwischen plazentarem Klotho und dem gebräuchlichsten Surrogatparameter der fetalen Programmierung, dem Geburtsgewicht, nachgewiesen werden ($r^2 = 0,0075$; $p = 0,1267$; $n = 313$). Auch eine Ausweitung der Analyse auf weitere ähnliche biologische Parameter, wie Körperlänge, Kopfumfang und Ponderalindex, erbrachte keine statistisch signifikante Resultate.

4.1.2 Interaktionen zwischen Klotho und anderen plazentaren Proteinen

Interaktionen zwischen Klotho und Vitamin D (4.2. bzw. 3.2.1.; Abb. 4)

Es konnte gezeigt werden, dass die bestimmten Proteinkonzentrationen von Klotho und dem Vitamin-D-Rezeptor in der Plazenta hochsignifikant und in positiver Weise miteinander korrelieren ($r^2 = 0,101$; $p < 0,0001$; $n = 323$).

Interaktionen zwischen Klotho und eNOS (4.3. bzw. 3.2.2.; Abb. 5)

Die bestimmten relativen plazentaren Proteinkonzentrationen von Klotho und der endothelialen NO Synthase (eNOS) wiesen eine hochsignifikante positive Korrelation zueinander auf ($r^2 = 0,080$; $p < 0,0001$; $n = 233$).

Interaktionen zwischen Klotho und RAS (4.4. bzw 3.2.3.1-2; Abb. 6-7)

Die Analyse der Interaktion zwischen AT-1 und Klotho erbrachte kein signifikantes Resultat, es ließ sich jedoch ein Trend einer negativen Korrelation erkennen ($r^2 = 0,004$; $p = 0,2992$; $n = 251$). Hingegen konnte zwischen Klotho und dem Angiotensin-II-Typ-2-

Rezeptor (AT-2) eine hochsignifikante positive Korrelation festgestellt werden. ($r^2 = 0,059$; $p < 0,0001$; $n = 257$).

Interaktionen zwischen Klotho und PPAR- γ (4.5. bzw. 3.2.4.; Abbildung 8)

Die statistische Analyse zeigte eine hochsignifikante positive Korrelation der bestimmten relativen plazentaren Proteinkonzentrationen von Klotho und PPAR- γ ($r^2 = 0,064$; $p < 0,0001$; $n = 297$).

4.1.3 Interaktionen zwischen maternalen Parametern und Klotho

Der maternale Raucherstatus und Klotho (4.6.1. bzw. 3.3.1.1-3; Abb. 9-11)

Die statistische Untersuchung des Einflusses des maternalen Raucherstatus auf die plazentare Expression von Klotho ergab bei drei unterschiedlichen Herangehensweisen signifikante Resultate. Es konnte gezeigt werden, dass vor der Schwangerschaft rauchende Frauen im Vergleich zu nichtrauchenden eine erniedrigte plazentare Expression von Klotho aufweisen [*Raucher* ($0,99 \pm 0,018$ [zum Aktingehalt der Probe relative Proteinkonzentration]; Mittelwert \pm SEM; $n = 109$) versus *Nichtraucher* ($1,05 \pm 0,014$ [zum Aktingehalt der Probe relative Proteinkonzentration]; Mittelwert \pm SEM; $n = 221$); $p = 0,0122$; $n = 330$; *Ungepaarter zweiseitiger T-Test*]. Auch die fokussierte Betrachtung von während der Schwangerschaft rauchenden Müttern zeigte einen ähnlichen Effekt [*während der Schwangerschaft rauchende Frauen* (*Raucher*; $0,97 \pm 0,024$ [zum Aktingehalt der Probe relative Proteinkonzentration]; Mittelwert \pm SEM; $n = 53$;) versus *Nichtraucher* ($1,05 \pm 0,015$ [zum Aktingehalt der Probe relative Proteinkonzentration]; Mittelwert \pm SEM; $n = 223$); $p = 0,013$; $n = 276$; *Ungepaarter zweiseitiger T-Test*]. Darüber hinaus konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen der Anzahl der Packyears und der plazentaren Klotho-Expression festgestellt werden ($r^2 = 0,021$; $p = 0,0091$; $n = 329$).

Interaktionen zwischen Leukozytenanzahl und Klotho (4.6.2. bzw. 3.3.1.4.; Abb 12-13)

Die Analyse des Einflusses der einer Woche prä- ($r^2 = 0,176$; $p = 0,0009$; $n = 60$) bzw. einer Woche postpartal ($r^2 = 0,025$; $p = 0,0042$; $n = 327$) bestimmten Leukozytenzahl auf die plazentare Expression von Klotho ergab eine signifikante negative Korrelation zwischen ansteigender Leukozytenzahl und der plazentaren Klotho-Expression.

4.2 Limitationen der Arbeit

Vor der Diskussion der Ergebnisse soll an dieser Stelle noch auf Limitationen der Arbeit eingegangen werden. Dies hat mehrere Gründe. Zum einen ist Klotho ein noch sehr unzureichend charakterisiertes Gen bzw. Protein. Wenn man bedenkt, welche starken Effekte ein Knockout bzw. eine Überexpression Klothos mit sich bringt, erscheint es verwunderlich, dass in der letzten Dekade nur relativ wenige Originalarbeiten (etwas mehr als 300; www.pubmed.gov;) erschienen sind und man in manchen Bereichen noch nicht viel mehr Erkenntnisse dazugewonnen hat als im Jahr 1997. Der Fokus der Klotho-Forschung lag in der letzten Dekade auf nephrologischen Fragestellungen, da in circa einem Drittel aller erschienenen Arbeiten die Rolle von Klotho in der Niere bzw. in mit der Niere interagierenden Organen wie der Nebenschilddrüse untersucht wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Funktion plazentaren Klothos näher beleuchtet. Dementsprechend schwierig gestaltete sich die Diskussion der erhaltenen Ergebnisse, da man unweigerlich aus Mangel an Literatur sehr schnell vom eigentlichen Thema abweicht.

Ferner muss man anmerken, dass, bedingt durch die methodische Herangehensweise dieser Arbeit, nur Assoziationen hergestellt werden konnten. Dies sollte dazu dienen, die Basis für weitere Forschungsarbeit zu schaffen, wobei im Diskussionsteil dieser Arbeit versucht wurde, literaturgestützte Hypothesen zu rein theoretisch möglichen Kausalitäten aufzustellen bzw. aus schon in anderen Organen beschriebenen putativen Klotho-Pathways Rückschlüsse auf die Rolle von plazentarem Klotho zu ziehen.

Die etwas ungewöhnliche statistische Herangehensweise soll auch begründet werden. Klotho ist, wie schon beschrieben, ein noch sehr schlecht charakterisiertes Protein. Es mehren sich jedoch Arbeiten, die verschiedenste Instanzen ausmachen konnten, welche ein verändertes Expressionsmuster dieses Proteins bewirken können. Zu diesen Instanzen zählen auch Lifestylefaktoren, als ein Beispiel sei vermehrte UV-Lichtexposition mit folglich höheren Vitamin-D-Spiegeln⁹¹ zu nennen, da dies potentiell auch eine verstärkte Expression von Klotho mit sich bringen könnte.⁴¹ Darüber hinaus muss man erwähnen, dass diese Arbeit Teil einer groß angelegten Studie ist, an der viele Personen mitgewirkt haben. Auch wenn alle Daten zu plazentaren Proteinen von einem in der Arbeitsgruppe tätigen Biotechnologen validiert wurden, blieb hier ein gewisses Maß an individuellem Spielraum bei der Frage, welche Ergebnisse in die statistische Auswertung einfließen sollten. Darüber hinaus sind manche der Parameter, wie Raucherstatus und Packyears, rein mündlich erhoben worden, wobei man hier annehmen kann, dass nicht immer zu 100 Prozent wahrheitsgemäß

geantwortet wurde, vor allem, wenn man bedenkt, dass es sich um schwangere Frauen handelte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, begründet durch einen recht komplexen Aufbau der Studie und manchen schwer exakt zu determinierenden Parametern, mit gewissen Unregelmäßigkeiten zu rechnen war.

Ein Großteil der Ergebnisse (alle Protein-Protein Interaktionen, die negative Korrelation zwischen Leukozytenzahl bzw. Packyears und Klotho) zeigte sich direkt signifikant. Hier wurden trotzdem Verfahren zur Ausreißerdetektion angewandt, um zu sehen, ob manche signifikante Resultate durch den Einbezug von Ausreißern beeinflusst waren. Zur grafischen Darstellung wurden Datensätze gewählt, in welchen die Ausreißer entfernt wurden, im Text finden sich jedoch immerzu beide Ergebnisse.

Zwei Fälle, Rauchen vor bzw. während der Schwangerschaft und Klotho, zeigten sich nicht auf direktem Wege signifikant. Am Beispiel Rauchen vor der Schwangerschaft soll demonstriert werden, wie einflussreich einzelne, als Ausreißer bzw. Extremwert definierte Werte in linearen Regressionsanalysen sein können. Eine anfängliche lineare Regressionsanalyse erbrachte kein signifikantes Resultat ($r^2=0,010$; $p=0,0619$; $n=336$), wengleich ein Trend erkannt werden konnte. Der Ausschluss eines einzelnen via Cook definierten Extremwerts deckte jedoch eine signifikante negative Interaktion zwischen positivem Raucherstatus und Klotho auf ($r^2=0,013$; $p=0,0356$; $n=335$;). Circa 0,3% der Gesamtdaten hatten in diesem Fall anscheinend solch einen Einfluss auf die untersuchte Assoziation, dass sie den Unterschied zwischen einem nicht- und einem signifikanten Ergebnis bewirkten. Da, wie vorher schon begründet, mehrere Faktoren dafür sprechen, kritisch mit aus der Reihe fallenden Werten umzugehen, war es in den Augen des Autors für diese Arbeit zulässig, spezifische Verfahren der Ausreißerdetektion bei linearen Regressionsanalysen anzuwenden.

4.3 Klotho und biologische Parameter der fetalen Programmierung

Die Interpretation der Rolle von Klotho in der fetalen Programmierung gestaltet sich schwierig, da zu diesem Thema noch keine Arbeiten existieren. Einzig die noch nicht publizierten Experimente von Professor Lang zeigen, dass eine während Trächtigkeit und Stillzeit eingehaltene Vitamin-D-defiziente Diät Modifikationen des Zusammenspiels von Klotho und Vitamin-D bewirkt und programmierende Effekte entfaltet in Form einer signi-

fikanten Milderung des bei Klotho-hypomorphen Mäusen entwickelten deletären Phänotyps. Eine Vielzahl der bei Klotho-hypomorphen Mäusen anzutreffenden Pathologien sind auf eine unreguliert hohe Vitamin-D-Aktivität zurückzuführen. Es erscheint daher eigentlich nicht zu erwarten, dass eine Vitamin-D-defiziente Diät während Schwangerschaft und Trächtigkeit die Entwicklung des typischen Klotho-Phänotyps zu mildern vermag. Im Sinne der *Thrifty-Phenotype-Hypothese* wäre eigentlich eher zu erwarten, dass der Organismus des Fetus sich auf eine Vitamin-D-arme Umgebung einstellt und sich das Expressionsmuster von im Vitamin-D-Metabolismus beteiligten Enzymen in Richtung einer gesteigerten Expression anabol wirkender Enzyme verschiebt, wie dies zum Beispiel in der Plazenta durch Hypermethylierung und dadurch bewirkter reduzierter Expression des Calcitriol katabolisierenden Enzyms CYP24A1 zur maximalen Bereitstellung von aktivem Vitamin-D geschieht.⁹² In der Einleitung wurde auch schon erwähnt, dass Klotho-hypomorphe Mäuse bis zu einem Alter von drei Wochen eine völlig normale Entwicklung zeigen.³⁹ Der Zeitraum von drei Wochen ist insofern interessant, da Mäuse ihre Nachkommenschaft gewöhnlich auch für eine Dauer von drei Wochen stillen.⁹³ Es stellt sich also die Frage, ob sezerniertes Klotho auch in der Muttermilch anzutreffen ist und ob dieses noch in der Lage ist, biologische Wirkung zu entfalten. Diese Hypothese ist höchst spekulativ, und es existieren hierzu bis dato noch keinerlei Daten. Man nimmt mittlerweile aber an, dass in der Muttermilch befindliche Cytokine mit Schleimhäuten und lymphatischen Geweben des oberen Atem- und Verdauungstrakts interagieren können, wobei aber noch wenig über die Rezeptorverteilung in diesen Geweben bei Neugeborenen bekannt ist. Des Weiteren wurde bis jetzt auch noch nicht untersucht, ob eine passive Aufnahme von Cytokinen über eine intakte oder defekte Schleimhaut stattfindet. Es gibt auch Hinweise darauf, dass manche dieser Mediatoren möglicherweise auch eine Magen-Darm-Passage überstehen und Effekte in distaleren Teilen des Gastrointestinaltraktes entfalten. Interleukine, wie Interleukin-1 und Interleukin-8, sind relativ resistent gegenüber gewissen Verdauungsvorgängen, andere Immunmodulatoren finden sich wiederum in kompartimentalisierter Form in der Milch, was auch vor proteolytischer Aufspaltung schützen kann. Aber auch größeren, in Muttermilch anzutreffenden Proteinen, wie dem circa 25 kDa schweren TGF- β ,⁹⁴ kommt eine Bedeutung für den neonatalen Organismus zu, von welcher man eventuell Schlüsse auf Klotho ziehen könnte, da TGF- β -Knockout-Mäuse in den ersten zwei Wochen nach der Geburt ein normales Wachstum zeigen, jedoch ab einem Alter von drei bis vier Wochen an systemischen Autoimmunerkrankungen versterben.^{95,96} Zusätzlich finden sich in Muttermilch auch Antiproteasen, zu Beginn der Lactation vor allem beacht-

lich hohe Konzentrationen von α_1 -Antitrypsin. Auch sind manche Komponenten des Verdauungsapparates für eine effektive Digestion von Proteinen bei Neugeborenen noch nicht voll entwickelt, und der pH Wert des Magensaftes von Neugeborenen liegt zwischen 3 und 5 und zeigt erst mit zunehmendem Alter einen absteigenden Trend, um sich dann auf dem für Erwachsene physiologischen pH Wert von 1 bis 2 einzupendeln.⁹⁷⁻⁹⁹

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit nicht zu beobachtenden Effekte auf das kindliche Geburtsgewicht programmierende Effekte in anderer Form durch Klotho nicht ausschließen. Die Tatsache, dass homozygote Klotho-Knockout-Mäuse erst in einem Alter von circa drei Wochen den spezifischen Phänotyp zu entwickeln beginnen, lässt vermuten, dass in diesen Tieren während der Embryonal-, Fetal-, und frühen Postnatalphase die fehlende endogene Expression von Klotho möglicherweise durch maternales (Mütter von homozygoten Klotho-Knockout-Mäusen sind zwingend heterozygot Klotho-defizient) Klotho bzw. bis jetzt noch nicht näher beschriebene andere Faktoren ausgeglichen wird. Es besteht also die Möglichkeit, dass Klotho eine Bedeutung in diesen frühen Phasen zukommt, Zeiträume, in welchem der Organismus noch über eine hohe biogenetische Plastizität verfügt und somit vulnerabel für programmierende Effekte ist.

4.4 Positive Korrelation zwischen Klotho und dem Vitamin-D-Rezeptor

In der Einleitung wurde schon erwähnt, dass Klotho als unbedingt benötigter Co-Faktor für die Bindung und Signaltransduktion von FGF-23 an FGF-23-bindenden *fibroblast growth factor* Rezeptoren fungiert. Die positive Korrelation zwischen Klotho und VDR lässt sich möglicherweise durch den Wirkmechanismus von FGF23 und Klotho erklären. Die Hauptaufgabe des vor allem im Knochen synthetisierten, phosphaturisch wirkenden FGF-23 ist die Regulation des Phosphathaushaltes, außerdem ist FGF-23 Mediator in einem negativen Feedback-Loop zur Kontrolle des Metabolismus von Calcitriol, wobei das Zusammenspiel mit Klotho für alle Wirkungen von FGF-23 unerlässlich ist, was man an den nahezu identen Phänotypen von FGF-23- bzw. Klotho-defizienten Tieren sehen kann.^{67,68}

FGF-23 bzw. Klotho antagonisieren auf zwei Weisen die Produktion von aktivem Vitamin D. Einerseits ist FGF-23 ein starker Inhibitor der Expression von CYP27B1, wodurch die Bildung von Calcitriol gedrosselt wird, andererseits kann FGF-23 die Expression von CYP24A1 stimulieren und somit den Katabolismus von Calcitriol beschleunigen. Calcitriol

wiederum kontrolliert die Expression von FGF-23, wodurch der Feedbackloop geschlossen wird (*Abbildung 1*). Der Promotor von FGF-23 beinhaltet ein *Vitamin D responsive element* (VDRE; DNA Zielstruktur des VDR-Calcitriol Komplexes;) ¹⁰⁰ und ein spezifischer Knockout ¹⁰¹ des VDR-Gens im Knochen reduziert die Expression von FGF-23. Dieser gezielte Knockout induziert gleichzeitig auch eine Zunahme des zirkulierenden Calcitriols. Aktives Vitamin D hat auch positiv regulatorischen Einfluss auf den FGF-23 Signaltransduktionspartner Klotho, da Calcitriol die Expression von Klotho in der Niere zu steigern vermag, ⁴¹ dies sogar zeitlich parallel zu der Expressionssteigerung von FGF-23. Die Verabreichung von Calcitriol bewirkt einen gleichzeitigen Anstieg von Klotho, der 24-Hydroxylase und dem Vitamin-D-Rezeptor. ⁴¹ Untermuert wird diese Beobachtung durch die Entdeckung eines putativen VDREs in der Promotorregion von Klotho. ¹⁰² (Zitat bezieht sich auf *Supplemental Table 4*)

Man muss sich aber nun die Frage stellen, was eine positive Korrelation zwischen VDR und Klotho in Plazentagewebe bedeutet. Die Konzentrationen von sich in Zirkulation befindlichem Calcitriol verdoppeln sich im Laufe einer Schwangerschaft, und circa die Hälfte davon stammt aus deciduellen und plazentaren Zellen. Es ist bis dato noch nicht klar ob Calcitriol die Plazentaschranke übertreten kann, aber von der direkten Vorstufe, 25(OH)D₃, weiß man, dass diese von der maternalen in die fetale Zirkulation gelangt. ⁹² Der drastische Anstieg der Calcitriol-Spiegel während der Schwangerschaft ¹⁰³ zeigt jedoch, dass die strenge Regulation des Vitamin-D-Metabolismus in dieser Phase entkoppelt ist. Zwei Möglichkeiten bestehen, um die Calcitriol-Konzentrationen zu erhöhen. Einerseits können anabol fungierende Enzyme vermehrt exprimiert werden, andererseits kann die Expression von katabolen Enzymen gedrosselt werden. In der Plazenta scheinen beide Optionen verwirklicht zu werden. CYP27B1 wird in frühen Phasen der Schwangerschaft im Vergleich zu normalem Endometrium vermehrt von dezidualen Zellen exprimiert. *Novakovic et al.* konnten zeigen, dass CYP24A1 einer Plazenta – spezifischen epigenetischen *Downregulation* unterliegt. ⁹²

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass der Vitamin-D-Rezeptor und Klotho, Teile der FGF-23-Klotho-Vitamin-D-Achse, auch in der Plazenta denselben Regel wie im übrigen Organismus folgen. Über die Rolle von FGF-23 im plazentaren Vitamin-D- Metabolismus lässt sich momentan nur mutmaßen. Wenn die von manchen Autoren formulierte Aussage, alle Klotho-exprimierenden Organe seien auf Grund der ubiquitären Expression von FGF-Rezeptoren auch Zielstrukturen für FGF-23 ¹⁰⁴, zutreffend ist, muss man sich

auch Gedanken über Verbleib und Funktion von FGF-23 in der Plazenta machen. *Zhong et al.* durchsuchten mittels Microarray-Analyse und semiquantitativer RT-PCR präimplantierte Mäuse-Embryonen, murine trophoblastäre Stammzellen und humane Plazentaprobe, welche in einem Gestationsalter von sieben bis neun Wochen entnommen worden waren, nach der Expression von allen 23 Vertretern der FGF-Familie. In dieser frühen Phase konnte sowohl bei der Maus als auch beim Menschen keine plazentare Expression von FGF-23 nachgewiesen werden.¹⁰⁵ *Yoshiko et al.* untersuchten die Expressionslevel von FGF-23 in jungen und fetalen Ratten. In allen examinieren Geweben (Calvaria, Femur, Schneidezähne, Gehirn, Thymus, Milz, Dünndarm, Leber, Niere, Herz) konnte eine Expression von FGF-23 nachgewiesen werden, jedoch zeigten Femur und Calvaria eine circa 30-mal höhere Expression als die übrigen untersuchten Organe. Des Weiteren waren die Expressionslevel von FGF-23 in jungen Ratten signifikant höher als in den untersuchten fetalen Gewebeproben. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Hauptquelle von FGF-23 in jungen Ratten mineralisierte Gewebe darstellen und dass die signifikant niedrigere Expression von FGF-23 in fetalen Ratten auf eine untergeordnete Rolle dieses Mediators in der fetalen Physiologie hinweist. Es wird auch angemerkt, dass es bei Aspekten wie Phänotyp und Geburtsgewicht keinen Unterschied zwischen FGF-23- homozygot-, oder -heterozygot-defizienten und Wildtyp Tieren gibt, jedoch homozygot FGF-23-defiziente Tiere ab einem Alter von dreizehn Tagen eine starke Wachstumsretardierung zeigen. Ferner scheint eine fetale Ablation des FGF-23-Gens keinen Einfluss auf die Organentwicklung bis zum Zeitpunkt der Geburt zu haben. Die Autoren erwähnen aber, dass der fetale Phosphathaushalt maternal kontrolliert ist und man vielleicht deswegen keine unmittelbaren Effekte durch eine fetale Ablation von FGF-23 sehen kann.¹⁰⁶ Es existieren bis dato jedoch keine Daten, ob maternal synthetisierter FGF-23 auch in die fetale Zirkulation gelangt, bzw., ob eine Schwangerschaft eine Veränderung der Konzentration an zirkulierendem FGF-23 mit sich bringt. Die Annahme, dass auch in der Plazenta die FGF-23–Klotho–Vitamin-D-Achse existent ist, bringt wiederum neue Fragen auf, da der Vitamin-D-Metabolismus in der Plazenta nicht von den gleichen Feedback-Mechanismen, wie zum Beispiel in der Niere, kontrolliert wird. Hier lässt sich aber anmerken, dass die FGF-23-gesteuerte Kontrolle der Calcitriol-Produktion in der Nebenschilddrüse auch anderen Regeln folgen kann. *Krajisnik et al.* untersuchten *in vitro* direkte Effekte von FGF-23 auf bovine parathyroide Zellen. FGF-23 zeigte eine starke, dosisabhängige, zeitlich etwas verzögerte Inhibition der Expression von Parathormon, jedoch interessanterweise eine un-

mittelbare, ebenso dosisabhängige Steigerung der Expression der 1- α - Hydroxylase, also einen der renalen FGF-23 Wirkung diametral entgegengesetzten Effekt.¹⁰⁷

4.5 Positive Korrelation zwischen Klotho und eNOS

Wie in der Einleitung erwähnt, konnten *Saito et al.* in Tierexperimenten an Klotho-defizienten Mäusen zeigen, dass eine eingeschränkte Expression des Klotho-Gens zu endothelialer Dysfunktion führt und diese durch Parabiosis zwischen Wildtyp- und Klotho-defizienten Tieren komplett aufgehoben werden konnte, was zu der Vermutung führte, dass Klotho selbst oder ein Klotho-assoziiierter zirkulierender Faktor von Wildtyp-Mäusen in die Zirkulation der Klotho-defizienten Tiere gelangt.⁴⁵ In einem weiteren Versuch an OLEFT-Ratten (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats; Tiermodell des metabolischen Syndroms;), in welchem die Rolle von Klotho direkter untersucht wurde, konnten *Saito et al.* zeigen, dass die adenovirale Zufuhr von exogenem Klotho-Gen, bei OLEFT-Ratten einen ähnlichen Effekt hatte wie die im vorhergehenden Versuch durchgeführte Parabiosis zwischen Klotho-defizienten und Wildtyp-Mäusen. Die exogene Zufuhr von Klotho-Gen konnte die bei OLEFT-Ratten ausgebildete endotheliale Dysfunktion bessern, basierend auf einer signifikanten Zunahme der aortalen Acetylcholin-vermittelten Relaxation (*ex vivo*; Gefäßpräparate;) und einem signifikantem Anstieg an über den Urin ausgeschiedenen NO-Metaboliten. Darüber hinaus verbesserte sich bei diesen Tieren auch die vorhandene Mediahypertrophie und perivaskuläre Fibrose.¹⁰⁸

Nakamura et al. verglichen die endotheliale Funktion von homo- und heterozygot Klotho-defizienten Mäusen mit Wildtyp-Tieren.⁸¹ Die Resultate ähnelten den vorhergehenden Versuchen von *Saito et al.*, wieder konnte an Ringpräparaten der thorakalen Aorta von Klotho-defizienten Mäusen eine eingeschränkte Relaxation als Antwort auf Acetylcholin-Applikation und eine erniedrigte Ausscheidung an NO-Metaboliten im Urin gezeigt werden.⁸¹ Zusätzlich wurden bei diesem Versuch noch weitere Parameter untersucht. Im Urin wurde cGMP, der *second messenger* der NO-vermittelten Vasodilatation, bestimmt, wobei in Analogie zu verminderten Urinkonzentrationen der NO-Metaboliten bei Klotho-defizienten Mäusen auch erniedrigte Werte von cGMP gemessen wurden.⁸¹ Gefäßpräparate der Aorta von Klotho-defizienten Mäusen zeigten eine überschießende Gefäßkontraktion nach der Verabreichung von Noradrenalin, wobei die Autoren bei diesen Tieren die durch eine eingeschränkte NO-Produktion fehlende Gegenregulation für den Effekt verantwortlich machten.⁸¹ Die zusätzliche Gabe von L-NAME (NO-Synthaseantagonist) beseitigte

die Unterschiede zwischen Wildtyp- und Klotho-defizienten Mäusen. Es wurden auch Experimente mit *lecithinized SOD* durchgeführt, einer zum Zweck der besseren Gewebe-Akkumulation, an Phosphatidylcholin gebundenen rekombinanten Form der Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase. Normalerweise verursacht die Applikation von *lecithinized SOD* eine Gefäßrelaxation, vermutlich auf Grund einer Beeinflussung der Konzentrationen an Superoxid Anionen. Bei Klotho-defizienten Mäusen konnte durch die Gabe von *lecithinized SOD* jedoch nur eine abgeschwächte Gefäßrelaxation ausgelöst werden, ein Effekt, der sich bei Wildtyp Mäusen erst nach der Gabe von L-NAME einstellte. Es wurde auch mittels Immunfärbung eNOS in Aortapräparaten bestimmt. Die optische Dichte von eNOS war im Vergleich zum Wildtyp sowohl in Gefäßpräparaten heterozygot als auch homozygot Klotho-defizienter Mäuse signifikant reduziert, wobei bei homozygoten Tieren fast keine eNOS nachzuweisen war.⁸¹

Saito und Nakamura stellten mehrere Hypothesen zu der bei Klotho-defizienten Mäusen ausgebildeten endothelialen Dysfunktion, auf. Einerseits könnte durch die wegfallenden antioxidativen Effekte von Klotho⁴⁵ die Halbwertszeit von NO gesenkt werden, da dieses Molekül recht sensibel auf reaktive Sauerstoffspezies reagiert. Der zweite vermutete Mechanismus reduzierter NO-Synthese könnte eine durch die Klotho-Defizienz bedingte Herabregulation von eNOS sein, wobei die Autoren meinen, dass Klotho eine inaktive Vorstufe der eNOS enzymatisch in eine aktive Form überführen könnte.⁴⁵

Die plazentare Interaktion von Klotho und eNOS ist übereinstimmend mit den Ergebnissen von *Saito et al.* und *Nakamura et al.*. Die formulierte Hypothese, ob Klotho eventuell durch seine enzymatische Funktion eNOS hochreguliert oder direkten Einfluss auf die Expression nimmt, kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht widerlegt oder bestätigt werden.

4.6 Klotho und das Renin-Angiotensin-System (RAS)

Mitani et al. untersuchten die Rolle von Angiotensin II (AGII) in der renalen Expression von Klotho. Zu diesem Zweck erhielten Sprague-Dawley-Ratten eine AGII Dauerinfusion über einen Zeitraum von sieben Tagen, wobei man eine signifikante, zeitabhängige Reduktion in der Expression von Klotho erkennen konnte. Um zu differenzieren, ob diese Herabregulation ein blutdruckabhängiges Phänomen darstellt, wurde den Tieren zusätzlich entweder der Vasodilatator Hydralazin oder der AT-1 Rezeptorantagonist Losartan verab-

reicht. Losartan, nicht jedoch Hydralazin, bewirkte eine vollständige Blockade der AGII-induzierten Herabregulation der Klotho Expression. Außerdem wurde untersucht, ob eine Langzeitinfusion von Noradrenalin zu ähnlichen Effekten wie eine AGII-Infusion führt, jedoch konnte man durch diese keinerlei Auswirkungen auf die Expression von Klotho beobachten. Eine sehr niedrig dosierte AGII-Infusion, welche keine Wirkung auf systolische Blutdruckwerte zeigte, bewirkte aber eine Senkung der Klotho-Expression. All diese Ergebnisse wiesen auf eine AGII-induzierte, aber blutdruckunabhängige Reduktion der Expression von Klotho hin.⁴⁶

Es ist bekannt, dass AGII unter anderem an fibrosierenden Prozessen in der Niere via den TGF- β_1 -/MAPK-Signalweg beteiligt ist. Renin-Angiotensin-System (RAS) inhibierende Substanzen, wie Inhibitoren des *angiotensin converting enzymes* (ACE) oder Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1- (AT-1-) Antagonisten, sind in der Lage, eine Aktivierung des TGF- β_1 -/MAPK-Signalweges und nachfolgender renaler Fibrose durch Blockade der AGII-Wirkung zu verhindern. Zhou *et al.* untersuchten in Zellkulturexperimenten an NRK-52E (*rat renal tubular epithelial cells*) Zellen den Einfluss von Angiotensin II auf die renale Expression von Klotho und etwaige Änderungen durch pharmakologische Beeinflussung dieses Mediators, durch Zugabe des *angiotensin converting enzyme* (ACE) Inhibitors Fosinopril, des AT-1 Rezeptorantagonisten Valsartan bzw. einer Kombination dieser zwei Substanzen. Eine alleinige Zugabe von AGII bewirkte einen signifikanten Anstieg der Expression von TGF- β_1 , p-p38 und p53, allesamt eher proinflammatorische, profibrotische Faktoren, welche die sogenannten „schlechten“ Effekte der AT-1-Rezeptor-medierten AGII-Signaltransduktion darstellen.^{109,110} Blockade des AT-1 Rezeptors, Inhibition von ACE bzw. eine Kombination dieser Mechanismen zeigten eine signifikante Reduktion in der Expression von TGF- β_1 , p-p38 und p53. Es wurde auch die Expression des Transkriptionsfaktors SP-1 bestimmt. Alleinige AGII-Gabe bewirkte eine deutliche Herabregulation der Expression von SP1 im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch führte eine anschließende Blockade von AT-1, ACE oder AT-1 und ACE wieder zu einem signifikanten Expressionsanstieg dieses Transkriptionsfaktors. Des Weiteren wurde auch die Expression von Klotho untersucht. Die Gabe von AGII resultierte in einer im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduzierten Klotho-Expression. Intervention mit Fosinopril, Valsartan und einer Kombination aus beiden Substanzen zeigte einen dem Verhalten von SP-1 ähnlichen signifikanten Expressionsanstieg. Es konnte auch eine positive lineare Korrelation zwischen SP-1 und Klotho gezeigt werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass AGII, die Hochregu-

lation von TGF- β_1 und p-p38 zu einer Aktivierung von p53 führen, welches in aktiviertem Zustand Komplexe mit SP-1 eingehen kann und so eine Bindung von SP-1 an die SP-1-Bindungsstelle im Klotho-Promotor verhindert. Fosinopril und Valsartan scheinen eine Hochregulation von TGF- β_1 , p-p38 und p53 zu verhindern und so durch Bindung des nun vermehrt verfügbaren SP1 an die SP-1-Bindungsstelle im Klotho-Promotor die Expression von Klotho zu steigern.⁸³

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die positiv regulatorischen Effekte auf die Expression von Klotho durch den AT-2 Rezeptor vermittelt werden. In vorhergehenden Arbeiten konnte dies durch eine Blockade des AT-1 Rezeptors mit nachfolgendem Wiederanstieg der Klotho-Expression gezeigt werden. Da bis dato jedoch nicht untersucht wurde, ob spezifische Agonisten des AT-2 Rezeptors denselben Effekt bewirken, kann man hier jedoch zurzeit nur mutmaßen. In weiteren Arbeiten konnte auch gezeigt werden, dass eine AT-1-medierte Angiotensin-II-Signaltransduktion negativ regulatorische Effekte auf die Expression von Klotho mit sich bringt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nur ein negativer Trend in der Korrelation zwischen AT-1 und Klotho ermittelt werden, welcher jedoch nicht signifikant war.

4.7 Positive Korrelation zwischen PPAR- γ und Klotho

Dieses Ergebnis soll im Kontext mit schon publizierten Arbeiten diskutiert werden, in welchen gezeigt werden konnte, dass PPAR- γ -Agonisten in der Lage sind, die Expression von Klotho in anderen Geweben hochzuregulieren.

Yamagishi et al. führten eine Studie an OLEFT-Ratten durch, in welcher der Effekt des zu den Thiazolidindionen/Glitazonen zählenden PPAR- γ -Agonisten Troglitazon auf den an das metabolische Syndrom erinnernden Phänotyp dieses Rattenmodells untersucht wurde, wobei der Fokus der Studie auf der Expression von Klotho lag. Es konnte gezeigt werden, dass die orale Administration von 200mg/kg KG Troglitazon über einen Zeitraum von zehn Wochen im Vergleich zu placebobehandelten Kontrolltieren einerseits zu einer Besserung vieler pathologischer Parameter führte und andererseits auch die Expression von Klotho signifikant steigerte.¹¹¹

Zhang et al. untersuchten den Einfluss von PPAR- γ auf die transkriptionelle Regulation der Klotho-Expression. HEK293-Zellen wurden mit den zur Familie der Thiazolidindio-

ne/Glitazone gehörenden PPAR- γ -Agonisten Troglitazon, Ciglitazon und auch Rosiglitazon behandelt. Es zeigte sich eine zeit- und dosisabhängige Hochregulation der Klotho-Expression. Zur Überprüfung, ob diese Hochregulation auch in anderen Zelltypen zu beobachten ist, wurde das Experiment mit IMCD (*inner medullary collecting duct cells*), MCT (*proximal tubular epithelial cells*) und MDCK (*distal tubule cells*) wiederholt, wobei die zuvor bei HEK293 beobachteten Effekte auch in diesen Zelllinien reproduzierbar waren. Um zu beweisen, dass die beobachteten Effekte auch durch PPAR- γ vermittelt wurden, wurde vor der Inkubation mit Troglitazon mit dem spezifischen PPAR- γ -Antagonist GW9662 vorbehandelt, was einen Expressionsanstieg von Klotho inhibierte. In ähnlicher Weise inhibierte auch ein weiterer PPAR- γ -Antagonist, Bisphenol-A-Diglycidil-Ether (BADGE), die Expression von Klotho. Als weitere Kontrolle wurden HEK293-Zellen mit PPAR- γ -spezifischer siRNA (*small interfering RNA*) transfiziert, wobei es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer 90-prozentigen Reduktion der PPAR- γ -Expression kam. Der PPAR- γ -*knockdown* hob die PPAR- γ -medierte Hochregulation von Klotho auf. Eine Sequenzanalyse der 5'-flankierenden Region des Klotho-Gens zeigte keine typischen Bindungsstellen für PPAR- γ . Es wurden jedoch zwei nichtkanonische *PPAR responsive elements* (PPARE) entdeckt. Durch ein Chromatin-Immunpräzipitation-Assay (CHIP) konnte gezeigt werden, dass das distalere PPARE mit einem PPAR-Antikörper präzipitiert, jedoch nicht mit Kontroll-IgG. Dieses Ergebnis konnte mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) präzisiert werden. HEK293-Zellen wurden auch mit einem Luciferase-kontrolliertem Klotho-PPARE-enthaltendem Reporter transfiziert. Rosiglitazon steigerte die transkriptionelle Aktivität des Reporters, hingegen konnte bei Anwesenheit des PPAR- γ -Antagonisten GW9662 kein Effekt beobachtet werden. Die Autoren schlossen aus diesen Resultaten, dass PPAR- γ die Klotho-Expression durch ein funktionelles cis-Element innerhalb des Klotho-Gens steuert. Um zu sehen, ob das Klotho-Gen auch *in vivo* ein Zielgen von PPAR- γ ist, wurden Mäuse für drei Tage mit Troglitazon oder Placebo behandelt und die Klotho-Expression sowohl auf mRNA-, als auch auf Protein-Ebene gemessen. Sowohl Klotho-mRNA als auch Klotho-Protein zeigten in der Troglitazon-behandelten Gruppe einen signifikanten Anstieg. Rosiglitazon zeigte in niedrigerer Dosierung als Troglitazon einen ähnlichen Effekt. Erneut konnte auch gezeigt werden, dass die gleichzeitige Behandlung mit dem PPAR- γ -Antagonist BADGE die Klotho-Expression signifikant reduzierte. Um auch Auskunft über die Rolle von endogenen PPAR- γ Agonisten zu bekommen, wurde ein konstitutiv aktives PPAR- γ Gen über einen adenoviralen Vektor in Mäusenieren eingeschleust, was zu einer renalen Überexpression von PPAR- γ führte. Anschließend

wurden die renalen Klotho-mRNA- und Protein-Konzentrationen bestimmt, wobei ein signifikanter Expressionsanstieg bemerkbar war.⁸⁴

Zhang et al. konnten zeigen, dass eine alleinige Überexpression von PPAR- γ ohne Zugabe von exogenen Agonisten ausreichend ist, um die Aktivität dieses Systems zu erhöhen.⁸⁴ In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine steigende plazentare PPAR- γ Dichte mit einer ansteigenden Klotho-Konzentration korreliert. Da Substanzen aus der Klasse der Thiazolidindione während einer Schwangerschaft kontraindiziert sind,¹¹² ist die Vermutung zulässig, dass endogene PPAR- γ Agonisten, je nach Höhe der gemessenen PPAR- γ Dichte, mehr oder weniger Einfluss auf die plazentare Expression von Klotho nehmen können. Eine Besonderheit von PPAR- γ ist die strukturelle Diversität seiner Liganden, welche endogene Metaboliten (z.B.: Arachidonsäurederivate¹¹³) und alimentäre Inhaltsstoffe beinhaltet.¹¹⁴ Die Liste an endogenen bzw. natürlichen, alimentär aufgenommenen Agonisten von PPAR- γ wird stetig länger, wie die momentane Studienlage zeigt.^{113,115,116} Wenn man davon ausgeht, dass eine Vielzahl endogener PPAR- γ Agonisten existiert und mit steigender Rezeptordichte von PPAR- γ auch die Wahrscheinlichkeit für eine Rezeptor-Ligandenbindung zunimmt, können sich die Ergebnisse dieser Arbeit dahingehend interpretieren lassen, dass endogene Agonisten von PPAR- γ in der Lage sind, positiven Einfluss auf die plazentare Expression von Klotho zu nehmen.

4.8 Der maternale Raucherstatus, oxidativer Stress und Klotho

4.8.1 Rauchen und Klotho

Die Interpretation der beobachteten Interaktionen zwischen Rauchen und der plazentaren Klotho-Proteinkonzentration gestaltet sich schwierig. Es ist zwar aus anderen Studien bekannt, dass oxidativer Stress negativen Einfluss auf die Expression der transmembranären Form von Klotho nimmt,⁸⁶ die hier zu sehenden Effekte, können aber nicht mehr (auch Frauen, die während der Schwangerschaft rauchten, taten dies nur zu Beginn der Schwangerschaft) höheren Konzentrationen an freien Radikalen zugeschrieben werden. Das signifikanteste Ergebnis lieferte der Vergleich zwischen Raucherinnen und Nichtraucherinnen, wobei hier nicht differenziert wurde, ob während der Schwangerschaft weiterhin geraucht wurde oder nicht. In die Gruppe der Raucherinnen wurden somit auch 56 Frauen gezählt,

die während der Schwangerschaft nicht geraucht hatten. Außerdem wurden die Packyears aus vor der Schwangerschaft konsumierten Zigaretten berechnet. Es ist an dieser Stelle aber anzumerken, dass ein rein mündlich erhobener Raucherstatus, vor allem wenn es um Fragen wie Rauchen während der Schwangerschaft geht, nicht exakt der Wahrheit entspricht, da hier, anzunehmenderweise, einige Frauen nicht wahrheitsgemäß geantwortet haben.

Unmittelbare Effekte des Rauchens sind eher kurzfristiger Natur, wie und über welche Rauchinhaltsstoffe es zu langfristigen, auch nach Aufgabe des Rauchens anhaltenden Effekten kommt, ist bis dato noch unklar.^{88,117} *Van Tiel et al.* untersuchten etwaige Assoziationen zwischen Rauchintensität bzw. Aufgabe des Rauchens und hämatologischen Parametern. Die Studienpopulation setzte sich aus 16.254 Männern und Frauen im Alter zwischen 20 und 70 Jahren zusammen. Bei den untersuchten Rauchern konnte in beiden Geschlechtern eine Assoziation zwischen Packyears und täglich konsumierten Zigaretten und einer erhöhten Anzahl an Leukozyten und anderen hämatologischen Zelltypen und Parametern hergestellt werden. Interessanterweise zeigte die Untersuchung von Personen, welche mindestens zwei Jahre nicht mehr geraucht hatten, eine Normalisierung vieler hämatologischer Parameter, jedoch eine Persistenz der erhöhten Anzahl an Leukozyten. Diese normalisierte sich erst nach einem rauchfreien Zeitraum von fünf Jahren.¹¹⁷

Es mehren sich Hinweise, dass Rauchen über epigenetische Mechanismen zu sehr langanhaltenden Veränderungen führen kann. Initial scheint vor allem oxidativer Stress Veränderungen epigenetisch wirkender Enzyme zu verursachen. Reaktive Sauerstoffspezies und Aldehyde aus dem Zigarettenrauch bewirken posttranslationelle Modifikationen wie zum Beispiel Nitrierung, Nitrosylierung, Carbonylierung, Addukt-Formierung und Phosphorylierung von HDAC2 (Histon Deacetylase 2, ein wichtiger Co Repressor) und SIRT-1 (*NAD-dependent deacetylase sirtuin-1*;) und verursachen so einen gesteigerten proteasomalen Abbau dieser falsch prozessierten Enzyme. Dieser vermehrte Abbau führt zur Entwicklung einer Imbalance zwischen Acetylierungs- und Deacetylierungsvorgängen und so, durch Modifikation der Chromatinstruktur, zu einer aberranten Genexpression.¹¹⁸ *Launay et al.* untersuchten die Aktivität der Monoamino Oxidase B (MAO-B) und die Promotormethylierung des MAO-B Gens in Rauchern, Nichtrauchern und ehemaligen Rauchern, die durchschnittlich 13 Jahre vor Beginn der Studie zu rauchen aufgehört hatten. Es zeigte sich, dass die Aktivität der MAO-B bei Rauchern inhibiert war, nach Aufgabe des Rauchens sich jedoch wieder normalisierte. Die Proteinkonzentration der MAO-B war bei

Rauchern kompensatorisch erhöht und blieb dies auch Jahre nach Einstellung des Rauchens. Eine Untersuchung des MAO-B-Gen-Promotors zeigte sowohl in Rauchern als auch in ehemaligen Rauchern eine Demethylierung, was eine gesteigerte Transkription dieses Gens und daher im Endeffekt auch eine höhere Proteinkonzentration der MAO-B bewirkte. Um zu bestätigen, dass diese Demethylierung auch durch Tabakrauch ausgelöst wurde, bestimmte man die Aktivitäten der DNA-Methyltransferase und Nukleinsäure-Demethylase in Kernextrakten aus Lungengewebe von Rauch-exponierten Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Nukleinsäure-Demethylase bei rauchexponierten Mäusen signifikant erhöht war.¹¹⁹

Ein Zusammenhang zwischen einer positiven Raucheranamnese und einer geringeren Expression der transmembranären Form von Klotho ist nicht von der Hand zu weisen, da drei unterschiedliche Herangehensweisen zu ähnlichen Resultaten führen. Über den dahinter steckenden Mechanismus lässt sich zu diesem Zeitpunkt jedoch nur mutmaßen. Es ist zwar aus anderen Studien bekannt, dass oxidativer Stress akut die Expression von Klotho herabzuregulieren vermag,^{86,87} jedoch kann man die hier beobachteten Phänomene nicht mit vermehrtem oxidativen Stress in Zusammenhang bringen. Initial ist es aber durchaus denkbar, dass durch Rauchen bedingter oxidativer Stress epigenetische Veränderungen bewirkt, welche auch die Expression von Klotho betreffen und auch noch nach Aufgabe des Rauchens messbar bleiben. Als weitere Erklärung für die beobachteten Effekte von Rauchen auf die Expression von Klotho kann man den von *van Tiel et al.* beobachteten Zusammenhang zwischen positiver Raucheranamnese und erhöhter Leukozytenzahl heranziehen. *Van Tiel et al.* wiesen auch nach, dass sich diese durch Rauchen verursachte relative Leukozytose erst nach einem rauchfreien Intervall von mindestens fünf Jahren normalisierte.¹¹⁷ Es ist auch bekannt, dass Rauchen die Anzahl der Leukozyten in menschlicher Samenflüssigkeit um 48 Prozent und dadurch die Konzentration an ROS um 107 Prozent erhöht.⁸⁹ Wenn man dieses Ergebnis zusammen mit einem Resultat dieser Arbeit, nämlich der beobachteten negativen Korrelation zwischen Leukozytenzahl und Klotho (*Abbildung 12 und 13*), betrachtet, lässt sich vermuten, dass Rauchen über, anzunehmenderweise, epigenetische Mechanismen zu einer erhöhten Anzahl von Leukozyten führt und das Expressionsmuster von Klotho durch den leukozytär bedingten, vermehrten oxidativen Stress im Sinne einer verminderten Expression der transmembranären Form verändert wird.

4.8.2 Leukozytenzahl und Klotho

Es ist bekannt, dass ein Anstieg der sich im Blut befindlichen Leukozyten durch deren Kapazität, im Rahmen von Immunantworten reaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies zu generieren, auch mit vermehrtem endogenem oxidativen Stress einhergeht.

Die meiste der von einem aeroben Organismus benötigten Energie entstammt der innerhalb der Mitochondrien ablaufenden, enzymatisch kontrollierten Reaktion von Sauerstoff mit Wasserstoff im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung. Während dieser und anderer physiologischer Stoffwechselforgänge werden ständig von Sauerstoff bzw. auch von Stickstoff hergeleitete freie Radikale generiert, welche eine wichtige Rolle in der normalen Zellhomöostase, -Signalgebung, -Differenzierung, Mitose- und Abwehrvorgängen einnehmen. Der Begriff oxidativer Stress bezieht sich auf Situationen, in welchen das Äquilibrium zwischen ROS bzw. RNS (reaktive Sauerstoff bzw. Stickstoffspezies) und antioxidativ wirkenden Mediatoren gestört ist und freie Radikale überhand nehmen. *Mitobe et al.* untersuchten den Einfluss von Wasserstoffperoxid, einem starken Oxidationsmittel, auf die Expression von Klotho in mIMCD3 Zellen (*mouse inner medullary collecting duct 3*). Die Zugabe von Wasserstoffperoxid bewirkte eine starke Zeit und Dosis abhängige Herabregulation der Expression von Klotho.⁸⁷ In einer Studie von *Hu et al.* wurde gezeigt, dass es bei Nieren-Ischämie-Reperfusionen zu einer durch oxidativen Stress bedingten Reduktion der Expression von Klotho kommt.¹²⁰ Bei auf Ischämie folgender Reperfusion tritt Sauerstoff sehr schnell in Zellen ein und wird von verschiedenen Enzymsystemen reduziert. Aufgrund der in dieser Situation herrschenden hohen Sauerstoffspannung sind Redoxsysteme überfordert, und es werden bei der Reduktion auch viele reaktive Sauerstoffspezies generiert, welche wiederum über verschiedene Mechanismen zum Zelltod führen können.¹²¹ Da man davon ausgehen kann, dass ein Anstieg der Leukozytenzahl mit einem Anstieg von oxidativem Stress einhergeht,⁸⁹ erscheint es umgekehrt plausibel, dass die Leukozytenzahl invers mit der transmembranären Form von Klotho korreliert, wie zwei Resultate dieser Arbeit zeigen. Wie oxidativer Stress negativ regulatorisch auf die Expression der transmembranären Form von Klotho wirkt, ist bis dato nicht bekannt. Die Studie von *Hu et al.* liefert jedoch einen interessanten Ansatzpunkt. In Sprague-Dawley-Ratten wurde durch vorübergehende Abklemmung der renalen Arterien ein Ischämie-Reperfusionsschaden gesetzt welcher ein akutes Nierenversagen bewirkte. Zu festgesetzten Zeitpunkten, beginnend ab einer Stunde nach der Reperfusion wurden Tiere getötet. In Plasma und Nierenlysat wurde anschließend auf mRNA- und Proteinebene die trans-

membranäre bzw. 130 kDa schwere Form von Klotho bestimmt. Die Bestimmung von Klotho zeigte einen interessanten zeitabhängigen Verlauf, da entgegen der Erwartung die in Plasma und Nierenlysat gemessenen Klotho-Proteinkonzentrationen in der ersten Stunde zuerst moderat anstiegen, um drei Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden plötzlich und nachhaltig abzusinken. Die mRNA-Konzentrationen zeigten am ersten Tag einen signifikanten Abfall und kehrten nach sieben Tagen wieder auf Werte von SHAM-Tieren zurück.⁸⁶ Aus anderen Studien ist bekannt, dass oxidativer Stress in der Lage ist, die Metalloprotease/Sheddase ADAM 17 zu aktivieren, welche daraufhin verschiedene Membranproteine abschilfert.^{122,123} Wie in der Einleitung erwähnt, ist ADAM17 auch in der Lage, mittels eines α -cut eine 130 kDa schwere sezernierte Form von Klotho zu generieren. Es wäre also vorstellbar, dass der initial beobachtete Anstieg vor allem der im Plasma gemessenen 130 kDa schweren sezernierten Form von Klotho, mit der durch oxidativen Stress bedingten Aktivierung von ADAM17 und folgender Abschilferung der transmembranären Form von Klotho zusammenhängt. Zeitlich wäre dieser Zusammenhang auch herstellbar, da eine H₂O₂-induzierte Aktivierung von ADAM17 ungefähr eine Stunde benötigt.¹²³ Ein weiteres von ADAM17 geschnittenes Protein stellt unter anderem TNF- α dar. ADAM17 wird synonym auch TACE (*tumor necrosis factor α converting enzyme*) genannt, da TACE die membrangebundene Vorläuferform des proinflammatorischen Cytokins TNF- α abschilfert und dieses so seine biologische Aktivität entfalten kann.¹²⁴ *Thurston et al.* untersuchten in einer sehr aktuellen Studie den Einfluss chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) auf die renale Klotho-Expression. Zu diesem Zweck wurde drei verschiedene, in der Erforschung von CED etablierte Mausmodelle verwendet. In allen drei Modellen konnte sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene eine signifikante Reduktion der renalen Expression von Klotho festgestellt werden, wobei das Ausmaß der Reduktion mit der Schwere der Erkrankung korrelierte. Die beobachteten Effekte konnten durch die Gabe von gegen TNF- α gerichteten Antikörper aufgehoben werden. In Zellkulturexperimenten konnte ebenso gezeigt werden, dass TNF- α die Expression von Klotho inhibiert, dies wahrscheinlich auf transkriptioneller Ebene, da die mRNA-Stabilität von Klotho unverändert blieb, jedoch eine reduzierte Promotoraktivität bemerkbar war.¹²⁵

Oxidativer Stress, bedingt durch eine leichte Leukozytose, könnte somit über die Aktivierung von ADAM17 an erster Stelle zu einer raschen Abschilferung der transmembranären Form von Klotho führen und außerdem durch gleichzeitige Abschilferung und Aktivierung von TNF- α so auch die Expression von Klotho negativ beeinflussen.

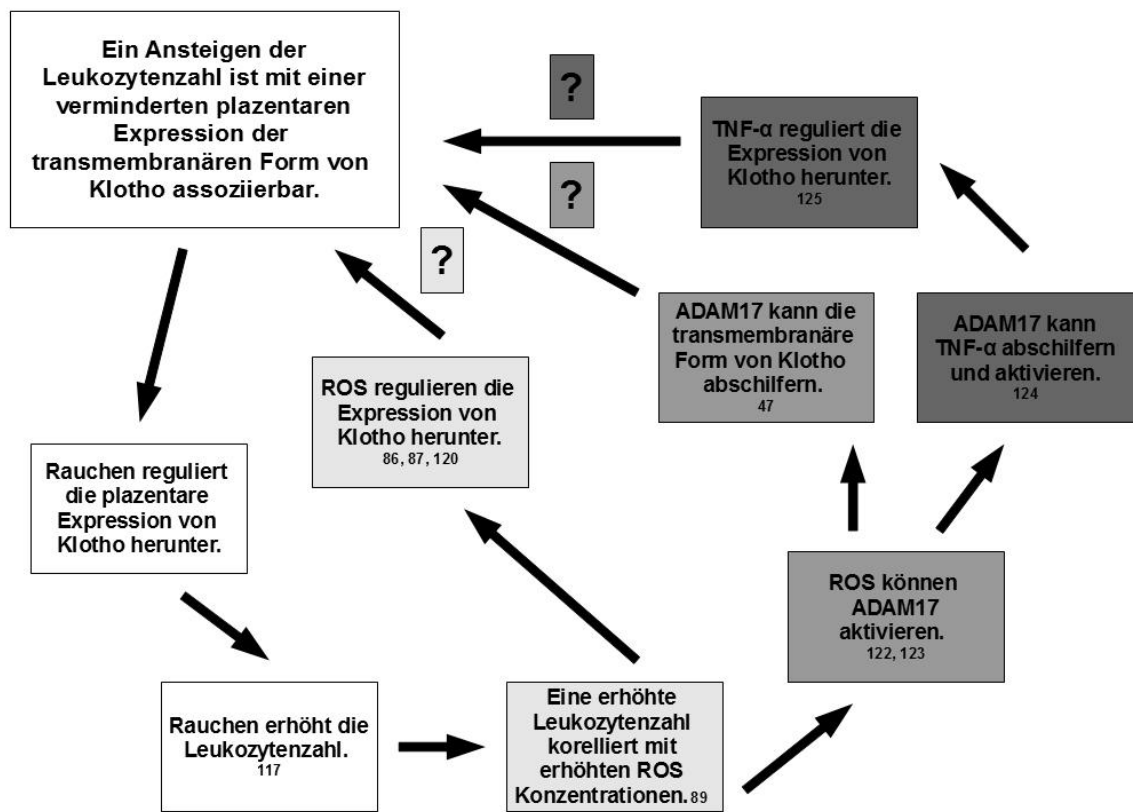


Abbildung 14: Hypothese zur negativen Beeinflussung der plazentaren Klotho-Expression durch Rauchen bzw. einer erhöhten Leukozytenzahl

Literaturverzeichnis

1. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *The Lancet*. 1986;327(8489):1077–1081.
2. Osmond C, Barker D, Winter P, Fall C, Simmonds S. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ*. 1993;307:1519-24.
3. Barker DJ, Osmond C, Simmonds SJ, Wield GA. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *British Medical Journal*. 1993;306(6875):422.
4. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *British Medical Journal*. 1991;303(6809):1019.
5. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis: Type 2 diabetes. *British Medical Bulletin*. 2001;60(1):5.
6. Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992;35(7):595-601.
7. Lumbers ER, Yu ZY, Gibson KJ. The selfish brain and the Barker hypothesis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2001;28(11):942–947.
8. Ravelli ACJ, van der Meulen JH, Michels RPJ, et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *The Lancet*. 1998;351(9097):173–177.
9. Poulsen P, Vaag AA, Kyvik KO, Jensen DM, Beck-Nielsen H. Low birth weight is associated with NIDDM in discordant monozygotic and dizygotic twin pairs. *Diabetologia*. 1997;40(4):439–446.
10. Poulsen P, Esteller M, Vaag A, Fraga MF. The Epigenetic Basis of Twin Discordance in Age-Related Diseases. *Pediatric Research*. 2007;61(5, Part 2).
11. Crowther NJ, Cameron N, Trusler J, Gray IP. Association between poor glucose tolerance and rapid post natal weight gain in seven-year-old children. *Diabetologia*. 1998;41(10):1163–1167.
12. Forsen T, Eriksson J, Tuomilehto J, et al. The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Annals of Internal Medicine*. 2000;133(3):176.
13. Yajnik C. Interactions of perturbations in intrauterine growth and growth during childhood on the risk of adult-onset disease. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2008;59(02):257–265.
14. Law CM, Barker DJ, Osmond C, Fall CH, Simmonds SJ. Early growth and abdominal fatness in adult life. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 1992;46(3):184.
15. Gale CR. Intrauterine Programming of Adult Body Composition. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(1):267-272.
16. Jornayvaz FR, Selz R, Tappy L, Theintz GE. Metabolism of oral glucose in children born small for gestational age: evidence for an impaired whole body glucose oxidation* 1. *Metabolism*. 2004;53(7):847–851.
17. Ibanez L. Early Development of Adiposity and Insulin Resistance after Catch-Up Weight Gain in Small-for-Gestational-Age Children. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(6):2153-2158.

18. Harrington TA, Thomas EL, Frost G, Modi N, Bell JD. Distribution of Adipose Tissue in the Newborn. *Pediatric Research*. 2004;55(3):437-441.
19. Modi N, Thomas EL, Harrington TA, et al. Determinants of Adiposity during Prewearing Postnatal Growth in Appropriately Grown and Growth-Restricted Term Infants. *Pediatric Research*. 2006;60(3):345-348.
20. Gillman MW, Rifas-Shiman S, Berkey CS, Field AE, Colditz GA. Maternal Gestational Diabetes, Birth Weight, and Adolescent Obesity. *PEDIATRICS*. 2003;111(3):e221-e226.
21. Boney CM. Metabolic Syndrome in Childhood: Association With Birth Weight, Maternal Obesity, and Gestational Diabetes Mellitus. *PEDIATRICS*. 2005;115(3):e290-e296.
22. Catalano PM, Kirwan JP, Haugel-de Mouzon S, King J. Gestational diabetes and insulin resistance: role in short-and long-term implications for mother and fetus. *Journal of Nutrition*. 2003;133(5):1674S.
23. Ehrenberg HM, Mercer BM, Catalano PM. The influence of obesity and diabetes on the prevalence of macrosomia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004;191(3):964-968.
24. Birth Weight and Adult Hypertension, Diabetes Mellitus, and Obesity in US Men -- Curhan et al. 94 (12): 3246 -- *Circulation*.
25. Birth Weight and Adult Hypertension and Obesity in Women -- Curhan et al. 94 (6): 1310 -- *Circulation*.
26. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, et al. Developmental plasticity and human health. *Nature*. 2004;430(6998):419-421.
27. Hocher B. Fetal programming of cardiovascular diseases in later life – mechanisms beyond maternal undernutrition. *The Journal of Physiology*. 2007;579(2):287 -288.
28. Lindsay RS, Lindsay RM, Edwards CR, Seckl JR. Inhibition of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase in Pregnant Rats and the Programming of Blood Pressure in the Offspring. *Hypertension*. 1996;27(6):1200-1204.
29. Singh RR, Cullen-McEwen LA, Kett MM, et al. Prenatal corticosterone exposure results in altered AT1/AT2, nephron deficit and hypertension in the rat offspring. *The Journal of Physiology*. 2007;579(2):503 -513.
30. Szyf M. The early life environment and the epigenome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2009;1790(9):878-885.
31. Baylin SB. DNA METHYLATION: Tying It All Together: Epigenetics, Genetics, Cell Cycle, and Cancer. *Science*. 1997;277(5334):1948-1949.
32. Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary Protein Restriction of Pregnant Rats Induces and Folic Acid Supplementation Prevents Epigenetic Modification of Hepatic Gene Expression in the Offspring. *J. Nutr*. 2005;135(6):1382-1386.
33. Pham TD, MacLennan NK, Chiu CT, et al. Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(5):R962-970.

-
34. Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJ. Epigenetic Modification of the Renin-Angiotensin System in the Fetal Programming of Hypertension. *Circ Res*. 2007;100(4):520-526.
 35. Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*. 2004;7(8):847-854.
 36. Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(49):19351 -19356.
 37. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(30):10604 -10609.
 38. Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, et al. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *British Journal of Nutrition*. 2007;97(03):435-439.
 39. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390(6655):45-51.
 40. Kurosu H. Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. *Science*. 2005;309(5742):1829-1833.
 41. Tsujikawa H. Klotho, a Gene Related to a Syndrome Resembling Human Premature Aging, Functions in a Negative Regulatory Circuit of Vitamin D Endocrine System. *Molecular Endocrinology*. 2003;17(12):2393-2403.
 42. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, et al. Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein* 1. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;242(3):626-630.
 43. Kuro-o M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol Chem*. 2008;389(3):233-41.
 44. Imura A, Iwano A, Tohyama O, et al. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS letters*. 2004;565(1-3):143-147.
 45. Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, et al. Klotho Protein Protects against Endothelial Dysfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;248(2):324-329.
 46. Mitani H. In Vivo klotho Gene Transfer Ameliorates Angiotensin II-Induced Renal Damage. *Hypertension*. 2002;39(4):838-843.
 47. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(50):19796.
 48. Bloch L, Sineschekova O, Reichenbach D, et al. Klotho is a substrate for [alpha]-, [beta]- and [gamma]-secretase. *FEBS Letters*. 2009;583(19):3221-3224.
 49. Nabeshima Y, Imura H. α-Klotho: A Regulator That Integrates Calcium Homeostasis. *Am J Nephrol*. 2008;28(3):455-464.

-
50. Wang Y, Sun Z. Current understanding of klotho. *Ageing research reviews*. 2009;8(1):43–51.
 51. Lu P, Boros S, Chang Q, Bindels RJ, Hoenderop JG. The β -glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2008;23(11):3397–3402.
 52. Cha S, Ortega B, Kurosu H, et al. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(28):9805–9810.
 53. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5N-glycosylation. *Nature*. 2001;409(6821):733–739.
 54. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(33):20807–20810.
 55. Cha S, Hu M, Kurosu H, et al. Regulation of Renal Outer Medullary Potassium Channel and Renal K⁺ Excretion by Klotho. *Molecular Pharmacology*. 2009;76(1):38–46.
 56. Rao TP, Kuhl M. An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways: A Prelude for More. *Circ Res*. 2010;106(12):1798–1806.
 57. Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, et al. Augmented Wnt Signaling in a Mammalian Model of Accelerated Aging. *Science*. 2007;317(5839):803–806.
 58. Lee J, Jeong D, Kim J, et al. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Molecular Cancer*. 2010;9(1):109.
 59. O'Connell MP, Fiori JL, Kershner EK, et al. Heparan Sulfate Proteoglycan Modulation of Wnt5A Signal Transduction in Metastatic Melanoma Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(42):28704–28712.
 60. Camilli TC, Xu M, O'Connell MP, et al. Loss Of Klotho During Melanoma Progression Leads To Increased Filamin Cleavage, Increased Wnt5A Expression and Enhanced Melanoma Cell Motility. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2010;no.
 61. White KE, Evans WE, O'Riordan JL, et al. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nature Genetics*. 2000;26(3):345–348.
 62. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a Novel Fibroblast Growth Factor, FGF-23, Preferentially Expressed in the Ventrolateral Thalamic Nucleus of the Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;277(2):494–498.
 63. Shimada T, Muto T, Urakawa I, et al. Mutant FGF-23 Responsible for Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets Is Resistant to Proteolytic Cleavage and Causes Hypophosphatemia in Vivo. *Endocrinology*. 2002;143(8):3179.
 64. Shimada T, Mizutani S, Muto T, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(11):6500–6505.
 65. Kurosu H, Kuro-o M. The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;299(1):72–78.

-
66. Kuro-o M. Overview of the FGF23-Klotho axis. *Pediatric Nephrology*. 2010;25(4):583-590-590.
 67. Razzaque MS, Sitara D, Taguchi T, St-Arnaud R, Lanske B. Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. *The FASEB Journal*. 2006:05.
 68. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(4):561–568.
 69. Prie D, Friedlander G. Reciprocal Control of 1,25-Dihydroxyvitamin D and FGF23 Formation Involving the FGF23/Klotho System. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2010;5(9):1717-1722.
 70. Haussler MR, Haussler CA, Whitfield GK, et al. The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the “Fountain of Youth” to mediate healthful aging. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2010.
 71. Marletta MA. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends in Biochemical Sciences*. 1989;14(12):488-492.
 72. Furchgott R, Vanhoutte P. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *The FASEB Journal*. 1989;3(9):2007 -2018.
 73. Fitzgerald JS, Germeyer A, Huppertz B, et al. REVIEW ARTICLE: Governing the Invasive Trophoblast: Current Aspects on Intra- and Extracellular Regulation. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2010;63(6):492-505.
 74. Stapel E. Box-and-Whisker Plots: Interquartile Ranges and Outliers.
 75. Howell D. *Statistical Methods for Psychology*. Wadsworth; 2009.
 76. Fox J. *Regression diagnostics*. Sage; 1991.
 77. Chatterjee S, Hadi A. *Regression analysis by example*. Wiley-Interscience; 2006.
 78. Hardin J, Hilbe J, Hilbe J. *Generalized linear models and extensions*. Stata Press; 2007.
 79. Fischer SS, Kempe DS, Leibrock CB, et al. Hyperaldosteronism in Klotho-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;ajprenal.00233.2010.
 80. Prie D, Friedlander G. Reciprocal Control of 1,25-Dihydroxyvitamin D and FGF23 Formation Involving the FGF23/Klotho System. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2010;5(9):1717-1722.
 81. Nakamura T, Saito Y, Ohyama Y, et al. Production of nitric oxide, but not prostacyclin, is reduced in klotho mice. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 2002;89(2):149–156.
 82. Narumiya H, Sasaki S, Kuwahara N, et al. HMG-CoA reductase inhibitors up-regulate anti-aging klotho mRNA via RhoA inactivation in IMCD3 cells. *Cardiovascular research*. 2004;64(2):331.
 83. Zhou Q, Lin S, Tang R, et al. Role of Fosinopril and Valsartan on Klotho Gene Expression Induced by Angiotensin II in Rat Renal Tubular Epithelial Cells. *Kidney Blood Press Res*. 2010;33(3):186-192.

-
84. Zhang H, Li Y, Fan Y, et al. Klotho is a target gene of PPAR- γ . *Kidney Int.* 2008;74(6):732-739.
 85. Yang H, Deleuze S, Zuo Y, et al. The PPAR Agonist Pioglitazone Ameliorates Aging-Related Progressive Renal Injury. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2009;20(11):2380-2388.
 86. Sugiura H, Yoshida T, Tsuchiya K, et al. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2005;20(12):2636.
 87. Mitobe M, Yoshida T, Sugiura H, et al. Oxidative Stress Decreases Klotho Expression in a Mouse Kidney Cell Line. *Nephron Exp Nephrol.* 2005;101(2):e67-e74.
 88. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EFM. Systemic Effects of Smoking*. *Chest.* 2007;131(5):1557 -1566.
 89. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human reproduction update.* 2008.
 90. Madjid M, Awan I, Willerson JT, Casscells SW. Leukocyte count and coronary heart disease: Implications for risk assessment. *Journal of the American College of Cardiology.* 2004;44(10):1945-1956.
 91. Karohl C, Su S, Kumari M, et al. Heritability and seasonal variability of vitamin D concentrations in male twins. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2010;92(6):1393 -1398.
 92. Novakovic B, Sibson M, Ng HK, et al. Placenta-specific Methylation of the Vitamin D 24-Hydroxylase Gene: Implications for feedback autoregulation of active vitamin D levels at the fetomaternal interface. *Journal of Biological Chemistry.* 2009;284(22):14838-14848.
 93. Fox GJ, Barthold S, Davisson M, et al. *The Mouse in Biomedical Research.* 2. Aufl. Academic Press; 2007.
 94. Radaev S, Zou Z, Huang T, et al. Ternary Complex of Transforming Growth Factor- β 1 Reveals Isoform-specific Ligand Recognition and Receptor Recruitment in the Superfamily. *Journal of Biological Chemistry.* 2010;285(19):14806 -14814.
 95. Letterio J. Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice. *Science.* 1994;264(5167):1936-1938.
 96. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, et al. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993;90(2):770 -774.
 97. Garofalo R. Cytokines in Human Milk. *The Journal of Pediatrics.* 2010;156(2, Supplement 1):S36-S40.
 98. Goldman A, Chheda S, Garofalo R, Schmalstieg F. Cytokines in human milk: Properties and potential effects upon the mammary gland and the neonate. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* 1996;1(3):251-258-258.
 99. Lönnerdal B. Bioactive Proteins in Human Milk: Mechanisms of Action. *The Journal of Pediatrics.* 2010;156(2, Supplement 1):S26-S30.

100. Liu S, Tang W, Zhou J, et al. Fibroblast Growth Factor 23 Is a Counter-Regulatory Phosphaturic Hormone for Vitamin D. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(5):1305-1315.
101. Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S, et al. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J Clin Invest*. 2006;116(12):3150-3159.
102. Wang T. Large-Scale in Silico and Microarray-Based Identification of Direct 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Target Genes. *Molecular Endocrinology*. 2005;19(11):2685-2695.
103. Shin J, Choi M, Longtine M, Nelson D. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta*. In Press, Corrected Proof.
104. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest*. 2007;117(12):4003-4008.
105. Zhong W, Wang Q, Sun T, et al. FGF Ligand Family mRNA Expression Profile for Mouse Preimplantation Embryos, Early Gestation Human Placenta, and Mouse Trophoblast Stem Cells. *Mol. Reprod. Dev*. 2006;73(5):540-550.
106. Yoshiko Y, Wang H, Minamizaki T, et al. Mineralized tissue cells are a principal source of FGF23. *Bone*. 2007;40(6):1565-1573.
107. Krajisnik T, Bjorklund P, Marsell R, et al. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1{alpha}-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol*. 2007;195(1):125-131.
108. Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, et al. In Vivo klotho Gene Delivery Protects against Endothelial Dysfunction in Multiple Risk Factor Syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;276(2):767-772.
109. Werner C, Baumhäkel M, Teo K, et al. RAS blockade with ARB and ACE inhibitors: current perspective on rationale and patient selection. *Clinical Research in Cardiology*. 2008;97(7):418-431-431.
110. Mattson MP, Maudsley S. Live Longer sans the AT1A Receptor. *Cell Metabolism*. 2009;9(5):403-405.
111. Yamagishi T, Saito Y, Nakamura T, et al. Troglitazone Improves Endothelial Function and Augments Renal Klotho mRNA Expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats with Multiple Atherogenic Risk Factors. *Hypertension Research*. 2001;24(6):705-709.
112. O'Moore-Sullivan T, Prins J. Thiazolidinediones and type 2 diabetes: new drugs for an old disease. *MJA*. 2002;(176 (8)):381-386.
113. Capobianco E, White V, Higa R, Martínez N, Jawerbaum A. Effects of natural ligands of PPAR γ on lipid metabolism in placental tissues from healthy and diabetic rats. *Molecular Human Reproduction*. 2008;14(8):491 -499.
114. Martin H. Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2009;669(1-2):1-7.
115. Jawerbaum A, Capobianco E, Pustovrh C, et al. Influence of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation by its endogenous ligand 15-deoxy Δ 12,14 prostaglandin J2 on nitric oxide production in term placental tissues from diabetic women. *Molecular Human Reproduction*. 2004;10(9):671 -676.

-
116. Schild RL, Schaiff WT, Carlson MG, et al. The Activity of PPAR{gamma} in Primary Human Trophoblasts Is Enhanced by Oxidized Lipids. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(3):1105-1110.
 117. Van Tiel ED, Peeters PHM, Smit HA, et al. Quitting Smoking May Restore Hematological Characteristics within Five Years. *Annals of Epidemiology.* 2002;12(6):378-388.
 118. Rajendrasozhan S, Yao H, Rahman I. Current Perspectives on Role of Chromatin Modifications and Deacetylases in Lung Inflammation in COPD. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* 2009;6(4):291-297.
 119. Launay J, Del Pino M, Chironi G, et al. Smoking Induces Long-Lasting Effects through a Monoamine-Oxidase Epigenetic Regulation Tailleux L, hrsg. *PLoS ONE.* 2009;4(11):e7959.
 120. Hu M, Shi M, Zhang J, et al. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int.* 2010.
 121. Andreadou I, Iliodromitis EK, Farmakis D, Kremastinos DT. To prevent, protect and save the ischemic heart: antioxidants revisited. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2009;13(8):945-956.
 122. Myers TJ, Brennaman LH, Stevenson M, et al. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Mediate GPCR-induced TACE/ADAM17-dependent Transforming Growth Factor- α Shedding. *Mol. Biol. Cell.* 2009;20(24):5236-5249.
 123. Brill A, Chauhan AK, Canault M, et al. Oxidative stress activates ADAM17/TACE and induces its target receptor shedding in platelets in a p38-dependent fashion. *Cardiovascular Research.* 2009;84(1):137 -144.
 124. Bass R, Edwards DR. ADAMs and protein disulfide isomerase: the key to regulated cell-surface protein ectodomain shedding? *Biochemical Journal.* 2010;428(3):e3-e5.
 125. Thurston RD, Larmonier CB, Majewski PM, et al. Tumor Necrosis Factor and Interferon- γ Down-regulate Klotho in Mice With Colitis. *Gastroenterology.* 2010;138(4):1384-1394.e2.

Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Christoph Reichetzer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *„Molekulare Mechanismen der fetalen Programmierung. Erste Einblicke in den Einfluss von plazentarem Klotho auf mütterliche und kindliche biologische Parameter.“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“