

Aus dem Institut für Pathobiochemie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Meprin β ist eine neue Sekretase des Anti-Aging-Proteins Klotho

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Greta Marie Böhme
aus Heidelberg

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 <i>Klotho, das Anti-Aging-Protein</i>	3
2.1.1 Grundlagen der Struktur Klothos	3
2.1.2 Prozessierung durch α -, β - und γ -Sekretasen.....	4
2.1.3 Lösliches Klotho durch Alternatives Spleißen	5
2.1.4 Expressionsorte und Regulation.....	6
2.1.5 Funktion auf zellulärer Ebene.....	7
2.1.6 <i>KL</i> -Varianten bei Menschen	8
2.1.7 Klotho und das Gehirn.....	8
2.1.7.1 Neuroplastizität und Kognition.....	10
2.1.7.2 Oxidativer Stress und Apoptose	10
2.1.7.3 Nicht-neuronale Strukturen.....	10
2.1.8 Morbus Alzheimer.....	11
2.1.8.1 Morbus Alzheimer Pathologie.....	11
2.1.8.2 Verbindung von Klotho zu Morbus Alzheimer	12
2.1.9 Klotho und die Blut-Hirn-Schranke	13
2.1.10 Klotho und die Nieren	14
2.1.11 Klotho als Ziel möglicher Therapieansätze	14
2.2 <i>Die Metalloprotease Mep1b</i>	16
2.2.1 Expression und Funktion von Mep1b	16
2.2.2 Mep1b und Morbus Alzheimer.....	17
2.2.3 Zusammenspiel von ADAM10, ADAM17 und Mep1b	18
2.3 <i>Hinweise auf die Interaktion von Mep1b und Klotho</i>	19
3 Material	21
3.1 <i>Chemikalien</i>	21
3.2 <i>Enzyme</i>	24
3.3 <i>Puffer</i>	25
3.4 <i>Primer und Plasmide</i>	27

3.5	Zellen.....	29
3.6	Mauslinien.....	29
3.7	Antikörper.....	30
3.8	Kits.....	31
3.9	Software.....	31
3.10	Verbrauchsmaterialien.....	32
3.11	Geräte.....	32
4	Methoden.....	35
4.1	Zellkultur.....	35
4.1.1	Kultivierung von Säugetierzellreihen.....	35
4.1.1.1	Zell-Passage und Aussaat.....	35
4.1.1.2	Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen.....	35
4.1.2	Kultivierung von Insekten-Zellreihen.....	36
4.1.3	Transfektion.....	36
4.1.3.1	Transiente Transfektion mit PEI (Polyethylenimin).....	37
4.1.3.2	Transiente Transfektion mit X-tremeGENE HP.....	37
4.1.3.3	Transiente Transfektion mit Lipofectamine 2000.....	37
4.1.4	Behandlung mit dem Mep1b-Inhibitor Actinonin.....	39
4.1.5	Behandlung mit rekombinantem Mep1b.....	39
4.2	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	40
4.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
4.2.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	43
4.2.3	Verdau und Aufreinigung der DNA-Fragmente.....	43
4.2.4	Ligation der Inserts und Vektoren.....	44
4.2.5	Transformation von E. coli-Stämmen.....	44
4.2.6	Kontrollverdau und Sequenzierung.....	45
4.2.7	Maxi-Präparation.....	45
4.3	Rekombinante Proteinexpression.....	46
4.3.1	GST-Fusionsproteine in Bakterienstämmen.....	46
4.3.1.1	Expression der Fusionsproteine.....	46
4.3.1.2	Zell-Lyse und Aufreinigung der Fusionsproteine.....	47
4.3.1.3	Konzentrationsbestimmung der Fusionsproteine.....	47
4.3.2	Expression im Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionssystem.....	48
4.3.2.1	Transposition und Blau-Weiß-Screening.....	49
4.3.2.2	Isolation der Bacmid-DNA und Kontroll-PCR.....	52
4.3.2.3	Transfektion von Sf9-Zellen und Virusamplifikation.....	53
4.3.2.4	Proteinexpression in High5-Zellen.....	54

4.3.2.5	Protein-Aufreinigung über Flüssigchromatografie	54
4.4	<i>Proteinanalyse</i>	56
4.4.1	Zell-Lyse	56
4.4.2	Gewebe-Lyse.....	56
4.4.3	Deglykosylierung von Nierenlysaten	56
4.4.4	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay	57
4.4.5	SDS-PAGE und Probenvorbereitung	57
4.4.6	Western-Blot.....	58
4.4.7	Coomassie Färbung von Polyacrylamid-Gelen	59
4.5	<i>In vivo Analysen</i>	59
4.5.1	Isolierung und Analyse der CSF.....	59
4.5.2	Lyse von Maus-Nieren.....	59
4.5.3	Induktion der Cre-Rekombinase mit Tamoxifen	59
4.6	<i>Statistische Auswertung</i>	60
5	Ergebnisse	61
5.1	<i>Interaktion von Mep1b und Klotho</i>	61
5.1.1	Mep1b ^{-/-} -Mäuse zeigen veränderte Klotho-Prozessierung in Nierenlysaten.....	61
5.1.2	Reduktion von s-KL2 und s-Klotho in CSF von Mep1b ^{-/-} -Mäusen.....	63
5.1.3	Reduktion von s-Klotho bei endothelspezifischer Mep1b-Überexpression.....	64
5.1.4	Deglykosylierung von Maus-Nierenlysaten verändert die Klotho-Darstellung im Western-Blot.....	65
5.1.5	Kotransfektions-Protokoll für MEFADAM10/17 ^{-/-} KL.....	66
5.1.6	Mep1b beeinflusst Klotho-Prozessierung unabhängig von ADAM10 und ADAM17	67
5.1.7	Effekt des Mep1b-Inhibitors Actinonin auf Klotho.....	69
5.1.8	Keine Unterschiede zwischen rekombinantem und transfiziertem Mep1b.....	71
5.2	<i>Herstellung und Aufreinigung von Klotho-Fusionsproteinen</i>	74
5.2.1	Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine in E. coli-Stämmen	74
5.2.2	Baculovirus-Expressions-System in Insektenzellenkultur	76
5.2.2.1	Bacmid-Herstellung und Kontroll-PCR	76
5.2.2.2	Expression der rekombinanten Proteine in High5-Zellen	77
5.2.2.3	Probe-Aufreinigung mittels Flüssigchromatografie.....	78
6	Diskussion	79
6.1	<i>Mep1b-Reduktion beeinflusst Klotho-Levels in vivo</i>	80
6.2	<i>Gezielte Überexpression von Mep1b reduziert nachweisbares s-Klotho</i>	82
6.3	<i>Mep1b-vermittelter Effekt auf Klotho ist unabhängig von ADAM10 und ADAM17</i>	84
6.3.1	Mep1b-Inhibitor Actinonin beeinflusst Klotho-Prozessierung	85
6.3.2	Vergleich von rekombinantem und membrangebundenem Klotho	85

6.4	<i>Expression von rekombinanten Klotho-Fusionsproteinen</i>	88
6.4.1	Geringe Expression der Fusionsproteine in E. coli Stämmen.....	88
6.4.2	Herstellung in Insektenzellkultur und die Rolle von Glykosylierungen.....	90
6.5	<i>Klinische Relevanz</i>	93
6.6	<i>Ausblick</i>	94
7	Zusammenfassung	96
8	Literaturverzeichnis	97
9	Anhang	109
9.1	<i>Vektorkarten</i>	109
9.2	<i>Genehmigung für Abbildung 2</i>	112
10	Danksagung	113
11	Lebenslauf	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Klotho-Struktur.....	2
Abbildung 2: Prozessierung von fl-Klotho	4
Abbildung 3: Potentielle Schnittstellen in Klotho durch Mep1b.....	19
Abbildung 4: Klotho-Fusionsproteine	41
Abbildung 5: Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionsystems	49
Abbildung 6: Transposition in DH10Bac	50
Abbildung 7: Grundlage des Blau-Weiß-Screenings.....	51
Abbildung 8: Kontroll-PCR-Produkte nach Transposition.....	52
Abbildung 9: Klotho-Prozessierung in Mep1b ^{-/-} -Maus-Nieren.....	62
Abbildung 10: s-Klotho und s-KL2 in CSF von Mep1b ^{-/-} -Mäusen	63
Abbildung 11: Reduktion von s-Klotho in CSF-Analysen von Slc ^{Cre} Mep1b-Mäusen.....	64
Abbildung 12: Deglykosylierung von Maus-Nierenlysaten	65
Abbildung 13: Kotransfektions-Protokoll für MEFADAM10/17 ^{-/-} KL	66
Abbildung 14: Klotho-Prozessierung unter Mep1b-Überexpression in ADAM10/17 ^{-/-} -Zellen ..	68
Abbildung 15: Klotho-Prozessierung unter Zugabe von Actinonin.....	70
Abbildung 16: Effekt von rekombinantem und transfiziertem Mep1b auf Klotho.....	72
Abbildung 17: Herstellung und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine	75
Abbildung 18: Überprüfung des Transpositions-Erfolgs mittels PCR	77
Abbildung 19: Probe-Expression in High5-Zellen.....	77
Abbildung 20: Probe-Aufreinigung von Klotho Δ TM-Strep.	78
Abbildung 21: Ergebnisse in Mep1b ^{-/-} -Mäusen verglichen mit wt-Mäusen.	81
Abbildung 22: N-Glykosylierung in Insekten und Säugetieren.....	92
Abbildung 23: KL1 in pGEX4T-1.....	109
Abbildung 24: KL2 in pGEX4T-1.....	109
Abbildung 25: Klotho Δ TM in pGEX4T-1	110
Abbildung 26: KL1 in pFastBac1	110
Abbildung 27: KL2 in pFastBac1	111
Abbildung 28: Klotho Δ TM in pFastBac1	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klotho-assoziierte Wirkungen auf das Gehirn	9
Tabelle 2: Chemikalien	21
Tabelle 3: Zellkulturmedien	22
Tabelle 4: Wachstums- und Konservierungsmedien, Zusammensetzung	23
Tabelle 5: Antibiotika	24
Tabelle 6: Restriktionsenzyme.....	24
Tabelle 7: Weitere Enzyme.....	24
Tabelle 8: Puffer für die Proteinbiochemie	25
Tabelle 9: Puffer für die Molekularbiologie.....	26
Tabelle 10: Puffer für die GST-Tag-Aufreinigung.....	26
Tabelle 11: Puffer für die Strep-Tag-Aufreinigung.....	26
Tabelle 12: Primer für die Klonierung	27
Tabelle 13: Primer für die Sequenzierung.....	27
Tabelle 14: Primer für die Kontroll-PCR der rekombinanten Bacmide.....	28
Tabelle 15: Plasmide	28
Tabelle 16: Bakterienstämme	29
Tabelle 17: Insektenzellen	29
Tabelle 18: Säugetierzellen	29
Tabelle 19: Mauslinien.....	30
Tabelle 20: Primäre Antikörper	30
Tabelle 21: Sekundäre Antikörper	31
Tabelle 22: Kits.....	31
Tabelle 23: Verbrauchsmaterialien	32
Tabelle 24: Geräte.....	32
Tabelle 25: Transfektion mit ADAM10 und Mep1b.....	38
Tabelle 26: PCR-Ansätze für alle Inserts	42
Tabelle 27: PCR-Amplifikation der Inserts für pGEX4T-1	42
Tabelle 28: PCR-Amplifikation der Inserts für pFastBac	42
Tabelle 29: Restriktionsverdau	43
Tabelle 30: Pipettierschema Kontroll-PCR.....	53
Tabelle 31: PCR-Programm Kontroll-PCR.....	53
Tabelle 32: Virusamplifikation in Sf9-Zellen	54
Tabelle 33: Pipettierschema BSA-Standardreihe.....	57
Tabelle 34: Trenn- und Sammelgel Zusammensetzung.....	58
Tabelle 35: <i>Rare Codons</i> in den Domänen KL1 und KL2.	89
Tabelle 36: <i>Rare Codon</i> Cluster in KL1 und KL2	89

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
APP	<i>Amyloid-Precursor-Protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aβ	Amyloid-beta
BACE	<i>β-Sekretase β-APP Cleaving Enzyme 1</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-Phosphatrest-Guanin
CSF	cerebrospinale Flüssigkeit
ctrl	Kontrolle
Cu	Kupfer
d	Tag
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
engl.	englisch
EZR	Extrazellulärraum
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
fl-Klotho	<i>full-length Klotho</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
g	je nach Zusammenhang mittlere Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
hAPP	humanes APP
High5	High Five (BTI-Tn-5B1-4)
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IGF1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-6-R	Interleukin-6-Rezeptor
IZR	Intrazellulärraum
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Klotho	α-Klotho
KlothoΔTM	Klotho ohne Transmembran-Domäne
KΔTM	Klotho ohne Transmembran-Domäne
LacDiNAc	GalNAcβ1-4GlcNAcβ

LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LRP1	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1</i>
LTP	<i>Long Term Potentiation</i> (Langzeitpotentierung)
M	Molar (Mol/Liter)
Mep1b	Meprin β
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MS	Multiple Sclerose
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramm
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA Decay</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.s.	nicht signifikant
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 Nanometern
PAGE	Polyacrylamid Gel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
P-gp	P-Glykoprotein
PS1	Presenilin 1
PTC	<i>Premature Termination Codons</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPM	<i>revolutions per minute</i>
RRMS	<i>Replapse-Remitting Multiple Sclerosis</i>
RT-qPCR	Quantitative Reverse-Transkriptase PCR
S	Serin
s	Sekunde
s-	<i>soluble</i> = löslich
sAPP	<i>soluble APP</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfat</i>
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda 9</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphismen</i>
sog.	sogenannte
Sp-KL1	Spliced KL1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembran
tRNA	transfer-RNA
TRPV5	Transiente Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie V, Subtyp 5
UV	ultraviolett
V	je nach Zusammenhang Valin oder Volt
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Lebenserwartung ist in den letzten Jahren weltweit deutlich gestiegen (1). Mit dem Alter steigt das Risiko für eine Vielzahl von Erkrankungen, die Herausforderungen für die Individuen und die Gesellschaft bedeuten.

Das Protein Klotho, das vor ca. 25 Jahren entdeckt wurde, gilt als Anti-Aging-Protein. In Mäusen führt ein Defekt im Gen, das für Klotho kodiert, zu einer reduzierten Lebenszeit von 7-8 Wochen (2). Von besonderer Bedeutung ist, dass diese Mäuse nach drei bis vier Wochen normalen Wachstums einen Phänotyp entwickeln, der dem menschlichen Altern ähnelt. Mäuse, die Klotho überexprimieren, leben hingegen 20-30 % länger als wildtypische Mäuse. In Menschen wird eine Reduktion Klothos mit dem Alter beobachtet und Verbindungen zu vielen alterstypischen Erkrankungen hergestellt.

Klotho wird als Transmembran-Protein exprimiert und besitzt zwei extrazelluläre Domänen, KL1 und KL2. Die Nieren gelten als Organ mit der stärksten Klotho-Expression in der Peripherie, im zentralen Nervensystem ist es der *Plexus choroideus*. Zusätzlich zur membrangebunden Form gibt es lösliche Formen Klothos, die in Blut, *Liquor cerebrospinalis* oder Urin vorliegen. Diese löslichen Formen entstehen durch die enzymatische Abspaltung der extrazellulären Anteile von der Zellmembran. Klothos Proteinsequenz weist zwei bekannte Schnittstellen für Enzyme auf, sogenannte Sekretasen, die Proteinanteile von der Membran schneiden. Eine Schnittstelle ist neben der Membran und eine zwischen den Domänen KL1 und KL2, sodass die Domänen einzeln oder das ganze extrazelluläre Klotho als lösliche Formen vorkommen (Abbildung 1) (3).

Durch die löslichen Formen wirkt Klotho nicht nur an Organen, die Klotho exprimieren, sondern systemisch und hat beispielsweise einen protektiven Effekt auf das vaskuläre System. Eine Reduktion der löslichen Formen wird bei Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz und chronischer Niereninsuffizienz beobachtet (4).

Die genauen Mechanismen hinter der Prozessierung Klothos sind noch unbekannt. Bereits identifizierte Proteasen, die an der Abspaltung Klothos von der Membran beteiligt sind, sind die α -, β - und γ -Sekretasen (5). Diese Sekretasen sind von der Prozessierung des *Amyloid Precursor Proteins* (APP) bekannt, dessen Spaltprodukte eine Schlüsselrolle in der Pathologie der Alzheimer-Demenz einnehmen. Abhängig davon, welche Sekretasen APP prozessieren, entstehen unterschiedliche Spaltprodukte, die teilweise neurotoxisch sind. Vor wenigen Jahren wurde die Metalloprotease Mep1b (β Mep1b) als eine weitere Sekretase entdeckt, die APP spaltet und an der Alzheimer-Pathologie beteiligt ist (6).

Da die Prozessierungen von Klotho und APP sich ähneln, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Hypothese, dass Klotho, wie APP, ebenfalls von Mep1b prozessiert wird (Abbildung 1). Neben der Verbindung über APP spricht dafür, dass Klotho und Mep1b im gleichen Gewebe exprimiert werden und Klotho Aminosäure-Abfolgen aufweist, an denen Mep1b präferiert spaltet.

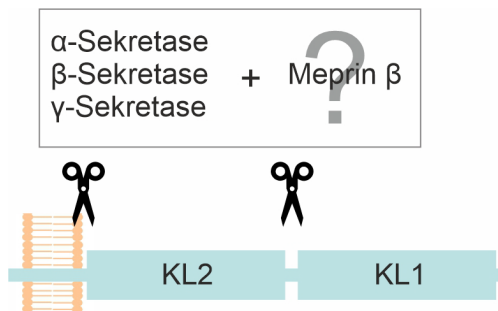


Abbildung 1: Übersicht der Klotho-Struktur. Transmembran-Protein Klotho mit zwei extrazellulären Domänen KL1 und KL2. Die Scheren markieren bekannte Schnittstellen für die Sekretasen.

Da Konzentrationsänderungen löslichen Klothos in einer Vielzahl von Erkrankungen beobachtet werden, ist eine genaue Kenntnis der Regulierung der enzymatischen Spaltung Klothos, der beteiligten Proteasen und der Spaltprodukte wichtig. Mep1b, als neue APP-Sekretase, kommt zudem als mögliches Ziel kommender Alzheimertherapien in Frage. Das Wissen über weitere Substrate von Mep1b kann helfen potentielle unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu verstehen.

Für die Interpretation der Ergebnisse ist von Bedeutung, dass die α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17, die Klotho prozessieren, durch Mep1b in eine Form mit gesteigerter Aktivität überführt werden können (7). Es muss also differenziert werden, ob Mep1b direkt auf Klotho wirkt, oder ob es über ADAMs die Klotho-Prozessierung verändert.

In dieser Arbeit werden *in vivo* Analysen von Nieren und *Liquor cerebrospinalis* von Mep1b-defizitären Mäusen mit den Proben wildtypischer Mäusen verglichen. Zusätzlich wird *Liquor cerebrospinalis* von Mäusen untersucht, die Mep1b spezifisch im Gehirndothel und *Plexus choroideus* überexprimieren. *In vitro* wird die Interaktion von Mep1b und Klotho unabhängig von ADAM10 und ADAM17 untersucht. Dafür wird eine ADAM10/17-*knockout* Zellreihe verwendet.

Aus diesen Versuchen lässt sich keine Aussage über die genauen Schnittstellen treffen. Deshalb sollen für anschließende Restriktionsanalysen Klotho und die einzelnen Domänen KL1 und KL2 als rekombinante Proteine hergestellt und aufgereinigt werden.

Diese Arbeit soll weitere Erkenntnisse über die Prozessierung Klothos liefern. Dabei wird zum ersten Mal die Interaktion von Mep1b und Klotho *in vivo* und, unabhängig von ADAM10 und ADAM17, *in vitro* untersucht.

2 Literaturdiskussion

2.1 Klotho, das Anti-Aging-Protein

1997 veröffentlichten Makoto Kuro-o und seine Kolleg*innen folgende Entdeckung: transgene Mäuse (*kl/kl*), in denen ein bestimmtes Protein nicht exprimiert wird, zeigen einen Phänotyp des menschlichen Alterns und sterben früher als wildtypische Mäuse (2). Im Alter von 3-4 Wochen entwickeln diese Mäuse unter anderem Osteoporose, Arteriosklerose, Hautatrophie und Gangschwierigkeiten, Symptome, die dem menschlichen Altern ähneln. Wird dieses Protein überexprimiert, leben die transgenen Mäuse 20-30 % länger als wildtypische Mäuse (8). Das beschriebene Protein wurde Klotho genannt, nach einer Göttin in der griechischen Mythologie, die den Faden des Lebens spinnt (2), und wird als Anti-Aging-Protein bezeichnet. Kurz nach dieser Entdeckung in Mäusen wurde das Klotho-Gen (*KL*) auch bei Menschen nachgewiesen, mit 80 % Homologie zur Maus-DNA (9). Bei Menschen konnte eine Korrelation zwischen niedrigen Serum-Klotho-Leveln und erhöhter Mortalität gezeigt werden (10).

Seit der Entdeckung 1997 wurden eine Vielzahl von alters-assoziierten Pathologien untersucht, in die Klotho-Signalwege involviert sind. Dazu gehören Nierenerkrankungen, Krebserkrankungen und neurologische Erkrankungen (11, 12). Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über den Aufbau und die Funktionen Klothos.

2.1.1 Grundlagen der Struktur Klothos

Zur Familie der Klotho-Proteine zählen drei Transmembran-Proteine. Neben dem nachfolgend beschriebenen α -Klotho (in dieser Arbeit nur Klotho genannt), gibt es β -Klotho und γ -Klotho (13, 14). Sie werden zu einer Familie gezählt, da sie eine ähnliche Struktur aufweisen und die Aminosäure-Sequenzen Homologien zu Klotho zeigen (13, 14). β -Klotho und γ -Klotho werden in anderen Geweben exprimiert als Klotho und haben vermutlich abweichende Funktionen (15). Während die Funktionen von γ -Klotho noch weitgehend unbekannt sind, ist β -Klotho, ähnlich wie Klotho, in die Signalwege der *Fibroblast Growth Factors* (FGF) involviert, vor allem in die von FGF19 und FGF21 (16).

Das *KL*-Gen befindet sich auf Chromosom 13 und kodiert für ein Typ-I-Transmembran-Protein von ca. 135 kDa. Nach einem Signalpeptid am N-Terminus folgen ein extrazellulärer Teil von 130 kDa und kleine trans- und intrazelluläre Domänen (17). Der extrazelluläre Teil besteht aus zwei Domänen mit homologen Sequenzen, KL1 und KL2. Zu Klothos post-translationalen Modifikationen gehört z. B. die Glykosylierung und die enzymatische Abspaltung von der Membran (18). Zwischen den Domänen KL1 und KL2, sowie im juxtamembranären Bereich,

befinden sich Schnittstellen für Proteasen. Der Schnitt zwischen Membran und KL2 wird α -Cut genannt, der Schnitt zwischen KL2 und KL1 β -Cut (19). Durch Prozessierung membrangebundenen Klothos (*fl*-Klotho = *full-length* Klotho) können also folgende Produkte entstehen: lösliches KL1 (s-KL1 = *soluble* KL1), lösliches KL2 (s-KL2 = *soluble* KL2) und das komplette lösliche Klotho (s-Klotho = *soluble* Klotho), wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt (18). KL2 kann an der Membran verbleiben. Die löslichen Formen sind im Serum, Urin oder *Liquor cerebrospinalis* (CSF, Cerebrospinale Flüssigkeit) zu finden (10, 18, 20). Zusätzlich zu s-KL1 und s-KL2 wurden kleinere Klotho-Fragmente, z. B. von ca. 30 kDa in CSF beschrieben, allerdings noch nicht weiter charakterisiert (19).

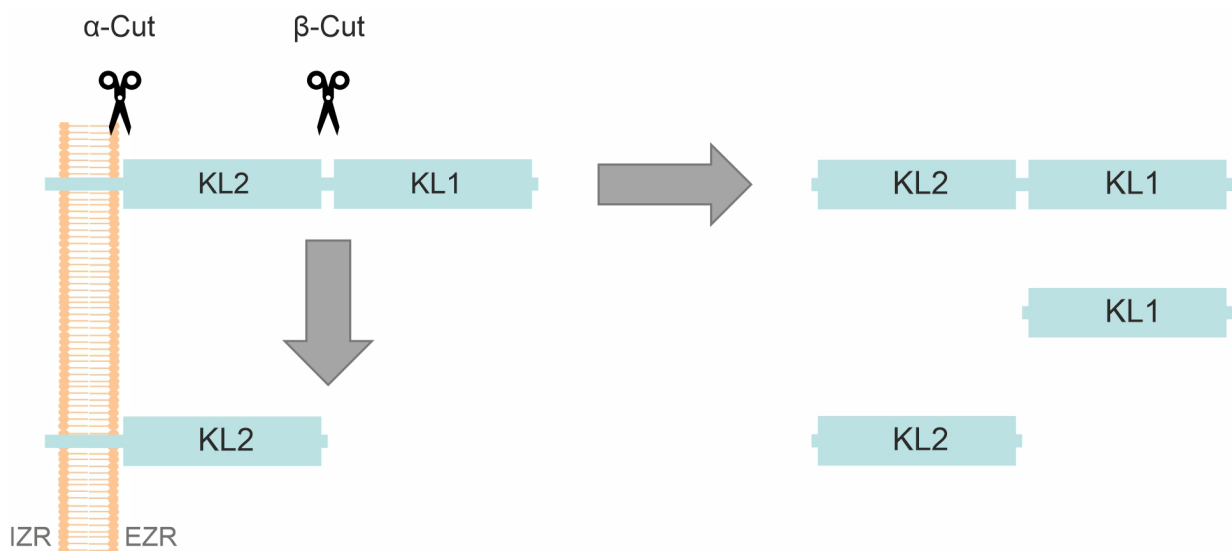


Abbildung 2: Prozessierung von *fl*-Klotho. Schematische Darstellung. Auf der linken Seite ist membrangebundenes *fl*-Klotho dargestellt. Die Scheren markieren den α - und den β -Cut. Durch die Schnitte und deren Kombination können folgende Produkte entstehen: auf der rechten Seite dargestellt, von oben nach unten s-Klotho, s-KL1 und s-KL2 und auf der linken Seite membrangebundenes KL2. IZR=Intrazellulärraum, EZR=Extrazellulärraum (modifiziert nach (21)).

2.1.2 Prozessierung durch α -, β - und γ -Sekretasen

Die α -Sekretasen *A Disintegrin And Metalloprotease 10 und 17* (ADAM10 und ADAM17) (19) und die β -Sekretase *β -APP Cleaving Enzyme 1* (BACE1) sind Sekretasen, die die extrazelluläre Prozessierung Klothos durchführen (5). Nachdem ADAM10, ADAM17 und BACE1 den extrazellulären Teil spalten, kann der zurückbleibende membrangebundene Teil von der γ -Sekretase abgebaut werden (5). Diese Sekretasen sind auch für die enzymatische Prozessierung des *Amyloid Precursor Proteins* (APP) verantwortlich (siehe 2.1.8.).

Chen und Kolleg*innen detektierten die genauen Schnittstellen für den α - und β -Cut durch ADAM10 und ADAM17 (21, 22). Nach Analysen vieler bekannter ADAM10 und ADAM17 Schnittstellen in Kombination mit der Klotho-Sequenz sagten sie mögliche Schnittstellen

vorher. Sie ließen Klotho-Varianten mit Veränderungen an den vorhergesagten Schnittstellen in Zellen exprimieren und analysierten die Prozessierung durch ADAM10 und ADAM17. α - und β -Cut scheinen voneinander abhängig zu sein, da sich die Veränderung einer der beiden Schnittstellen hemmend auf die Prozessierung an der anderen Schnittstelle auswirkt (22). Wie sich die Rollen von ADAM10 und ADAM17 unterscheiden ist noch nicht abschließend geklärt (4).

Durch die veränderten ADAM-Schnittstellen konnte die Prozessierung jedoch nicht vollständig unterbunden werden, möglicherweise aufgrund der zusätzlichen Prozessierung durch andere Proteasen, wie BACE1 (22). Die Schnittstelle für BACE1 ist nicht bekannt. (5, 4).

2.1.3 Lösliches Klotho durch Alternatives Spleißen

Neben löslichen Klotho-Fragmenten als Produkt enzymatischer Prozessierung wurde zusätzlich die Produktion löslichen KL1 vermutet, welches ohne Transmembrandomäne translatiert wird und durch alternatives Spleißen entsteht. Alternatives Spleißen ist ein Mechanismus bei der Transkription durch den aus einem Gen unterschiedliche *messenger* RNAs (mRNA) entstehen können. Für das *KL*-Gen wurde, neben der mRNA aus der fl-Klotho entsteht, eine weitere mRNA entdeckt, die durch alternatives Spleißen entsteht (17). Ursprünglich ging man davon aus, dass daraus ein lösliches Protein entsteht, sp-KL1 (*spliced* KL1), das ca. 65 kDa groß ist und die Aminosäuren der KL1-Domäne besitzt, lediglich mit unterschiedlichem C-Terminus (17). 2015 wurde diese Hypothese durch die Funde von Masso und Kolleg*innen bestärkt. Mit einem Antikörper, der gegen die Sequenz gerichtet ist, die KL1 und sp-KL1 unterscheiden soll, wiesen sie Proteine im Gehirn von Mäusen durch Western-Blot-Analysen nach (23).

Neue Erkenntnisse aus der mRNA-Forschung legen jedoch nahe, dass die sp-KL1-mRNA ein Ziel des Kontrollmechanismus *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) ist und nicht transkribiert wird. Dieser Mechanismus ist für den Abbau von fehlerhafter mRNA verantwortlich, wenn diese, beispielsweise durch Mutationen, vorzeitige Stoppcodons (PTC, engl. *Premature Termination Codons*) aufweisen. NMD findet allerdings nicht bei allen Stoppcodons statt, sondern nur unter bestimmten Bedingungen. Eine bekannte Voraussetzung ist, dass sich das vorzeitige Stoppcodon mehr als 50 Basenpaare (bp) vor einer Exon-Exon-Grenze befindet (24). In der sp-KL1-mRNA befindet sich ein solches vorzeitiges Stoppcodon am Ende des dritten von fünf Exons, und somit vor der Transmembrandomäne, weshalb ursprünglich vermutet wurde, dass ein lösliches Klotho-Fragment entsteht. Die neuen Erkenntnisse über NMD lassen vermuten, dass sp-KL1 nicht transkribiert wird, sondern NMD unterliegt (25). Die Ergebnisse von Mencke und Kolleg*innen unterstützen diese Vermutung. Sie zeigten, dass sp-KL1-mRNA in *P-bodies* zu finden ist, in

denen die mRNA abgebaut wird. Zusätzlich fanden sie bei NMD-Inhibition vermehrte sp-KL1-mRNA in den Zellen (26). Diese Hypothese wird durch eine weitere Studie unterstützt, die einige der Erkenntnisse von Masso und Kolleg*innen (23) diskutiert und widerlegt (27). Möglicherweise trägt die nicht-transkribierte mRNA zur Regulation der Proteinexpression bei (26). Passend zu dieser Hypothese waren *in vivo* und *in vitro* Nierenschäden mit niedrigen fl-Klotho-Levels und hohen sp-KL1-mRNA-Levels assoziiert (26).

2.1.4 Expressionsorte und Regulation

Während die löslichen Formen in vielen Körperflüssigkeiten wie Blut, CSF und Urin zu finden ist, beschränkt sich die starke Expression membrangebundenen Klothos auf wenige Organe. Als Gewebe mit hoher Klotho-Expression gelten die Niere, der *Plexus choroideus*, die Nebenschilddrüse und der Sinusknoten (28). Die Expression in geringerem Ausmaß wird in einer Vielzahl weiterer Gewebe beschrieben, darunter Neuronen, *Placenta*, Skelettmuskel oder Schilddrüse (2, 28). Die Niere gilt als Hauptproduzent für lösliche Klotho-Varianten in Serum und Urin und reguliert die Klotho-Clearance (29, 30). Die Expression in der Niere findet an unterschiedlichen Stellen statt, z. B. im proximalen und distalen Tubulussystem (31, 28). Mäuse, bei denen die Klotho-Expression ausschließlich in der Niere unterdrückt ist, entwickeln einen Phänotyp, der den *kl/kl* Mäusen gleicht. Zusätzlich sinken die Serumlevels s-Klothos im Vergleich zu Kontrollmäusen um 80 % (29). Bei Menschen sank die Konzentration s-Klothos nach unilateraler Nephrektomie um 30 % im Vergleich zu Werten vor der Operation (32).

Die Expression von Klotho wird über verschiedene Wege reguliert. Bereits in den ersten postnatalen Tagen wurde eine Feinregulierung der Klotho-Expression in Ratten beschrieben, mit kontrolliertem Abfallen und Ansteigen der Expression (33). Ein Mechanismus der Epigenetik, der die Expression von Proteinen beeinflusst, ist die DNA-Methylierung (34). Die Methylierung erfolgt durch DNA-Methyltransferasen an CpG-Dinukleotiden (Cytosin-Phosphatrest-Guanin) (34). DNA-Methylierung im der Promotor Region ist einer der bekannten Regulierungsmechanismen, der die Expression von Klotho reduziert (35, 36). Im Bereich des Klotho-Promotors befindet sich eine sogenannte (sog.) CpG-Insel, in der eine hohe Dichte von CpG-Dinukleotiden vorliegt (35). Durch demethylierende Substanzen konnte eine gesteigerte Klotho-Expression erzielt werden (35). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die verminderte Klotho-Produktion im Alter sein. So wurde bei Rhesusaffen im Alter weniger Klotho in der weißen Substanz entdeckt und dies korrelierte mit vermehrter Promotor-Methylierung (36). Die DNA-Methylierung könnte auch im Zusammenhang mit der verminderten Klotho-Expression bei Zuständen von Neuroinflammation stehen, wie z. B. bei neurodegenerativen Erkrankungen (37, 38). Urämische Toxine, wie die proteingebundenen Toxine Indoxylsulfat and P-cresylsulfat, die bei Nierenschäden vermehrt im Blut vorliegen,

scheinen die Expression von DNA-Methyltransferasen zu steigern. Diese senken dann über DNA-Methylierung ebenfalls die Klotho-Expression (37). Auch bei kolorektalen- und Cervixkarzinomen wurde ein Zusammenhang zwischen vermehrter Promotor-Methylierung und verminderter Klotho-Expression beschrieben (39, 40).

Unabhängig von der DNA-Methylierung können Sexualhormone die Klotho-Expression beeinflussen, so wurden bei Männern höhere Klotho-Konzentrationen in CSF nachgewiesen (20, 41). Eine mögliche Erklärung ist, dass Testosteron, welches auch mit dem Alter abnimmt, die Klotho-Expression über Androgenrezeptoren induziert. Weibliche Sexualhormone scheinen einen umgekehrten Effekt zu haben (9, 41, 42).

Vermehrte Klotho-Expression kann z. B. auch durch körperliche Aktivität erreicht werden (43).

2.1.5 Funktion auf zellulärer Ebene

Zu Klothos Einflussbereichen auf Proteinebene gehören der FGF23-Signalweg, die Unterdrückung der *Insulin/Insulin-like growth factor 1* (IGF1)- und Wnt-Signalwege, sowie die Regulation der Calcium- und Phosphathomöostase (3). Besonders erforscht ist die Rolle Klothos im FGF23-Signalweg. Membrangebundenes Klotho und s-Klotho können als Korezeptor für FGF23 an den FGF-Rezeptoren FGFR-1, -3 und -4 agieren (44). FGF23-*knockout* Mäuse ähneln den *kl/kl* Mäusen (45, 46). Über den FGF23-Signalweg wird Vitamin-D herabreguliert und die Ausscheidung von Phosphat gefördert (45). Vor allem Phosphatretention scheint eine große Rolle beim Alters-Phänotyp beider Mausmodelle zu spielen, denn das Senken der Phosphat-Spiegel in diesen Tieren, z. B. durch phosphatarmer Ernährung, lindert die Ausprägung des Alters-Phänotypen (45).

Kuro-o und Kolleg*innen beschrieben bei der Entdeckung von Klotho eine strukturelle Ähnlichkeit Klothos zu Glykosidasen (2). Die Aktivierung des Calcium-Kanals „Transient-Rezeptor-Potential-Kationenkanals der Unterfamilie V, Suptyp 5“ (TRPV5) wurde ebenfalls durch die schwache Glykosidaseaktivität Klothos erklärt (47). Im Widerspruch dazu stehen neue Kristallstrukturanalysen des Klotho-FGF23-FGFR-Komplexes, die zeigen, dass Klotho in diesem Komplex nicht als Glykosidase agieren kann (44). Analysen von Zhong und Kolleg*innen deuten darauf hin, dass Unterschiede in der posttranslationalen Modifikation, wie Glykosylierungen, die Funktionen Klothos als FGF23-Korezeptor und als Glykosidase definieren (48). Klotho könnte dementsprechend entweder als FGF23-Korezeptor oder als Glykosidase agieren, je nach Zustand der Glykosylierungen. Ob und inwieweit Klotho über Glykosidaseaktivität verfügt, ist Gegenstand aktueller Forschung. Welche Funktionen KL1 und KL2 alleine übernehmen wird ebenfalls noch untersucht.

2.1.6 KL-Varianten bei Menschen

Bei der Analyse des menschlichen Klotho-Genes wurden verschiedene Genvarianten (Polymorphismen) detektiert, die auch Auswirkungen auf die Funktionen Klothos haben (3). Der bekannteste Polymorphismus ist die Variante KL-VS und besitzt 6 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, engl. *Single Nucleotide Polymorphism*), also Veränderungen einzelner Basenpaare, die zusammen auftreten (49). Zwei dieser SNPs führen dazu, dass an zwei Stellen ein Austausch von Aminosäuren durch Valin (V) und Serin (S) stattfindet. Diese Modifikationen führen zu veränderten biochemischen Eigenschaften Klothos, und folglich zu veränderten Interaktionen mit anderen Proteinen, was beispielsweise auch den Abbau Klothos verändert (25). KL-VS tritt in hetero- und homozygoter Form auf (49). Bei heterozygoten Tragenden des KL-VS-Allels zeigte sich mehr lösliches Klotho im Serum, verglichen mit Nicht-KL-VS-Tragenden; paradoxerweise war bei KL-VS-homozygoten Personen weniger Klotho im Serum zu finden (50, 51).

Der hetero- und der homozygote Genotyp korrelieren mit gegensätzlichen Beobachtungen bei betroffenen Individuen. Die heterozygote Form scheint mit einem verlängerten Leben, im Vergleich zu Nicht-KL-VS-Tragenden, assoziiert zu sein, während es eine Korrelation zwischen der homozygoten Form und verkürzter Lebenszeit gibt (49). Gleichartige Auswirkungen konnten auf kardiovaskuläre Erkrankungen gezeigt werden, mit vermindertem Risiko für diese Erkrankungen bei heterozygoten KL-VS-Tragenden und erhöhtem Risiko bei homozygoten KL-VS-Tragenden (52, 53).

Effekte auf die kognitiven Leistungen betroffener Individuen werden diskutiert. Individuen mit der heterozygoten KL-VS-Variante schienen verbesserte kognitive Leistungen aufzuzeigen, während KL-VS-homozygote Personen schlechtere Leistungen erzielten, als Personen ohne KL-VS Variante (54, 50). Der Effekt von KL-VS auf die Kognition konnte in der kürzlich veröffentlichten Studie von Müller und Kolleg*innen nicht bestätigt werden, passend zu den Daten einer dänischen Kohorte von 2016 (55, 56). Unabhängig vom KL-VS-Polymorphismus ist Klotho in viele zentralnervöse Prozesse involviert.

2.1.7 Klotho und das Gehirn

Bereits bei der ersten Klotho-Entdeckung von Kuro-o wurden Veränderungen in den Gehirnen der *kl/kl* Mäuse beschrieben. Diese Mäuse zeigten ein Parkinson-ähnliches Gangbild und eine verminderte Zahl von Purkinje-Zellen im Cerebellum, im Vergleich zu wildtypischen Tieren (2).

Klotho wird im Gehirn hauptsächlich vom Epithel des *Plexus choroideus* produziert (57–59). Der *Plexus choroideus* befindet sich in den inneren Liquorräumen und ist für die Produktion von CSF verantwortlich, der Flüssigkeit, die Gehirn und Rückenmark umgibt. Klotho wird vom

Plexus choroideus in CSF sezerniert (18). In geringerem Maße als im *Plexus choroideus* konnte die Expression Klothos im *Hippocampus* von Mäusen gezeigt werden (50, 60, 61). Auf zellulärer Ebene wurde die Expression in Neuronen, prä- und postsynaptisch, und in Gliazellen nachgewiesen (33, 62). Auch bei Menschen findet sich Klotho in CSF und der Groß- und Kleinhirnrinde (20, 63).

Klotho hat einen neuroprotektiven Effekt. Neben Zellkultur- und Mausstudien weisen Korrelationen von niedrigen Klotho-Levels im zentralen Nervensystem (ZNS) und in CSF mit neurologischen Erkrankungen darauf hin (20, 60, 64). In CSF von Patient*innen mit schubförmig remittierender Multipler Sklerose (RRMS), der häufigsten initialen Form von Multipler Sklerose (MS), wurden verminderte Klotho-Levels gezeigt (64). Zusätzlich korrelierten die niedrigen Konzentrationen mit der Symptomatik der Patient*innen, gemessen mit der *Expanded Disability Status Scale* (EDSS). Auch bei Patient*innen mit Temporallappen-Epilepsie wurde eine verminderte Klotho-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe entdeckt (60). Die mRNA-Analysen von *Hippocampus*-Gewebe wurde dabei mit Kontroll-Geweben verglichen. Die Rolle von Klotho bei Morbus Alzheimer wird in 2.1.8 diskutiert.

Die genauen Mechanismen, die die Wirkung von Klotho auf das ZNS erklären, sind nicht bekannt. Die folgenden Abschnitte geben eine Übersicht über die bis zum jetzigen Zeitpunkt bekannten Effekte, die mit reduziertem oder gesteigertem Klotho-Angebot assoziiert sind. Tabelle 1 fasst diese Effekte zusammen.

Tabelle 1: Klotho-assoziierte Wirkungen auf das Gehirn. Auszug von Veränderungen, die bei Klotho-Überexpression oder Klotho-knock-out *in vivo* und *in vitro* beobachtet wurden.

Assoziation Klothos mit	Zelluläre Mechanismen
Neuroplastizität	Synapsen-Anzahl und Morphologie (58, 65)
	Neurogenese, über neuronale Stammzellen (66)
	Langzeitpotenzierung, über NMDAR-Untereinheit (50, 67, 68)
Neuroprotektion	Schutz vor oxidativem Stress (69, 70)
Gliazellen und Plexus choroideus	Oligodendrozyten-Reifung und Myelinisierung (71, 72)
	Neuronen-Astrozyten-Kommunikation (62)
	Calcium-Homöostase in CSF, Regulation im <i>Plexus choroideus</i> (57)
	Regulierung des Immunsystems im <i>Plexus choroideus</i> (73)

2.1.7.1 Neuroplastizität und Kognition

Nagai und Kolleg*innen veröffentlichten 2003 die Entdeckung, dass *kl/kl* Mäuse ab dem Alter von 7 Wochen kognitive Defizite aufweisen und dadurch schlechter in Verhaltenstestungen abschneiden, was seitdem mehrfach bestätigt wurde (66, 70, 74). Auf zellulärer Ebene präsentierten die *kl/kl* Tiere Neurodegeneration in Form von reduzierter Synapsenanzahl im Hippocampus und strukturellen Unterschieden der Neuronen, im Vergleich zu wildtypischen Tieren (58, 65). Eine verminderte Zahl neuronaler Vorläuferzellen gab Hinweise darauf, dass Klotho in die Neurogenese involviert ist (66). Durch Klotho-Überexpression in Mäusen konnten entsprechend gegenläufige Ergebnisse erzielt werden: Klotho-überexprimierende Mäuse zeigten in Verhaltenstests ein besseres Erinnerungsvermögen, vor allem des räumlichen Gedächtnisses (50, 66). Auch eine erhöhte Anzahl neuronaler Stammzellen wurde beobachtet (66). Die Überexpression von s-Klotho durch intrahippocampale und ventrikuläre Lentivirus-Injektionen bestätigten die Ergebnisse der Verhaltenstest (74, 68). Langzeitpotenzierung (LTP) ist einer der Mechanismen der synaptischen Plastizität, die auf zellulärer Ebene bei Lernvorgängen, die in den Verhaltenstests geprüft werden, stattfindet. Ein vermehrtes Klothoangebot führte bei Mäusen zu gesteigerter LTP, abhängig vom N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor und dessen veränderter Untereinheit GluN2B (50, 67, 68).

2.1.7.2 Oxidativer Stress und Apoptose

Klotho fördert nicht nur die Entstehung von Nervenzellen und die synaptische Übertragung, es wirkt auch neuroprotektiv (75). Erneut brachte die Untersuchung von Klotho-defizienten Mäusen neue Erkenntnisse: Gehirne von *kl/kl* Mäusen sind anfälliger für oxidativen Stress, z. B. in Form von DNA-Schäden in Hippocampi, bereits zwei Wochen vor Auftreten der kognitiven Defizite (70). Bei Klotho-Abwesenheit wurden zusätzlich vermehrt proapoptotische Proteine, wie Bax, und vermindert antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 nachgewiesen (65, 70). Die zellulären Schäden und kognitiven Defizite konnten durch Injektion des Antioxidans α -Tocopherol reduziert werden (70). Eine vermehrte Expression von Klotho korreliert äquivalent dazu mit dem Schutz vor oxidativem Stress *in vivo* und *in vitro* (69, 76). So hatte eine Vorbehandlung von hippocampalen Mausneuronen mit Klotho einen schützenden Effekt vor neurotoxischem Glutamat und oligomerem Amyloid- β (A β). Die vorbehandelten Zellen reagierten mit einer gesteigerten Produktion antioxidativer Enzyme (75).

2.1.7.3 Nicht-neuronale Strukturen

Gliazellen kommen als weitere Zellart neben Neuronen im Nervensystem vor und sind z. B. in die Myelinbildung, die Immunabwehr und den neuronalen Stoffwechsel involviert. Auch auf sie wirkt sich eine fehlende Klotho-Expression aus. In *kl/kl* Mäusen waren Myelin und

Oligodendrocytenzahl reduziert, verglichen mit wildtypischen Mäusen (71), während eine Überexpression *in vitro* mit vermehrter Reifung von Oligodendrocyten-Vorläufer-Zellen einhergeht und deren Differenzierung und Myelinisierung fördert (71).

Klotho-Überexpression zeigte in einem Multiple Sklerose Mausmodell vermehrte Remyelinisierung nach induzierter Demyelinisierung, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit unveränderten Klotho-Konzentrationen (72).

Außerdem könnte Klotho die Kommunikation von Neuronen mit Astrozyten beeinflussen (62). *In vitro* wurde durch den Neurotransmitter Glutamat mehr s-Klotho aus Neuronen freigesetzt. Vermehrtes s-Klotho kann dann in Astrozyten unter anderem die Lactat-Freisetzung stimulieren, welches von den Neuronen aufgenommen und verstoffwechselt wird (62).

Im Plexus choroideus, dem Hauptexpressionsort Klothos im Gehirn, scheint Klotho den Calcium-Haushalt mit zu beeinflussen, in Analogie zur Niere (57). Weiterhin könnte Klotho an dieser Stelle in die Immunabwehr des zentralen Nervensystems eingreifen. Transgene Mäuse, die ausschließlich im Plexus choroideus kein Klotho exprimieren, zeigen vermehrte Entzündungsaktivität, wie die Einwanderung von Makrophagen in das zentrale Nervensystem und vermehrte Aktivierung von Mikroglia im Hippocampus (73, 47).

2.1.8 Morbus Alzheimer

2.1.8.1 Morbus Alzheimer Pathologie

Mit dem Alter erhöht sich das Risiko für dementielle Erkrankungen, was in unserer alternden Bevölkerung eine Herausforderung für die Gesellschaft darstellt. Die WHO veröffentlichte 2019, dass schätzungsweise 55,2 Millionen Menschen weltweit von Demenzen betroffen sind, 2050 könnten es 139 Millionen Menschen sein (77). Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung und die häufigste Form der dementiellen Erkrankungen. Trotz der großen Prävalenz und intensiver Forschung ist weder die genaue Pathophysiologie, noch eine kurative Therapie bekannt (78). Während zu Beginn der Erkrankung kognitive Defizite im Vordergrund stehen, kommen im Verlauf neurologische Symptome wie Harn- oder Stuhlinkontinenz oder depressive Verstimmungen hinzu, die für die Betroffenen sehr belastend sind (78).

Ein wichtiger Risikofaktor ist das Vorhandensein des E4 Alleles des *APOE*-Genes, welches für das Apolipoprotein E (ApoE) kodiert (79). Die Allele E2, E3 und E4 sind bekannte Polymorphismen des Genes. Tragende des E4 Alleles haben ein erhöhtes Risiko an Alzheimer zu erkranken, während das Allel E2 mit einem reduzierten Risiko einhergeht (80).

Histologisch sind extrazelluläre Amyloid-Ablagerungen in Form von sog. Plaques und intrazelluläre Neurofibrillen aus Tau-Proteinen mit der Alzheimer-Demenz assoziiert (78, 79). Die prominente Amyloid-Hypothese beschreibt einen mutmaßlichen Pathomechanismus. Sie besagt, dass das *Amyloid-Precursor-Protein* (APP) durch Sekretasen gespalten wird und dabei Amyloid- β (A β) entstehen kann. Bei der Spaltung werden der amyloidogene und der nicht-amyloidogene Weg unterschieden. Beim amyloidogenen Weg wird APP durch die β -Sekretase BACE-1 und dann durch den γ -Sekretase-Komplex prozessiert, wodurch *soluble* APP β (sAPP β) und A β entstehen. Beim nicht-amyloidogenen Weg findet zuerst ein Schnitt durch die α -Sekretase ADAM10 in der A β -Sequenz statt, wodurch lösliches sAPP α entsteht. Ein Ungleichgewicht zwischen Entstehung und *Clearance* (dt. Ausscheidung) des A β -Peptides führt zu einer Akkumulation der löslichen A β -Peptide und der abgelagerten Plaques und zur Neurodegeneration (78).

Klotho und APP ähneln sich in Struktur und Spaltung (5). Am Beispiel von APP wird deutlich, dass durch die Prozessierung durch unterschiedliche Enzyme verschiedene Fragmente mit konträren Wirkungen entstehen können. Von Klotho sind zwar einige Schnittstellen bekannt, über die dabei entstehenden Fragmente gibt es allerdings noch große Wissenslücken (4).

2.1.8.2 Verbindung von Klotho zu Morbus Alzheimer

Altern gilt als größter Risikofaktor für die Entwicklung einer Alzheimer-Demenz (81). Da altersähnliche Phänotypen und kognitive Einschränkungen typische Auffälligkeiten von *kl/kl*-Mäusen sind (2, 70), liegt die Frage nach einer Verbindung nahe. Außerdem nehmen die Klotho-Levels im Gehirn mit dem Alter ab, was in Maus-, Ratten- und Rhesusaffen-Gehirnen, sowie im Plexus choroideus von Mäusen beschrieben wurde (82, 23, 73). Im Menschen ermittelten Semba und Kolleg*innen 2014 eine verminderte Konzentrationen von löslichem Klotho in CSF von an Morbus Alzheimer Erkrankten im Vergleich zu Erwachsenen ohne kognitive Einschränkungen (20). Passend dazu war in den Hippocampi von transgenen Mäusen, die humanes APP (hAPP) exprimieren, weniger Klotho nachweisbar als in wildtypischen Mäusen (83).

Weiterhin wurden bei Tragenden des KL-VS-Polymorphismus schützende Effekte in Bezug auf die Alzheimer-Pathologien nachgewiesen. Heterozygote KL-VS-Tragende präsentierten im Vergleich zu Nichttragenden weniger Amyloid-abhängige Tau-Akkumulation und weniger Gedächtniseinschränkungen (84). Besonders in Kombination mit dem Risikofaktor ApoE4 zeigte sich der schützende Einfluss des KL-VS-Polymorphismus. In einer Studie mit asymptomatischen KL-VS-Heterozygoten, sowie Tragenden des ApoE4 Allels wurde ein protektiver Effekt von heterozygotem KL-VS festgestellt (85). Während bei Individuen ohne KL-VS-Allele ApoE4-Tragende eine höhere A β -Belastung aufwiesen als nicht ApoE4-

Tragende, zeigten KL-VS-Tragende mit und ohne ApoE4 gleiche A β -Levels. In einer Meta-Analyse konnte bestätigt werden, dass asymptotische Tragende des ApoE4-Allels, die gleichzeitig heterozygote KL-VS-Tragende sind, weniger A β zeigen im Vergleich zu nicht KL-VS-Tragenden (86).

In Alzheimer-Mausmodellen wurde ein schützender Einfluss von Klotho auf die Kognition gezeigt. Eine Verbesserung der kognitiven Leistungen wurde in bereits genannten hAPP-Mäusen, die zusätzlich Klotho überexprimierten, gesehen, im Vergleich zu Mäusen mit normalen Klotho-Levels (83). Verstärkte synaptische Plastizität, abhängig von der NMDA-Rezeptor-Untereinheit GluN2B, die vermehrt in der postsynaptischen Verdichtung vorkam, bildete die verbesserten kognitiven Leistungen auf zellulärer Ebene ab (83). Effekte auf A β - und Tau-Levels wurden nicht beobachtet (83).

In einem anderen Ansatz verwendeten Zhao und Kolleg*innen das APP/Presenilin1 (PS1) Alzheimer-Mausmodell und induzierten die vermehrte Klotho-Expression durch zweimalige Lentivirus-Injektionen in die Seitenventrikel (87, 59). Mehr Klotho im Gehirn führt auch in diesem Modell, verglichen mit Mäusen mit natürlicher Klotho-Expression, dazu, dass die Mäuse in Verhaltenstests besser abschnitten. Zusätzlich wurden in den Gehirnen dieser Mäuse sowohl weniger A β -Plaques, als auch weniger lösliches A β nachgewiesen. Die Autor*innen vermuten, dass Klotho die A β -Clearance fördert. Diese Hypothese unterstützend, sahen sie sowohl *in vitro*, in einem Modell der Blut-CSF-Schranke, als auch *in vivo*, dass mehr Klotho mit vermehrter Expression von A β -Transportern korrelierte (59). Unter anderem wurden die an der A β -Clearance beteiligten Proteine *low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) und das P-glycoprotein (P-gp), (88, 89) unter Klotho-Anwesenheit vermehrt exprimiert, entsprechend unter Klotho-Abwesenheit weniger.

Umgekehrt könnte die Klotho-Expression durch sAPP β , welches neben A β beim amyloiden Weg entsteht, hochreguliert werden (90).

Auf andere Demenzformen scheint Klotho ebenfalls einen Effekt zu haben. Transgene Mäuse, die humanes α -Synuklein exprimieren, profitierten von einem gesteigerten Klotho-Angebot. Diese Mäuse entwickeln ein Krankheitsbild, das dem der Lewy-Body-Demenz ähnlich ist, und periphere Injektion von Klotho konnte motorische und kognitive Defizite verbessern (68).

2.1.9 Klotho und die Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) trennt das zentrale Nervensystem vom Blutkreislauf, und schützt es z. B. vor Pathogenen und schädigenden Substanzen. Über spezielle Transporter findet dennoch ein Austausch mit der Peripherie statt (91). Ob s-Klotho oder Fragmente auf diesem Weg die BHS passieren können ist noch ungeklärt (47, 38).

Dass lösliches Klotho via Transzytose unidirektional durch Barrieren geschleust werden kann, wurde bereits am Beispiel der Niere *in vitro* und *in vivo* untersucht (30). Für eine Interaktion von peripherem Klotho mit dem zentralen Nervensystem spricht, dass erhöhte Klotho-Konzentrationen in der Peripherie mit weniger kognitiven Beeinträchtigungen einhergehen (92). Weiterhin korrelierten in einer Studie die Klotho-Levels in Serum und CSF (93)(93). Bei Mäusen, die einer 5/6 Nephrektomie unterzogen wurden und daraufhin kognitive Einschränkungen aufwiesen, war weniger Klotho im Frontallappen messbar, verglichen mit einer Kontrollgruppe ohne reduzierte Nierenfunktion (94). Leon und Kolleg*innen stellten fest, dass intraperitoneal injiziertes s-Klotho in Mäusen sich positiv auf deren kognitiven Fähigkeiten auswirkt und die Langzeitpotenzierung fördert (68). Gegen einen Transport, zumindest von s-Klotho spricht, dass in den Gehirnen dieser behandelten Mäuse das rekombinante s-Klotho nicht detektiert werden. Auch in einem Versuch mit radioaktiv markiertem s-Klotho, das peripher in Mäuse injiziert wurde, konnte kein Transport über die BHS gemessen werden (30).

2.1.10 Klotho und die Nieren

Für die Gesundheit der Nieren, den Hauptproduzenten peripheren Klothos, scheint Klotho von Relevanz zu sein. Durch Schädigung der Nieren sinkt die Klotho-Expression. Hypoxie-induziertes Nierenversagen bei Mäusen korreliert mit niedrigen Klotho-Levels in Serum und Urin, im Vergleich zur Kontrollgruppe (31). Die Zugabe von rekombinantem s-Klotho wirkt nephroprotektiv bei Nierenschäden, die durch Hypoxie induziert wurden (3, 31, 95). Da Klothos Serum-Konzentrationen mit der Nierenfunktion korrelieren wird eine Rolle Klothos als Biomarker bei chronischer Niereninsuffizienz diskutiert (95, 4).

In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass chronische Niereninsuffizienz als Risikofaktor für kognitive Defizite gilt und mit niedrigen Klotho-Levels einhergeht (95, 96). Serum-Klotho-Levels korrelieren positiv mit kognitiver Leistung (38, 92, 93). Diese Korrelationen werfen die Frage nach einem Kausalzusammenhang auf. Momentan wird von einer multifaktoriellen Genese der kognitiven Defizite bei chronischer Niereninsuffizienz ausgegangen, mit dem Schwerpunkt auf vaskulären Pathologien. Dabei spielen Komorbiditäten wie z. B. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder Dyslipidämien eine Rolle (96). Inwieweit Klotho dabei eine Rolle spielt ist noch Gegenstand aktueller Forschung (95).

2.1.11 Klotho als Ziel möglicher Therapieansätze

Anti-Aging-Wirkung, gesteigerte kognitive Leistung, Schutz vor Demenz und chronischer Niereninsuffizienz – bei diesen Effekten stellt sich die Frage, wie sich Klotho klinisch anwenden lässt.

Klinische Studien, in denen ein vermehrtes Angebot von Klotho im Menschen induziert wird, wurden noch nicht durchgeführt. Die bereits beschriebenen Studien an Mäusen zeigten, dass verschiedene Applikationsformen denkbar sind. Sowohl die Zugabe von rekombinantem Klotho, als auch die vermehrte Klotho-Produktion über Lentivirus-Injektionen, demonstrierten beeindruckende neuroprotektive und kognitionsfördernde Effekte (68, 59). Die Injektion von rekombinantem Klotho wirkte zusätzlich nephroprotektiv (31). Auch Verfahren zur Verstärkung der endogenen Expression, wurden bereits an Mäusen angewendet. Über DNA-Demethylierung wurde Klotho vermehrt exprimiert und damit ein nephroprotektiver Effekt erzielt (95).

Welche Nachteile könnten mit einer vermehrten Verfügbarkeit einhergehen? Ein Fallbericht aus dem Jahr 2008 weist auf mögliche Folgen von einem Überschuss an Klotho hin: Brownstein und Kolleg*innen berichteten von einer Translokation, die mit erhöhten Klotho-Levels einhergeht und unter anderem zu erniedrigtem Serumphosphat und Skelettdeformitäten führen, ähnlich denen einer Rachitis (97). Auch der Zeitpunkt, zu dem Klotho appliziert wird, beeinflusst die Wirkung (3). In einer Studie zur Muskelkraft bei alten Mäusen, wurde durch eine Klotho-Injektion nur zu bestimmten Zeitpunkten eine Kraftsteigerung erzielt, während die tägliche Klotho-Injektion nachteilig war im Vergleich zu täglichen Kochsalzinjektionen (3).

Die Anwendung von rekombinantem Klotho bringt zusätzliche Probleme der Haltbarkeit mit sich. Rekombinantes Klotho ist sehr instabil, und wenn es wiederholt eingefroren und aufgetaut wird, reduziert sich die Aktivität (3). Eine ähnliche Instabilität wurde von endogenem Klotho im Urin berichtet (98).

Interessant bleibt, wie endogene Klotho-Levels feinreguliert und pathologisch beeinflusst werden. Neben Erkenntnissen über Einflüsse auf die Expression gilt es weiterhin, die enzymatische Prozessierung und Freisetzung löslichen Klothos zu untersuchen. Ein möglicher neuer Akteur in der Prozessierung könnte die Metalloprotease Meprin β sein.

2.2 Die Metalloprotease Mep1b

Mep1b (Mep1b) ist eine Metalloprotease, die eine Rolle bei vielen physiologischen sowie pathologischen Prozessen spielt (99). Im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Familie der Metalloproteasen, zu denen auch ADAM10 und ADAM17 zählen, war Mep1b zunächst wenig erforscht und wurde erst in den letzten Jahren gründlicher untersucht (99). Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Morbus Alzheimer, Karzinome und weitere Pathologien sind mit Mep1b assoziiert. Mögliche Substrate von Mep1b sind unter anderem Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6) (100), APP (101) oder FGF-19 (102), der mit β -Klotho interagiert (16).

Mep1b hat zwei aktive Formen. Es ist ein membrangebundenes Protein, kann aber durch andere Proteasen wie ADAM10 und ADAM17 von der Zellmembran geschnitten werden und liegt dann in löslicher Form vor (102). Sowohl in membrangebundener, als auch in löslicher Form kann Mep1b als Protease agieren. Beide Formen scheinen spezifische und teilweise unterschiedliche Substrate zu haben. Während z. B. APP und der Interleukin-6-Rezeptor (IL-6-R) ausschließlich von der membrangebundenen Form prozessiert werden (6, 103), wird Mucin 2, welches wichtig für die Ablösung des Mucus im Gastrointestinaltrakt ist, nur von der löslichen Form prozessiert (104).

2.2.1 Expression und Funktion von Mep1b

Ursprünglich wurde Mep1b im Gastrointestinaltrakt und in der Niere entdeckt und deshalb Mep1b genannt (*Metalloprotease from renin tissue*) (99). In der Niere wurde Mep1b am Bürstensaum an der apikalen Seite des proximalen Tubulus detektiert, an dem auch Klotho exprimiert wird (105–107). Im Verlauf wurde die Expression in weiteren Organen untersucht, so wurde Mep1b-RNA auch im Gehirn nachgewiesen (101, 108).

Mep1b spielt eine Rolle bei akuten und chronischen Entzündungsreaktionen (109). So werden unter anderem die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β , Interleukin-18 und Interleukin-6 unter Einfluss von Mep1b vermehrt exprimiert (110, 109). Auch der Interleukin-6-Rezeptor ist ein Substrat von Mep1b, wodurch Mep1b proinflammatorisch wirkt (103). Zusätzlich beeinflusst Mep1b die Leukozytenmigration, die im Rahmen entzündlichen Gewebeumbaus stattfindet (111). Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa sind ein Beispiel für Erkrankungen, bei denen diese Prozesse stattfinden (99).

Bei akutem Nierenversagen und substanzvermittelter Nephrotoxizität scheint Mep1b nierenschädliche Effekte zu vermitteln. Bei induzierten Nierenversagen in Mäusen wurde eine Umverteilung von Mep1b von der apikalen auf die basolaterale Seite der proximalen Tubuluszellen beobachtet (112, 113). An der basolateralen Membran fördert Mep1b dann

Entzündungsprozesse, indem es zum Abbau der Basalmembran beiträgt und Zell-Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin spaltet. Dadurch wird die Leukozyteninfiltration begünstigt (99, 113). Transgene Mäuse, die Mep1b nicht exprimieren, sind weniger anfällig für ein Nierenversagen nach Minderperfusion als wildtypische Mäuse (112, 114). Auch die Inhibierung von Mep1b mit dem Inhibitor Actinonin reduzierte hypoxische Nierenschäden (115). Die Abwesenheit von Mep1b führte in einem weiteren Modell des akuten Nierenversagens zu einer verbesserten Nierenfunktion, im Vergleich zu wildtypischem Mep1b. In diesem Modell wurde das Nierenversagen durch das nephrotoxische Chemotherapeutikum Cisplatin herbeigeführt (113). In diesem Zusammenhang ist ein Blick auf Cisplatin-induziertes Nierenversagen und Klotho spannend. In den ersten Tagen nach Cisplatin-induziertem Nierenversagen wurde in einer anderen Studie verminderte Klotho-Levels in Nierenlysaten gemessen (116).

Kürzlich wurde von Gindorf & Storck und Kolleg*innen gezeigt, dass Mep1b eine Rolle bei der Integrität der Bluthirnschranke spielt (117). *In vitro* führte die Überexpression von Mep1b dazu, dass *Tight-Junction*-Proteine von endothelialen Zellen reduziert wurden und die Zell-Barriere eines BHS-Modells eine erhöhte Permeabilität aufwies. Fehlende Mep1b Expression war mit einer gesteigerten Expression von *Tight-Junction*-Proteinen assoziiert. *In vivo* Analysen von Mep1b^{-/-}-Mäusen bestätigten, dass Mep1b die BHS-Integrität reguliert: verglichen mit wildtypischen Mäusen zeigten die Mep1b^{-/-}-Mäuse gesteigerte Levels von *Tight-Junction*-Proteine in Gehirnkapillaren, reduzierte Immunglobulin G (IgG)-Levels in CSF und Unterschiede im Hirnwassergehalt (117).

2.2.2 Mep1b und Morbus Alzheimer

Mep1b scheint bei der Pathogenese von Morbus Alzheimer beteiligt zu sein. In Gehirnen von Alzheimer-Patient*innen fand sich mehr Mep1b-mRNA als in einer nicht dementen Vergleichsgruppe (6, 108). Kürzlich wurden zusätzlich erhöhte Proteinlevels von Mep1b in den Gehirnen von Alzheimer-Patient*innen nachgewiesen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von Individuen, die nicht an Alzheimer erkrankt waren (118). Mep1b kann APP in ähnlicher Weise wie BACE1 schneiden und A β herstellen. Der Großteil der Schnitte durch Mep1b findet versetzt zum BACE1-Schnitt statt, sodass die A β -Peptide, die durch Mep1b entstehen (A β 2-x), sich von denen unterscheiden, die durch den BACE1-Schnitt entstehen (A β 1-x) (6, 119). Mep1b produziert also unabhängig von BACE1 A β -Peptide, die zusätzlich verstärkt zu Aggregation neigen, verglichen mit A β 1-x (120). Weiterhin kann APP durch Mep1b auch nicht-amyloidogen gespalten werden, sodass N-APP-Fragmente entstehen, die möglicherweise neuroprotektiv wirken (101, 121).

Marengo und Kolleg*innen bestätigten die APP-Prozessierung durch Mep1b *in vivo* (118). Sie generierten ein Alzheimer-Mausmodell, in dem die Mäuse eine mutierte hAPP Variante (APP-London = APP/lon) exprimieren und einen Mep1b-*knockout* besitzen. In Gehirnen der Mep1b-defizitären Mäuse waren die A β -Levels reduziert, verglichen zu den APP/lon Mäusen ohne Mep1b-*knockout*. In Verhaltenstests spiegelten sich die reduzierten A β -Levels wider. Die Abwesenheit von Mep1b verbesserte die Lernleistung der APP/lon-Mäuse.

2.2.3 Zusammenspiel von ADAM10, ADAM17 und Mep1b

Die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 spielen sowohl bei der Produktion von löslichem Klotho und sAPP α , als auch von löslichem Mep1b eine Rolle. Mep1b wiederum fördert die Aktivität von ADAM10 und ADAM17, indem es innerhalb der Prodomäne der ADAMs spaltet (102, 7). Dieser Prozess scheint nicht essentiell für die Aktivität der ADAMs zu sein, da ADAM10- und ADAM17-*knockout*-Mäuse nicht lebensfähig sind, Mep1b^{-/-}-Mäuse aber schon (7). Mep1b scheint also wichtig für die Feinregulierung der ADAMs zu sein (7). Interessant ist diese Erkenntnis auch in Bezug auf das Zusammenspiel der Proteasen bei gleichen Substraten wie APP oder IL-6-Rezeptor (7). Diese gegenseitige Regulierung der Proteasen muss beachtet werden, wenn die Substrate einzelner Proteasen untersucht werden sollen (109).

Hier lohnt sich ein erneuter Blick auf die Interaktion zwischen Mep1b und ADAM10 bei der Pathogenese von Morbus Alzheimer. Da Mep1b APP nur in der membranständigen Form prozessiert, kann ADAM10 neuroprotektiv wirken, indem es Mep1b von der Membran schneidet und so die Entstehung von A β 2-x verhindert, zusätzlich zu seiner Rolle beim nicht-amyloidogenen Weg (121).

2.3 Hinweise auf die Interaktion von Mep1b und Klotho

Mep1b und Klotho haben mehrere Schnittpunkte. Welche Hinweise gibt es, dass sie tatsächlich interagieren und dass Mep1b Klotho prozessieren könnte?

1. APP und Klotho werden beide von den gleichen Proteasen, α -, β - und γ -Sekretase, geschnitten. Für APP wurden zusätzliche Schnittmöglichkeiten von Mep1b entdeckt, für Klotho gibt es dazu bis dato keine Veröffentlichungen.
2. Mep1b und Klotho werden beide in der Peripherie in großen Mengen in der Niere exprimiert und wurden beide im Bürstensaum, apikal im proximalen Tubulus, nachgewiesen (107, 105). Außerdem werden beide im Gehirn exprimiert.
3. Korrelationen bei Pathologien: Mep1b spielt sowohl bei der Entstehung von Morbus Alzheimer, als auch beim akuten Nierenversagen eine Rolle, beides Prozesse bei denen Klotho in geringeren Mengen detektiert wird.

Für Mep1b wurden Aminosäure-Abfolgen beschrieben, an denen Mep1b präferiert schneidet (122). Auch in der Proteinsequenz Klothos finden sich mögliche Schnittstellen (Abbildung 3).

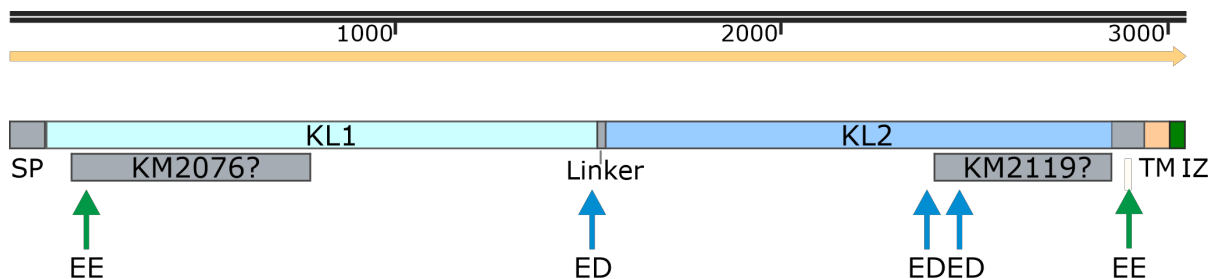


Abbildung 3: Potentielle Schnittstellen in Klotho durch Mep1b. Erstellt mit *SnapGene*. Schematische Darstellung der Klotho-Proteinsequenz. ED und EE markieren Aminosäuren, an denen bevorzugte Schnittstellen von Mep1b liegen (122), E = Glutaminsäure, D = Asparaginsäure. TM = Transmembran Domäne, IZ = intrazelluläre Domäne. KM2076 und KM2119 kennzeichnen die Bindungsstellen für die verwendeten Antikörper.

Möglicherweise prozessiert Mep1b Klotho in einer noch unbekanntenen Art, sodass Fragmente entstehen, die funktionelle Unterschiede zu den bis jetzt bekannten Arten aufweisen, analog zur Prozessierung von APP (4). Diese Interaktion ist vor allem von Bedeutung, sollten Mep1b-Inhibitoren in der Alzheimer-Therapie erprobt werden. Zusätzlich ist weiteres Wissen über die Prozessierung Klothos wichtig, da lösliches Klotho eine Vielzahl der Klotho-assoziierten Effekte vermittelt und weder die genauen Mechanismen der Prozessierung noch die exakten Spaltprodukte bekannt sind (4).

In der Analyse gilt es, zusätzlich auf die Interaktionen von ADAM10 und ADAM17, sowohl mit Mep1b, als auch mit Klotho zu achten. Es sollte also berücksichtigt werden, dass eine Änderung der Klotho-Levels durch Mep1b sowohl durch die direkte Interaktion von Mep1b und Klotho, als auch indirekt, über ADAM10 und ADAM17, geschehen kann.

Daniel Nallin erzielte in seiner Diplomarbeit „Die Interaktion zwischen Anti-Aging-Faktor Klotho und der Metalloprotease Meprin“ (123) in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] bereits Ergebnisse, die auf eine Mep1b-Klotho-Interaktion hindeuten. *In vitro* beobachtete er die Interaktion von Mep1b und Klotho in *Human Embryonic Kidney* (HEK)-Zellen und sah Hinweise, dass Mep1b sowohl den α - als auch den β -Cut durchführen kann. Diese Ergebnisse sollen durch die vorliegende Arbeit überprüft und durch zusätzliche *in vitro*- und *in vivo*-Analysen erweitert werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Bezeichnung	Herstellfirma
1 kb DNA <i>Ladder</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main
40% Acrylamid 29:1 Bis-Acrylamid	Roth, Karlsruhe
6x Gel <i>Loading Dye</i> , Blau	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Actinonin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK
Aluminiumsulfat-Hydrat	Roth, Karlsruhe
Amintra Glutathion <i>Resin</i>	Expedeon Ltd., Cambs, UK
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
<i>BCA 200 Protein Assay Kit</i>	Pierce, Bonn
<i>BioLock Biotin blocking solution</i>	IBA, Göttingen
Bis-Tris	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Pierce, Bonn
CaCl ₂	Roth, Karlsruhe
Chlorwasserstoff (HCl)	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau	Merck, Darmstadt
DEPC-H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
dNTPs	New England Biolabs, Frankfurt am Main
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
<i>Fetal Bovine Serum (FBS)</i>	GIBCO/BRL, Eggenstein
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
<i>Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate</i>	Millipore Corporation, Billerica, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
KCL	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe

Magermilchpulver	Ralphps, Compton, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	B.Braun, Meisungen
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
NP-40 (Nonidet P40)	Sigma, Deisenhofen
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	ThermoScientific, Dreieich
PBS(<i>Phosphate buffered saline</i>)	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK
Plasma stämmiges Rinderserum	First Link, Birmingham, UK
Polybrene	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-L-Ornithin	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Protease-Inhibitor	Roche, Mannheim
ROTI-Load-1 4x Ladepuffer	Roth, Karlsruhe
SDS (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)	BioRad, München
SuperSignal Substrat für HRP	Pierce, Rockford, USA
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Merck, Darmstadt
Tris-acetat	Roth, Karlsruhe
Tris-base (Tris-OH)	Roth, Karlsruhe
Tris-hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinfeld
Trypsin/EDTA	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK
Trypton	BD, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
X-tremeGENE HP	Roche, Mannheim

Tabelle 3: Zellkulturmedien

Name	Herstellfirma
DMEM (1x) (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK
<i>Express Five SFM</i>	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK
<i>Grace's Insect Medium, supplemented</i>	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK
<i>Grace's Insect Medium, unsupplemented</i>	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK
Opti-MEM	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK

Tabelle 4: Wachstums- und Konservierungsmedien, Zusammensetzung

Name	Medium	Zusätze (v/v)
HEK-Konservierungsmedium	DMEM	10% FBS 10% DMSO 1% Penicillin/Streptomycin 1% Natriumpyruvat (100 mM)
HEK-Wachstumsmedium	DMEM	10% FBS 1% Penicillin/Streptomycin 1% Natriumpyruvat (100 mM)
High 5-Wachstumsmedium	<i>Express Five Insect SFM</i>	10 % L-Glutamin (20 mM) 1 % Penicillin/Streptomycin
High 5-Konservierungsmedium	<i>Express Five Insect SFM</i>	10 % FBS 5 % DMSO 1 % Penicillin/Streptomycin
MEF-Konservierungsmedium	DMEM	10% FBS 10% DMSO 1% Penicillin/Streptomycin
MEF-Wachstumsmedium	DMEM	10% FBS 1% Penicillin/Streptomycin
Serumfreies DMEM	DMEM	1% Penicillin/Streptomycin
Sf9-Konservierungsmedium	<i>Grace's insect media, supplemented</i>	20 % FBS 1 % Penicillin/Streptomycin 7,5 % DMSO
Sf9-Wachstumsmedium	<i>Grace's insect media, supplemented</i>	10 % FBS 1 % Penicillin/Streptomycin

Tabelle 5: Antibiotika

Name	Herstellfirma
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Blasticidin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Ciprofloxacin	Sigma, Deisenhofen
Gentamicin	Sigma, Deisenhofen
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Plasmocin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich

3.2 Enzyme

Tabelle 6: Restriktionsenzyme. Alle Restriktionen wurden in mitgeliefertem 10x Cut Smart Puffer durchgeführt.

Enzym-Name	Schnittstelle	Herstellfirma	EC-Nummer
EcoRI-HF	G AATTC	New England Biolabs, Frankfurt am Main	3.1.21.4
NotI-HF	GC GGCCGC	New England Biolabs, Frankfurt am Main	
SpeI-HF	A CTAGT	New England Biolabs, Frankfurt am Main	

Tabelle 7: Weitere Enzyme

Enzym-Name	Herstellfirma	EC-Nummer
Endo HF	New England Biolabs, Frankfurt am Main	3.2.1.96
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main	2.7.7.7
PNGase F	New England Biolabs, Frankfurt am Main	3.5.1.52
rekombinantes Mep1b	(102), Geschenk von Christoph Becker-Pauly, Christian-Albrechts Universität, Kiel	3.4.24.63
t4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main	6.5.1.1
Trypsin	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK	3.4.21.4

3.3 Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Bestandteile in ddH_2O gelöst.

Tabelle 8: Puffer für die Proteinbiochemie

Name	Zusammensetzung
10x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM NaH_2PO_4 1,8 mM KH_2PO_4
10x TBS (pH 7,4)	1,37 M NaCl 27 mM KCl 0,25 M Tris-Base
Coomassie-Entfärbe-Lösung I	20 % (v/v) Ethanol (99,9 %) 7 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbe-Lösung II	10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbe-Lösung	5 % (w/v) Aluminiumsulfat-Hydrat 10 % (v/v) Ethanol (99,9 %) 0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G 250 2 % (v/v) σ – Phosphorsäure
NP40-Lyse-Puffer	50 mM Tris-Base pH 8.0 150 mM NaCl 0,02 % (v/v) NaN_3 1 % (v/v) NP40
Ponceau-S	0,4% (w/v) Ponceau S 1% (v/v) Essigsäure
RIPA-Lyse-Puffer	150 mM NaCl 50 mM Tris-Base 10 mM NaF 1 mM β -Glycerophosphat 1 % (v/v) Nonidet P40 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat 0,1 % (w/v) SDS
Sammelgel-Puffer (pH 6.8)	0.6 M Tris-HCl 0.4 % (w/v) SDS
SDS-Ladepuffer-PAP (2x)	0.72 M Bis-Tris 0.32 M Bicine 0.88 M Sucrose 2 % (w/v) SDS 0.015 % (w/v) Bromphenol Blau
SDS-Laufpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0.1 % (w/v) SDS
TBS-T	Gelöst in 1x TBS 0,05% (v/v) Tween20
Trenngel-Puffer (pH 8.8)	1.5 M Tris-Base 0.4 % (w/v) SDS
Western-Blot Puffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol

Tabelle 9: Puffer für die Molekularbiologie

Name	Zusammensetzung
LB-Agar-Platten	1 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) NaCl 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1,5 % Agar
LB-Agar-Platten	1 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) NaCl 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1,5 % Agar 50 µg/ml Kanamycin 7 µg/ml Gentamicin 10 µg/ml Tetracyclin
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) NaCl 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
LB-Medium für Transposition	1 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) NaCl 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 40 µg/ml IPTG 50 µg/ml Kanamycin 7 µg/ml Gentamicin 10 µg/ml Tetracyclin 50 µg/ml X-Gal
S.O.C.-Puffer Hergestellt von GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
TAE-Puffer	400 mM Tris-Base 10 mM EDTA 1 % (v/v) Essigsäure

Tabelle 10: Puffer für die GST-Tag-Aufreinigung

Name	Zusammensetzung
Elutionspuffer (pH 7,2)	20 mM Natriumphosphat 0,15 M NaCl 20 mM Gluthation
Sarcosyl-Puffer	500 mM Tris-Cl, pH 8 150 mM NaCl 3 % (w/v) N-Laurylsarcosin
Waschpuffer (pH7,2)	20 mM Sodium phosphate 0,15 M NaCl

Tabelle 11: Puffer für die Strep-Tag-Aufreinigung. Alle Puffer wurden von IBA, Göttingen, hergestellt und zur weiteren Verwendung mit ddH₂O verdünnt.

Name	Zusammensetzung
10x Elutionspuffer (pH 8)	1 M Tris-Cl 1.5 M NaCl 10 mM EDTA 25 mM Desthiobiotin
10x Regenerationspuffer (pH 8)	1 M Tris-Cl 1.5 M NaCl 10 mM EDTA 10 mM HABA

Name	Zusammensetzung
10x Waschpuffer (pH 8)	1 M Tris-Cl 1.5 M NaCl 10 mM EDTA

3.4 Primer und Plasmide

Alle Primer wurden von Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) hergestellt. Sie wurden im entsalzten und trockenen Zustand geliefert und in DEPC-H₂O gelöst, sodass die Primer eine Endkonzentration von 100 µM hatten.

Tabelle 12: Primer für die Klonierung

Konstrukt	Bezeichnung	Sequenz
KΔTM pGEX4T	Primer_fwd_EcoRI	GGAATTCCAATGCTAGCCCCGCGC
	Primer_rev_Not	TAAGAATAGCGGCCGCTCACTTATCGTCGTCAT
KL1 pGEX4T	Primer_fwd_EcoRI	GGAATTCCAATGCTAGCCCCGCGC
	Primer_rev_Notl_KL1_Flag	AGTATGCGGCCGCTCACTTATCGTCGTCAT CCTTGTAATCAAAGCCATTGTCCTCTAT
KL2 pGEX4T	Primer_fwd_EcoRI_KL2	GGAATTCCAAGCTGAGCCGGGTCAG
	Primer_rev_Not	TAAGAATAGCGGCCGCTCACTTATCGTCGTCAT
KΔTM pFastBac	Primer_fwd_EcoRI_new	GGAATTCCAAGCTGAGCCGGGTCAG
	Primer_rev_Spel	GGACTAGTCCTCACTTATCGTCGTCATCC
KL1 pFastBac	Primer_fwd_EcoRI_new	GGAATTCCAAGCTGAGCCGGGTCAG
	Primer_rev_Spel_KL1_Flag	GGACTAGTCCTCACTTATCGTCGTCAT CCTTGTAATCAAAGCCATTGTCCTCTAT
KL2 pFastBac	Primer_fwd_EcoRI_KL2	GGAATTCCAAGCTGAGCCGGGTCAG
	Primer_rev_Spel	GGACTAGTCCTCACTTATCGTCGTCATCC

Tabelle 13: Primer für die Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz
Klotho_seq_primer_fwd_1	TGCAGCCGGTGGTTACCCTGTAC
Klotho_seq_primer_fwd_2	CTCTTCTACGTTGACTTTCTG
Klotho_seq_primer_fwd_3	ACATCACTCCAGTGGTGGCCCTGTG
Klotho_seq_primer_fwd_4	AACTGGGAAGGTTTTGTCCAG

Klotho_seq_primer_rev_1	TTTGCCGTGCTGTCGCCAG
Primer_pGEX_fwd	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
Primer_pGEX_rev	CCGGGAGCTGCATGTGT CAGAG
PR_fwd_KL2_seq_GM:	CCTTGGCTTGGCATCTGTA
PR_rev_KL2_seq_GM:	GTTCTATCCAGTCAGCCTGC

Tabelle 14: Primer für die Kontroll-PCR der rekombinanten Bacmide

Bezeichnung	Sequenz
M13/pUC Forward Amplification Primer	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
M13/pUC Reverse Amplification Primer	AGCGGATAACAATTTACACACAGG

Tabelle 15: Plasmide

Konstrukt und Vektor	Spezies
ADAM10 pcDNA3.1	Human
KL1-GST pGEX4T	Maus
KL1-Strep pFastBac	Maus
KL2-GST pGEX4T	Maus
KL2-Strep pFastBac	Maus
KlothoFlag pLBCX	Maus
K Δ TM-GST pGEX4T	Maus
K Δ TM-Strep pFastBac	Maus
Mep1b pCMV	Human
pcDNA	Leervektor
RAP-GST pGEX4T	Human

3.5 Zellen

Tabelle 16: Bakterienstämme. Bei allen Bakterien handelt es sich um kompetente *Escherichia coli* (E. coli)-Bakterien

Zelllinie	Verwendung
BL21	Expression rekombinanter Proteine
DH10-Bac	Transposition von DNA aus pFastBac in Bacmid
DH5 α	Vervielfältigung von Plasmiden
Origami (DE3)	Expression rekombinanter Proteine
Rosetta (DE3)	Expression rekombinanter Proteine

Tabelle 17: Insektenzellen. Die Zellen wurden vom Friedrich-Loeffler-Institut Greifswald (Insel Riems) bezogen. Sie sind in der „Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine“ (CCLV) beschrieben.

Name	Zelltyp	CCLV-Listennummer
BTI-TN-5B1-4 (High5 = kommerzieller Name)	<i>Trichopulsia ni</i> , Eierstock	CCLV-RIE 350
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> , Eierstock	CCLV-RIE 203

Tabelle 18: Säugetierzellen. Zellen wurden im in

Tabelle 4 beschriebenem Medium kultiviert und konserviert

Zelllinie	Zelltyp	Referenz/Beschreibung
HEK293-T	Humane embryonale Nierenzelle	(124)
MEFADAM10/17 ^{-/-} KL	Embryonale Maus-Fibroblasten	(124), mit fl-Klotho stabil transfiziert
MEFwt KL		(125), mit fl-Klotho stabil transfiziert
MEFBACE 1/2 ^{-/-} KL		(126), mit fl-Klotho stabil transfiziert
MEFMep1b ^{-/-} KL		AG Becker-Pauly, Christian-Albrechts Universität, Kiel, mit fl- Klotho stabil transfiziert

3.6 Mauslinien

Die Mäuse wurden in einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gehalten und hatten ständigen Zugang zu Wasser und Standardfutter. Die Versuche erfolgten gemäß der europäischen und deutschen Richtlinien zu Pflege und Verwendung von Versuchstieren. Alle

Versuche wurden durch Kolleg*innen durchgeführt, die über nach TierSchG spezifizierten erforderlichen Fachkenntnisse verfügen.

Tabelle 19: Mauslinien

Bezeichnung	Herkunft
Mep1b ^{-/-} C57BL/6J	AG Becker-Pauly, Institut für Biochemie, Christian-Albrechts Universität, Kiel (127)
Mep1b ^{+/-} C57BL/6J	AG Becker-Pauly, Institut für Biochemie, Christian-Albrechts Universität, Kiel (127)
WT C57BL/6J	Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA)
Slc1c1 ^{CreERT2} ;Rosa26 ^{Mep1b-HA} (Slc ^{Cre} Mep1b)	AG Becker-Pauly, Institut für Biochemie, Christian-Albrechts Universität, Kiel
Rosa26 ^{Mep1b-HA}	AG Becker-Pauly, Institut für Biochemie, Christian-Albrechts Universität, Kiel (128)

3.7 Antikörper

Die Antikörper wurden in TBS-T + 5% (w/v) Magermilchpulver (MMP) gelöst.

Tabelle 20: Primäre Antikörper

Name	Antigen	Verdünnung	Spezies	Hergestellt durch
ADAM10	C-Terminus ADAM10	1:1000	Kaninchen	Millipore Corporation, Billerica, USA
Flag	Flag-Tag	1:1000	Maus	ThermoFisher, Waltham, USA
KM2076	KL1-Domäne von Klotho (Abbildung 3)	1:500	Ratte	TransGenic Inc., Kobe, Japan
KM2119	KL2-Domäne von Klotho (Abbildung 3)	1:200	Ratte	TransGenic Inc., Kobe, Japan
Mep1n β Hecto 1	Mep1b, extrazellulärer Teil	1:1000	Kaninchen	AG Becker-Pauly, Institut für Biochemie, Christian-Albrechts Universität, Kiel
Strep	Strep-Tag	1:2000	Maus	QIAGEN, Venlo, Niederlande
Tubulin	Tubulin	1:1000	Maus	Merck, Darmstadt
β-Aktin	Aktin	1:1000	Kaninchen	Sigma-Aldirch

Tabelle 21: Sekundäre Antikörper

Name	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Herstellfirma
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	HRP	1:10000	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Maus-IgG	Esel	HRP	1:5000	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Anti-Ratte-IgG	Ziege	HRP	1:5000	BioRad, München

3.8 Kits

Tabelle 22: Kits

Name	Funktion	Herstellfirma
<i>NucleoSpin-Gel and PCR-Clean-Up</i>	Aufreinigung von DNA nach PCR und Agarose-Gel	Machery-Nagel, Düren
<i>High Pure Plasmid Isolation Kit</i>	Mini-Präparation	Roche, Mannheim
<i>NucleoBond Xtra Midi EF</i>	Maxi-Präparation	Machery-Nagel, Düren

3.9 Software

- Labfolder
- LAS-3000, FujiFilm
- Microsoft Office
- Prism 8.4, GraphPad
- SnapGene Viewer 3.2.1
- CoreIDRAW 2021 V5
- Unicorn Start 1.1, GE Healthcare Europe, Freiburg
- ClustalX 2.1, Conway Institute UCD Dublin
- BioEdit Sequence Alignment Editor V5
- NEB BioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>)
- UNICORN start 1.1
- ImageJ

3.10 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 23: Verbrauchsmaterialien

Artikel	Herstellfirma
Aluminiumfolie	Aro, Metro
Cellophanfolie	BioRad, München
Einmalküvetten Kunststoff	Roth, Karlsruhe
Einweghandschuhe Nitril	STARLAB GmbH, Hamburg
Einwegküvetten Kunststoff	Roth, Karlsruhe
Eppendorfgefäße 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Gefäße 15 mL, 50 mL	VWR, Darmstadt
Glaspipetten 1 ml - 20 ml	VWR, Darmstadt
Glaspipetten 5 ml- 25 ml	VWR, Darmstadt
Kryoröhrchen	Apogent, Wiesbaden
Mikrotest Platten 96-well	Sarstedt, Nümbrecht
Multiwell Platten 6-, 12-, 24-, 48-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulose-Membran Protran BA82, 0,2 µm	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gele	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Parafilm® American National Can™	Neeah, USA
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 0,1 µl-1000 µl	Starlab, Ahrensburg
Protan Nitrocellulose Membranen	Schleicher&Schuell, Dassel
Serologische Pipette, steril 1-50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
<i>Strep-Tactin Superflow 5 ml Cartridge</i>	IBA, Göttingen
T-25 Zellkultur-Flasche	Sarstedt, Nümbrecht
T-75 und T175 Zellkultur-Flasche	Thermo Scientific, Waltham, USA
X-Tracta Gelausstanzer	Biozym, Hess Oldendorf
Zellschaber	TPP, Trasadingen Schweiz

3.11 Geräte

Tabelle 24: Geräte

Bezeichnung	Herstellfirma
Agarose Gel Elektrophorese System	Biorad, München
ÄKTA start	GE Healthcare Europe, Freiburg
Anthos 2010 Mikrotiterplatten-Photometer	Anthos Mikrosysteme, Friesoythe

CO ₂ -Brutschrank	New Brunswick, Edison, USA
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf ThermoMixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Flachbettschüttler Rocky	Fröbel Labortechnik, Lindau
Folienschweißgerät	Krups, Solingen
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau
Glaspipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL	VWR Int. GmbH, Darmstadt
Inkubationsschüttler	Infors AG, Buttmingen, Schweiz
Inkubator WON 105	Witeg, Wertheim
Intas Gel <i>Imager</i> Agarose Geldokumentation	INTAS, Göttingen
Kühlschrank +4 °C	Liebherr, Kirchdorf
LAS3000 mini <i>Imager</i>	Fujifilm, Japan
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Magnetrührer MR 3000D	Heidolph, Schwabach
Mikrowelle	Medison, Essen
<i>Mini Trans-Blot Cell</i> Western Blot System	BioRad, München
<i>Mini-PROTEAN 3 Cell</i> Elektrophorese System	BioRad, München
<i>Mr. Frosty</i> Gefrierbehälter	ThermoScientific, Dreieich
<i>NanoDrop One C</i>	ThermoScientific, Waltham, USA
pH-Meter	Inolab, Weilheim
<i>Pipetboy 2</i>	Integra Biosciences, Biebertal
Rotator mit Drehteller	Baacklab Armin Baack, Schwerin
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Sterilbank Safemate 1.2 Vision	Euroclone, Pero, Italien
<i>Thermocycler T3</i>	Biometra, Göttingen
Ultraschallstab Sonoplus HD 2070	Bandelin Elektronik, Berlin
<i>Vacunsafe Comfort</i> Absaugsystem	Integra Biosciences, Biebertal
Vortexer MS 2 Mini Shaker	IKA Labortechnik, Staufen
Waage AE160	Mettler-Toledo, Göttingen
Waage Kern PCB	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad GFL 1092	GFL, Burgwedel
Wasserbad SUB6	Grant Instruments, Cambridgeshire, UK
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg

Zentrifuge Heraeus Biofuge stratos	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Hettich Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Hettich Universal 320R	Hettich, Tuttlingen

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Säugetier- und Insektenzelllinien wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilbank behandelt. Die Sterilbank und die darin verwendeten Materialien wurden vor Gebrauch mit 70-prozentigem Ethanol gereinigt. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf Mycoplasmen getestet und im Fall einer Infektion für 2 Wochen mit Plasmocin 25 µg/ml behandelt.

4.1.1 Kultivierung von Säugetierzellreihen

Alle Zellen wurden als adhärente Kulturen in 10-cm-Petrischalen bei 37 °C und einem CO₂-Parialdruck von 5 % und 95 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Für die jeweiligen Versuche wurden die Zellen in 6-Well- oder 6-cm-Schalen ausgesät. Die verwendeten Medien und Puffer wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

4.1.1.1 Zell-Passage und Aussaat

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90-100 % passagiert. Dazu wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 2 ml PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS erfolgte die Zugabe von 2 ml Trypsin und eine Inkubation bei 37 °C für 2-10 min bis sich die Zellen von der Kulturschale lösten. Die gelösten Zellen wurden in 8 ml frischem Wachstumsmedium vorsichtig suspendiert und entweder für die Versuche ausgesät oder in den Verhältnissen 1:10, 1:20 oder 1:50 für die weitere Kultivierung in 10-cm-Schalen ausgesät. Für die Aussaat von HEK-Zellen wurden die Schalen zuvor mit Poly-L-Ornithin behandelt, was die Zelladhäsion zur Schale verbesserte.

4.1.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen

Für die langfristige Aufbewahrung wurden die Zelllinien bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums und Spülung mit 2 ml PBS wie für die Aussaat mit 2 ml Trypsin gelöst. Die Zellen wurden in zusätzlichen 8 ml Wachstumsmedium suspendiert, in ein 15 ml Falcon überführt, und für 4 min bei 160 RPM pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 2 ml Konservierungsmedium gelöst. Die Zellsuspension wurde in zwei Kryokonservierungs-Röhrchen aliquotiert und in einen *Mr. Frosty*-Gefrierbehälter überführt, der mit Isopropanol

gefüllt war. Dieser Gefrierbehälter wurde bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte der Transfer der Röhrchen in den Flüssigstickstofftank für die langfristige Lagerung.

Für die Revitalisierung wurde die Zellsuspension aus den Kryokonservierungs-Röhrchen zügig in 9 ml vorgewärmtem Wachstumsmedium aufgenommen. Die Zellen wurden für 4 min bei 160 RPM pelletiert, in 10 ml frischen Wachstumsmedium suspendiert und auf eine 10-cm-Schale ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumswechsel auf frisches Wachstumsmedium.

4.1.2 Kultivierung von Insekten-Zellreihen

Die immortalisierten Insekten-Zellreihen Sf9 und High5 können sowohl als adhärenente Kultur, als auch in Suspension kultiviert werden. Für diese Arbeit wurden adhärenente Kulturen verwendet. Dafür wurden die Zellen in T-75-Flaschen mit 20 ml Wachstumsmedium bei 27 °C kultiviert.

Die Zellen wurden jeden 3. oder 4. Tag passagiert, im Verhältnis 1:3. Da die Insektenzellen weniger Adhärenz zur Oberfläche aufweisen, ist für die Passage keine Behandlung mit Trypsin nötig. Für die Passage wurde das Medium abgeschüttet und die Zellen durch wiederholtes Abspülen mit 10 ml frischen Wachstumsmedium gelöst. Von der Zellsuspension wurden 3 ml in eine neue Flasche überführt.

Die Kryokonservierung und Revitalisierung erfolgte wie für Säugerzellen mit Konzentrationen von $7,8 \times 10^6/\text{ml}$ für High5-Zellen und $6 \times 10^6/\text{ml}$ für Sf9-Zellen. Für die Revitalisierung wurden sie zunächst in T-25-Flaschen ausgesät und beim Erreichen einer 100-prozentigen Konfluenz in T-75-Flaschen überführt.

4.1.3 Transfektion

Transfektion bezeichnet das Einbringen von DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Dabei wird zwischen transienter und stabiler Transfektion unterschieden. Wird Fremd-DNA in Zellen eingebracht, wird diese spätestens nach einigen Tagen abgebaut, wie es bei der transienten Transfektion der Fall ist. Bei der stabilen Transfektion soll die Fremd-DNA langfristig durch eine Zellreihe exprimiert werden, was über die Integration der Fremd-DNA in das Genom der Zellen mit Hilfe von Retroviren erreicht wird.

Für die transiente Transfektion wurden die Transfektionsreagenzien Polyethylenimin (PEI), XtremeGene HP und Lipofectamine 2000 genutzt. Die Mengenangaben beziehen sich auf ein *Well* oder eine Schale. Für die Transfektion mehrerer *Wells* wurde ein *Master-Mix* mit einem Vielfachen der beschriebenen Mengen angesetzt.

4.1.3.1 *Transiente Transfektion mit PEI (Polyethylenimin)*

HEK293-T-Zellen wurden transient mit ADAM10 transfiziert, als Positivkontrolle für weitere ADAM10-Transfektionen, da HEK293-T-Zellen hohe Transfektionseffizienzen aufweisen. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit pcDNA-Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden dazu in zwei 10-cm-Schalen gesät, die zuvor mit Poly-L-Ornithin beschichtet wurden. Bei einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurden 4 Mikrogramm (μg) Plasmid-DNA und 16 Mikroliter (μl) PEI in jeweils 120 μl serumfreiem DMEM in separaten 1,5-ml-Eppendorf-Gefäßen gelöst. Die Lösungen wurden auf einem Vortexer gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die beiden Ansätze zusammengeführt wurden. Nach erneutem Mischen auf dem Vortexer und Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurden die Ansätze tropfenweise zu den Zellen gegeben und die Schalen geschwenkt. Am Folgetag wurde das Wachstumsmedium durch 10 ml serumfreies DMEM ersetzt und 48 Stunden (h) nach Transfektion wurden die Zellen lysiert.

4.1.3.2 *Transiente Transfektion mit X-tremeGENE HP*

Für die Behandlung mit Actinonin (4.1.4) und den Vergleich zu rekombinantem Mep1b (4.1.5), wurden MEF-Zelllinien transient mit dem Transfektionsreagenz X-tremeGENE HP transfiziert. Die Zellen wurden in 6-cm-Schalen gesät und bei einer Konfluenz von 70 % transfiziert. Ein Mediumswechsel auf 3 ml serumfreies DMEM erfolgte 1 h vor Transfektion. Pro Schale wurden 2 μg DNA und 8 μl X-tremeGENE HP in 200 μl serumfreiem DMEM gelöst und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Schalen kurz geschwenkt. Am Folgetag wurde das Medium durch 2 ml serumfreies Medium ersetzt. 72 h nach Transfektion wurden Überstände und Zellen für die Analyse entnommen, bzw. lysiert.

4.1.3.3 *Transiente Transfektion mit Lipofectamine 2000*

Lipofectamine 2000 ist ein Verfahren der Lipofektion, bei der die Plasmid-DNA Komplexe mit Lipiden bildet und auf diese Weise die Zellmembran passieren kann. Ein Vorteil dieser Methode sind die vergleichsweise hohen Transfektionseffizienzen. Diese Transfektionsmethode wurde für die Transfektion der MEF-Zellen mit ADAM10 genutzt, da diese Transfektion mit zuvor beschriebenen Methoden keine Erfolge zeigte. Ebenso wurde sie für die Kotransfektion zweier Plasmide genutzt.

Zunächst wurde ein Protokoll für die Kotransfektion zweier Plasmide etabliert. Dafür wurden verschiedene DNA-Mengen und Verhältnisse der DNA zum Transfektionsreagenz verglichen. Ebenso wurde die zeitlich versetzte Zugabe des zweiten Plasmids getestet.

MEF-Zellreihen wurden in Multiwellplatten mit 6-*Wells* gesät und bei einer Konfluenz von 70 % transfiziert. Pro *Well* wurden Plasmid-DNA und Lipofectamine 2000 separat in 100 µl Opti-MEM in Eppendorf-Röhrchen gelöst, entsprechend Tabelle 25. Nach 5 min wurden beide Ansätze zusammengeführt, vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Am Folgetag erfolgte ein Mediumswechsel auf 0,9 ml Wachstumsmedium und die Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert und das Medium aufgehoben. Für die Kotransfektionen von ADAM10 und Mep1b wurden die Ansätze separat gemischt, sodass ADAM10- und Mep1b-Plasmide bei der Bildung der DNA-Lipid-Komplexe nicht miteinander konkurrieren konnten. Anschließend wurden die zwei Ansätze nacheinander auf die Zellen gegeben. Für die mit Stern markierten Ansätze 10-12 (Tabelle 25) erfolgte die Zugabe von Mep1b erst 18 h nach Transfektion mit ADAM10.

Tabelle 25: Transfektion mit ADAM10 und Mep1b

Ansatz	ADAM10		Mep1b	
	Plasmid-DNA (µg)	Lipofectamine 2000 (µl)	Plasmid-DNA (µg)	Lipofectamine 2000 (µl)
1	4	10		
2	2	5		
3	1	2,5		
4	2	10		
5	2	8		
6	2	2		
7	2	8	2	8
8	2	8	1	1
9	1	2	1	2
10	1	2	1*	2
11	1	4	1*	4
12	2	8	1*	4

Die Kotransfektionen wurden folgend mit insgesamt 4 µg DNA und 16 µl Lipofectamine 2000 pro *Well* in 6-*Wells* durchgeführt. Am Folgetag erfolgte ein Mediumswechsel auf 0,9 ml Wachstumsmedium und 72 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und das Medium gesammelt.

4.1.4 Behandlung mit dem Mep1b-Inhibitor Actinonin

Die Wirkung des Mep1b-Inhibitors Actinonin auf die Klotho-Prozessierung wurde in der Zellkultur untersucht. Dazu wurden die MEFADAM10/17^{-/-}KL-Zellen in 6-cm-Schalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 70 % transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels X-tremeGENE HP (vgl. 4.1.3.2) mit Mep1b und eine Kontrollgruppe wurde mit dem Leervektor pcDNA und transfiziert. Am Folgetag erfolgte ein Mediumswechsel auf 2 ml serumfreies DMEM und die Zugabe von Actinonin auf eine Endkonzentration von 20 µM. Nach 2 Tagen Inkubation mit Actinonin wurden die Überstände für die Analyse entnommen und die Zellen lysiert.

4.1.5 Behandlung mit rekombinantem Mep1b

Die Auswirkungen von rekombinantem Mep1b und transfiziertem Mep1b auf Klotho wurden verglichen. Dazu wurden MEFADAM10/17^{-/-}KL-Zellen in 6-cm-Schalen gesät und am Folgetag mit Mep1b oder dem Leervektor pcDNA mit dem Transfektionsreagenz X-tremeGENE HP transfiziert (vgl. 4.1.3.2). Nach 24 h erfolgte ein Mediumswechsel auf 1,9 ml serumfreies DMEM und die Zugabe von rekombinantem Mep1b, in einer Endkonzentration von 1,25 nM, auf die mit dem Leervektor transfizierten Zellen. Überstände und Zellen wurden jeweils nach weiteren 24 h oder 48 h entnommen bzw. lysiert.

4.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

Als Klonierung versteht man in der Molekularbiologie das Einbringen eines DNA-Fragments, *Insert* genannt (dt. Einsatz), in einen Vektor. In dieser Arbeit sollten die DNA für fl-Klotho ohne die Transmembrandomäne (Klotho Δ TM) und die Domänen KL1 und KL2 in die Plasmide pGEX4T-1 und pFastBac eingebaut werden. Plasmide sind ringförmige DNA-Doppelstrang-Moleküle, die in Bakterien oder eukaryotische Zellen eingebracht und dort abgelesen werden können. Beide Plasmide sind für die Expression von Fusionsproteinen bestimmt (für Vektorkarten, siehe 9.1)

Das Plasmid pGEX4T-1 enthält bereits die DNA-Sequenz für die Gluthation-S-Transferase (GST), ein Enzym, das als Protein-Tag für die Aufreinigung durch Affinitätschromatografie genutzt wird. Am 3'-Ende der GST-Sequenz befindet sich die *Multiple Cloning Site* (MCS), in die die Inserts mit Hilfe von Restriktionsenzymen eingefügt werden. Die Expression unterliegt der Regulierung des Tac-Promotors, der durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) stimuliert wird.

Das Plasmid pFastBac enthält bereits die Sequenz für das Strep-Tag II, ein Protein-Tag, das ebenfalls für die Aufreinigung genutzt werden kann. Das hier verwendete pFastBac-Plasmid wurde im Vorfeld modifiziert und besitzt am 5'-Ende der Strep-Sequenz ein Signalpeptid, das die Sekretion aus den Zellen gewährleistet (129).

Beide Plasmide enthalten Resistenzgene für das Antibiotikum Ampicillin, pFastBac ebenfalls für das Antibiotikum Gentamicin. So wird eine Antibiotikaselektion ermöglicht.

Die DNA für die *Inserts* wurde aus dem von Daniel Nallin hergestellten Klotho Δ TM/pGEX2T Plasmid entnommen (123). Ein Umstieg auf das Plasmid pGEX4T-1 wurde deshalb durchgeführt, da es andere Schnittstellen in der MCS aufweist als pGEX2T. Die möglichen Enzymkombinationen in pGEX4T-1 waren für einen angestrebten Doppelverdau mit zwei Enzymen gleichzeitig besser geeignet und bessere Restriktionseffizienzen waren zu erwarten.

Am 3'-Ende des *Inserts* lag bereits die Sequenz für ein FLAG-Tag vor, die beibehalten wurden. Vor Beginn der Klonierungsarbeiten wurde das Vorliegen der korrekten DNA durch Sequenzierung überprüft. Die Fusionsproteine, für die die DNA-Sequenzen kodieren, sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Alle geplanten Fusionsproteine besitzen ein FLAG-Tag am C-Terminus und ein GST- oder Strep-Tag am N-Terminus.

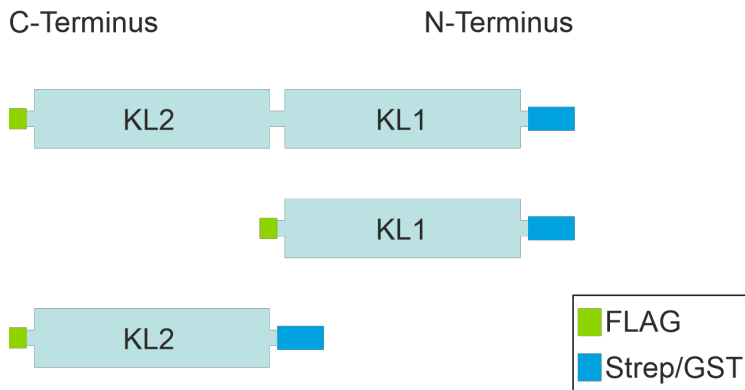


Abbildung 4: Klotho-Fusionsproteine. Schematische Darstellung. Von oben nach unten sind Klotho Δ TM, KL1 und KL2 dargestellt. Alle Protein-Sequenzen sind so geplant, dass am C-Terminus ein FLAG-Tag zur Detektion und am N-Terminus das Protein-Tag für die Aufreinigung (GST oder Strep) vorliegt.

Die Klonierung besteht aus folgenden Schritten:

1. Amplifikation der *Inserts* durch Polymerase-Kettenreaktion (**PCR**)
2. **Restriktion** der *Inserts* und der Vektoren, somit Herstellung von kompatiblen Enden
3. **Ligation** der *Inserts* und Vektoren
4. **Transformation** in *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämmen und Vervielfältigung der Plasmide
5. **Aufreinigung** der Plasmide und Kontrollverdau
6. **Vervielfältigung** der Plasmide durch Maxi-Präparation

Bei allen in diesem Abschnitt beschriebenen Schritten, die die Arbeiten mit DNA beinhalten, wurden Filter-Pipettenspitzen und autoklavierte Eppendorf-Gefäße verwendet.

4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase-Chaine-Reaction*, PCR) ist eine Methode um bestimmte DNA-Abschnitte aus einem sog. *DNA-Template* (dt. Vorlage) zu vervielfältigen. Die Abschnitte werden durch vorher designte Oligonukleotide, Primer genannt, bestimmt. Eine PCR besteht aus den Schritten Denaturierungen, Hybridisierung (auch engl. *Annealing*) und Elongation. Im Rahmen der Klonierung wurde die PCR genutzt, um die *Inserts* zu amplifizieren, und um die Restriktionsstellen und, im Falle von KL1, die FLAG-Tag-Sequenz hinzuzufügen. Dabei wurden die Schnittstellen für EcoRI und NotI oder SpeI eingefügt. Das Plasmid Klotho Δ TM/pGEX2T wurde als *Template* genutzt. Die Bedingungen für die PCRs sind in Tabelle 26, Tabelle 27 und Tabelle 28 beschrieben. Im Anschluss an die PCRs erfolgte die Aufreinigung über das *NucleoSpin-Gel-and-PCR-CleanUp-Kit*, dem Herstellfirma-Protokoll folgend. Die DNA wurde dabei dreimal in 15 μ l vorgewärmten Puffer eluiert.

Tabelle 26: PCR-Ansätze für alle Inserts

Komponente	KΔTM pGEX (μl)	KL1 pGEX (μl)	KΔTM & KL1 pFast (μl)	KL2 pGEX & pFast (μl)
DEPC H ₂ O	51,7	51,7	60,8	33,3
MgCl (25mM)	4	4	0	-
DMSO	10	10	5	-
5x HF Puffer	20	20 (GC Puffer)	20	10
dNTPs	3	3	3	2
Primer_fwd	5	5	5	2,5
Primer_rev	5	5	5	2,5
Phusion DNA Polymerase	1	1	1	0,5
DNA <i>Template</i> (21ng)	0,3	0,3	0,2	0,2
Gesamt	100	100	100	50

Tabelle 27: PCR-Amplifikation der Inserts für pGEX4T-1

Phase	KΔDM		KL1		KL2		
Initiale Denaturierung	95 °C	60 s	95 °C	60 s	95 °C	60 s	
Denaturierung	95 °C	10 s	95 °C	10 s	98 °C	10 s	30x
<i>Annealing</i> Elongation	72 °C	150 s	72 °C	150 s	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	72 °C	5 min	72 °C	5 min	

Tabelle 28: PCR-Amplifikation der Inserts für pFastBac

Phase	KΔDM		KL1		KL2		
Initiale Denaturierung	95 °C	60 s	95 °C	60 s	95 °C	60 s	
Denaturierung	95 °C	10 s	95 °C	10 s	98 °C	10 s	30x
<i>Annealing</i> Elongation	68 °C	25 s	69 °C	25 s	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	72 °C	5 min	72 °C	5 min	

4.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Der Erfolg der PCRs wurde in einem Agarosegel analysiert. Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt und durch die Zugabe von Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkaliert, unter UV-Licht sichtbar gemacht. Nach der Aufreinigung der PCRs wurden 2 µl PCR-Produkt mit 1,66 µl Ladepuffer und 6,34 µl H₂O versetzt, sodass insgesamt 10 µl aufgetragen wurden. Es wurden 1 %-Agarosegele verwendet. Für die Herstellung der Gele wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach einigen Minuten Abkühlen wurde die Lösung in eine Form gegeben, 10 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und vermischt und ein Kamm eingefügt. Die Gele liefen für ca. 90 min zwischen 90 V und 110 V. Der Farbstoff im Ladepuffer macht die Lauffront farblich erkennbar und die Elektrophorese wurden gestoppt, wenn die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Als Marker wurde der 1-kb-DNA-Ladder verwendet.

4.2.3 Verdau und Aufreinigung der DNA-Fragmente

Damit die *Inserts* an den richtigen Stellen in die Vektoren eingefügt werden, werden sowohl *Inserts* als auch Vektoren mit den gleichen zwei Restriktionsenzymen geschnitten. Die Schnittstellen wurden entweder durch die PCR über die Primer eingefügt oder waren bereits in der MCS der Vektoren vorhanden. Durch den Verdau mit den gewählten Restriktionsenzymen entstehen sog. *Sticky-Ends* an *Insert* und Vektor, die kompatibel zueinander sind. Für die Klonierung in pGEX4T-1 wurden die Enzyme EcoRI und NotI verwendet, für pFastBac EcoRI und SpeI. Beide Kombinationen waren für einen Doppelverdau geeignet, was bedeutet, dass die Restriktion durch beide Enzyme parallel abläuft. Sowohl Vektoren als auch *Inserts* wurden über Nacht bei 37 °C verdaut. Dazu wurde das in Tabelle 29 beschriebene Protokoll befolgt.

Tabelle 29: Restriktionsverdau

Komponente	Inserts (µl)	Vektoren (µl)
DNA aus PCR-Aufreinigung	40	1
EcoRI (20 000 U/ml)	1	1
NotI oder SpeI (20 000 U/ml)	1	1
Cut Smart Puffer (10x)	5	5
DEPC H ₂ O	3	42
Gesamt	50	50

Am folgenden Tag wurde die verdaut DNA über eine Agarose-Gelelektrophorese von den Enzymen und den abgeschnittenen DNA-Fragmenten getrennt. Die Restriktionsansätze wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (vgl. 4.2.2). Anschließend wurden die Banden kurz unter UV-Licht sichtbar gemacht, aus dem Gel gestanzt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *NucleoSpin-Gel-and-PCR-CleanUp-Kit* nach dem Herstellfirmaprotokoll. Die DNA-Konzentrationen wurden anschließend mit dem NanoDrop bestimmt.

4.2.4 Ligation der Inserts und Vektoren

Die verdauten *Inserts* konnten anschließend durch die Inkubation mit Ligasen in die Vektoren eingebracht werden. Dazu wurde die T4-DNA-Ligase verwendet und molare Vektor-*Insert* Verhältnisse von 1:2, 1:3 und 1:5 wurden getestet. Die Verhältnisse wurden mit dem NEB BioCalculator berechnet. Totale DNA-Mengen von 150 Nanogramm (ng) bis 700 ng wurden verwendet, abhängig von der aufgereinigten DNA-Menge. Für die Ligation wurden DEPC H₂O mit 1 µl T4-DNA-Ligase, 2 µl DNA-Ligase-Puffer (10x) und den berechneten DNA-Mengen vermischt, sodass Ansätze mit einem Endvolumen von 20 µl entstanden. Die Proben wurden gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

4.2.5 Transformation von E. coli-Stämmen

Transformation beschreibt das Einbringen von DNA in kompetente Bakterienzellen. Die kompetenten E. coli-Stämme BL21, für pGEX4T, und DH5α, für pFastBac, wurden mittels Hitzeschocktransformationen mit den ligierten Vektoren transformiert. Durch schnelle Temperaturänderungen sollen Poren in der Plasmamembran der Bakterien auftreten, wodurch die DNA-Aufnahme ermöglicht wird. Die Nährmedien, auf denen die Bakterien anschließend wachsen, beinhalten das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration unter der die nicht-transformierten Bakterienstämme nicht überleben. Da beide verwendeten Plasmide Resistenzgene gegen Ampicillin enthalten, können transformierte Bakterienkolonien auch in Anwesenheit von Ampicillin wachsen. Diese Situation wird als Antibiotika-Selektion bezeichnet.

Für jede Transformation wurden 50 µl Bakteriensuspension aufgetaut, mit 7 µl der Ligationsansätze versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock für 1 min bei 42 °C im Wasserbad und eine Inkubation für 2 min auf Eis. Anschließend wurde 400 µl LB-Medium zu den transformierten Bakterien gegeben und die Suspension für 1 h bei 37°C und 200 RPM auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Die Bakterien wurden dann pelletiert, durch Zentrifugation für 1 min bei 6000 RPM. Vom Überstand wurden 350 µl entnommen und das Pellet in den restlichen 50 µl suspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mithilfe einer

Pasteurpipette, die zuvor über einem Bunsenbrenner sterilisiert und umgebogen wurde, auf einer LB-Agar-Platte, mit 50 µg/ml Ampicillin, ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden jeweils 2-5 Kolonien in Röhrchen mit 5 ml LB-Medium und 50 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37 °C bei 200 RPM auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Die in den Bakterien vervielfältigten Plasmide wurden durch eine Mini-Präparation mit dem *High Pure Plasmid Isolation Kit* isoliert. Aus der Bakteriensuspension wurden 150 µl für eine mögliche Maxi-Präparation am selben Tag, im Anschluss an den Kontrollverdau, aufgehoben.

4.2.6 Kontrollverdau und Sequenzierung

Der Erfolg der Ligation wurde mittels erneutem Verdau und anschließender Sequenzierung überprüft. Für den Verdau wurden die durch die Mini-Präparation isolierten Plasmide, wie in Abschnitt 4.2.3, mit den Restriktionsenzymen EcoRI + NotI oder EcoRI + SpeI inkubiert. Es wurden jeweils ca. 500 µg DNA eingesetzt. Die Ergebnisse wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und unter UV-Licht wurden die Banden sichtbar gemacht. Bei Banden auf den gewünschten Höhen wurden die Plasmide zur Sequenzierung versendet.

Die Sequenzierung wurde von StarSEQ, Mainz, durchgeführt und die Ergebnisse mit ClustalX und Bioedit analysiert. Durch diese Sequenzanalyse wurden Leserasterverschiebungen oder Punktmutationen ausgeschlossen und die Plasmide durch Maxi-Präparation weiter vervielfältigt.

4.2.7 Maxi-Präparation

Die Maxi-Präparation wurde zur weiteren Vervielfältigung der Plasmide genutzt. Entweder erfolgte eine Transformation von DH5α mit den Plasmiden, oder es wurden 150 µl Bakteriensuspension aus der Mini-Präparation im Anschluss weiterverwendet. Im Falle einer erneuten Transformation wurde wie in Abschnitt 4.2.5 vorgegangen. Aus den Vorkulturen wurden 150 µl Bakteriensuspension in 150 ml LB-Medium, mit 50 µg/ml Ampicillin, überführt und über Nacht bei 37°C und 200 RPM auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Es folgte die Aufreinigung mit dem *NucleoBond Xtra Midi EF Kit*, nach Protokoll der Herstellfirma.

4.3 Rekombinante Proteinexpression

In dieser Arbeit wurden rekombinante Proteine in zwei unterschiedliche Zellsysteme hergestellt. Beide Systeme beruhen darauf, dass Zellen mit Plasmiden transfiziert oder transformiert werden und folgend die gewünschten Fusionsproteine herstellen. Die Fusionsproteine bestehen aus der gewünschten Proteinsequenz und einem Protein-Tag. Das Protein-Tag hat eine hohe Affinität zu einem spezifischen Bindungspartner und ermöglicht die Aufreinigung über die Affinitätschromatografie. Dafür werden die Zell-Überstände oder Zell-Lysate, die die gewünschten Proteine enthalten, als mobile Phase auf eine sog. stationäre Phase gegeben; eine Matrix an die der Bindungspartner des Tags gebunden ist. Die Fusionsproteine verbleiben durch die Affinität des Tags zu seinem Bindungspartner in der stationären Phase. Die restlichen Proteine in Zell-Lysat oder Zell-Überstand werden durch wiederholte Zugabe und Abnahme eines Waschpuffers entfernt. Anschließend werden die Fusionsproteine wieder von der Matrix entfernt. Dafür wird ein weiteres Protein, welches eine höhere Affinität zum Bindungspartner an der Matrix aufweist als das Tag, hinzugegeben. Das neue Protein verdrängt die Fusionsproteine von der stationären Phase. Die Fusionsproteine werden so durch die Affinitätschromatografie konzentriert und gereinigt.

4.3.1 GST-Fusionsproteine in Bakterienstämmen

In *E. coli*-Stämmen wurden Fusionsproteine mit Gluthation-S-Transferase (GST) als Protein-Tag hergestellt und anschließend aufgereinigt. Nach der Expression in den Bakterien wurden diese durch Sonifizierung lysiert. Als Matrix für die Affinitätschromatografie dienten Agarose-*Beads*, an die als Bindungspartner für GST Glutathion gebunden war. Für die Elution wurde GST durch die Zugabe von Glutathion von den Agarose-*Beads* gelöst.

4.3.1.1 *Expression der Fusionsproteine*

Die *E. coli* Stämme BL21, Rosetta und Origami wurden mit den zuvor hergestellten pGEX4T-Plasmiden transformiert (4.2.5). Zusätzlich wurde das Fusionsprotein RAP-GST transformiert. Nachdem die transformierten Bakterien auf die LB-Agar-Platten mit 50 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C inkubiert wurden, wurde jeweils eine Kolonie gewählt und in einer Vorkultur von 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator bei 200 RPM inkubiert. Am folgenden Morgen wurden 2,5-4 ml der Vorkultur in 100 ml oder 150 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin für eine bis drei Stunden bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert, bis OD₆₀₀ Werte zwischen 0,5 und 1 erreicht waren. Folgend wurde die Transkription durch IPTG-Zugabe induziert, mit Endkonzentrationen von 0,5 mM oder 1 mM. Zusätzlich zu den Variationen in der IPTG-Konzentration wurden in mehreren Durchläufen unterschiedliche Temperaturen und Inkubationszeiten für die Proteinexpression

getestet. Es erfolgte die Inkubation bei 37°C für 4 h, bei 30 °C für 5,5 h und bei 21 und 24 °C über Nacht jeweils auf Schüttelinkubatoren mit 200 RPM.

4.3.1.2 Zell-Lyse und Aufreinigung der Fusionsproteine

Um die exprimierten Proteine aufzureinigen zu können, wurden die Bakterien lysiert. Die Bakteriensuspensionen wurden für 15 min bei 4000 RPM und 4 °C pelletiert und der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet und verworfen. Die Pellets wurden in 1-3 ml Sarcosyl-Puffer gelöst und in 5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Die Suspensionen wurde dreimal für 10 s sonifiziert und zwischen den Durchläufen für wenige Minuten auf Eis gelagert. Triton-X-100 wurde auf eine Endkonzentration von 1 % hinzugefügt. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert.

Zusätzlich wurden die *Beads* equilibriert. Dazu wurde 1 ml *Beads* mit 2 ml Waschpuffer über Nacht auf einem Rotator bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die *Beads* dreimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Für jeden Waschdurchlauf wurde 1 ml Waschpuffer zu den *Beads* gegeben, gemischt, 1 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Entfernung des letzten Überstandes, wurden die *Beads* im Verhältnis 1:1 mit Waschpuffer versetzt, und auf 2-ml- oder 5-ml-Eppendorfgefäße verteilt. Die Gefäße wurden erneut für 1 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen, sodass zwischen 200 µl und 400 µl *Beads* pro Gefäß verblieben.

Die Bakterienlysate wurden, anschließend an die Inkubation über Nacht, in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und für 10 min bei 14000 RPM und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden folgend auf die *Beads* gegeben und für 2 h auf einem Rotor bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 500 g und 4 °C wurden die Überstände für spätere Analysen entnommen und die *Beads* dreimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen, wie bereits beschrieben. Die Waschfraktionen wurden ebenfalls für Western-Blot-Analysen gesammelt.

Für die Elution der Fusionsproteine wurden die *Beads* mit 200 µl Elutionspuffer versetzt und für 2 h bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben für 2 min bei 500 g und 4 °C und die Überstände mit den Elutionsproteinen wurden in neue Gefäße überführt. Die Elution wurde zweimal wiederholt.

Zur Regeneration der *Beads* wurden diese zweimal mit 0,1 mM NaCl und anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen und bei 4 °C in Waschpuffer gelagert.

4.3.1.3 Konzentrationsbestimmung der Fusionsproteine

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe von Coomassie-Färbungen von SDS-Gelen (4.4.5 und 4.4.7). Zusätzlich zu den Eluaten wurde eine Protein-Standardreihe aufgetragen.

Dazu wurde Bovines Serumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0,5-5 µg aufgetragen. Die Gele wurden anschließend fotografiert und die Banden densitometrisch ausgewertet.

4.3.2 Expression im Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionssystem

Das Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionssystem der Firma Invitrogen wurde verwendet, um die rekombinanten Proteine in Insektenzellkultur herzustellen. In diesem System werden Fusionsproteine in Insektenzellen exprimiert und anschließend über das Protein-Tag mittels Affinitätschromatografie aufgereinigt. In dieser Arbeit wurde das Strep-Tag II verwendet, welches an den Bindungspartner Strep-Tactin bindet und bei der Elution durch Desthiobiotin von der Matrix verdrängt wird.

Damit die Insektenzellen die gewünschten Proteine herstellen, werden sie mit Baculoviren infiziert, die die cDNA der Fusionsproteine enthalten. Baculoviren bieten im Vergleich zu Expressionssystemen in Säugerzellen den Vorteil, dass sie für Säugetiere ungefährlich sind, weshalb die Arbeiten damit unter S1-Bedingungen durchgeführt werden können (130). Zunächst müssen die rekombinanten Baculoviren, die die gewünschte DNA enthalten, hergestellt werden. Dazu wird im Bac-to-Bac-System ein *Shuttle*-Vektor genutzt, ein 130 kb-Plasmid, das Bacmid, in das die gewünschte DNA zuvor mittels Transposition überführt wurde. Das Bacmid enthält die virale DNA und nach Transfektion von Sf9-Zellen mit dem Bacmid, stellen diese die rekombinanten Baculoviren her. Nach der Virusamplifikation werden High5-Zellen mit den Viren infiziert und für die Proteinexpression genutzt. Diese Zellen haben im Vergleich zu Sf9-Zellen höhere Expressionsraten (131). Die Teilschritte und ihre Kontrollen sind in Abbildung 5 dargestellt.

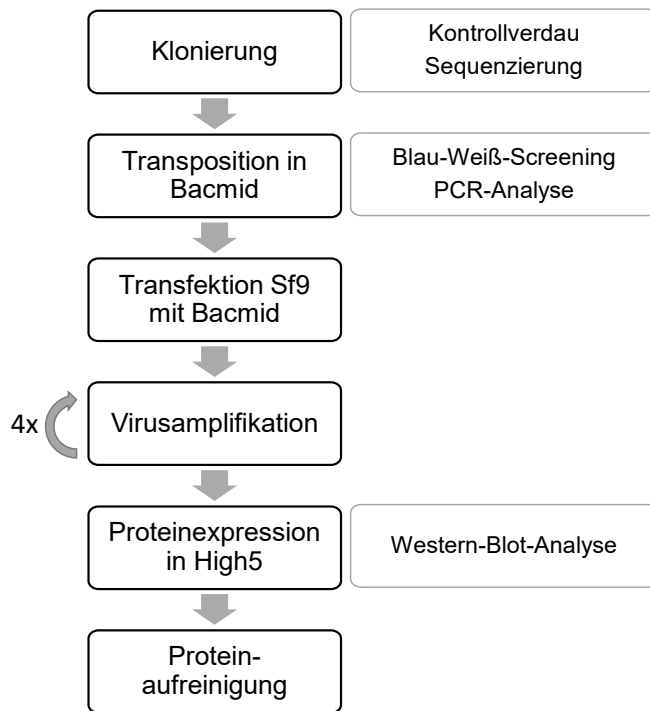


Abbildung 5: Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionssysteme. Die grauen Kästen auf der rechten Seite stellen die Kontrollschritte dar (in Anlehnung an (132)).

4.3.2.1 Transposition und Blau-Weiß-Screening

Transposition beschreibt die Versetzung von DNA-Sequenzen. In diesem Fall wird die Expressionskassette für die Fusionsproteine aus pFastBac in die Bacmide übertragen, mit Hilfe des bakteriellen Transposons 7 (Tn7). Dieser Prozess findet im Bac-to-Bac System in dem dafür konstruierten, *E. coli*-Stamm DH10Bac statt (Abbildung 6). Zunächst erfolgte die Klonierung der Inserts in pFastBac (vgl. 4.2). Die DH10Bac-Bakterien wurden folgend mit den Plasmiden transformiert. In DH10Bac-Zellen sind bereits Bacmide vorhanden, die die Sequenzen der Baculoviren enthalten. Die Sequenz der Bacmide enthält zusätzlich die Tn7 attachment site (attTn7), an der die gewünschte DNA-Sequenz eingefügt wird. In pFastBac wird die Expressionskassette von dazugehörigen Tn7-Sequenzen flankiert (Tn7R und Tn7L), an die Transposasen binden können. Über diese DNA-Abschnitte, Tn7R und Tn7L im Plasmid und attTn7 im Bacmid, wird die gezielte Transposition sichergestellt. Die Transposasen, die die Transposition durchführen, werden von einem Helfer-Plasmid bereitgestellt, das ebenfalls in den DH10Bac-Zellen enthalten ist.

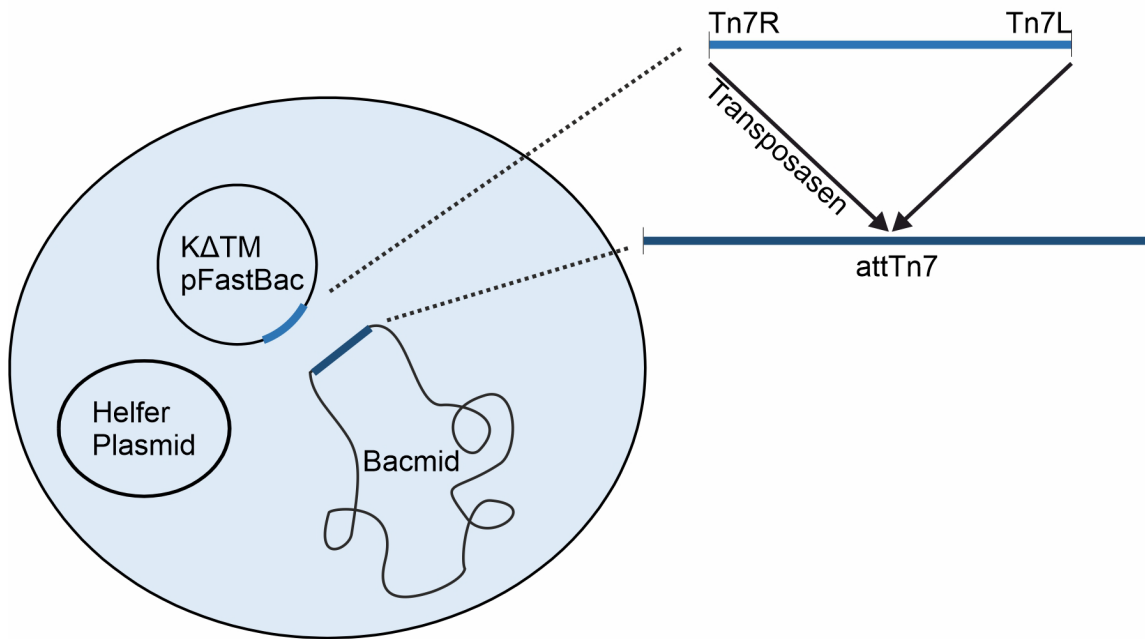


Abbildung 6: Transposition in DH10Bac. Schematische Darstellung. Auf der linken Seite ist eine vereinfachte DH10Bac-Zelle abgebildet, in der sich Helfer-Plasmid, Bacmid und, nach der Transformation, Klotho Δ TM pFastBac befinden. Auf der rechten Seite ist die gezielte Transposition des von Tn7R und Tn7L flankierten DNA-Abschnittes aus pFastBac in das Bacmid durch Transposasen dargestellt (in Anlehnung an (132)).

Für die Erfolgskontrolle der Transposition wird die Methode des Blau-Weiß-Screenings genutzt. Die attTN7-Sequenz im Bacmid liegt im *LacZ α* -Gen, was dieses Screening ermöglicht. Denn das *LacZ α* -Gen kodiert für einen Teil der β -Galactosidase, die ihr Substrat X-Gal im LB-Agar umsetzt, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht. Die Bakterienkolonien die über das intakte *LacZ α* -Gen verfügen färben sich blau. Ist die Expression der β -Galactosidase gestört, da durch die Transposition Fremd-DNA in das *LacZ α* -Gen eingefügt wurde, findet diese Färbung nicht statt (vgl. Abbildung 7).

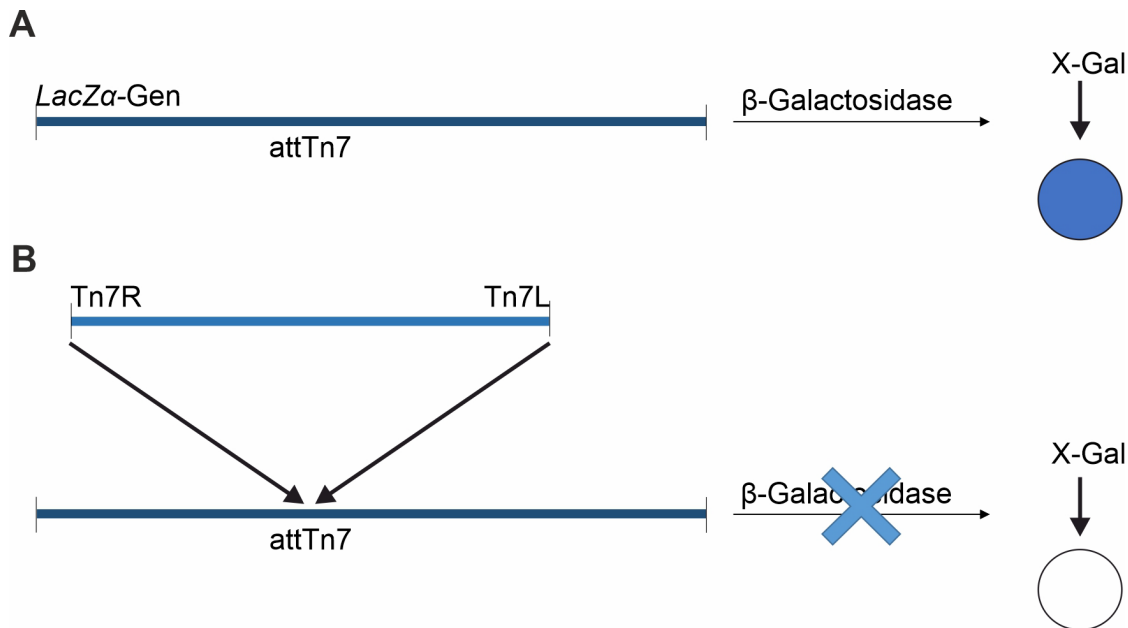


Abbildung 7: Grundlage des Blau-Weiß-Screenings. (A) zeigt das *LacZα*-Gen vor der Transposition in die Stelle *attTn7*. Die β -Galactosidase wird exprimiert und wandelt X-Gal um, wonach ein blauer Farbstoff entsteht. (B) Im Rahmen der Transposition wird der von *Tn7R* und *Tn7L* flankierte DNA-Abschnitt in das *LacZα*-Gen eingefügt. Die β -Galactosidase wird nicht mehr exprimiert und kein blauer Farbstoff entsteht; die Bakterienkolonien bleiben weiß.

Zusätzlich fand eine Antibiotikaselektion statt. Die Plasmide in DH10Bac enthalten unterschiedliche Resistenzgene, pFastBac gegen Gentamicin, das Helferplasmid gegen Tetracyclin und das Bacmid gegen Kanamycin. Das LB-Medium enthielt alle drei Antibiotika, sodass lediglich Bakterien mit den drei Plasmiden wachsen konnten.

Das Einbringen der pFastBac-Plasmide in DH10Bac wurde via Hitzeschock-Transformation durchgeführt. Dafür wurden pro Transformation 30 μ l DH10Bac Zellsuspension auf Eis aufgetaut, 1 ng Plasmid-DNA hinzugefügt, vorsichtig gemischt und die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde für 1 min bei 42 °C im Wasserbad durchgeführt und die Suspension anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. 1 ml S.O.C Medium wurde hinzugegeben und es erfolgte die Inkubation für 4 Stunden bei 37°C und 200 RPM auf dem Schüttelinkubator. Die Zellen wurden daraufhin pelletiert, durch Zentrifugation für 3 min bei 380 RPM und 930 μ l des Überstandes wurden verworfen. Das Pellet wurde in den restlichen 100 μ l resuspendiert. Die Suspension wurde dann auf eine 10 cm LB-Agar-Platte (siehe LB-Agar-Platten für Transposition in Tabelle 9) überführt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Zwei große weiße Bakterienkolonien wurden gepickt, auf zwei neue LB-Agar-Platten ausgestrichen und erneut für 24 h bei 37 °C inkubiert. Von diesen Platten wurden mehrere Bakterienkolonien in 5 ml LB-Medium (siehe LB-Medium für Transposition in Tabelle 9) überführt und für 24 h bei 200 RPM auf einem Schüttelinkubator inkubiert.

4.3.2.2 Isolation der Bacmid-DNA und Kontroll-PCR

Mit dem *High Pure Plasmid Isolation Kit* wurden die Bacmide nach Herstellfirmaprotokoll isoliert. Die Elution erfolgte in 100 µl DEPC-H₂O und die Bacmide wurden folgend bei -20 °C gelagert. Da Bacmide aufgrund ihrer Größe instabiler sind als kleiner Plasmide und zerreißen können, wurden für alle Schritte die Bacmide involvierten, nur 200 µl und 1000 µl Pipettenspitzen verwendet und mechanische Suspension durch Vortexen vermieden.

Der Erfolg der Transposition wurde durch eine PCR-Analyse überprüft, da ein Kontrollverdau aufgrund der Größe und der mehrfach vorkommenden Restriktionsstellen nicht aussagekräftig ist. Die M13/pUC-Primer flankieren in der Bacmid-Sequenz das Transpositions-Ziel attTN7 und lagern sich 273 bp voneinander entfernt an. Mit diesem Wissen gelingt es die folgenden drei Möglichkeiten zu unterscheiden: keine Transposition, Transposition mit pFastBac-DNA, Transposition mit pFastBac-DNA und *Insert*. Je nach Ergebnis werden DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe repliziert. Am Beispiel von KlothoΔTM sind die unterschiedlichen Größen der PCR-Produkte in Abbildung 8 gezeigt.

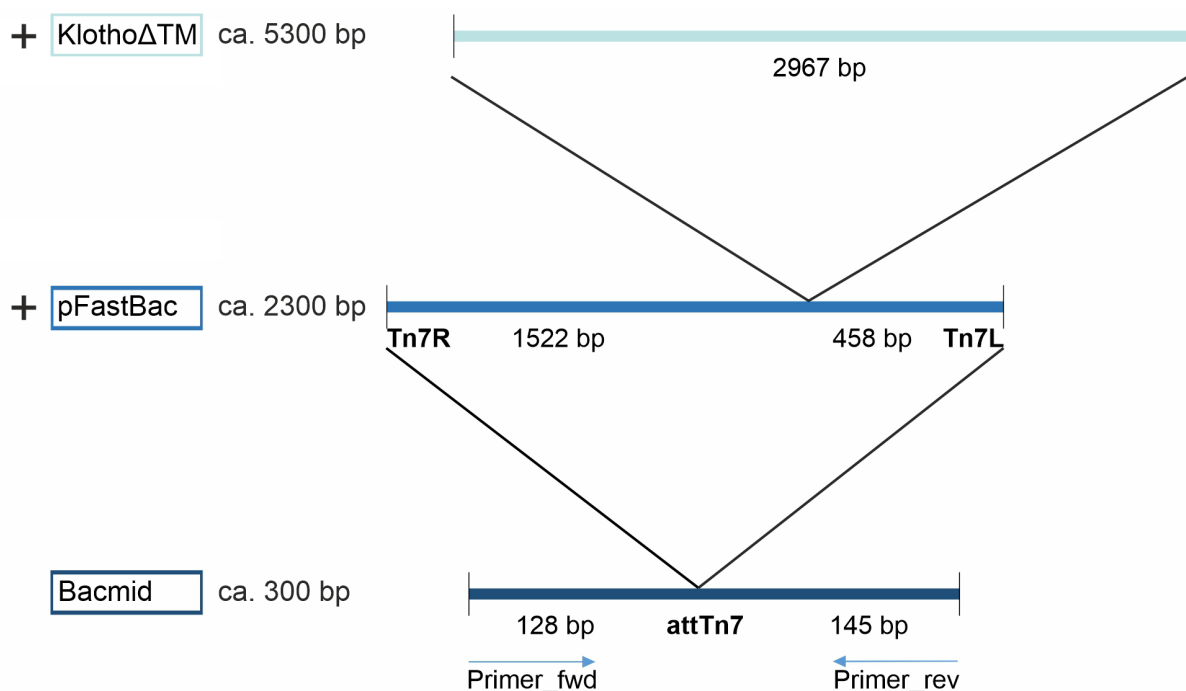


Abbildung 8: Kontroll-PCR-Produkte nach Transposition. Dargestellt ist die replizierte Sequenz der Bacmid-DNA (unterste Zeile) von ca. 300 bp. Bei geglückter Klonierung und Transposition sind dort pFastBac-DNA (ca. 2000 bp) und KlothoΔTM-DNA (ca. 3000 bp) insertiert, sodass ein PCR-Produkt von ca. 5300 bp entsteht. Die Größenverhältnisse sind nicht proportional zu den tatsächlichen PCR-Produkten (in Anlehnung an (132)).

Die PCR wurde mit dem Ansatz aus Tabelle 30 mit den Programmen Tabelle 30 durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Ansätze nach Zugabe von 6x Ladebuffer auf ein 0,8%-Agarosegel geladen und die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Tabelle 30: Pipettierschema Kontroll-PCR

Komponente	Volumen in μl
HF- Buffer	10
dNTP	1
Primer fwd (10 μM)	2,5
Primer rev (10 μM)	2,5
DNA	4
Phusion	0,5
DEPC H ₂ O	29,5
Gesamt	50

Tabelle 31: PCR-Programm Kontroll-PCR

Phase	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	98 °C	45 s	30x
<i>Annealing</i>	55 °C	45 s	
Elongation	72 °C	7 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

4.3.2.3 Transfektion von Sf9-Zellen und Virusamplifikation

Die Baculoviren wurden in Sf9-Zellen hergestellt und amplifiziert. Für die Herstellung der rekombinanten Baculoviren wurden Sf9-Zellen mit Bacmiden transfiziert. Für jede Transfektion wurden 8×10^5 Zellen pro Well in 6-Well-Platten gesät. Die Platten wurden bei 27 °C über Nacht inkubiert, dann wurde das Medium durch 2 ml frisches Wachstumsmedium ersetzt. Pro Well wurden 2 μg Bacmid-DNA und 6 μl der Transfektionsreagenz X-tremeGENE HP zu 200 μl *Grace's Insect Medium, unsupplemented* gegeben und vorsichtig gemischt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung tropfenweise auf das Well gegeben. Als Negativkontrolle wurde ein Well lediglich mit 200 μl *Grace's Insect Medium, unsupplemented* versetzt.

Die Baculoviren wurden nach 72 h geerntet. Dafür wurde der Überstand in ein 15 ml Falcon überführt und für 2 min bei 3000 RPM zentrifugiert. Der Überstand enthielt die erste Viruspassage, P0, die kurzfristig in Alufolie eingeschlagen bei 4 °C oder langfristig bei -80 °C gelagert werden kann.

Für die Virusamplifikation wurde Sf9 Zellen bei einer Konfluenz von ca. 80 % mit Überstand aus der vorhergegangenen Passage behandelt. Das Verhältnis aus Wachstumsmedium und virusenthaltenden Überstand war dabei 10:1 und Gefäßgröße und Volumen wurden pro Passage vergrößert. Die Amplifikation wurde bis P4 fortgeführt. Jede Passage wurde nach 96 h geerntet, entsprechend der Ernte von P0.

Tabelle 32: Virusamplifikation in Sf9-Zellen

Viruspassage	Wachstumsmedium	Kulturgefäß	Überstand aus der vorherigen Passage
P1	5,6 ml	6 cm Schale	0,6 ml
P2	13,5 ml	10 cm Schale	1,5 ml
P3	45 ml	T-175 Flasche	5 ml
P4	45 ml	T-175 Flasche	5 ml

4.3.2.4 Proteinexpression in High5-Zellen

In der Passage P4 ist der Virustiter voraussichtlich groß genug um eine große Menge High5-Zellen zu infizieren, die dann die rekombinanten Proteine exprimieren. Vor der Proteinexpression im großen Maßstab wurde die passende Menge der Virussuspension bestimmt, die auf High5-Zellen gegeben werden sollte um eine möglichst gute Ausbeute zu erhalten. Dabei soll ein Mittelmaß zwischen Zelltod durch zu hohe Virustiter auf der einen Seite und niedrige Expressionsraten durch niedrige Titer auf der anderen Seite erreicht werden. Ebenso wurde die beste Produktionsdauer bestimmt, zwischen maximaler Expression und Abbau der Proteine. Die optimale Zeit kann sich für verschiedene Proteine unterscheiden.

Für die Probe-Expression wurden High5-Zellen in T-75 Flaschen gesät und bei einer Konfluenz von 80 % im Verhältnis 1:10, 1:20 und 1:100 mit P4-Virus infiziert. Für 120 h wurde jeweils nach 24 h 100 µl Überstand entnommen, und die Proteinmengen durch Western-Blot-Analysen verglichen.

4.3.2.5 Protein-Aufreinigung über Flüssigchromatografie

Nachdem die Bedingungen für die Expression der Fusionsproteine optimiert worden waren, wurden KlothoΔTM-Strep in kleinem Maßstab aufgereinigt. Dafür wurden High5-Zellen in eine T-175-Flasche gesät und bei einer Konfluenz von 70 % mit P4-Virus infiziert. Auf insgesamt 35 ml Medium wurden 350 µl Virus verwendet. Nach 72 h wurde der Überstand für 10 min bei

200 g zentrifugiert, danach erfolgte die Zugabe von 350 µl 100x Protease-Inhibitor und 3,5 ml 10x Waschpuffer. Im Wachstumsmedium *Express Five SFM* ist Biotin vorhanden und dieses bindet, ebenso wie das Strep-Tag II, an Strep-Tactin. Somit konkurriert Biotin mit dem Strep-Tag II um die Bindung an die stationäre Phase. Deshalb wurde Biotin im Überstand mit der Biotin-Blocking-Lösung blockiert. Dafür wurden 2,4 µl pro Milliliter Medium zu der Probe hinzugegeben. Für die Blockierung erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde der Überstand für 20 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gefiltert und der pH-Wert gemessen, der sich, wie für die Aufreinigung nötig, im Bereich zwischen 7,5 und 8 befand. Zu diesem Zeitpunkt wurden 50 µl für die spätere Western-Blot-Analyse entnommen.

Die Aufreinigung wurde mit dem *Fast protein liquid chromatography* (FPLC)-System ÄKTA start durchgeführt. Als stationäre Phase wurde die vorgefertigte *Strep-Tactin Superflow* Säule verwendet, die mit Agarose gefüllt ist, an die Strep-Tactin gebunden ist. Die mobile Phase wird durch Pumpen mit einer konstanten Durchflussrate auf die Säule gegeben.

Alle Puffer und die Säule wurden auf Eis gelagert. Nachdem das System mit H₂O gespült wurde, wurde die Säule angeschlossen und mit Waschpuffer äquilibriert.

Der vorbereitete Überstand wurde mit 1 ml/min in das System gegeben. Der Durchfluss wurde für die spätere Analyse gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Die Waschfraktionen wurden in 5 ml Fraktionen gesammelt und später für die Western-Blot-Analyse verwendet. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer und wurde in 0,5 ml Schritten gesammelt.

Es folgte eine Western-Blot-Analyse, in der 25 µl des Überstandes vor Chromatografie, 25 µl des gesammelten Durchflusses, 20 µl der Waschfraktionen und 5 µl der Eluate aufgetragen wurden.

4.4 Proteinanalyse

4.4.1 Zell-Lyse

Um die Proteinanalysen der Zellkulturversuche durchzuführen, wurden die Zellen lysiert. Im Falle von zusätzlichen Analysen der Überstände, wurden diese zunächst entnommen. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Zellrasen wurde dreimal vorsichtig mit 1 ml gekühltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von einem weiteren Milliliter PBS wurden die Zellen mechanisch von der Schale gekratzt, in Eppendorf-Gefäße überführt und für 4 min bei 4 °C und 6000 RPM pelletiert. Die Überstände wurde verworfen und die Zellpellets je nach Größe in 15-100 µl NP40-Lyse-Puffer mit 2 % Protease-Inhibitor gelöst und für 20 min auf Eis gelagert. Während der Lyse wurden die Proben alle 5 Minuten auf einem Vortexer gemischt. Es folgte die Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und die Überstände wurden in neue Eppendorf-Gefäße überführt.

4.4.2 Gewebe-Lyse

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Gewebe, Maus-Gehirn oder -Niere, wurden gewogen, in Glashomogenisierer überführt und mit 3 ml eisgekühltem RIPA-Puffer mit 2 % Protease-Inhibitor pro Gramm Gewebe für 10 min inkubiert. Folgend wurden die Gewebe homogenisiert. Die Lysate wurden in 1,5-ml-Eppendorf-Gefäße überführt und für 3 min bei 13000 RPM und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden auf 5 Eppendorf-Gefäße verteilt, vier wurden für spätere Analysen bei -80 °C gelagert und eines 1:16,6 mit Wasser verdünnt. Die Verdünnung erfolgte aufgrund der erfahrungsgemäß hohen Proteinkonzentration in Gewebe-Lysaten und wurde für die weitere Proteinbestimmung und Western-Blot-Analyse verwendet.

4.4.3 Deglykosylierung von Nierenlysaten

Als Teil der posttranslationalen Modifikationen werden Proteine im Endoplasmatischen Retikulum und anschließend im Golgi-Apparat glykosyliert. Die Glykane können durch Endoglykosidasen entfernt werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich die Entfernung von N-Glykanen auf die Klotho-Darstellung im Western-Blot auswirkt. Dazu wurden Nierenlysate von wildtypischen Mäusen deglykosyliert. Es wurde die Endoglykosidase Endo Hf verwendet, welche stark mannosehaltige Oligosaccharide entfernt, die im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden. Ebenso erfolgte die Deglykosylierung mittels PNGase F, welche nahezu alle N-Glykane entfernt. Dem Herstellfirmaprotokoll für

denaturierende Reaktions-Bedingungen wurde gefolgt und in beiden Ansätze wurden jeweils 40 µg Protein eingesetzt.

4.4.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay

BCA-Assay wurde verwendet um die Proteinkonzentrationen der Lysate zu bestimmen (133). Dazu wurde der Pierce BCA-Assay benutzt. Diese Methode beruht auf der Biuret-Reaktion, wobei Proteine Cu^{2+} unter alkalischen Bedingungen zu Cu^+ reduzieren. Cu^+ und Bicinchoninsäure (BCA) bilden dann zusammen einen violetten Farbkomplex. Dieser Farbstoff ist stabil und proportional zur vorliegenden Proteinmenge. Die Proteinmenge kann dann aus der photometrischen Messung des violetten Farbstoffs berechnet werden. Die Proben werden anhand der Werte einer Standardreihe ausgewertet. Die Standardreihe wurde mit BSA hergestellt, wie in Tabelle 33.

Tabelle 33: Pipettierschema BSA-Standardreihe

BSA-Konzentration (µg/ml)	0	100	200	300	400	500
ddH₂O (µl)	50	45	40	35	30	25
BSA 1 µg/µl (µl)	0	5	10	15	20	25

Von den Proben wurden 5 µl Lysat mit 45 µl ddH₂O in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gemischt. Pierce A und B Lösung wurden im Verhältnis 1:20 gemischt und jeweils 1 ml zu jeder Probe und der Standardreihe gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 60 °C. Die Proteinkonzentration wurde mit dem „Anthos 2010“ Photometer und der Software ADAP bestimmt.

4.4.5 SDS-PAGE und Probenvorbereitung

Die Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Um vergleichbare Verhältnisse zu schaffen, wurden die Proben so vorbereitet, dass sich in allen zu vergleichenden Proben die gleiche Proteinmenge (Lysate), bzw. das gleiche Volumen (CSF, Überstände) befand. Im Falle von Lysaten wurden die Proben mit Wasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt und mit 4x ROTI-Load 1 Ladepuffer versetzt. Überstände und CSF wurden ebenfalls mit 4x ROTI-Load 1 Ladepuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C gekocht. Finale Proteinmengen reichten von 20-50 µg und die finalen Volumen von 10-60 µl. Durch das Kochen mit dem Ladepuffer, der SDS und β-Mercaptoethanol enthält, werden die Proteine denaturiert. Zusätzlich verbinden sie sich mit SDS zu negativ geladenen Komplexen, die im elektrischen Feld zum positiven Pol wandern.

Es wurden entweder vorgegossene Gradienten-Gele (NuPAGE-Gele, 4-12%, Invitrogene) im Xcell II Surelock Elektrophorese-System oder selbst gegossene Gele (siehe Tabelle 34) im Mini-PROTEAN 3 System verwendet. Zunächst wurde eine Spannung von 90 V angelegt, die nach ca. 30 min auf 120 V erhöht wurde. Die Elektrophorese wurde nach ca. 90 min beendet, wenn die Lauffront vor dem unteren Gelrand angekommen war. Für vorgegossene NuPAGE-Gele wurde eine Spannung von 200 V angelegt.

Tabelle 34: Trenn- und Sammelgel Zusammensetzung

Reagenzien	4 % Sammelgel	8 % Trenngel	10 % Trenngel
ddH ₂ O (ml)	1,563	5,5	5
40% Acrylamid (29:1) (ml)	0,312	2	2,5
Trenngel-Puffer (ml)	-	2,5	2,5
Sammelgel-Puffer (µl)	625	-	-
10% APS (µl)	25	100	100
TEMED (µl)	2,5	10	10

4.4.6 Western-Blot

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden durch Western-Blotting elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wo sie anschließend immunhistochemisch detektiert wurden. In dieser Arbeit wurde das Nass-Blot-Verfahren in der *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* verwendet. Schwämme, Nitrozellulosemembran und Blotting-Papier wurden für 10 min in Western-Blot-Puffer eingeweicht, und nach Herstellfirmaangaben zusammengebaut. Der Aufbau wurde durch eine Kassette zusammengehalten und in die Kammer überführt. Die Kammer wurde mit gekühltem Western-Blot-Puffer gefüllt. Der Transfer wurde für 90 min bei 85 V durchgeführt.

Anschließend wurden die übertragenen Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau-Färbung sichtbar gemacht, die Membranen evtl. geschnitten und, für 1 h mit 5 % Magermilchpulver gelöst in TBS-T, blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem entsprechenden Primäantikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Nach Entfernung des Primäantikörpers wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und mit dem passenden *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelte Sekundäantikörper für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Antikörperlösung wurde entfernt und die Membran erneut dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Chemilumineszenz wurde mit dem *LAS-3000 mini Imaging System* nach Zugabe von Luminol und H₂O₂ (im Immobilon Western HRP Substrat) detektiert.

4.4.7 Coomassie Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Um die Proteinkonzentrationen auf SDS-Gelen zu bestimmen wurden diese mit Coomassie brillant Blau gefärbt, welches alle Proteine-Banden in den Gelen anfärbt.

Für die Färbungen wurden 10 % SDS-Gele verwendet. Nach der SDS-PAGE wurden sie in Coomassie Färbe-Lösung für eine Stunde inkubiert. Die Entfärbung erfolgte für eine Stunde mit Entfärbe-Lösung-I und anschließend mit Entfärbe-Lösung-II über Nacht. Alle Färbe- und Entfärbe-Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Die Banden wurde anschließend mit dem Programm ImageJ analysiert.

4.5 *In vivo* Analysen

Für weitere Angaben zu den Tierversuchen siehe Abschnitt 3.6.

4.5.1 Isolierung und Analyse der CSF

Die Entnahme der CSF erfolgte aus der *Cisterna magna*, wie kürzlich beschrieben (88). Die CSF wurde für 10 min bei 900 x g und 4 °C zentrifugiert. Bei Mep1b^{-/-}-Mäuse und ihren Kontrollmäusen erfolgte die Entnahme im Alter von 11-13 Wochen und nach der Zentrifugation wurden die CSF-Überstände mit PAP-Ladepuffer denaturiert und für 5 min bei 70 °C gekocht. Die CSF-Entnahme und Protein-Analyse wurde durch [REDACTED] (AG Pietrzik) durchgeführt. Bei Slc^{Cre}Mep1b-Mäuse und ihren Kontrollmäusen erfolgte die Entnahme im Alter von 4 Wochen. Die CSF-Überstände dieser Mäuse wurden mit 4x ROTI-Load Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C gekocht. Für die Protein-Analyse wurden die Proben auf Gradientengele (NuPAGE-Gele, 4-12 %) aufgetragen.

4.5.2 Lyse von Maus-Nieren

Die Entnahme der Nieren erfolgte bei Mäusen im Alter von 11-13 Wochen. Die Nieren wurden gemäß Abschnitt 4.4.2 lysiert und die Proteinkonzentration wie in Abschnitt 4.4.4. bestimmt. Für die Auftrennung wurden selbstgegossene SDS-Gele (4% Sammelgel, 8 % Trenngel) verwendet.

4.5.3 Induktion der Cre-Rekombinase mit Tamoxifen

Das Slc1c1^{CreERT2};Rosa26^{Mep1b-HA} (Slc^{Cre}Mep1b) Mausmodell basiert darauf, dass Mep1b abhängig von der Cre-Rekombinase exprimiert wird. Für dieses Mausmodell wurden der CAG-Promotor und die Mep1b-cDNA in den ROSA26-Genlocus inseriert, der ubiquitär in Maus-Embryos vorkommt und gut für die Transkription dort eingefügter DNA zugänglich ist (134,

128). Zwischen Promotor und Mep1b-DNA befindet sich ein Stoppcodon, welches von loxP-Stellen flankiert ist und die Transkription von Mep1b verhindert. Durch die Cre-Rekombinase wird diese flankierte Sequenz ausgeschnitten und die Transkription von Mep1b kann stattfinden (128). Die Cre-Rekombinase ist an die mutierte Liganden-Bindedomäne des humanen Östrogen-Rezeptors (ERT2) gebunden, an die Tamoxifen, oder dessen hydroxylierte Form OH-Tamoxifen, bindet und die Rekombinase-Aktivität induziert (135). Die Expression der Cre-Rekombinase ist in diesem Mausmodell an *Solute carrier organic anion transporter 1c1* (Slco1c1) gekoppelt, welcher nur im Gehirndothel, sowie im *Plexus choroideus*-Epithel exprimiert wird (136, 137). Die spezifische Expression von Mep1b im Gehirndothel und *Plexus choroideus*-Epithel kann so durch die Injektion der Mäuse mit Tamoxifen induziert werden.

Die verwendeten Mäuse waren heterozygot für Slco1c1^{CreERT2} und homozygot für Rosa26^{Mep1b-HA}. Als Kontrolle wurden Mäuse genutzt, die nicht über die Slco1c1^{CreERT2}-Genkassete verfügten, in denen die vermehrte Mep1b-Expression somit nicht induziert werden konnte.

Die Tamoxifen-Injektion zur Induktion der Cre-Rekombinase erfolgte bei den Slc^{Cre}Mep1b-Mäusen im Alter von 4 Wochen. An 5 aufeinanderfolgenden Tagen wurden jeweils 2 mg intraperitoneal injiziert, wie bereits beschrieben (88). Die CSF-Entnahme wurde 5 oder 10 Tage nach der letzten Tamoxifen-Injektion durchgeführt.

4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem GraphPad Prism durchgeführt. Beim Vergleich von Daten aus mehreren Versuchen und Western-Blot-Analysen wurden die Daten auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollen normiert. Der ungepaarte t-Test wurde für den Vergleich zweier Gruppen verwendet. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine univariante Varianzanalyse (ANOVA) verwendet, gefolgt von einem *post-hoc Tukey's* Test, bei signifikanten Ergebnissen in der ANOVA. P-werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet.

5 Ergebnisse

Folgend werden zunächst die Ergebnisse aus den Versuchen präsentiert, die die Interaktion von Mep1b und Klotho betreffen. Zusätzlich wurden s-Klotho, KL1 und KL2 im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellt. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen folgen im Anschluss an die Interaktions-Analysen.

5.1 Interaktion von Mep1b und Klotho

Die Interaktion von Mep1b und Klotho wurde sowohl *in vivo*, in CSF und Nierenlysaten Mep1b-überexprimierender oder defizitärer Mäuse, als auch *in vitro* analysiert. *In vitro* wurde zudem der Einfluss des Mep1b-Inhibitors Actinonin untersucht und der Einfluss von rekombinatem Mep1b und transient transfiziertem Mep1b auf Klotho verglichen.

5.1.1 Mep1b^{-/-}-Mäuse zeigen veränderte Klotho-Prozessierung in Nierenlysaten

Da Klotho peripher vor allem in den Nieren exprimiert wird (2, 29), wurde die Klotho-Expression in Nierenlysaten analysiert. Die Lysate wurden mittels Western-Blot analysiert und fl-Klotho und KL2 mit dem Antikörper KM2119, der sich gegen KL2 richtet, nachgewiesen (Abbildung 9A). Wildtyp-Mäuse wurden mit homo- und heterozygoten Mep1b-*knockout*-Mäusen verglichen. Bei reduzierter (Mep1b^{+/-}) oder fehlender (Mep1b^{-/-}) Mep1b-Expression zeigte sich signifikant weniger KL2 im Vergleich zu fl-Klotho (Abbildung 9B). Die absoluten Levels von fl-Klotho und KL2 wurden auf die Ladekontrolle Aktin normiert. Dabei zeigten sich bei reduzierter oder fehlender Mep1b-Expression in der Tendenz erhöhte Werte für fl-Klotho (Abbildung 9C) und reduzierte Werte für KL2 (Abbildung 9D), verglichen zu den wildtypischen Mäusen. Zusätzlich zu den Nierenlysaten erfolgte die Western-Blot-Analyse von Serum und Hirnlysaten, auf denen kein Signal mit dem Antikörper KM2119 erkennbar war (Daten nicht gezeigt).

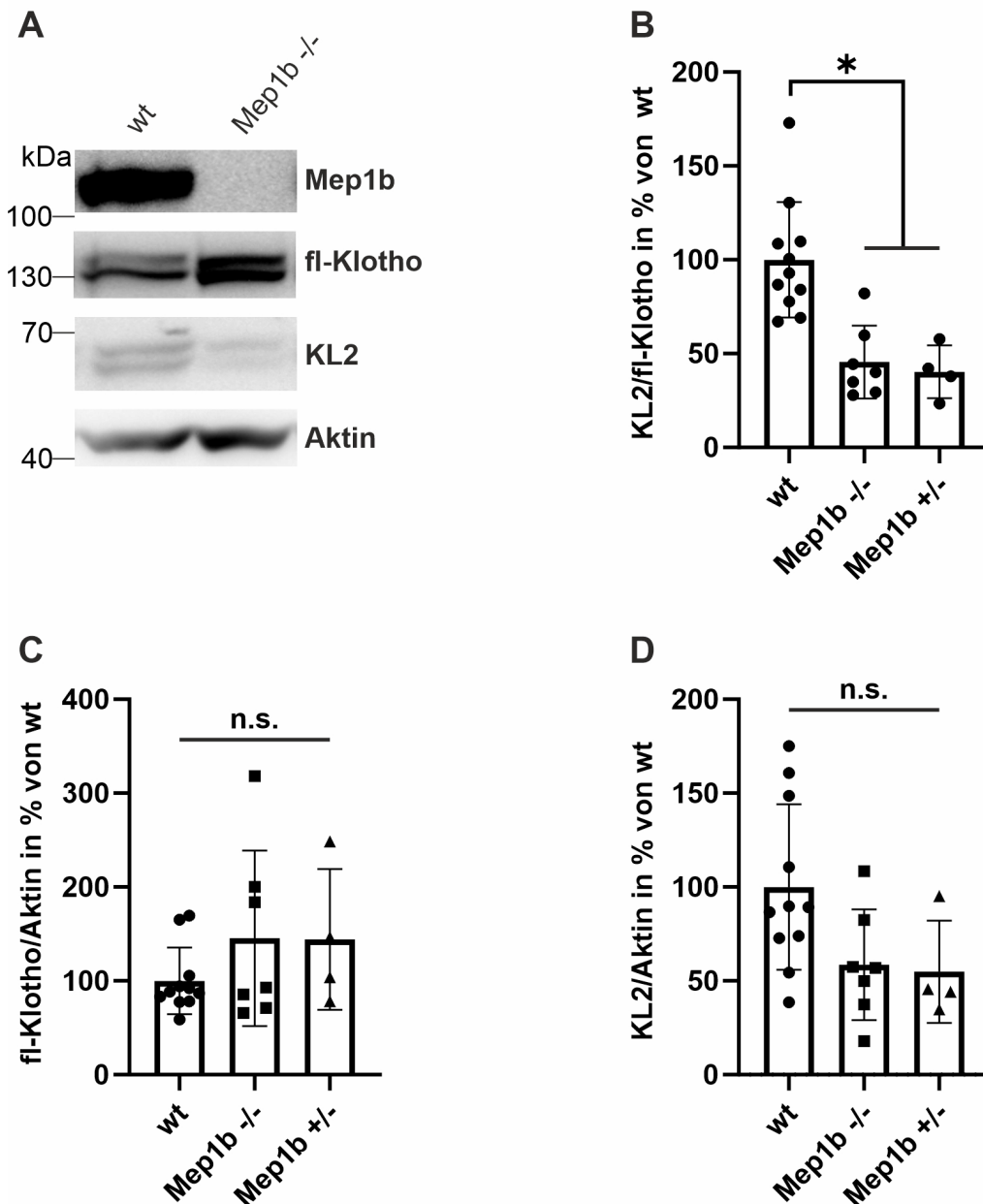


Abbildung 9: Klotho-Prozessierung in Mep1b^{-/-}-Maus-Nieren. (A) Dargestellt ist eine repräsentative Western-Blot-Analyse von Nierenlysaten aus wt (= wildtypisch) und Mep1b^{-/-}-Mäusen. Heterozygote Mäuse wurde ebenfalls analysiert (hier nicht im Western-Blot-Ausschnitt zu sehen). Zur Darstellung von fl-Klotho und KL2 wurde der Antikörper KM2119 verwendet. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (B) Quantifizierung des Verhältnisses von KL2 zu fl-Klotho in Prozent von wt-Werten. (C+D) Quantifizierung von fl-Klotho (C) und KL2 (D) jeweils normiert auf Aktin, in Prozent von wt-Werten. Die Daten werden mit Mittelwert ± Standardabweichung abgebildet mit n = 11 (wt), n = 7 (Mep1b^{-/-}), n = 4 (Mep1b^{+/-}), one-way ANOVA gefolgt von Tukey's post-hoc-Test, *p < 0.05, n. s. = nicht signifikant.

5.1.2 Reduktion von s-KL2 und s-Klotho in CSF von Mep1b^{-/-}-Mäusen

Zusätzlich zu den Nierenlysaten wurden CSF-Proben der Mep1b^{-/-}-Tiere mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 10A), da in der CSF lösliches Klotho beschrieben wurde (18, 20). Im Vergleich zu den wildtypischen Tieren zeigte sich bei den Mep1b-defizienten Tieren signifikant geringere s-Klotho-Level in CSF (Abbildung 10B). Die s-KL2-Level waren im Vergleich zu den wildtypischen Mäusen tendenziell reduziert (Abbildung 10C). Auch das Verhältnis von s-KL2 zu s-Klotho veränderte sich signifikant (Abbildung 10D).

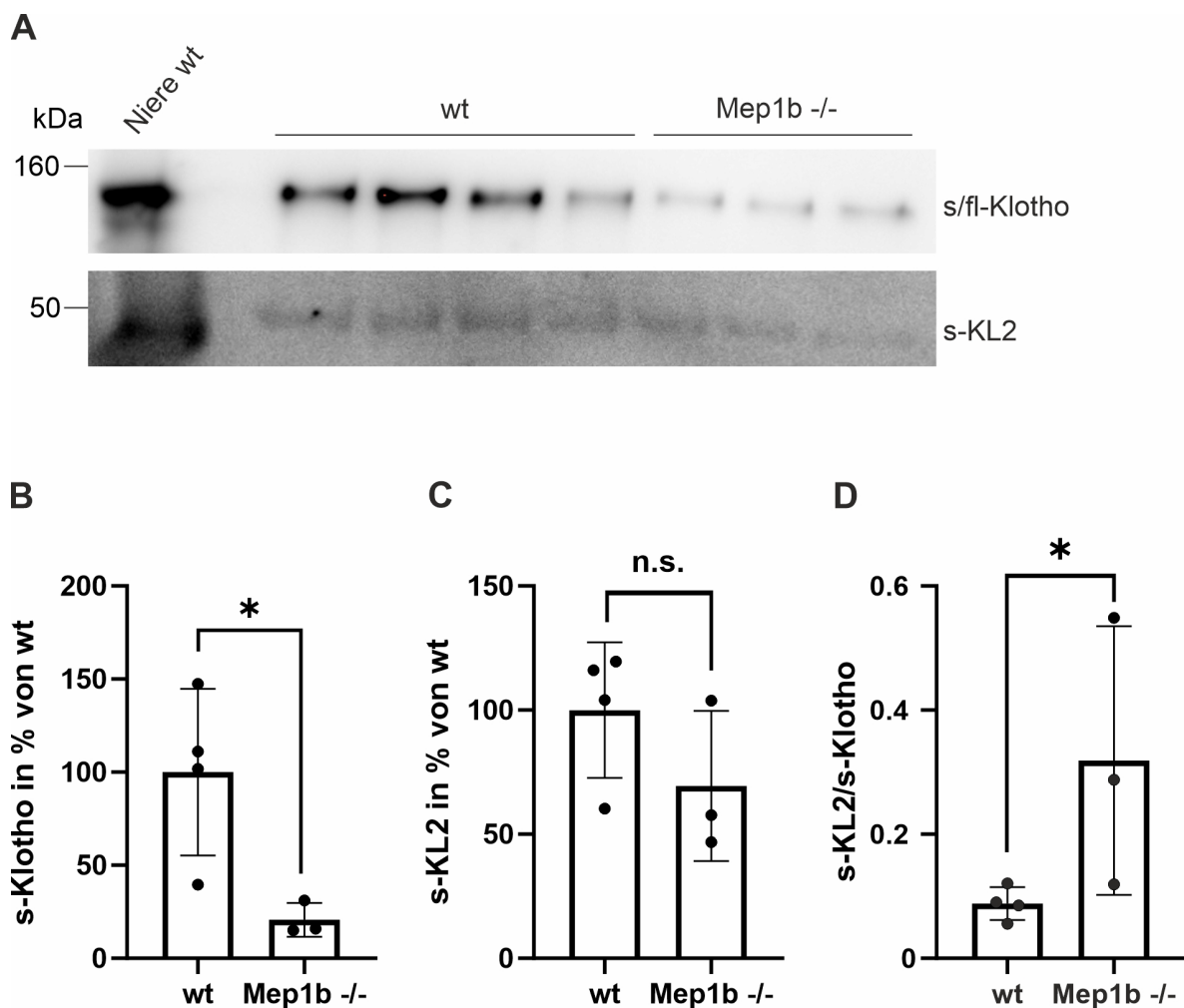


Abbildung 10: s-Klotho und s-KL2 in CSF von Mep1b^{-/-}-Mäusen. (A) Western-Blot-Analyse von wt- (= wildtypischen) und Mep1b^{-/-}-Mäusen. Es wurden jeweils 4 µl aufgetragen. Als Positivkontrolle für die Klotho-Detektion wurde wildtypisches Maus-Nierenlysate verwendet. Die Immunodetektion erfolgte mit dem Antikörper KM2119, gegen KL2. (B+C) Quantifizierung von s-Klotho (B) und s-KL2 (C) in Prozent von wt-Werten. (D) Quantifizierung des Verhältnisses s-KL2 zu s-Klotho in wildtypischen Mäusen und Mep1b^{-/-}-Mäusen. Die Daten werden mit Mittelwert ± Standardabweichung abgebildet mit n = 4 (wt), n = 3 (Mep1b^{-/-}), t-test, *p < 0.05, n. s. = nicht signifikant.

5.1.3 Reduktion von s-Klotho bei endothelspezifischer Mep1b-Überexpression

Als Gegensatz zur CSF der Mep1b^{-/-}-Mäuse wurde CSF einer Mep1b-überexprimierenden Mauslinie untersucht. In den Slc^{Cre}Mep1b-Mäusen wird Mep1b nach Induktion durch Tamoxifen-Injektion spezifisch im Endothel des Gehirnes und im *Plexus Choroideus*-Epithel exprimiert (vgl. 4.5.3). Als Kontrolle dienten Rosa26^{Mep1b-HA}-Mäuse, die die Slco1c1^{CreERT2}-Kassette nicht besitzen und die Tamoxifen-Injektion kein Effekt auf die Mep1b-Expression hat. Von diesen Kontrollmäusen wurden einige ebenfalls mit Tamoxifen injiziert. CSF wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 11). In CSF der Slc^{Cre}Mep1b-Mäuse zeigt sich vermindertes s-Klotho, im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Weitere Banden von Klotho-Fragmenten, wie beispielsweise s-KL1, konnten auf dem Western-Blot nicht detektiert werden. Von Bedeutung ist, dass hier für die Detektion der Antikörper KM2076 verwendet wurde, der an eine Sequenz in KL1 bindet. Im Vergleich dazu wurde bei den Analysen der Mep1b^{-/-}-Mäuse, der Antikörper KM2119 verwendet, der an eine Sequenz in KL2 bindet (vgl. Abbildung 3).

Zusätzlich wurde mit einem Anti-Maus-Antikörper die schwere Kette von Immunglobulin G (IgG) dargestellt. Es zeigte sich ein Anstieg des IgG-Gehalts in den Slc^{Cre}Mep1b-Mäusen, verglichen mit den Kontrollen. Eine Ausnahme bildet die mit einem Pfeil markierte Probe, bei der makroskopisch eine Verunreinigung durch Blut in der Probe auffiel.

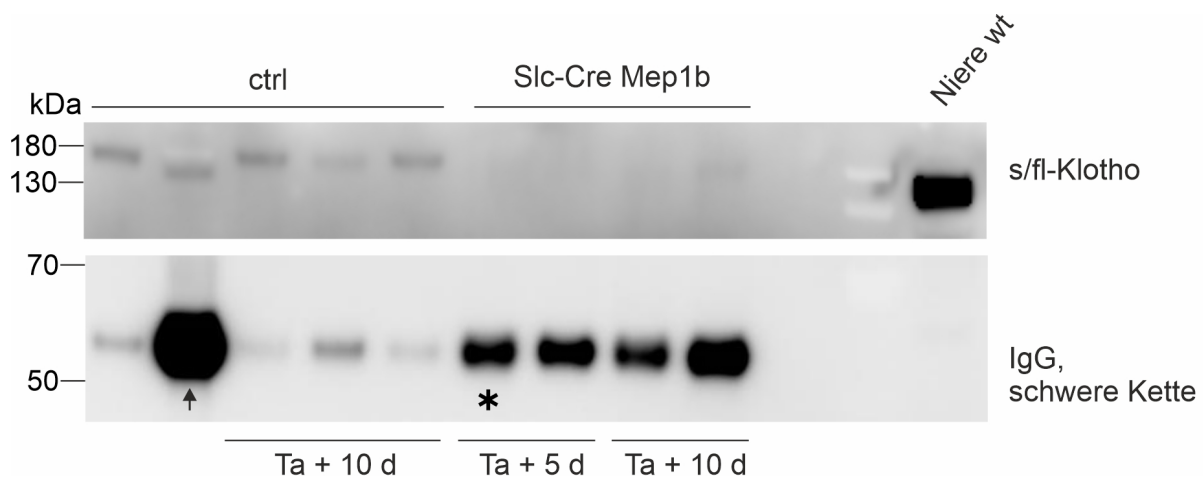


Abbildung 11: Reduktion von s-Klotho in CSF-Analysen von Slc^{Cre}Mep1b-Mäusen. Western-Blot-Analyse von Maus-CSF. Jeweils 4 μ l wurde aufgetragen, der Stern kennzeichnet die Probe bei der nur 3,5 μ l zur Verfügung standen. Der Pfeil kennzeichnet die Probe, bei der makroskopisch Blut in der CSF sichtbar war. Die Proben wurden jeweils 5 oder 10 Tage nach Tamoxifen-Injektion entnommen. Ta = Tamoxifen. Zur Detektion von fl-Klotho wurde der Antikörper KM2076 verwendet, zur Detektion von IgG, der Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG. Als Positivkontrolle für die Detektion von Klotho diente wildtypisches Maus-Nierenlysat.

5.1.4 Deglykosylierung von Maus-Nierenlysaten verändert die Klotho-Darstellung im Western-Blot

Im Rahmen der Analyse der Nierenlysate fielen Doppelbanden bei der Klotho-Detektion auf. Zur besseren Identifikation wurde eine Deglykosylierung der Nierenlysate durchgeführt und der Effekt auf endogenes Klotho qualitativ untersucht (Abbildung 12). Die Deglykosylierung mit der Endoglykosidase Endo Hf, welche N-Glykosylierungen entfernt, die viel Mannose enthalten, zeigt eine Veränderung der Banden im Vergleich zur nicht behandelten Niere. Unter Behandlung mit PNGase, welche nahezu alle N-Glykosylierungen entfernt, verschwinden die Banden bei 130 kDa und eine Bande zwischen 130 kDa und 100 kDa erscheint.

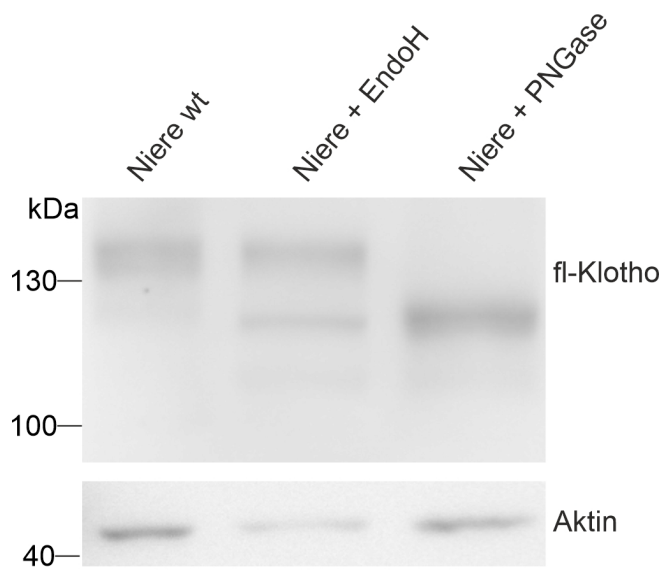


Abbildung 12: Deglykosylierung von Maus-Nierenlysaten. Western-Blot-Analyse nach Deglykosylierung durch die Endoglykosidasen Endo Hf und PNGase. Als Kontrolle dienten unbehandelte Nierenlysate. Der Antikörper KM2119 wurde zum Klotho-Nachweis verwendet und Aktin diente als Ladekontrolle.

5.1.5 Kotransfektions-Protokoll für MEFADAM10/17^{-/-}KL

Da MEF-Zellreihen niedrige Transfektions-Effizienzen zeigen und die Transfektion mit ADAM10 mit dem bestehenden Protokoll erfolglos war, wurden ein Protokoll für eine transiente Transfektion mit ADAM10 und für die Kotransfektion mit ADAM10 und Mep1b in MEFADAM10/17^{-/-}KL etabliert (vgl. 4.1.3.3). Dazu wurden verschiedene DNA-Konzentrationen und Verhältnisse zwischen Transfektionsreagenz und DNA miteinander verglichen (Abbildung 13). Das Protokoll bezieht sich auf Zellen, die in 6-Well/s ausgesät wurden. Die Transfektion mit Lipofectamine 2000 und jeweils 2 µg DNA, im Verhältnis 4:1, (Abbildung 13, Ansatz 7) zeigte die stärksten Banden im Western-Blot. Diese Bedingungen wurden für folgende Transfektionen verwendet.

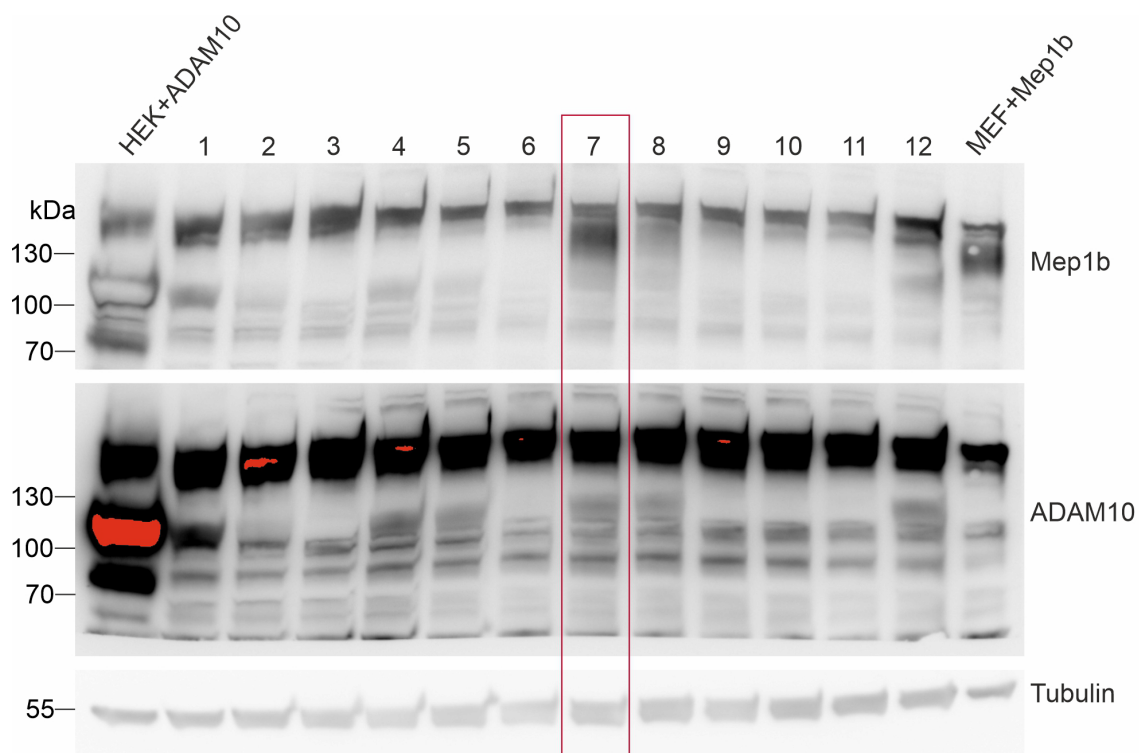


Abbildung 13: Kotransfektions-Protokoll für MEFADAM10/17^{-/-}KL. MEFADAM10/17^{-/-}KL-Zellen wurden transient transfiziert mit ADAM10- und Mep1b-DNA verschiedener Konzentrationen und Verhältnissen zum Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000. Die DNA-Mengen und Verhältnisse sind in Tabelle 25 beschrieben. Der markierte Ansatz 7 zeigte die stärksten Banden für die Kombination aus ADAM10 und Mep1b. Als Positivkontrollen für die gewünschte Proteinexpression wurden HEK- bzw. MEF-Zellen verwendet, die in Vorversuchen mit ADAM10 oder Mep1b transient transfiziert wurden.

5.1.6 Mep1b beeinflusst Klotho-Prozessierung unabhängig von ADAM10 und ADAM17

Das Protokoll für die Kotransfektion wurde genutzt um den Mep1b-Einfluss auf Klotho zu analysieren. Klotho-Levels in Zell-Lysaten und Überständen aus Mep1b-überexprimierenden Zellen wurden mit Kontrollzellen verglichen. Zusätzlich fand ein Vergleich zur Überexpression von ADAM10 und dem Zusammenspiel aus Mep1b und ADAM10 statt (Abbildung 14A+B). In der Auswertung der Lysate zeigten sich unter Mep1b-Expression signifikant reduzierte Mengen fl-Klotho, im Vergleich zum Kontrollansatz (Abbildung 14C). Der Vergleich des Effekts von Mep1b mit dem von ADAM10 ergab keinen signifikanten Unterschied, ebenso wenig der Vergleich beider zur Kotransfektion mit ADAM10 und Mep1b. In den densitometrischen Untersuchungen der Überstände waren die s-Klotho-Levels unter Mep1b-Expression signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrolltransfektion und signifikant erhöht unter ADAM10-Expression (Abbildung 14D). Ebenso war der Unterschied zwischen Mep1b und ADAM10 signifikant (Abbildung 14D).

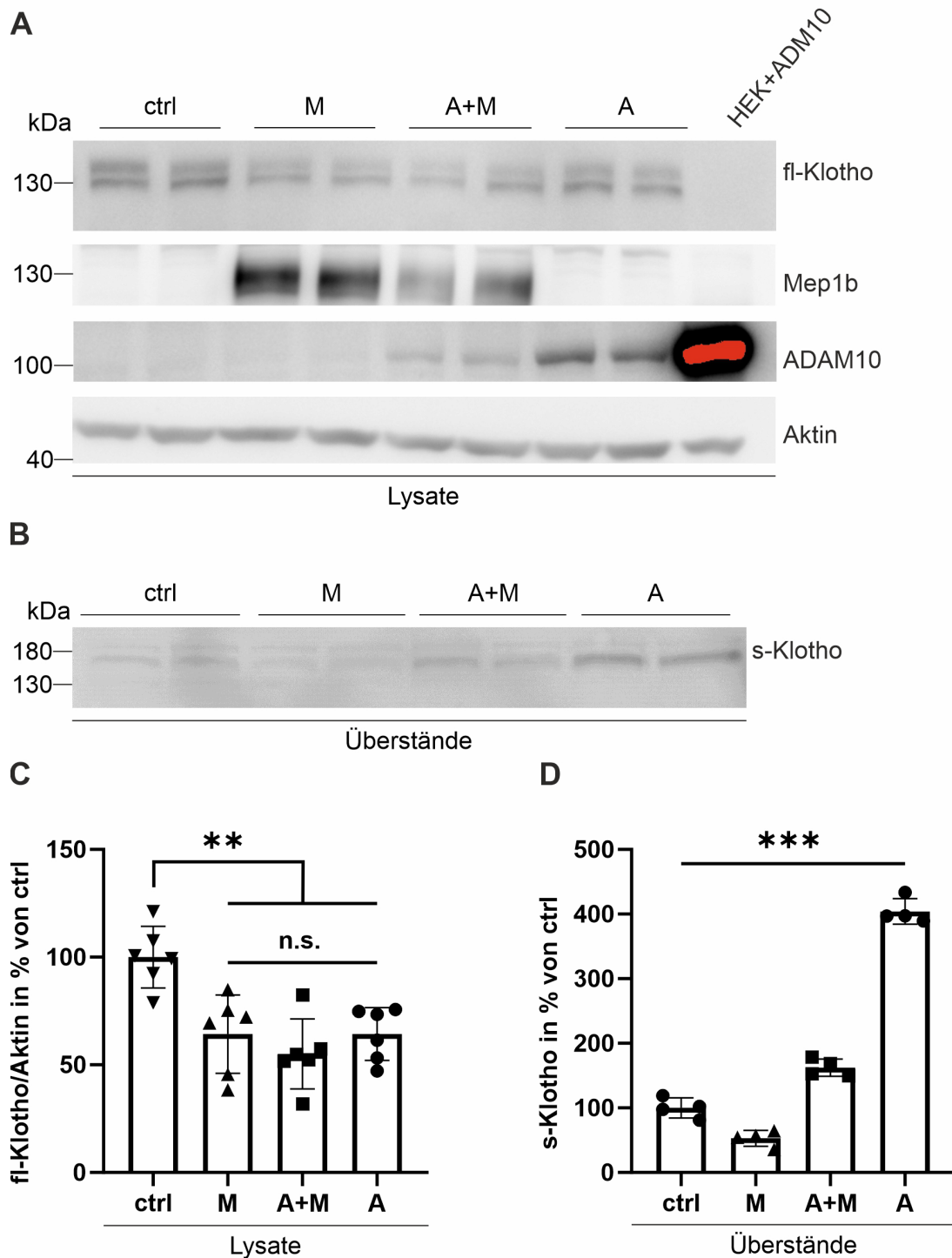


Abbildung 14: Klotho-Prozessierung unter Mep1b-Überexpression in ADAM10/17^{-/-}-Zellen. (A) Repräsentative Western-Blot-Analyse von MEFADAM10/17^{-/-}-KL-Lysaten und (B) -Überständen. Die Zellen wurden mit jeweils 2 µg A (= ADAM10), M (= Mep1b) oder der Kombination beider transfiziert. Um ähnliche Bedingungen für alle Ansätze zu erzielen, wurden A und M zusammen mit 2 µg Leervektor transfiziert, wenn nicht gleichzeitig mit A und M transfiziert wurde. Als Kontrolle (ctrl) dienten Zellen, die mit 4 µg Leervektor transfiziert wurden. Der Antikörper KM2076 wurde zur Detektion von Klotho verwendet. Die Detektion von Aktin diente als Ladekontrolle, auf die fl-Klotho normiert wurde. (C) Quantifizierung von fl-Klotho/Aktin und (D) s-Klotho in Prozent der Kontrolle. Die Daten werden mit Mittelwert ± Standardabweichung abgebildet mit n = 6 in (A+C) und n = 4 (B+D) in 3 (Lysate) bzw. 2 (Überstände) unabhängigen Versuchen. One-way ANOVA Test gefolgt von Tukey's post-hoc-Test, **p < 0,01, ***p < 0,001.

5.1.7 Effekt des Mep1b-Inhibitors Actinonin auf Klotho

Ob die Effekte von Mep1b auf Klotho durch den Mep1b-Inhibitor Actinonin unterbunden werden können, sollte ebenfalls untersucht werden. MEFADAM10/17^{-/-}KL-Zellen wurden mit Mep1b transfiziert, anschließend mit Actinonin, in einer Endkonzentration von 20 µM, inkubiert und mit Zellen verglichen, die nicht mit Actinonin behandelt wurden (Abbildung 15). Um zu überprüfen, ob der Effekt von Actinonin auf die Inhibierung von Mep1b zurückzuführen ist, wurden Kontrollzellen, die nicht mit Mep1b transfiziert wurden, ebenfalls mit Actinonin behandelt. In den Zell-Lysaten zeigte sich eine Tendenz zu mehr fl-Klotho unter Actinonin-Behandlung (Abbildung 15C). Diese Tendenz war auch in der Kontrollgruppe, die nicht mit Mep1b transfiziert wurde, ersichtlich. In der Analyse der Überstände fand sich unter Actinonineinfluss tendenziell mehr s-Klotho, als in den Überständen der Zellen ohne Actinonin-Behandlung (Abbildung 15D). Der Einfluss von Actinonin auf die Klotho-Levels zeigte sich also sowohl in Zellen, die mit Mep1b transfiziert worden waren, als auch in Zellen ohne Mep1b-Überexpression.

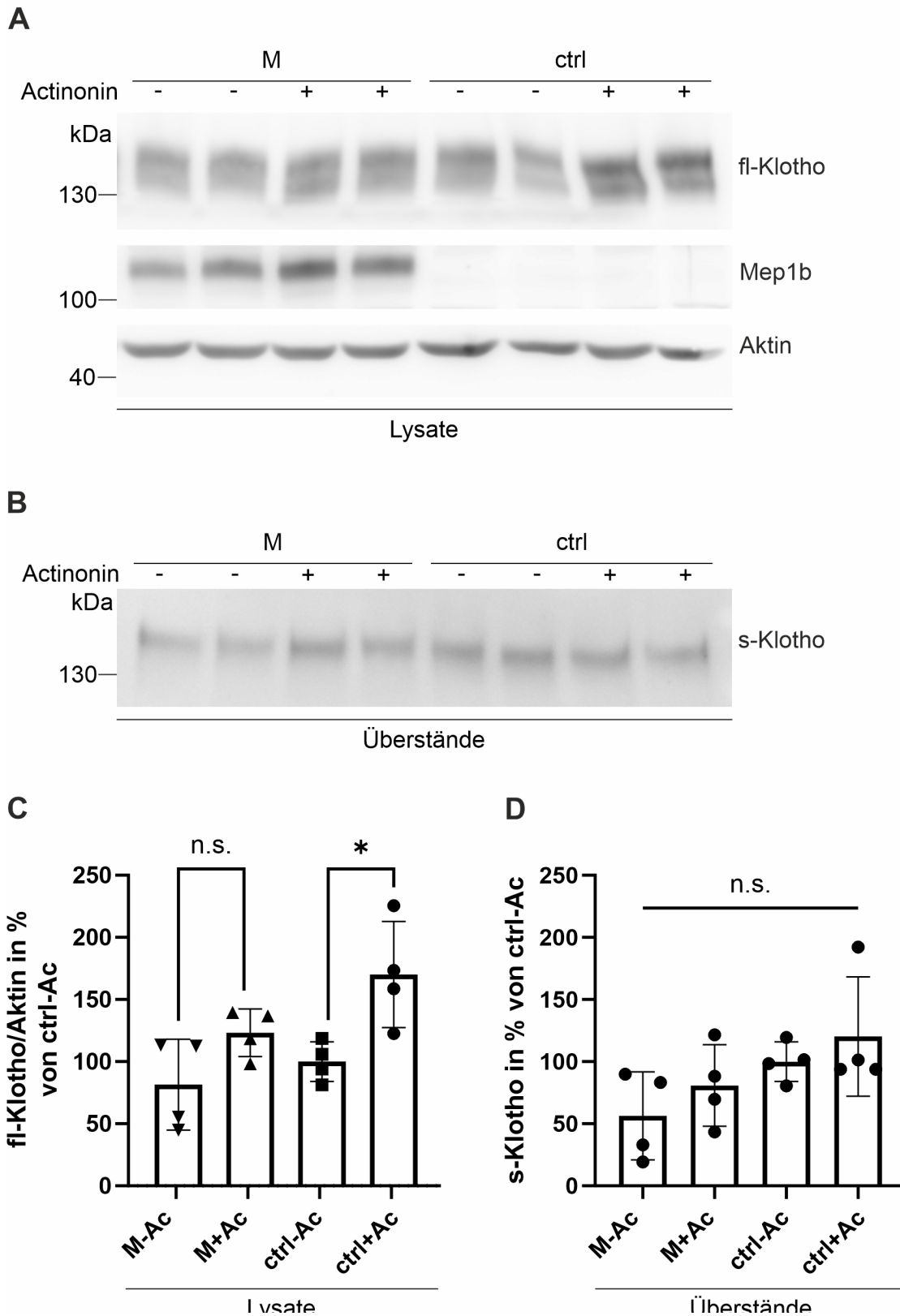


Abbildung 15: Klotho-Prozessierung unter Zugabe von Actinonin. (A) Repräsentative Western-Blot-Analyse von MEFADAM10/17^{-/-}KL-Lysaten und (B) Überständen nach transienter Transfektion und Behandlung mit 20 μ M Actinonin. Die transiente Transfektion erfolgte mit M (= Mep1b) und als Kontrolle (= ctrl) mit Leervektor. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte ein Mediumswechsel mit Zugabe von Actinonin gelöst in DMSO. Die Kontrollgruppen erhielten das gleiche Volumen DMSO. Für die Klotho-Detektion wurde der Antikörper KM2076 verwendet. Aktin diente als Ladekontrolle, auf die fl-Klotho

normiert wurde. **(C)** Quantifizierung von fl-Klotho/Aktin und **(D)** s-Klotho, angegeben in Prozent der Kontrolle ohne Actinonin-Behandlung. Die Daten werden mit Mittelwert \pm Standardabweichung abgebildet mit $n = 4$ in zwei unabhängigen Versuchen. *One-way ANOVA* gefolgt von *Tukey's post-hoc-Test*, * $p < 0.05$, n. s.= nicht signifikant.

5.1.8 Keine Unterschiede zwischen rekombinantem und transfiziertem Mep1b

Mep1b kann sowohl in membrangebundener, als auch in löslicher Form als Protease agieren. Die beiden Formen haben teilweise unterschiedliche Substrate (6, 103). Zum Vergleich der beiden Formen wurden MEFADAM10/17^{-/-}KL entweder transient mit Mep1b transfiziert oder mit rekombinantem Mep1b behandelt, in einer Endkonzentration von 1,25 nM (Abbildung 16). Es wird angenommen, dass transfiziertes Mep1b unter Abwesenheit von ADAM10 und ADAM17 vor allem membrangebunden vorliegt, während rekombinantes Mep1b die lösliche Form repräsentiert. Fl-Klotho in Zell-Lysaten und s-Klotho in Überständen wurde im Western-Blot analysiert (Abbildung 16A+B). In der densitometrischen Auswertung der Western-Blots ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Klotho-Levels unter Einfluss der beiden Mep1b-Formen (Abbildung 16C+D).

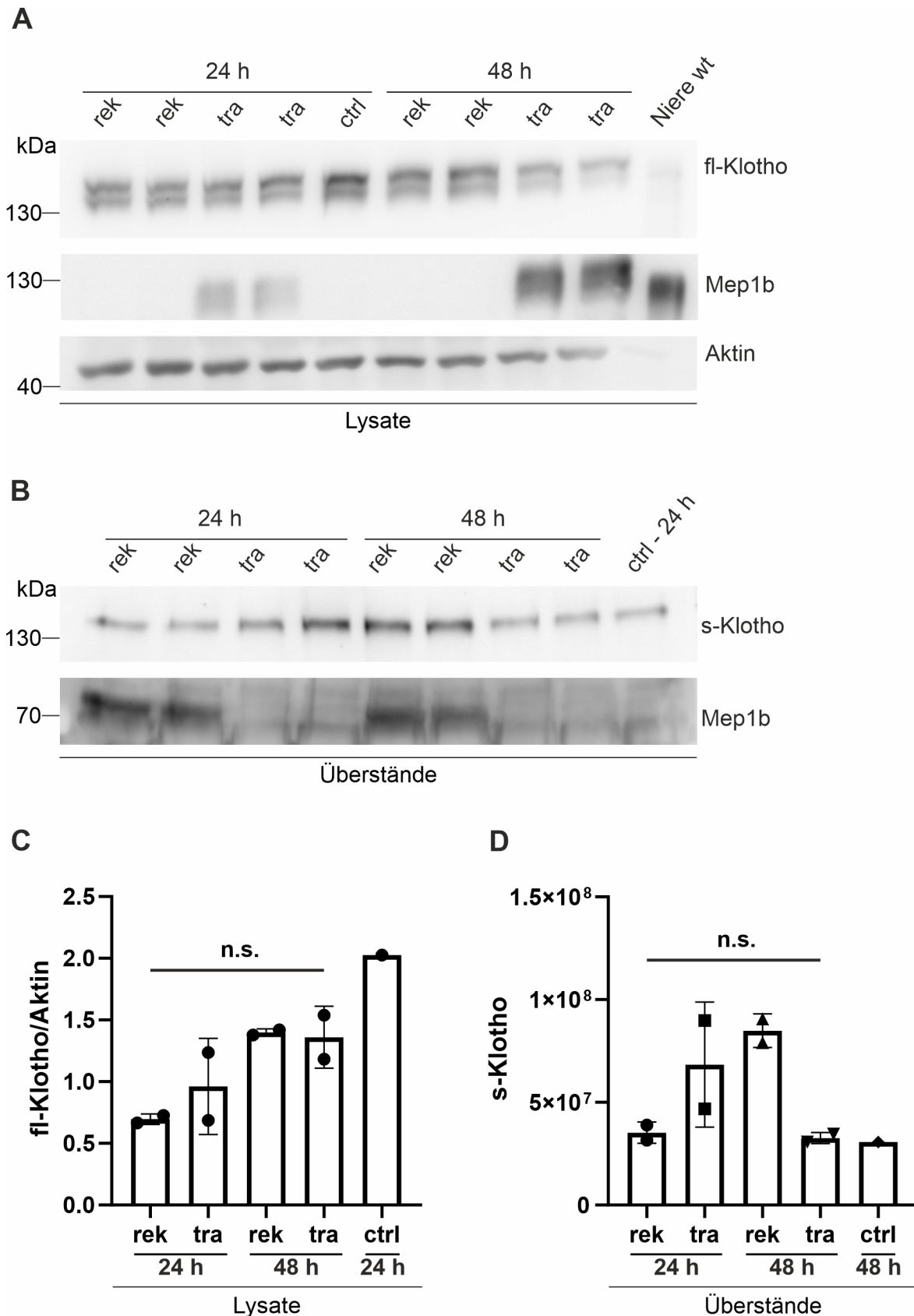


Abbildung 16: Effekt von rekombinalem und transfiziertem Mep1b auf Klotho. MEADAM10/17^{-/-}-KL-Zellen wurden mit 1,25 nM rekombinalem Mep1b (= rek) behandelt oder transient mit Mep1b transfiziert (= tra). Zusätzlich wurden Inkubationszeiten von 24 h und 48 h verglichen. **(A)** Lysate und **(B)** Überstände wurden mittels Western Blot analysiert. Mep1b wurde ebenfalls mittels Immunodetektion in Lysaten und Überständen dargestellt, um das Vorliegen von

rekombinantem Mep1b und den Transfektionserfolg zu bestätigen. Als Kontrolle (= ctrl) dienten Zellen, die mit Leervektor transfiziert wurden. Der Antikörper KM2076 wurde zur Detektion von Klotho verwendet. Die Detektion von Aktin diente als Ladekontrolle, auf die fl-Klotho normiert wurde. **(C)** Quantifizierung von fl-Klotho/Aktin und **(D)** s-Klotho. Die Daten werden mit Mittelwert \pm Standardabweichung abgebildet mit $n = 2$ in einem Versuch, *one-way* ANOVA, n. s.= nicht signifikant.

5.2 Herstellung und Aufreinigung von Klotho-Fusionsproteinen

Für zukünftige Versuche, beispielsweise Restriktionsanalysen mit rekombinantem Mep1b und Klotho oder Transportanalysen von Klotho und seinen Fragmenten über die BHS, sollten Klotho Δ TM (= K Δ TM), KL1 und KL2 rekombinant hergestellt werden. Die Aufreinigung der Fusionsproteine wurde nach der Expression in Bakterien über ein GST-Tag, und nach der Expression in Insektenzellen über ein Strep-Tag II, durchgeführt.

5.2.1 Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine in E. coli-Stämmen

Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in den E. coli-Stämmen BL21, Rosetta und Origami (vgl. 4.3.1). Zusätzlich wurde die Expression bei verschiedenen Temperaturen und IPTG-Konzentrationen getestet. RAP-GST, welches in der Arbeitsgruppe bereits erfolgreich hergestellt wurde, wurde zusätzlich aufgereinigt, um die Durchführung der Methodik zu überprüfen (Abbildung 17A). KL2-GST wurde in allen Stämmen am stärksten exprimiert, und Klotho Δ TM-GST am wenigsten. Abbildung 17B zeigt Auszüge einer Western Blot-Analyse von Eluaten und Waschfraktionen zum Vergleich der drei Fusionsproteine in Rosetta-Bakterien. Banden in der Höhe von KL2-GST (ca. 85 kDa) wurden auch in Coomassie-Färbungen der SDS-PAGE-Gele gesehen (beispielsweise in Abbildung 17C). Deutliche Banden auf der Höhe von KL1-GST (ca. 85 kDa) und Klotho Δ TM-GST (ca. 155 kDa) wurden in keinem Versuchsansatz in Coomassie-Färbungen detektiert. Lediglich bei der Größe von GST in Höhe von 25 kDa waren deutliche Banden nachweisbar (für den Expressionsversuch von KL1-GST gezeigt in Abbildung 17C). Abbildung 17D verdeutlicht die stärkere Expression in Rosetta- im Vergleich zu Origami-Bakterien.

Aus der densitometrischen Auswertung von Abbildung 17C ließen sich für KL2-GST Proteinmengen von insgesamt 10 μ g berechnen, die aus einem Ansatz mit 150 ml Bakteriensuspension aufgereinigt wurden. Die Aufreinigung in Rosetta-Bakterien über Nacht bei 21 °C mit 0,5 mM IPTG erbrachte verglichen mit den anderen Ansätzen und Bakterienstämmen, die größten Mengen KL2-GST-Fusionsprotein (Abbildung 17C+D). Für KL1-GST und Klotho Δ TM-GST ließen sich keine Konzentrationen bestimmen.

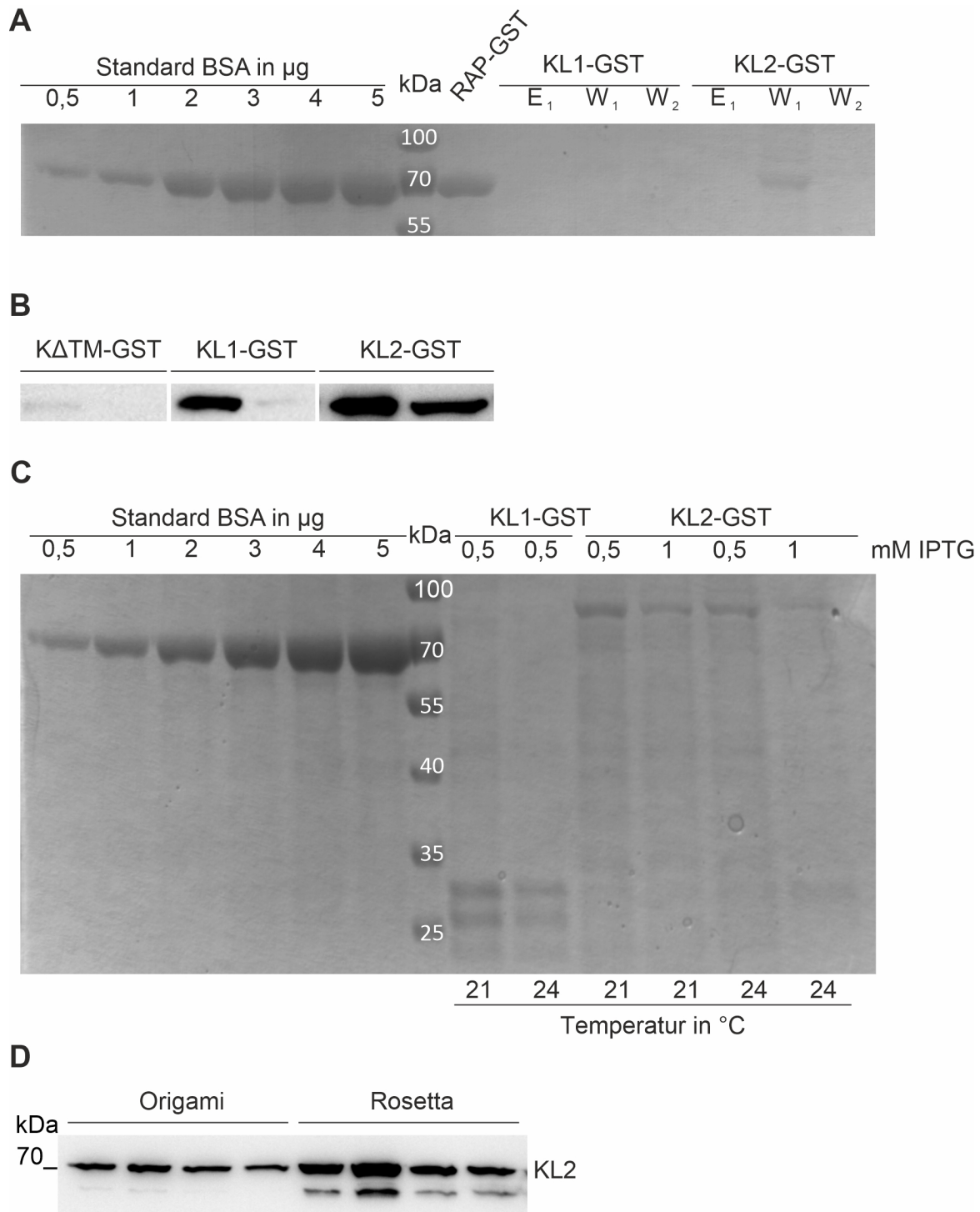


Abbildung 17: Herstellung und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine. (A) Ausschnitt einer Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE von Eluaten und Waschfraktionen in BL21-Bakterien. Zur Konzentrationsbestimmung wurde auf der linken Seite eine BSA-Standardreihe aufgetragen. Daneben sind 2 μl RAP-GST-Eluat und von KL1- und KL2-GST jeweils 10 μl Eluat (= E₁) und 10 μl der ersten und zweiten Waschfraktionen (= W₁, W₂) dargestellt. (B) Repräsentative Western-Blot-Analyse nach Aufreinigung von K Δ TM-, KL1- und KL2-GST in Rosetta-Bakterien. Es wurden jeweils 12 μl des ersten Eluates und der ersten Waschfraktion (von rechts nach links) aufgetragen. (C) Coomassie-Färbung nach SDS-Page von jeweils 10 μl KL1-GST- und KL-GST-Eluaten nach Aufreinigung aus 150 ml Ansätzen bei 21 °C oder 24 °C und mit IPTG-Konzentration von 0,5 mM oder 1 mM. BSA-Standardreihe auf der linken Seite. (D) Vergleich der KL2-GST-Expression in Rosetta- und Origami-Bakterien. In (B) und (D) wurde der Anti-FLAG-Antikörper zur Detektion verwendet.

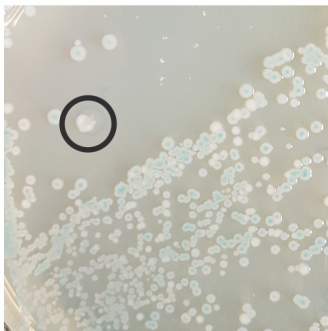
5.2.2 Baculovirus-Expressions-System in Insektenzellenkultur

Die Expression der Fusionsproteine KL1-Strep, KL2-Strep und Klotho Δ TM-Strep wurden in der Insektenzellkultur etabliert (vgl. 4.3.2). Hier präsentiert werden Kontrollschritte der Bacmid-Herstellung, sowie die Expression der rekombinanten Proteine unter verschiedenen Bedingungen in High5-Zellen und die Ergebnisse einer Probe-Aufreinigung von Klotho Δ TM-Strep mittels Affinitätschromatografie.

5.2.2.1 Bacmid-Herstellung und Kontroll-PCR

Nach Klonierung der Konstrukte in pFastBac erfolgte die Transposition der DNA in Bacmide in DH10Bac Zellen. DH10Bac-Kolonien wurden zunächst mittels Blau-Weiß-Screening selektiert (Ausschnitt gezeigt in Abbildung 18A). Aus jeweils mehreren weißen Bakterienkolonien wurde die Bacmid-DNA isoliert. Die DNA wurde in einem weiteren Kontrollschritt mittels PCR analysiert. Abbildung 18B zeigt die Ergebnisse dieser Kontroll-PCR. Die Banden von ca. 3700 bp bei KL1-Strep und KL2-Strep und ca. 5300 bp bei Klotho Δ TM sprechen für eine erfolgreich stattgefundene Transposition der gewünschten Konstrukte (vgl. Abbildung 8). Bei allen KL2-Strep-Proben sind Banden < 0,5 kb zu sehen, die bei fehlender Transposition vorliegen können. Wiederholte Transposition und Analysen anderer Bakterienkolonien (hier nicht gezeigt) brachten keine Ergebnisse ohne diese Bande, weshalb mit dem gezeigten Bacmid weitergearbeitet wurde.

A



B

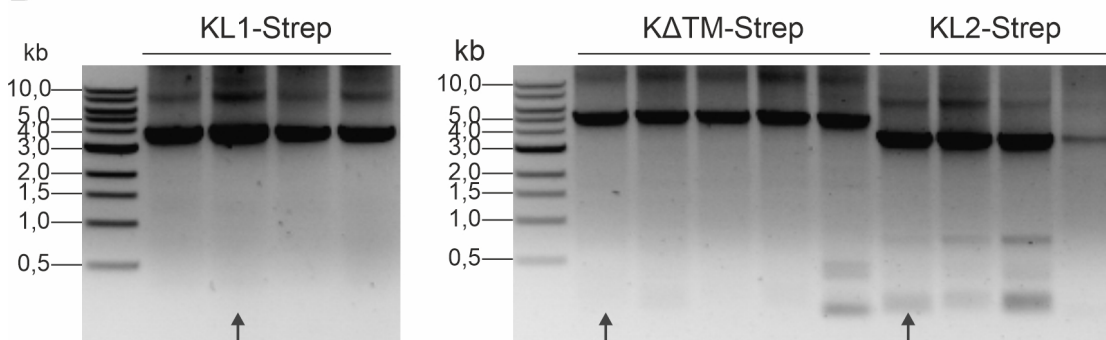


Abbildung 18: Überprüfung des Transpositions-Erfolgs mittels PCR. (A) Auszug eines Blau-Weiß-Screenings und Selektion geeigneter Bakterienkolonie. Der Kreis kennzeichnet eine weiße Bakterienkolonie die beispielsweise gepickt und weiterbearbeitet wurde. (B) Agarose-Gelelektrophorese der PCR isolierter Bacmide für die drei Fusionsproteine. Jeweils mehrere Klone wurden analysiert. Die Pfeile markieren die Bacmide die weiterverwendet wurden.

5.2.2.2 Expression der rekombinanten Proteine in High5-Zellen

Nach drei Zyklen der Virusamplifikation in Sf9-Zellen wurden High5-Zellen mit P4-Viren infiziert und die Überstände mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 19). Bei der Virusproduktion und -amplifikation wurde eine Kontrollgruppe mitgeführt, bei der Sf9 Zellen initial mit Medium ohne Transfektionsreagenz und DNA behandelt wurden. Bei ersten Expressionsversuchen mit einer Viruszugabe im Verhältnis 1:10 zum Medium wurden reduzierte Zelladhärenz und eingeschränktes Zellwachstum beobachtet und geringe Proteinmengen im Western Blot detektiert (Daten nicht gezeigt). Zwei geringere Virusmengen mit Verdünnungen von 1:20 und 1:100 wurden deshalb verglichen. Gleichzeitig wurden Proben nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h entnommen, um die optimale Expressionsdauer zu bestimmen (Abbildung 19). Die Expression für 72 h mit der Verdünnung 1:100 zeigte in qualitativen Analysen die stärksten Banden im Western-Blot.

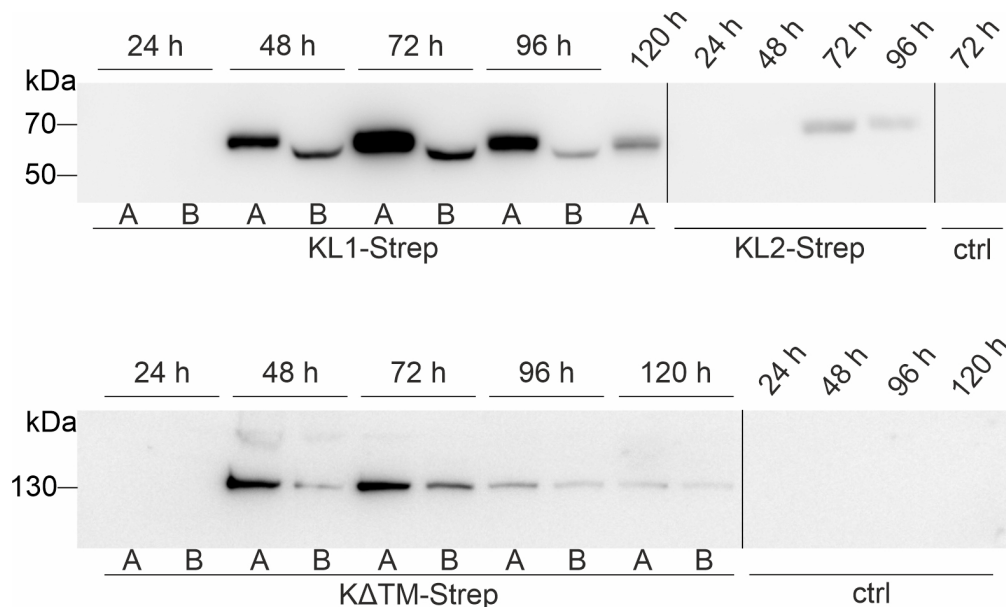


Abbildung 19: Probe-Expression in High5-Zellen. Qualitative Analyse von 30 μ l Überständen, aus insgesamt 20 ml Medium, mittels Western-Blot. Die Fusionsproteine KL1-Strep, KL2-Strep und Klotho Δ TM-Strep wurden mit dem Anti-Strep-Antikörper detektiert. Die Kontrolle (= ctrl) wurde gleichartig analysiert. Viruszugabe im Vergleich zum Medium A = 1:100, B = 1:20. KL2-Strep ist hier nur mit 1:100 gezeigt.

5.2.2.3 Probe-Aufreinigung mittels Flüssigchromatografie

Klotho Δ TM-Strep wurde probeweise mithilfe des automatisierten Chromatographiesystems ÄKTA start aufgereinigt (vgl. 4.3.2.5). Dazu wurden 35 ml Überstand einer High5 Kultur verwendet, die zuvor für 72 h P4-Virus im Verhältnis 1:100 behandelt wurde. Aus dem Zellüberstand wurde eine Probe für die Western-Blot-Analyse entnommen, ebenso aus den Waschfraktionen, den Eluaten und dem Durchfluss, der aufgefangen wurde, nachdem der Überstand auf die Säule gegeben wurde. Abbildung 20A zeigt die Western-Blot-Analyse dieser Proben. Es wurden die Elutionsfraktionen ab E₅ für die Analyse gewählt, da die photometrischen Daten ab dieser Fraktion erhöhte Proteinwerte vermuten ließen. Abbildung 20B stellt die Anteile dar, die die verschiedenen Fraktionen an der Klotho-Menge ausmachen, die sich in den Zellüberständen befanden. Über 50% der ursprünglichen Mengen waren nicht mehr in den Fraktionen zu finden.

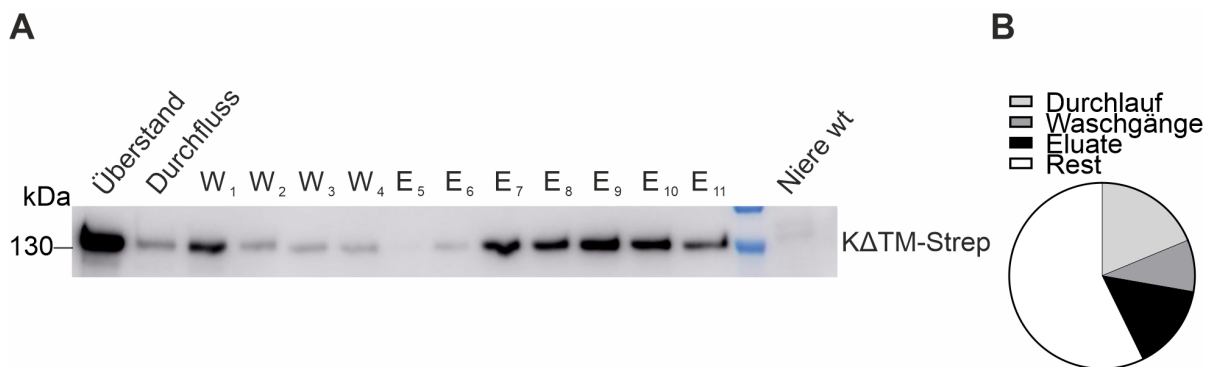


Abbildung 20: Probe-Aufreinigung von Klotho Δ TM-Strep. (A) Western-Blot-Analyse des initialen Zellüberstandes (25 μ l), des Durchflusses (25 μ l), der Waschfraktionen 1-4 (W₁₋₄) (jeweils 20 μ l) und der Eluate 5-11 (E₅₋₁₁) (jeweils 5 μ l). Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper KM2076. Als Positivkontrolle für Klotho diente Nierenlysat. (B) Darstellung der Klotho-Anteile aus dem eingesetzten Zellüberstand, die im Durchfluss, den Waschfraktionen und Eluaten detektiert wurden. Die Werte wurden durch densitometrische Analysen des Western-Blots und unter Berücksichtigung der aufgetragenen Volumen und der insgesamt bestehenden Volumen bestimmt.

6 Diskussion

Klotho und seine löslichen Fragmente spielen eine Rolle bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen des menschlichen Alterns, beispielsweise bei kognitiven Prozessen, im kardiovaskulären System und für die Nierenfunktion (2–4). Sowohl die membranständigen, als auch die löslichen Formen scheinen dabei Funktionen zu übernehmen (4). Reduzierte Mengen löslichen Klothos korrelieren mit kognitiven Defiziten und eingeschränkter Nierenfunktion (93). Die Zugabe löslichen Klothos zeigte währenddessen schützende Effekte auf kognitive Leistungen und die Nierenfunktion (68, 31). Es ist bekannt, dass α -, β - und γ -Sekretase fl-Klotho spalten und so vermehrt lösliche Klotho-Fragmente entstehen können (5). Wie diese Prozessierung reguliert wird, welche Proteasen beteiligt sind und welche Produkte dabei entstehen, ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten.

Die Metalloprotease Mep1b ist ein noch nicht lang erforschter Faktor in der Pathogenese von Morbus Alzheimer, aber auch in der Genese von Niereninsuffizienz. Ähnlich wie BACE1, ist Mep1b an der Produktion des neurotoxischen Peptids A β beteiligt, das einen Teil der Alzheimerpathologie ausmacht (6, 121).

Mep1b und Klotho haben viele Schnittpunkte, die eine mögliche Interaktion vermuten lassen. Sie werden in den gleichen Geweben exprimiert. Klotho wird auf die gleiche Weise wie APP prozessiert, und Mep1b wurde als neue Protease für APP entdeckt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten von APP und Klotho, könnte Mep1b auch Klotho prozessieren. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass Klotho von Mep1b in Analogie zu APP so geschnitten wird, dass keine protektiven Formen entstehen, sondern Klotho abgebaut wird oder sogar toxische Formen entstehen. Mögliche Schnittstellen von Mep1b in Klotho sind in Abbildung 3 dargestellt. Bei der Analyse der Interaktion beider Proteine gilt es zu beachten, dass ein Effekt von Mep1b auf Klotho auch über ADAM10 und ADAM17 stattfinden könnte, die sowohl mit Klotho, als auch mit Mep1b verknüpft sind.

In dieser Arbeit wurde nach unserem Wissen zum ersten Mal die Beziehung zwischen Mep1b und Klotho untersucht. Die Ergebnisse von *in vitro* und *in vivo* Versuchen bekräftigen unsere Hypothese, dass Mep1b die Prozessierung von Klotho beeinflusst, auch unabhängig von ADAM10 und ADAM17.

Zusätzlich sollte ein Expressionssystem etabliert werden, um Restriktions- und Transportversuche mit rekombinantem Klotho und seinen Fragmenten durchzuführen. Die Expression der Fusionsproteins gelang in beiden Zellsystemen. Es wurden jedoch nur geringe Mengen aufgereinigt, sodass im Rahmen dieser Arbeit keine weiterführenden Versuche mit den rekombinanten Proteinen durchgeführt werden konnten.

6.1 Mep1b-Reduktion beeinflusst Klotho-Levels *in vivo*

In den Nieren von Mep1b^{-/-}-Mäusen wurde eine veränderte Prozessierung Klothos beobachtet, verglichen mit wildtypischen Mäusen (vgl. 5.1.1). In Abwesenheit von Mep1b verändert sich das Verhältnis von KL2 zu fl-Klotho in den Nierenlysaten signifikant im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollmäusen. Dabei nahm fl-Klotho verhältnismäßig zu und KL2 verhältnismäßig ab. Die absoluten Veränderungen normiert auf Aktin zeigten die gleiche Tendenz, waren allerdings nicht signifikant verändert. Die Veränderung im Verhältnis von KL2 und fl-Klotho deuten darauf hin, dass die Abwesenheit von Mep1b mit reduziertem β -Cut, also dem Schnitt zwischen KL1 und KL2 verbunden ist.

Die Ergebnisse in Tieren mit hetero- und homozygotem Mep1b-*knockout* unterschieden sich nicht signifikant. Lediglich die Reduktion von Mep1b scheint also Effekte auf die Prozessierung von Klotho zu haben.

Weiterhin wurden s-Klotho und s-KL2 in CSF dieser Mäuse analysiert (vgl. 5.1.2). Hier wurden in der densitometrischen Auswertung der Western-Blots reduzierte Mengen von s-Klotho und s-KL2 in Mep1b^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen gemessen. Das reduzierte s-Klotho lässt sich durch eine zusätzliche Reduktion des α -Cuts erklären. Denn wäre ausschließlich der β -Cut verhindert würde s-Klotho in unveränderter Menge oder vermehrt vorliegen. Die reduzierte Menge von s-KL2 lässt sich sowohl mit Reduktion des α - als auch des β -Cuts erklären.

Das Verhältnis von s-KL2 zu s-Klotho veränderte sich zusätzlich signifikant, verglichen zum Verhältnis der wildtypischen Mäuse. Die Reduktion von s-KL2 ist signifikant weniger, als die Reduktion von s-Klotho. Zu erklären wäre dieser Effekt durch einen Anstieg des β -Cuts in den *knockout*-Mäusen, gekoppelt mit einer Reduktion des α -Cuts. Einen Überblick über diese Ergebnisse aus den Mep1b^{-/-}-Mäusen gibt Abbildung 21.

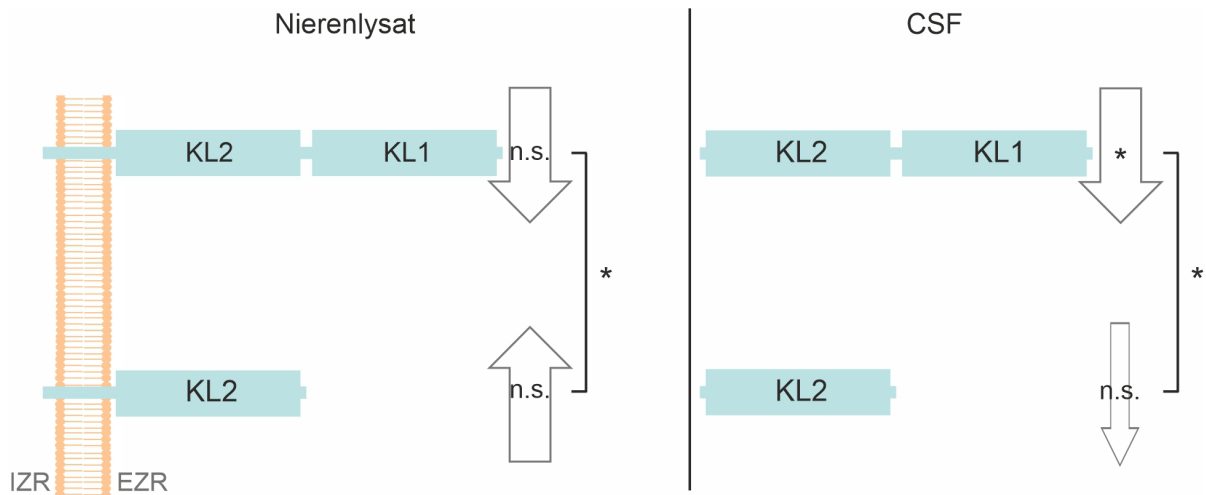


Abbildung 21: Ergebnisse in *Mep1b*^{-/-}-Mäusen verglichen mit *wt*-Mäusen. Auf der linken Seite sind fl-Klotho und KL2 in Nierenlysaten dargestellt, auf der rechten s-Klotho und s-KL2 in CSF. Die Pfeile symbolisieren die Richtung der beobachteten Änderungen im Vergleich zu den Ergebnissen in wildtypischen Mäusen. * $p < 0.05$, n. s. = nicht signifikant.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *Mep1b* die Prozessierung von Klotho beeinflusst und die Reduktion von *Mep1b* zu verminderten Mengen von löslichem Klotho in CSF führt. Eine Aussage über die veränderten Schnitte lässt sich dabei nicht eindeutig treffen. Nierenlysate und CSF können nicht direkt miteinander in Verbindung gesetzt werden, da nicht bekannt ist, ob die Prozessierung im ZNS anders erfolgt als in der Peripherie und ob peripheres Klotho die zentralen Levels beeinflusst, beispielsweise über einen Transport über die BHS. Die Analyse von Serum-Klotho und membrangebundenem Klotho im Plexus choroideus könnten hier weitere Daten liefern. Zusätzlich wäre die Analyse von s-KL1 von Vorteil. Eine sichere Aussage über eine direkte Interaktion von *Mep1b* und Klotho ist in diesem Versuchsaufbau ohnehin nicht möglich, da weitere Proteasen bei der Prozessierung von Klotho zusammenspielen und die reduzierte Expression von *Mep1b* dieses Proteasennetzwerk vermutlich zusätzlich beeinflusst. Für die Proteasen ADAM10 und ADAM17 ist das Zusammenspiel mit *Mep1b* bereits bekannt.

Die untersuchten *Mep1b*^{-/-}-Mäuse waren männlich und zwischen 11 und 13 Wochen alt. Ein Vergleich zu weiblichen Mäusen wäre ebenfalls von Interesse da die Klotho-Expression von Sexualhormonen beeinflusst wird und sich die Klotho-Levels geschlechtsspezifisch unterscheiden (9, 41, 42).

6.2 Gezielte Überexpression von Mep1b reduziert nachweisbares s-Klotho

Um die Effekte einer Mep1b-Überexpression zu untersuchen wurde CSF von *Slco1c1^{CreERT2};Rosa26^{Mep1b-HA}*-Mäusen untersucht, die nach Induktion spezifisch in Gehirnendothel und *Plexus choroideus*-Epithel vermehrt Mep1b exprimieren (vgl. 5.1.3). Gemäß der Hypothese, dass Mep1b Klotho von der Membran abschneidet, war hier, im Gegensatz zur CSF der *Mep1b^{-/-}*-Mäuse, vermehrt s-Klotho im Vergleich zu den Kontrollmäusen zu erwarten.

Das Gegenteil dieser Erwartung zeigte sich in der Western-Blot-Analyse. Die vermehrte Expression von Mep1b in Gehirnendothel und *Plexus Choroideus*-Epithel war mit reduzierten s-Klotho-Mengen in CSF verbunden, verglichen zur CSF der Kontrollmäuse (vgl. 5.1.3). Weitere Klotho-Fragmente waren auf dem Western-Blot nicht klar erkennbar.

Von Bedeutung ist hier, dass für diese Analysen ein anderer Antikörper genutzt wurde, als bei den Analysen in *Mep1b^{-/-}*-Mäusen. Der hier verwendete KM2076 Antikörper bindet an die Domäne KL1. Die genaue Sequenz, an die der Antikörper bindet, ist nicht bekannt. Von der Herstellfirma wird lediglich ein möglicher Bindungsbereich angegeben. In diesen Bereich liegen auch potentielle Schnittstellen von Mep1b (vgl. Abbildung 3). Die hier gemessene Reduktion von s-Klotho bei Mep1b-Überexpression könnte also dadurch bedingt sein, dass die übrigen Klotho-Fragmente nichtmehr nachweisbar sind. Über die Größe der Fragmente lässt sich folglich keine Aussage treffen.

Könnte die Klotho-Reduktion auch durch andere Effekte von Mep1b erklärt werden? Gindorf & Storck und Kolleg*innen beschrieben die Einflüsse von Mep1b auf die Integrität der BHS (117). In *Mep1b^{-/-}*-Mäusen wurden reduzierte Mengen von IgG in CSF nachgewiesen, verglichen zu wildtypischen Mäusen (117). IgG wurde von Gindorf & Storck und Kolleg*innen als Permeabilitätsmarker genutzt, da die Antikörper zu groß sind, um die BHS in großen Mengen zu passieren (117). Unter Mep1b-Überexpression sollte die BHS demnach durchlässiger sein. Passend dazu wurde in dieser Arbeit in CSF der *Slc^{Cre}Mep1b*-Mäuse ein erhöhter Gehalt von IgG im Vergleich zu den Kontrollmäusen beobachtet (vgl. 5.1.3). Für s-Klotho könnte eine Störung der BHS-Integrität Ähnliches wie für IgG bedeuten, da die s-Klotho-Levels in CSF niedriger sind als im Serum und kein aktiver Transport von s-Klotho über die BHS bekannt ist (138). Eine gestörte BHS-Integrität als Grund für die veränderten s-Klotho-Levels scheint deshalb unwahrscheinlich, ist aber nicht ausgeschlossen, da nicht bekannt ist, inwieweit die BHS Klotho-Levels in CSF reguliert (47).

Reduzierte s-Klotho-Levels sind auch durch andere Mep1b-vermittelte Prozesse denkbar. Mep1b gilt als Entzündungsmediator und kann beispielsweise zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B) führen, sowie zur Freisetzung der

Zytokine Interleukin-1 β und Interleukin-18 (99, 110). Abhängig unter anderem vom Transkriptionsfaktor NF- κ B, werden Entzündungsprozesse wiederum mit reduzierter Klotho-Expression in Verbindung gebracht (37, 139). Ob beide Mechanismen im Fall der Slc^{Cre}Mep1b-Mäusen miteinander in Verbindung stehen, ist jedoch nicht bekannt. Auch in diesem Fall könnten folgende Analysen von membranständigem Klotho im *Plexus choroideus*, oder mRNA-Analysen, z. B. durch eine quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR) wie in (139), aufschlussreich sein.

Limitationen der beschriebenen *in vivo* Ergebnisse sind, dass für die CSF-Untersuchungen nicht auf eine Ladekontrolle normiert wurde. Weiterhin zeigten die Analysen regelmäßig sehr schwache Signale im Western-Blot, was die densitometrische Quantifizierung erschwerte.

Die *in vivo* Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass veränderte Mep1b-Expression Einfluss auf die Klotho-Prozessierung nimmt, sowohl zentral, als auch peripher. Unklar ist nach diesen Versuchen, ob der Effekt durch eine direkte Interaktion von Klotho und Mep1b erzielt wird, oder über weitere Proteasen, wie z. B. ADAM10 und ADAM17, vermittelt ist.

6.3 Mep1b-vermittelter Effekt auf Klotho ist unabhängig von ADAM10 und ADAM17

Da die Mep1b-vermittelten Änderungen der Klotho-Prozessierung in den Mäusen unter anderem auch über die Interaktion von Mep1b mit ADAM10 und ADAM17 zu erklären sind (vgl. 2.2.3), wurden *in vitro* Versuche in Abwesenheit von ADAM10 und ADAM17 durchgeführt. Die Klotho-Levels wurden unter verschiedenen Bedingungen analysiert. In den MEFADAM10/17^{-/-}KL-Zellen zeigten sich nach Transfektion mit Mep1b signifikant reduzierte fl-Klotho-Levels (vgl. 5.1.6). Die Reduktion wurde ebenfalls durch die Transfektion mit ADAM10 und durch die Kotransfektion mit ADAM10 und Mep1b erzielt. Mep1b führt also unabhängig von ADAM10 und ADAM17 zu einer veränderten Prozessierung von Klotho. Welcher Schnitt dabei bevorzugt wird, ist aus den Analysen der Lysate nicht zu sagen, da hier der Antikörper KM2076 gegen KL1 verwendet wurde. Eine Reduktion von fl-Klotho könnte also sowohl durch eine vermehrte Freisetzung von s-Klotho oder von KL1 bedingt sein, da beide Fälle zu vermindert nachweisbarem fl-Klotho führen. Ein weiterer n-terminaler Schnitt, der die Immunodetektion mit KM2076 unmöglich macht, wie nach den CSF-Analysen in Abschnitt 6.2 vermutet, könnte ebenso ursächlich für die reduzierten fl-Klotho-Levels sein.

In qualitativen Analysen von Mep1b und ADAM10 im Western-Blot fielen bei der Kotransfektion verminderte Levels beider Enzyme auf. Die Interaktion von Mep1b mit ADAM10 könnte Grund für die unterschiedlichen Levels sein. Durch die n-terminale Spaltung von ADAM10 durch Mep1b entstehen kleinere Fragmente, die nicht mehr bei 100 kDa nachgewiesen werden können (7). Mep1b kann umgekehrt durch ADAM10 von der Membran geschnitten werden und ist dann ebenfalls nicht mehr in den Lysaten nachweisbar (102). Schlechtere Transfektionseffizienzen bei der Kotransfektion mit Mep1b und ADAM10 könnten für die verminderten Proteinlevels zusätzlich ursächlich sein. Um diesen Fehler zu reduzieren wurden die Zellen bei den Transfektionen mit nur einem der beiden Enzyme zusätzlich mit einem Leervektor transfiziert. Dennoch ist der Unterschied aufgrund des Versuchsaufbaus nicht auszuschließen.

Bei der Analyse der Überstände dieser Versuchsreihe wurden ähnliche Ergebnisse wie bei den Slc^{Cre}Mep1b-Mäusen beobachtet. Mit dem Antikörper KM2076 gegen KL1 wurde signifikant weniger s-Klotho nachgewiesen, als in der Kontrollgruppe und in den Transfektionen mit ADAM10. Die Transfektion mit ADAM10 brachte wie erwartet erhöhte s-Klotho-Levels in den Überständen und unterschied sich damit signifikant von der Mep1b-Überexpression (5, 22). Die Werte der Kotransfektion liegen zwischen denen von Mep1b und ADAM10 alleine, was mit einer Prozessierung durch beide Enzyme vereinbar ist.

Die s-Klotho-Reduktion in den Überständen, zusammen mit reduziertem fl-Klotho in den Lysaten, durch Mep1b, sprechen dafür, dass Mep1b fl-Klotho so prozessiert, dass es nicht

mehr mit dem verwendeten Antikörper nachgewiesen werden kann. Eine mögliche Schnittstelle am N-Terminus könnte die Ursache dafür sein. Die Reduktion von fl-Klotho und s-Klotho erfolgte unabhängig von ADAM10 und ADAM17. Zusätzlich scheint sich die Prozessierung durch Mep1b von der durch die ADAMs zu unterscheiden.

In der Untersuchung der Überstände bestand erneut die Problematik der fehlenden Ladekontrolle, was die Ergebnisse weniger belastbar macht. Ebenso ist ein weiterer Effekt von Mep1b, der die Klotho-Expression allgemein reduziert, nicht ausgeschlossen.

6.3.1 Mep1b-Inhibitor Actinonin beeinflusst Klotho-Prozessierung

Eine Aufhebung des Effekts von Mep1b wurde durch Zugabe des Mep1b-Inhibitors Actinonin erwartet (vgl. 5.1.7). Die Zellen, die mit Actinonin, gelöst in DMSO, behandelt wurden zeigten im Vergleich zu den Zellen die als Kontrolle nur mit DMSO behandelt wurden, tendenziell höhere fl-Klotho-Levels. Diese Tendenz fand sich überraschend nicht nur bei den Zellen, die zuvor mit Mep1b transfiziert wurden, sondern auch in der Kontrollgruppe, die mit einem Leervektor transfiziert wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Actinonin unabhängig von Mep1b einen Einfluss auf fl-Klotho hat. Da Actinonin zusätzlich zu Mep1b Meprin- α (Mep1a) und weitere Metalloproteasen inhibiert, könnten auch diese mit der Prozessierung Klothos verbunden sein und die gesteigerten fl-Klotho-Mengen nach Behandlung mit Actinonin erklären (140, 141). Es ist jedoch auch nicht ausgeschlossen, dass die MEF-Zellen endogenes Mep1b exprimieren, welches aufgrund geringer Expressionslevels nicht im Western-Blot nachweisbar ist.

In den Überständen der Gruppen, die mit Actinonin behandelt wurde, lässt sich mit dem Antikörper KM2076 tendenziell mehr s-Klotho detektieren als in denen ohne Actinonin-Zugabe. Das gleicht den Ergebnissen der Kotransfektions-Versuche (vgl. 6.3), in denen ebenfalls ohne Mep1b-Transfektion, mehr s-Klotho detektiert wurde, als mit Mep1b-Transfektion. Wie in den Lysaten wurde diese Tendenz sowohl in den Überständen der Zellen beobachtet, die mit Mep1b transfiziert worden waren, als auch in den Überständen der Kontrollzellen, die mit Leervektoren transfiziert worden waren.

Aufgrund der kleinen Anzahl der Versuche, sollten diese wiederholt werden, um eine sichere Aussage über die Effekte von Actinonin zu treffen.

6.3.2 Vergleich von rekombinantem und membrangebundenem Klotho

Da Mep1b in membrangebundener und löslicher Form andere Substrate haben kann, wurden die Unterschiede zwischen beiden Formen untersucht (vgl. 5.1.8). Weder nach 24 h, noch nach 48 h zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Lysaten der Zellen, die mit

Mep1b transfiziert wurden und denen, die mit rekombinantem Mep1b behandelt wurden. Auch in der Analyse der Überstände zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die s-Klotho-Levels nach 48 h waren bei den Ansätzen mit rekombinantem Mep1b tendenziell erhöht, verglichen mit den transfizierten Ansätzen. Das könnte auf eine reduzierte Aktivität von Mep1b nach 48 h hinweisen, oder aber auf eine andere Art der Prozessierung. Diese Beobachtung korreliert jedoch nicht mit den Ergebnissen der Lysate.

Aufgrund der geringen Probenanzahl und der fehlenden Ladekontrolle in den Überständen, ist keine sichere Aussage über den Unterschied zwischen der membrangebundenen und der löslichen Form möglich. Obwohl in den Überständen kein Mep1b in den transfizierten Zellen nachgewiesen wurde, ist nicht ausgeschlossen, dass transfiziertes Mep1b auch in geringen Mengen von der Membran geschnitten wird und dann in löslicher Form vorliegt.

In allen beschriebenen *in vitro*-Analysen wurde Mep1b- und ADAM10-DNA, für die Transfektion verwendet, die für humane Proteine kodieren. Die stabil transfizierte Klotho-DNA der MEFADAM10/17^{-/-}KL-Zellen kodiert hingegen für murines Klotho. Die Gene dieser Proteine in Maus und Mensch sind größtenteils homolog zueinander, eine veränderte Interaktion ist dennoch möglich.

Die *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse der Interaktion von Mep1b und Klotho geben folgende Hinweise:

1. Die Mep1b-Reduktion führt in Mäusenieren zu einem veränderten Verhältnis von KL2 und fl-Klotho und reduzierten löslichem Klotho-Fragmenten in Maus-CSF, beeinflusst also die Klotho-Prozessierung *in vivo*.
2. *In vitro* ist nach der Transfektion mit Mep1b weniger fl-Klotho und s-Klotho nachweisbar. Klotho wird unabhängig von ADAM10 und ADAM17 durch Mep1b prozessiert.
3. *In vitro* unterscheidet sich die Prozessierung von Klotho in Anwesenheit von Mep1b zu der durch ADAM10.
4. Die Kombination der *in vivo* und *in vitro* Analysen deuten auf eine mögliche reduzierte Bindung des KM2076-Antikörpers an Klotho nach Mep1b-Prozessierung hin. Das könnte auf einem n-terminalen Schnitt Klothos durch Mep1b basieren.
5. Der Inhibitor Actinonin beeinflusst die Klotho-Prozessierung; möglicherweise unabhängig von Mep1b. Dieser Effekt könnte durch weitere Proteasen, die durch Actinonin inhibiert werden, erzielt werden.
6. Es bestehen keine Hinweise auf eine unterschiedliche Klotho-Prozessierung durch die membrangebundener oder die lösliche Mep1b-Form.

Unklar bleibt, wie genau Mep1b Klotho prozessiert, welche Produkte dabei entstehen und ob sich diese funktional von denen unterscheiden, die durch ADAM10 und ADAM17 produziert werden. Für genauere Analyse der Schnitte durch Mep1b wurden im Rahmen dieses Projektes Expressionssysteme für rekombinantes s-Klotho, sowie KL1 und KL2 etabliert.

6.4 Expression von rekombinanten Klotho-Fusionsproteinen

s-Klotho und die Fragmente KL1 und KL2 sollten im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellt werden. Mithilfe der rekombinanten Proteine sollte in weiteren Versuchen die Interaktion von rekombinantem Klotho mit rekombinantem Mep1b analysiert werden. Die Expression und Aufreinigung wurde zunächst in *E. coli* Stämmen durchgeführt, da dieses System in der Arbeitsgruppe bereits für andere Proteine erfolgreich etabliert wurde und eine schnelle und vergleichsweise unkomplizierte Methode darstellt. Da die Proteinausbeute in diesem System zu gering war, wurde die Expression in Insektenzellen etabliert. Alle rekombinanten Proteine wurden in diesen Zellen hergestellt. Die Aufreinigung der Fusionsproteine war jedoch nur eingeschränkt möglich.

6.4.1 Geringe Expression der Fusionsproteine in *E. coli* Stämmen

Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde in den Stämmen BL21, Rosetta und Origami durchgeführt (vgl. 5.2.1). Alle drei Fusionsproteine konnten in Western-Blot-Analysen auf den vorhergesagten Höhen nachgewiesen werden. Der Nachweis im Western-Blot gelang mit einem Antikörper, der gegen das FLAG-Tag gerichtet ist, welches sich am C-Terminus der Proteine befindet. Dies spricht dafür, dass die korrekte Translation stattfand und kein *Frameshift* (= Leserasterverschiebung) durch fehlerhafte Klonierung entstanden war. Das Fusionsprotein RAP-GST, welches bereits erfolgreich in der Arbeitsgruppe aufgereinigt wurde, konnte erneut aufgereinigt werden, was die korrekte Durchführung bestätigt. Allerdings konnte lediglich KL2-GST deutlich in Coomassie-Färbungen der Gele gesehen werden, in denen 20-50 ng pro Bande detektiert werden können (142). KL1-GST war schwach sichtbar während für Klotho Δ TM-GST keine eindeutige Bande auf der richtigen Höhe nachweisbar war. Die deutlichen Banden auf der Höhe von GST bei KL1- und Klotho Δ TM-GST sprechen dafür, dass Probleme bei der Expression vorlagen und teilweise nur GST produziert wurde. Die Größe der Proteine kann eine Rolle beim Herstellen der Proteine spielen und größere Proteine scheinen schwieriger aufzureinigen zu sein (143). Da KL1- und KL2-GST gleichgroß sind, kann das nicht die einzige Ursache für die schlechtere Expression von KL1- und Klotho Δ TM-GST sein. Eine weitere Ursache für die erschwerte Proteinexpression von Säugetierproteinen in Bakterien ist die ungleiche Codonverwendung (engl. *Codon Bias*) (144, 145). In verschiedenen Organismen werden unterschiedliche Codons für die Translation einer Aminosäure bevorzugt verwendet. Für *E. coli* sind einige *rare Codons* (dt. seltene Codons) beschrieben, die weniger als 10 % der Codons, die für die gleiche Aminosäure kodieren, ausmachen (146). Kommen diese *rare Codons* häufig in der DNA der zu exprimierenden Proteine vor, mangelt es in den Bakterien schnell an der passenden transfer-RNA (tRNA), was zu verlangsamer Expression oder sogar einem Expressionsstopp führt. Tabelle 35 zeigt die Analyse der *rare Codons* in KL1

und KL2, die in KL2 seltener vorkommen und mit einer schwächeren Expression von KL1 vereinbar sind.

Tabelle 35: Rare Codons in den Domänen KL1 und KL2. Die Codons, für die speziell in Rosetta-Bakterien tRNAs vorliegen, sind in grün markiert, die restlichen in rot. Die Analyse erfolgte über die Website: <https://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>, 19.01.2022.

Aminosäure	Rare Codon	Häufigkeit in KL1	Häufigkeit in KL2
Arginin	CGA	5	4
	CGG	8	5
	AGG	7	7
	AGA	6	6
Glycin	GGA	9	9
Isoleucin	AUA	10	8
Leucin	CUA	6	4
Prolin	CCC	10	8
Insgesamt		61	51
	Davon nicht in Rosetta „gerettet“	13	9

Besonders herausfordernd scheint die Expression von Clustern von *rare Codons* zu sein, dargestellt in Tabelle 36 (144). Diese Cluster finden sich in KL1 ebenfalls vermehrt.

Tabelle 36: Rare Codon Cluster in KL1 und KL2. Die Codons, für die speziell in Rosetta-Bakterien tRNAs vorliegen, sind in grün markiert, die restlichen in rot. Die Analyse erfolgte über die Website: <https://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>, 19.01.2022.

Cluster in KL1	Cluster in KL2
AUA CUA = 1 CGG CGG = 1 CGA AGA = 1 CCC AUA = 1 AGA GGA = 1 CGG CGA GGA = 1	AUA CUA = 1 CUA AGG = 1 AGG AGA = 1 GGA AGG = 1

In Rosetta-Bakterien ist das Problem der *rare Codons* teilweise aufgehoben. Rosetta enthalten einen pRARE-Vektor, der die tRNA-Gene für einige der Codons enthält nämlich: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA. Ausgenommen sind die Arginin Codons CGA und CGG (146). Dieser Ersatz der tRNAs für *rare Codons* erklärt, weshalb die Expression in Rosetta mehr Erfolg

zeigte, als die in BL21 und Origami. Beim Vergleich der Sequenzen von KL1 und KL2 fällt jedoch auf, dass in KL1 die Arginin-Codons CGA und CGG, vor allem in Clustern, vorkommen. Für diese beiden Codons liegt auch in Rosetta nicht vermehrt tRNA vor, was die schlechtere Expression von KL1-GST und Klotho Δ TM-GST auch in Rosetta-Bakterien erklären kann. Die Reduktion der Wachstumsraten kann zu einer Veränderung des *Codon Bias* führen (146), ebenso kann die Faltung der Proteine durch die Temperatur beeinflusst werden (147). Deshalb wurde die Expression bei unterschiedlichen Temperaturen und IPTG-Konzentrationen verglichen. Die Expression bei 21 °C mit 0,5 mM IPTG also der niedrigsten getesteten Temperatur, mit der niedrigsten IPTG-Konzentration zeigte die besten Ergebnisse (vgl. Abbildung 17). Diese beiden Änderungen reduzieren die Wachstumsraten, passend zur Theorie, dass die *rare Codons* dann besser übersetzt werden können. Eine weitere Reduktion der Temperatur war im Rahmen dieser Arbeit aufgrund technischer Einschränkungen nicht durchführbar.

Da auch unter optimierten Bedingungen KL1-GST und Klotho Δ TM-GST weiterhin nur gering exprimiert werden konnten, wurden die Expression in Insektenzellen begonnen.

6.4.2 Herstellung in Insektenzellkultur und die Rolle von Glykosylierungen

Nach erfolgreicher Bacmidproduktion und Virusamplifikation gelang, wie bei der Expression in Bakterien, in den Insektenzellen der Nachweis aller Konstrukte mittels Western-Blot (vgl. 5.2.2.2). Der Nachweis erfolgte mit einem Anti-Strep-Antikörper und für KL1-Strep und Klotho Δ TM-Strep auch mit dem KM2076 Antikörper gegen KL1, was die erfolgreiche Expression bestätigt. Bei der Analyse der Inkubationszeiten wurde für alle drei Proteine eine optimale Expressionszeit von 72 h beobachtet. Das passt zum typischen Zyklus der Baculoviren, die in der Wirtszelle akkumulieren und nach ca. 72 h zur Lyse der Zelle führen (148).

Die Expression von KL2-Strep scheint in der Western-Blot-Analyse geringer als die von KL1-Strep zu sein. Im Agarosegel der Kontroll-PCR der Bacmide (Abbildung 18) sind Banden bei ca. 250 bp sichtbar. Möglicherweise wurden hier Mischkolonien gepickt, die teilweise das Bacmid mit gewünschtem Insert enthalten, teilweise aber nur das Bacmid.

Im Anschluss an die Expression erfolgt die Aufreinigung über das Strep-Tag II (Vgl. 5.2.2.3). Diese fand zunächst im kleinen Maßstab als Probe-Aufreinigung für Klotho Δ TM-Strep statt. Wie Abbildung 19 zeigt konnten dabei nur ca. 15 % des im Überstand vorhandenen Klotho Δ TM-Strep eluiert werden, während ca. 20 % nicht von der Säule aufgenommen wurden und ca. 55 % nicht in den Waschfraktionen oder Eluaten zu finden sind. Bei der Analyse dieser Daten ist jedoch zu beachten, dass im gezeigten Western-Blot nicht alle Eluate analysiert wurden und auch in folgenden Eluaten möglicherweise noch Klotho Δ TM-Strep zu finden ist.

Dennoch bleibt ein großer Anteil von Klotho Δ TM-Strep, der nicht mehr nachweisbar ist. Möglicherweise aggregierten die rekombinanten Proteine an der Säule und konnten deshalb nicht eluiert werden. Die Herstellfirma der Strep-Tactin Säule empfiehlt die Durchführung der Flüssigchromatografie im Kühlraum, was aus technischen Gründen nicht möglich war. Alle Flüssigkeiten wurden zwar auf Eis gehalten, trotzdem sind Proteinverluste durch die Temperaturwechsel nicht auszuschließen. Wie Cheikhi und Kolleg*innen beschrieben haben ist rekombinantes Klotho sehr instabil und könnte auch im Verlauf der Aufreinigung abgebaut worden sein (3). Eine weitere Aufreinigung mit der Analyse weiterer Eluate und des Säulenmaterials, um eine mögliche Aggregation dort nachzuweisen, wären die nächsten Schritte. Im Rahmen dieser Arbeit waren weitere Aufreinigungsversuche jedoch nicht mehr möglich.

Insektenzellen werden häufig für die Expression von Säugetier-Proteinen verwendet, weil sie ähnliche posttranslationale Modifikationen und Faltungen zeigen. Eine Schwachstelle ist dabei die Glykosylierung (149). Zu Beginn dieses Projektes waren die Glykosylierungseigenschaften Klothos noch nicht genauer bekannt (150).

Zhong und Kolleg*innen veröffentlichten kürzlich Analysen der N-Glykosylierungen Klothos, die von großer Bedeutung für Versuche mit rekombinatem Klotho sind und möglicherweise auch Einfluss auf die Aufreinigung haben (48). Sie analysierten s-Klotho, das von *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zellen und HEK-Zellen exprimiert wurde, und fanden Unterschiede in der Glykosylierung. Abhängig von der Glykosylierung veränderte sich die Aktivität als Korezeptor für FGF23. Einige der N-Glykosylierungen schienen auch eine wichtige Rolle für die Sekretion von Klotho zu spielen und essentiell für die Faltung Klothos zu sein. Außerdem fanden sie heraus, dass an rekombinatem Klotho aus HEK-Zellen die LacdiNac-Glykan-Struktur (GalNAc β 1-4GlcNAc β), eine seltene Glykan-Struktur, vorkommt, und möglicherweise für den FGF23-Signalweg von Bedeutung ist.

Die in 5.1.4 beschriebenen Ergebnisse der Deglykosylierung von endogenem Klotho passen zu den Funden von Zhong und Kolleg*innen. Die Behandlung von Nierenlysaten mit den Endoglykosidasen PNGase F, die nahezu alle N-Glykane entfernt, und Endo Hf, die hauptsächlich *High-mannose*-Glykane entfernt, erbrachte Banden auf unterschiedlichen Höhen in der Western-Blot-Analyse. Die Klotho-Banden nach Behandlung mit den zwei verschiedenen Endoglykosidasen unterschieden sich von den Klotho-Banden unbehandelter Nierenlysaten sowie untereinander. Das deutet darauf hin, dass Klotho in Nierenlysaten glykosyliert war, mit mindestens zwei unterschiedlichen N-Glykan-Strukturen.

Insektenzellen unterscheiden sich in ihren Glykosylierungseigenschaften von Säugetierzellen (151). Während Säugetierzellen komplexe N-Glykane bilden können, haben Insektenzellen einfachere sog. paucimannose N-Glykane (schematisch dargestellt in Abbildung 22). Folglich

werden komplexe N-Glykane, wie die LacdiNAc-Struktur von HEK-s-Klotho, durch einfachere Strukturen ersetzt (151, 152).

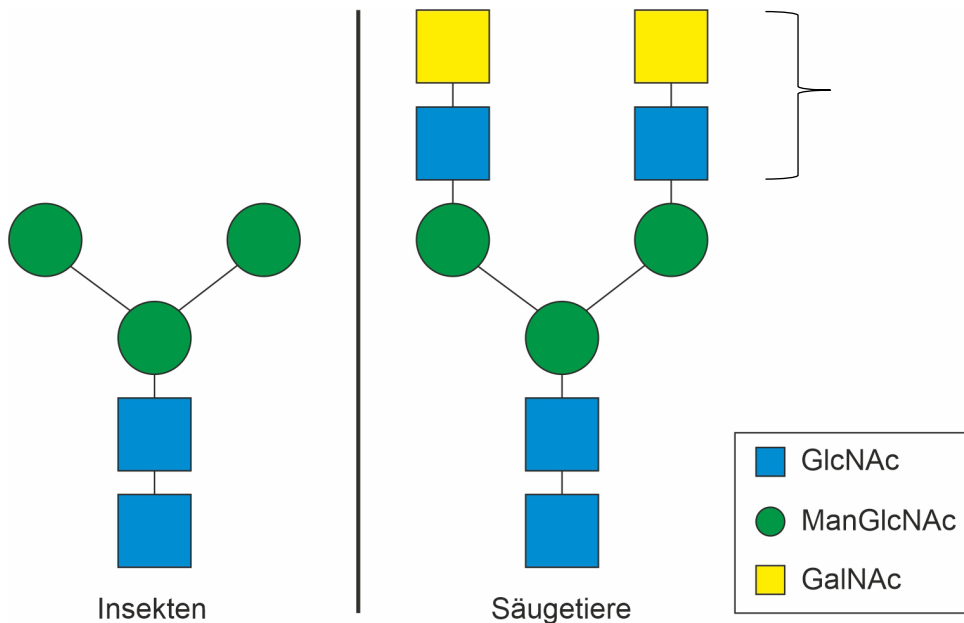


Abbildung 22: N-Glykosylierung in Insekten und Säugetieren. Beispiele für paucimannose N-Glykane in Insekten und komplexen N-Glykanen in Säugetieren. Die Klammer umfasst das Disaccharid LacdiNAc ($\text{GalNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta$), welches in HEK-s-Klotho nachgewiesen wurde.

Die fehlenden komplexen N-Glykane könnten zu einer Fehlfaltung und somit zu erschwerter Aufreinigung führen.

Wie Zhong und Kolleg*innen beschreiben, hat die Glykosylierung starken Einfluss auf die Eigenschaft von s-Klotho, wie z. B. die Interaktion mit anderen Proteinen (48). Das wirft die Frage auf, ob rekombinante Proteine, die in Insektenzellen hergestellt sind, geeignet sind für Restriktions- und Transportversuche. Haben diese rekombinanten Proteine andere Faltungs- oder Interaktionseigenschaften, könnten sie in Versuchen anderes reagieren als endogenes Klotho und eignen sich möglicherweise nicht für aussagekräftige Analysen. Am Beispiel von APP ist zu sehen, dass Glykosylierungen wichtig für die Interaktion mit Mep1b sein können (153).

Rekombinantes Mep1b, das in High5-Zellen hergestellt wurde und auch in dieser Arbeit verwendet wurde, hat hingegen wahrscheinlich ähnliche Glykosylierungsmuster wie endogenes Mep1b (153).

6.5 Klinische Relevanz

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Prozessierung von Klotho durch die Metalloprotease Mep1b und bringt diese als neue Sekretase auf.

Die genaue Kenntnis der Spaltungsprozesse Klothos sind von großer Bedeutung. Bis jetzt sind weder die genauen Mechanismen hinter der Wirkung Klothos bekannt, noch welche Form welche Funktionen erfüllt. Dass lösliches Klotho viele Rollen einnimmt, ist jedoch mehrfach untersucht. So nehmen lösliche Klotho-Formen z. B. Einfluss auf das kardiovaskuläre System und die Nieren, als parakriner Faktor oder systemisch (4). Zusätzlich zeigte die periphere Applikation löslichen Klothos protektive Effekte auf das Gehirn und die Nieren (68, 31).

Kürzlich wurde beschrieben, dass KL1 nicht als Produkt alternativen Splicings entstehen kann (26, 27). Folglich kann KL1 nur durch die enzymatische Spaltung Klothos entstehen. Diese Erkenntnis bestätigt, dass es von großer Relevanz ist, die Prozessierung von Klotho weiter zu erforschen.

Die Vermutung, dass Mep1b Klotho auf eine Art prozessiert, die einen Nachweis mit dem Antikörper KM2076 verhindert, ist für folgende Untersuchungen wichtig. Häufig wird dieser Antikörper für die Analyse Klothos verwendet. Sollte er nicht alle Formen Klothos nachweisen, beeinflusst das die Ergebnisse weiterer Studien.

Dass Mep1b und Klotho interagieren wirkt auch für mögliche Therapien, die Mep1b involvieren, neue Fragen auf. Aufgrund seiner Rolle in der Alzheimer-Pathogenese stellte eine Inhibition von Mep1b einen Ansatzpunkt für Alzheimer-Therapien dar. Was würde das für Klotho bedeuten? Eine Reduktion der löslichen Fragmente könnte unerwünschte Wirkungen auf die Kognition haben, da Klotho neuroprotektiv wirkt (12). Auch die Nierenfunktion könnte durch fehlendes lösliches Klotho eingeschränkt werden. Es ist jedoch auch nicht ausgeschlossen, dass Klotho-Fragmente, die durch Mep1b-Prozessierung entstehen, andere Funktionen aufweisen und nicht neuroprotektiv wirken. Abgesehen vom direkten Effekt auf Klotho, sind auch die Änderungen des Proteasenetzes, das für die Klotho-Prozessierung verantwortlich ist, zu beachten. Verminderte Aktivierung der ADAMs durch Mep1b-Inhibition könnte auch zur Reduktion der Klotho-Spaltung führen.

Die Kenntnis über Mep1b als neue Sekretase Klothos trägt dazu bei, die Prozessierung Klothos besser zu verstehen. Um weitere Aussagen über die Bedeutung dieser Erkenntnis treffen zu können, ist es wichtig, die genauen Mep1b-Schnittstellen in Klotho und die entstehenden Spaltprodukte zu analysieren.

6.6 Ausblick

Eine Anschlussfrage an diese Arbeit ist, wo die tatsächlichen Schnittstellen von Mep1b in der Klotho-Sequenz liegen und welche Fragmente bei den Schnitten entstehen. Dazu könnte beispielsweise in einem Restriktionsassay rekombinantes Klotho mit Mep1b inkubiert und anschließend die Fragmente analysiert werden. Analog zu den Analysen der ADAM10- und ADAM17-Schnittstellen von Chen und Kolleg*innen (22) könnten Folgeversuchen mit Abänderungen einzelner Aminosäuren an vermuteten Schnittstellen weitere Hinweise auf die genaue Prozessierung Klothos geben. Dafür sollte in Western-Blot-Analysen der Einsatz weiterer Antikörper außer KM2076 bedacht werden.

Die Produkte der Schnitte sollten außerdem auf ihre Funktionalität getestet werden. Haben sie die gleichen protektiven Eigenschaften wie s-Klotho? Oder haben, wie bei APP, die unterschiedlichen Fragmente sogar gegensätzliche Funktionen? Die bereits bekannten Funktionen Klothos, wie die als Glykosidase oder FGFR-Korezeptor, könnten wie von Zhong und Kolleg*innen beschrieben für die verschiedenen Fragmente getestet werden (48).

Weiterhin wären kognitive Tests der Mep1b^{-/-}-Mäuse interessant. Mep1b-*knockout* scheint auf transgene Mäuse mit APP-Überexpression schützende Effekte vor kognitiven Defizienten zu haben, verbunden mit reduzierten A β -Werten (118). Womöglich sind die Leistungen auch aufgrund veränderter Klotho-Levels verbessert. Gegenätzlich dazu könnte die veränderte Klotho-Prozessierung auch abschwächend auf die Leistungssteigerung wirken. Verhaltenstests in Mep1b^{-/-}-Mäusen und Analysen der Klotho-Levels im Gehirn dieser Mäuse könnten diesbezüglich weitere Erkenntnisse liefern.

Zusätzlich bleibt die Frage, ob Mep1b die Klotho-Expression über andere Wege beeinflusst. RNA-Analysen transfizierter Zellen oder Geweben aus transgenen Mäusen könnten deshalb durchgeführt werden.

Um den Effekt von Actinonin zu bestätigen, sollten die Versuche mit diesem Inhibitor zunächst reproduziert werden. Sollte die vermehrte Prozessierung in Anwesenheit von Actinonin ohne Transfektion mit Mep1b erneut gesehen werden, könnten sich Analysen der Interaktionen Klothos mit anderen Metalloproteasen, die auch von Actinonin inhibiert werden, anschließen.

Die Ergebnisse aus der Aufreinigung in Insektenzellen zeigen, dass dort die Herstellung der gewünschten Proteine möglich ist. Die neueren Erkenntnisse zur Glykosylierung Klothos und die Schwierigkeiten bei der Aufreinigung sind Zeichen dafür, dass weitere Expressionssysteme bevorzugt werden sollten. Der Hauptproduzent für lösliches Klotho bei Menschen sind die Nieren (29, 30). Für folgende Analysen der Klotho-Mep1b-Interaktion sollte also eine Expression in HEK-Zellen erwogen werden, um Proteine zu erzeugen, die dem endogenen Klotho möglichst ähnlich sind. Nach der Herstellung wäre dann ein Aktivitätstest,

beispielsweise mit Nachweis der ERK Phosphorylierung wie bei Chen und Kolleg*innen beschrieben (22) anzuschließen, um die tatsächliche Funktionalität der rekombinanten Proteine zu überprüfen. Ein weiterer Vorteil davon, die Produktion nicht in Insektenzellen durchzuführen, ist, dass dort die Proteine häufig fukosyliert werden, was in einer späteren Anwendung an Säugetieren verstärkt zu allergischen Reaktion führen könnte (149).

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Metalloprotease Mep1b eine Rolle bei der Prozessierung des Anti-Aging-Proteins Klotho übernimmt.

Erstmals zeigten sich in *in vivo* Analysen sowohl in Nieren, als auch in der CSF Mep1b-defizitärer Mäuse veränderte Klotho-Levels, verglichen mit wildtypischen Mäusen. Auch unter Endothel- und *Plexus choroideus*-spezifischer Überexpression von Mep1b waren veränderte Klotho-Levels im Vergleich zu den Kontrollmäusen messbar.

In vitro wurde der Einfluss von Mep1b auf die Prozessierung Klothos in Zell-Lysaten und Überständen bestätigt. Zusätzlich wurde in der Zellkultur erstmals gezeigt, dass dieser Prozess auch unabhängig von ADAM10 und ADAM17 stattfindet. Weiterhin wurde der Einfluss des Mep1b-Inhibitors Actinonin *in vitro* untersucht. Dieser beeinflusste unabhängig von einer Mep1b-Überexpression die Klotho-Levels. Aufgrund der kleinen Probenanzahl sollte dieser Versuch, vor weiteren Analysen des Einflusses von Actinonin auf Klotho, auf seine Reproduzierbarkeit geprüft werden.

Die Produkte die durch die Prozessierung Klothos durch Mep1b entstehen sind nicht bekannt. Die Prozessierung durch Mep1b scheint allerdings andersartig zu sein, als die durch ADAM10. Möglicherweise wird ein n-terminaler Anteil Klothos abgespalten an den der häufig verwendete Antikörper KM2076 bindet, was bei zukünftigen Analysen Klothos bedacht werden sollte.

Bei der Expression der Klotho-Fusionsproteine in Bakterien konnten nur geringe Proteinmengen hergestellt und aufgereinigt werden. KL2-GST wurde von den Bakterien in größeren Mengen exprimiert als KL1- und Klotho Δ TM-GST. *Rare Codons* könnten ursächlich für die geringen Expressionsraten sein. Aufgrund geringer Expressionsraten erfolgte der Umstieg auf die Expression in Insektenzellen.

In Insektenzellen ließen sich alle drei Fusionsproteine exprimieren. Über die Affinitätschromatografie ließ sich jedoch nur ein kleiner Teil der exprimierten Proteine aufreinigen. Ursächlich dafür könnten Fehlfaltungen aufgrund von, in Insekten und Säugetieren unterschiedlichen, posttranslationalen Modifikationen, wie Glykosylierungen, sein.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der *in vivo* und *in vitro* Versuche, dass Mep1b eine weitere Sekretase des Anti-Aging-Proteins Klotho ist. Die Fragen, welche Klotho-Fragmente durch Mep1b entstehen und wie Mep1b mit den bereits bekannten Sekretasen zusammenspielt, bieten Raum für weiterführende Forschungsarbeiten.

8 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. World health statistics 2021: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. World Health Organization; 2021. Available from: URL: http://apps.who.int/iris/handle/10665/342703?search-result=true&query=world+health+statistics+2021&scope=%2F&rpp=10&sort_by=score&order=desc.
2. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390(6655):45–51.
3. Cheikhi A, Barchowsky A, Sahu A, Shinde SN, Pius A, Clemens ZJ, Li H, Kennedy CA, Hoeck JD, Franti M, Ambrosio F. *Klotho*: An Elephant in Aging Research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2019; 74(7):1031–42.
4. Saar-Kovrov V, Donners, Marjo M. P. C., van der Vorst, Emiel P. C. Shedding of *Klotho*: Functional Implications in Chronic Kidney Disease and Associated Vascular Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 2020; 7:617842.
5. Bloch L, Sineshchekova O, Reichenbach D, Reiss K, Saftig P, Kuro-o M, Kaether C. *Klotho* is a substrate for α -, β - and γ -secretase. *FEBS Letters* 2009; 583(19):3221–4.
6. Bien J, Jefferson T, Causević M, Jumpertz T, Munter L, Multhaup G, Weggen S, Becker-Pauly C, Pietrzik CU. The metalloprotease meprin β generates amino terminal-truncated amyloid β peptide species. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(40):33304–13.
7. Wichert R, Scharfenberg F, Colmorgen C, Koudelka T, Schwarz J, Wetzel S, Potempa B, Potempa J, Bartsch JW, Sagi I, Tholey A, Saftig P, Rose-John S, Becker-Pauly C. Meprin β induces activities of A disintegrin and metalloproteinases 9, 10, and 17 by specific prodomain cleavage. *The FASEB Journal* 2019; 33(11):11925–40.
8. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Suppression of aging in mice by the hormone *Klotho*. *Science (New York, N.Y.)* 2005; 309(5742):1829–33.
9. Wang Y, Sun Z. Current understanding of *klotho*. *Ageing Res Rev* 2009; 8(1):43–51.
10. Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, Guralnik JM, Ferrucci L. Plasma *Klotho* and Mortality Risk in Older Community-Dwelling Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; 66A(7):794–800.
11. Kuro-o M. The *Klotho* proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019; 15(1):27–44.
12. Vo HT, Laszczyk AM, King GD. *Klotho*, the Key to Healthy Brain Aging? *Brain Plast* 2018; 3(2):183–94.
13. Ito S, Kinoshita S, Shiraishi N, Nakagawa S, Sekine S, Fujimori T, Nabeshima Y-I. Molecular cloning and expression analyses of mouse β *klotho*, which encodes a novel *Klotho* family protein. *Mechanisms of development* 2000; 98(1-2):115–9.
14. Ito S, Fujimori T, Hayashizaki Y, Nabeshima Y-I. Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site

structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 2002; 1576(3):341–5.

15. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annual review of physiology* 2013; 75:503–33.

16. Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Rosenblatt KP, Kliewer SA, Kuro-o M. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem* 2007; 282(37):26687–95.

17. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochemical and biophysical research communications* 1998; 242(3):626–30.

18. Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, Fujimori T, Nabeshima Y-I. 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):143–7.

19. Chen C-D, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *PNAS* 2007; 104(50):19796–801.

20. Semba RD, Moghekar AR, Hu J, Sun K, Turner R, Ferrucci L, O'Brien R. Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 2014; 558:37–40.

21. Chen C-D, Tung TY, Liang J, Zeldich E, Tucker Zhou TB, Turk BE, Abraham CR. Identification of cleavage sites leading to the shed form of the anti-aging protein klotho. *Biochemistry* 2014; 53(34):5579–87.

22. Chen C-D, Li Y, Chen AK, Rudy MA, Nasse JS, Zeldich E, Polanco TJ, Abraham CR. Identification of the cleavage sites leading to the shed forms of human and mouse anti-aging and cognition-enhancing protein Klotho. *PLoS one* 2020; 15(1):e0226382.

23. Massó A, Sánchez A, Gimenez-Llort L, Lizcano JM, Cañete M, García B, Torres-Lista V, Puig M, Bosch A, Chillón M. Secreted and Transmembrane α Klotho Isoforms Have Different Spatio-Temporal Profiles in the Brain during Aging and Alzheimer's Disease Progression. *PLoS ONE* 2015; 10(11):e0143623.

24. Schweingruber C, Rufener SC, Zünd D, Yamashita A, Mühlemann O. Nonsense-mediated mRNA decay - mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta* 2013; 1829(6-7):612–23.

25. Tucker Zhou TB, King GD, Chen C, Abraham CR. Biochemical and functional characterization of the klotho-VS polymorphism implicated in aging and disease risk. *J Biol Chem* 2013; 288(51):36302–11.

26. Mencke R, Harms G, Moser J, van Meurs M, Diepstra A, Leuvenink HG, Hillebrands J-L. Human alternative Klotho mRNA is a nonsense-mediated mRNA decay target inefficiently spliced in renal disease. *JCI insight* 2017; 2(20).

27. Li L, Pastor J, Zhang J, Davidson T, Hu M-C, Moe OW. In search of alternatively spliced alpha-Klotho K11 protein in mouse brain. *FASEB Bioadv* 2021; 3(7):531–40.

28. Olauson H, Mencke R, Hillebrands J-L, Larsson TE. Tissue expression and source of circulating α Klotho. *Bone* 2017; 100:19–35.
29. Lindberg K, Amin R, Moe OW, Hu M-C, Erben RG, Ostman Wernerson A, Lanske B, Olauson H, Larsson TE. The kidney is the principal organ mediating klotho effects. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25(10):2169–75.
30. Hu MC, Shi M, Zhang J, Addo T, Cho HJ, Barker SL, Ravikumar P, Gillings N, Bian A, Sidhu SS, Kuro-o M, Moe OW. Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating α Klotho. *JASN* 2016; 27(1):79–90.
31. Hu M-C, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Kuro-o M, Moe OW. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney international* 2010; 78(12):1240–51.
32. Kakareko K, Rydzewska-Rosolowska A, Brzosko S, Gozdzikiewicz-Lapinska J, Koc-Zorawska E, Samocik P, Kozlowski R, Mysliwiec M, Naumnik B, Hryszko T. The effect of nephrectomy on Klotho, FGF-23 and bone metabolism. *International urology and nephrology* 2017; 49(4):681–8.
33. Clinton SM, Glover ME, Maltare A, Laszczyk AM, Mehi SJ, Simmons RK, King GD. Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood. *Brain research* 2013; 1527:1–14.
34. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto jr. GJ, Stryer L. *Stryer Biochemie*. 8. Aufl. 2018. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2018. (Springer eBook Collection).
35. Azuma M, Koyama D, Kikuchi J, Yoshizawa H, Thasinas D, Shiizaki K, Kuro-o M, Furukawa Y, Kusano E. Promoter methylation confers kidney-specific expression of the Klotho gene. *The FASEB Journal* 2012; 26(10):4264–74.
36. King GD, Rosene DL, Abraham CR. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. *AGE* 2012; 34(6):1405–19.
37. Sun C-Y, Chang S-C, Wu M-S. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney international* 2012; 81(7):640–50.
38. Cararo-Lopes MM, Mazucanti CHY, Scavone C, Kawamoto EM, Berwick DC. The relevance of alpha-KLOTHO to the central nervous system: Some key questions. *Ageing Res Rev* 2017; 36:137–48.
39. Pan J, Zhong J, Gan LH, Chen SJ, Jin HC, Wang X, Wang LJ. Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2011; 32(4):729–35.
40. Lee J, Jeong D-J, Kim J, Lee S, Park J-H, Chang B, Jung S-I, Yi L, Han Y, Yang Y, Kim KI, Lim J-S, Yang I, Jeon S, Bae DH, Kim C-J, Lee M-S. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer* 2010; 9:109.
41. Hsu S-C, Huang S-M, Lin S-H, Ka S-M, Chen A, Shih M-F, Hsu Y-J. Testosterone increases renal anti-aging klotho gene expression via the androgen receptor-mediated pathway. *The Biochemical journal* 2014; 464(2):221–9.
42. Oz OK, Hajibeigi A, Howard K, Cummins CL, van Abel M, Bindels RJ, Word RA, Kuro-o M, Pak CYC, Zerwekh JE. Aromatase deficiency causes altered expression of molecules

- critical for calcium reabsorption in the kidneys of female mice *. *J Bone Miner Res* 2007; 22(12):1893–902.
43. Tan S-J, Chu MM, Toussaint ND, Cai MM, Hewitson TD, Holt SG. High-intensity physical exercise increases serum α -klotho levels in healthy volunteers. *J Circ Biomark* 2018; 7:1849454418794582.
44. Chen G, Liu Y, Goetz R, Fu L, Jayaraman S, Hu M-C, Moe OW, Liang G, Li X, Mohammadi M. α -Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. *Nature* 2018; 553(7689):461–6.
45. Kuro-o M. Molecular Mechanisms Underlying Accelerated Aging by Defects in the FGF23-Klotho System. *International Journal of Nephrology* 2018; 2018:9679841.
46. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T. Targeted ablation of *Fgf23* demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 2004; 113(4):561–8.
47. Hanson K, Fisher K, Hooper NM. Exploiting the neuroprotective effects of α -klotho to tackle ageing- and neurodegeneration-related cognitive dysfunction. *Neuronal Signal* 2021; 5(2):NS20200101.
48. Zhong X, Jagarlapudi S, Weng Y, Ly M, Rouse JC, McClure K, Ishino T, Zhang Y, Sousa E, Cohen J, Tzvetkova B, Cote K, Scarcelli JJ, Johnson K, Palandra J, Apgar JR, Yaddanapudi S, Gonzalez-Villalobos RA, Opsahl AC, Lam K, Yao Q, Duan W, Sievers A, Zhou J, Ferguson D, D'Antona A, Zollner R, Zhu HL, Kriz R, Lin L, Clerin V. Structure-function relationships of the soluble form of the antiaging protein Klotho have therapeutic implications for managing kidney disease. *J. Biol. Chem.* 2020; 295(10):3115–33.
49. Arking DE, Krebsova A, Macek M, Arking A, Mian IS, Fried L, Hamosh A, Dey S, McIntosh I, Dietz HC. Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(2):856–61.
50. Dubal DB, Yokoyama JS, Zhu L, Broestl L, Worden K, Wang D, Sturm VE, Kim D, Klein E, Yu G-Q, Ho K, Eilertson KE, Yu L, Kuro-o M, Jager PL de, Coppola G, Small GW, Bennett DA, Kramer JH, Abraham CR, Miller BL, Mucke L. Life Extension Factor Klotho Enhances Cognition. *Cell Reports* 2014; 7(4):1065–76.
51. Yokoyama JS, Marx G, Brown JA, Bonham LW, Wang D, Coppola G, Seeley WW, Rosen HJ, Miller BL, Kramer JH, Dubal DB. Systemic klotho is associated with KLOTHO variation and predicts intrinsic cortical connectivity in healthy human aging. *Brain Imaging Behav* 2017; 11(2):391–400.
52. Arking DE, Becker DM, Yanek LR, Fallin D, Judge DP, Moy TF, Becker LC, Dietz HC. KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *American journal of human genetics* 2003; 72(5):1154–61.
53. Arking DE, Atzmon G, Arking A, Barzilai N, Dietz HC. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circulation research* 2005; 96(4):412–8.
54. Yokoyama JS, Sturm VE, Bonham LW, Klein E, Arfanakis K, Yu L, Coppola G, Kramer JH, Bennett DA, Miller BL, Dubal DB. Variation in longevity gene KLOTHO is associated with greater cortical volumes. *Ann Clin Transl Neurol* 2015; 2(3):215–30.

55. Müller BW, Hinney A, Scherbaum N, Weimar C, Kleinschnitz C, Peters T, Hochfeld L, Pechlivanis S, Stang A, Jokisch M, Kowall B. Klotho KL-VS haplotype does not improve cognition in a population-based sample of adults age 55-87 years. *Sci Rep* 2021; 11(1):13852.
56. Mengel-From J, Soerensen M, Nygaard M, McGue M, Christensen K, Christiansen L. Genetic Variants in KLOTTHO Associate With Cognitive Function in the Oldest Old Group. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2016; 71(9):1151–9.
57. Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A, Obuse C, Togashi K, Tominaga M, Kita N, Tomiyama K, Iijima J, Nabeshima Y, Fujioka M, Asato R, Tanaka S, Kojima K, Ito J, Nozaki K, Hashimoto N, Ito T, Nishio T, Uchiyama T, Fujimori T, Nabeshima Y-I. alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science (New York, N.Y.)* 2007; 316(5831):1615–8.
58. Li S-A, Watanabe M, Yamada H, Nagai A, Kinuta M, Takei K. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell structure and function* 2004; 29(4):91–9.
59. Zhao Y, Zeng C-Y, Li X-H, Yang T-T, Kuang X, Du J-R. Klotho overexpression improves amyloid- β clearance and cognition in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Aging Cell* 2020; 19(10):e13239.
60. Teocchi MA, Ferreira AÉD, Da Luz de Oliveira EP, Tedeschi H, D'Souza-Li L. Hippocampal gene expression dysregulation of Klotho, nuclear factor kappa B and tumor necrosis factor in temporal lobe epilepsy patients. *J Neuroinflammation* 2013; 10(1):53.
61. Li Q, Vo HT, Wang J, Fox-Quick S, Dobrunz LE, King GD. Klotho regulates CA1 hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience* 2017; 347:123–33.
62. Mazucanti CH, Kawamoto EM, Mattson MP, Scavone C, Camandola S. Activity-dependent neuronal Klotho enhances astrocytic aerobic glycolysis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2019; 39(8):1544–56.
63. Lim K, Groen A, Molostvov G, Lu T, Lilley KS, Snead D, James S, Wilkinson IB, Ting S, Hsiao L-L, Hiemstra TF, Zehnder D. α -Klotho Expression in Human Tissues. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2015; 100(10):E1308-E1318.
64. Emami Aleagha MS, Siroos B, Ahmadi M, Balood M, Palangi A, Haghghi AN, Harirchian MH. Decreased concentration of Klotho in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing–remitting multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2015; 281:5–8.
65. Shiozaki M, Yoshimura K, Shibata M, Koike M, Matsuura N, Uchiyama Y, Gotow T. Morphological and biochemical signs of age-related neurodegenerative changes in klotho mutant mice. *Neuroscience* 2008; 152(4):924–41.
66. Laszczyk AM, Fox-Quick S, Vo HT, Nettles D, Pugh PC, Overstreet-Wadiche L, King GD. Klotho regulates postnatal neurogenesis and protects against age-related spatial memory loss. *Neurobiology of aging* 2017; 59:41–54.
67. Li D, Jing D, Liu Z, Chen Y, Huang F, Behnisch T. Enhanced Expression of Secreted α -Klotho in the Hippocampus Alters Nesting Behavior and Memory Formation in Mice. *Front. Cell. Neurosci.* 2019; 13:133.

68. Leon J, Moreno AJ, Garay BI, Chalkley RJ, Burlingame AL, Wang D, Dubal DB. Peripheral Elevation of a Klotho Fragment Enhances Brain Function and Resilience in Young, Aging, and α -Synuclein Transgenic Mice. *Cell Reports* 2017; 20(6):1360–71.
69. Zhou H-J, Zeng C-Y, Yang T-T, Long F-Y, Kuang X, Du J-R. Lentivirus-mediated klotho up-regulation improves aging-related memory deficits and oxidative stress in senescence-accelerated mouse prone-8 mice. *Life Sci* 2018; 200:56–62.
70. Nagai T, Yamada K, Kim H-C, Kim Y-S, Noda Y, Imura A, Nabeshima Y-I, Nabeshima T. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *The FASEB Journal* 2003; 17(1):50–2.
71. Chen C-D, Sloane JA, Li H, Aytan N, Giannaris EL, Zeldich E, Hinman JD, Dedeoglu A, Rosene DL, Bansal R, Luebke JI, Kuro-o M, Abraham CR. The Antiaging Protein Klotho Enhances Oligodendrocyte Maturation and Myelination of the CNS. *J. Neurosci.* 2013; 33(5):1927–39.
72. Zeldich E, Chen C-D, Avila R, Medicetty S, Abraham CR. The Anti-Aging Protein Klotho Enhances Remyelination Following Cuprizone-Induced Demyelination. *J Mol Neurosci* 2015; 57(2):185–96.
73. Zhu L, Stein LR, Kim D, Ho K, Yu G-Q, Zhan L, Larsson TE, Mucke L. Klotho controls the brain-immune system interface in the choroid plexus. *PNAS* 2018; 115(48):E11388-E11396.
74. Massó A, Sánchez A, Bosch A, Giménez-Llort L, Chillón M. Secreted α Klotho isoform protects against age-dependent memory deficits. *Molecular psychiatry* 2018; 23(9):1937–47.
75. Zeldich E, Chen C-D, Colvin TA, Bove-Fenderson EA, Liang J, Tucker Zhou TB, Harris DA, Abraham CR. The neuroprotective effect of Klotho is mediated via regulation of members of the redox system. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(35):24700–15.
76. Cheng M-F, Chen L-J, Niu H-S, Yang T-T, Lin K-C, Cheng J-T. Signals mediating Klotho-induced neuroprotection in hippocampal neuronal cells. *Acta neurobiologiae experimentalis* 2015; 75(1):60–71.
77. WHO, Health, Mental, Use S. Global status report on the public health response to dementia. World Health Organization 2021 Sep 1 [cited 2022 Feb 3].
78. Lieb. Intensivkurs Psychiatrie und Psychotherapie. 9. Auflage. München: Elsevier; 2019.
79. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *European journal of neurology* 2018; 25(1):59–70.
80. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *The Lancet Neurology* 2011; 10(3):241–52.
81. Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2019; 15(10):565–81.
82. Duce JA, Podvin S, Hollander W, Kipling D, Rosene DL, Abraham CR. Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey. *Glia* 2008; 56(1):106–17.
83. Dubal DB, Zhu L, Sanchez PE, Worden K, Broestl L, Johnson E, Ho K, Yu G-Q, Kim D, Betourne A, Kuro-o M, Masliah E, Abraham CR, Mucke L. Life extension factor klotho prevents mortality and enhances cognition in hAPP transgenic mice. *J. Neurosci.* 2015; 35(6):2358–71.

84. Neitzel J, Franzmeier N, Rubinski A, Dichgans M, Brendel M, Malik R, Ewers M. KL-VS heterozygosity is associated with lower amyloid-dependent tau accumulation and memory impairment in Alzheimer's disease. *Nature communications* 2021; 12(1):3825.
85. Erickson CM, Schultz SA, Oh JM, Darst BF, Ma Y, Norton D, Betthausen T, Gallagher CL, Carlsson CM, Bendlin BB, Asthana S, Hermann BP, Sager MA, Blennow K, Zetterberg H, Engelman CD, Christian BT, Johnson SC, Dubal DB, Okonkwo OC. KLOTHO heterozygosity attenuates APOE4-related amyloid burden in preclinical AD. *Neurology* 2019; 92(16):e1878-e1889.
86. Belloy ME, Eger SJ, Le Guen Y, Napolioni V, Deters KD, Yang H-S, Scelsi MA, Porter T, James S-N, Wong A, Schott JM, Sperling RA, Laws SM, Mormino EC, He Z, Han SS, Altmann A, Greicius MD. KL*VS heterozygosity reduces brain amyloid in asymptomatic at-risk APOE*4 carriers. *Neurobiology of aging* 2021; 101:123–9.
87. Zeng C-Y, Yang T-T, Zhou H-J, Zhao Y, Kuang X, Duan W, Du J-R. Lentiviral vector-mediated overexpression of Klotho in the brain improves Alzheimer's disease-like pathology and cognitive deficits in mice. *Neurobiology of aging* 2019; 78:18–28.
88. Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meißner JN, Schubert N, Di Spiezio A, Baches S, Vandenbroucke RE, Bouter Y, Prikulis I, Korth C, Weggen S, Heimann A, Schwaninger M, Bayer TA, Pietrzik CU. Endothelial LRP1 transports amyloid- β (1-42) across the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 2016; 126(1):123–36.
89. Storck SE, Hartz AMS, Bernard J, Wolf A, Kachlmeier A, Mahringer A, Weggen S, Pahnke J, Pietrzik CU. The concerted amyloid-beta clearance of LRP1 and ABCB1/P-gp across the blood-brain barrier is linked by PICALM. *Brain Behav Immun* 2018; 73:21–33.
90. Li H, Wang B, Wang Z, Guo Q, Tabuchi K, Hammer RE, Südhof TC, Zheng H. Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and Klotho gene expression without rescuing the essential function of APP. *PNAS* 2010; 107(40):17362–7.
91. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Aufl. 2014. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. (Springer-Lehrbuch). Available from: URL: <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1544388>.
92. Shardell M, Semba RD, Rosano C, Kalyani RR, Bandinelli S, Chia CW, Ferrucci L. Plasma Klotho and Cognitive Decline in Older Adults: Findings From the InCHIANTI Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2016; 71(5):677–82.
93. Kundu P, Zimmerman B, Quinn JF, Kaye J, Mattek N, Westaway SK, Raber J. Serum Levels of α -Klotho Are Correlated with Cerebrospinal Fluid Levels and Predict Measures of Cognitive Function. *J Alzheimers Dis* 2022.
94. Degaspari S, Tzanno-Martins CB, Fujihara CK, Zatz R, Branco-Martins JP, Viel TA, Buck HdS, Orellana AMM, Böhmer AE, Lima LdS, Andreotti DZ, Munhoz CD, Scavone C, Kawamoto EM. Altered KLOTHO and NF- κ B-TNF- α Signaling Are Correlated with Nephrectomy-Induced Cognitive Impairment in Rats. *PLoS ONE* 2015; 10(5):e0125271.
95. Neyra JA, Hu MC. Potential application of klotho in human chronic kidney disease. *Bone* 2017; 100:41–9.
96. Drew DA, Weiner DE, Sarnak MJ. Cognitive Impairment in CKD: Pathophysiology, Management, and Prevention. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2019; 74(6):782–90.

97. Brownstein CA, Adler F, Nelson-Williams C, Iijima J, Li P, Imura A, Nabeshima Y-I, Reyes-Mugica M, Carpenter TO, Lifton RP. A translocation causing increased alpha-klotho level results in hypophosphatemic rickets and hyperparathyroidism. *PNAS* 2008; 105(9):3455–60.
98. Adema AY, Vervloet MG, Blankenstein MA, Heijboer AC. α -Klotho is unstable in human urine. *Kidney international* 2015; 88(6):1442–4.
99. Broder C, Becker-Pauly C. The metalloproteases meprin α and meprin β : unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem J* 2013; 450(2):253–64.
100. Keiffer TR, Bond JS. Meprin metalloproteases inactivate interleukin 6. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(11):7580–8.
101. Jefferson T, Čaušević M, Keller U auf dem, Schilling O, Isbert S, Geyer R, Maier W, Tschickardt S, Jumpertz T, Weggen S, Bond JS, Overall CM, Pietrzik CU, Becker-Pauly C. Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(31):27741–50.
102. Jefferson T, dem Keller U auf, Bellac C, Metz VV, Broder C, Hedrich J, Ohler A, Maier W, Magdolen V, Sterchi E, Bond JS, Jayakumar A, Traupe H, Chalaris A, Rose-John S, Pietrzik CU, Postina R, Overall CM, Becker-Pauly C. The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin β and ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013; 70(2):309–33.
103. Arnold P, Boll I, Rothaug M, Schumacher N, Schmidt F, Wichert R, Schneppenheim J, Lokau J, Pickhinke U, Koudelka T, Tholey A, Rabe B, Scheller J, Lucius R, Garbers C, Rose-John S, Becker-Pauly C. Meprin Metalloproteases Generate Biologically Active Soluble Interleukin-6 Receptor to Induce Trans-Signaling. *Sci Rep* 2017; 7:44053.
104. Wichert R, Ermund A, Schmidt S, Schweinlin M, Ksiazek M, Arnold P, Knittler K, Wilkens F, Potempa B, Rabe B, Stirnberg M, Lucius R, Bartsch JW, Nikolaus S, Falk-Paulsen M, Rosenstiel P, Metzger M, Rose-John S, Potempa J, Hansson GC, Dempsey PJ, Becker-Pauly C. Mucus Detachment by Host Metalloprotease Meprin β Requires Shedding of Its Inactive Pro-form, which Is Abrogated by the Pathogenic Protease RgpB. *Cell Reports* 2017; 21(8):2090–103.
105. Craig SS, Reckelhoff JF, Bond JS. Distribution of meprin in kidneys from mice with high- and low-meprin activity. *The American journal of physiology* 1987; 253(4 Pt 1):C535-40.
106. Oneda B, Lods N, Lottaz D, Becker-Pauly C, Stöcker W, Pippin J, Huguenin M, Ambort D, Marti H-P, Sterchi EE. Metalloprotease meprin beta in rat kidney: glomerular localization and differential expression in glomerulonephritis. *PloS one* 2008; 3(5):e2278.
107. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-o M, Moe OW. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *The FASEB Journal* 2010; 24(9):3438–50.
108. Medoro A, Bartollino S, Mignogna D, Marziliano N, Porcile C, Nizzari M, Florio T, Pagano A, Raimo G, Intriери M, Russo C. Proteases Upregulation in Sporadic Alzheimer's Disease Brain. *J Alzheimers Dis* 2019; 68(3):931–8.
109. Arnold P, Otte A, Becker-Pauly C. Meprin metalloproteases: Molecular regulation and function in inflammation and fibrosis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 2017; 1864(11 Pt B):2096–104.

110. Li Y-J, Fan Y-H, Tang J, Li J-B, Yu C-H. Meprin- β regulates production of pro-inflammatory factors via a disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) dependent pathway in macrophages. *International Immunopharmacology* 2014; 18(1):77–84.
111. Bedau T, Peters F, Prox J, Arnold P, Schmidt F, Finkernagel M, Köllmann S, Wichert R, Otte A, Ohler A, Stirnberg M, Lucius R, Koudelka T, Tholey A, Biasin V, Pietrzik CU, Kwapiszewska G, Becker-Pauly C. Ectodomain shedding of CD99 within highly conserved regions is mediated by the metalloprotease meprin β and promotes transendothelial cell migration. *The FASEB Journal* 2017; 31(3):1226–37.
112. Bylander J, Li Q, Ramesh G, Zhang B, Reeves WB, Bond JS. Targeted disruption of the meprin metalloproteinase beta gene protects against renal ischemia-reperfusion injury in mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2008; 294(3):F480-90.
113. Herzog C, Marisiddaiah R, Haun RS, Kaushal GP. Basement membrane protein nidogen-1 is a target of meprin β in cisplatin nephrotoxicity. *Toxicology Letters* 2015; 236(2):110–6.
114. Ahmed F, Mwiza J-M, Fernander M, Yahaya I, Abousaad S, Onger EM. Meprin- β activity modulates the β -catalytic subunit of protein kinase A in ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2020; 318(5):F1147-F1159.
115. Carmago S, Shah SV, Walker PD. Meprin, a brush-border enzyme, plays an important role in hypoxic/ischemic acute renal tubular injury in rats. *Kidney international* 2002; 61(3):959–66.
116. Panesso MC, Shi M, Cho HJ, Paek J, Ye J, Moe OW, Hu MC. Klotho has dual protective effects on cisplatin-induced acute kidney injury. *Kidney international* 2014; 85(4):855–70.
117. Gindorf M, Storck SE, Ohler A, Scharfenberg F, Becker-Pauly C, Pietrzik CU. Meprin β : A novel regulator of blood-brain barrier integrity. *J Cereb Blood Flow Metab* 2021; 41(1):31–44.
118. Marengo L, Armbrust F, Schoenherr C, Storck SE, Schmitt U, Zampar S, Wirths O, Altmeyen H, Glatzel M, Kaether C, Weggen S, Becker-Pauly C, Pietrzik CU. Meprin β knockout reduces brain A β levels and rescues learning and memory impairments in the APP/Ion mouse model for Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 2022; 79(3):168.
119. Schlenzig D, Cynis H, Hartlage-Rübsamen M, Zeitschel U, Menge K, Fothe A, Ramsbeck D, Spahn C, Wermann M, Roßner S, Buchholz M, Schilling S, Demuth H-U. Dipeptidyl-Peptidase Activity of Meprin β Links N-truncation of A β with Glutaminyl Cyclase-Catalyzed pGlu-A β Formation. *J Alzheimers Dis* 2018; 66(1):359–75.
120. Schönherr C, Bien J, Isbert S, Wichert R, Prox J, Altmeyen H, Kumar S, Walter J, Lichtenthaler SF, Weggen S, Glatzel M, Becker-Pauly C, Pietrzik CU. Generation of aggregation prone N-terminally truncated amyloid β peptides by meprin β depends on the sequence specificity at the cleavage site. *Mol Neurodegeneration* 2016; 11(1):19.
121. Becker-Pauly C, Pietrzik CU. The Metalloprotease Meprin β Is an Alternative β -Secretase of APP. *Front Mol Neurosci* 2016; 9:159.
122. Becker-Pauly C, Barré O, Schilling O, Keller U auf dem, Ohler A, Broder C, Schütte A, Kappelhoff R, Stöcker W, Overall CM. Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2011; 10(9):M111.009233.

123. Daniel Nallin. Die Interaktion zwischen Anti-Aging-Faktor Klotho und der Metalloprotease Meprin [Diplomarbeit]. Mainz: Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften, Johannes Gutenberg-Universität; 2016.
124. Le Gall SM, Bobé P, Reiss K, Horiuchi K, Niu X-D, Lundell D, Gibb DR, Conrad D, Saftig P, Blobel CP. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Molecular Biology of the Cell* 2009; 20(6):1785–94.
125. Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, Chevallier N, Merriam DE, Kounnas MZ, Wagner SL, Troncoso JC, Kawas CH, Katzman R, Koo EH. Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest* 2000; 106(9):1159–66.
126. Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, Huth T, Cryns K, Deforce S, Serneels L, Camacho IE, Marjaux E, Craessaerts K, Roebroek AJ, Schwake M, D'Hooge R, Bach P, Kalinke U, Moechars D, Alzheimer C, Reiss K, Saftig P, Strooper B de. Phenotypic and Biochemical Analyses of BACE1- and BACE2-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(35).
127. Norman LP, Jiang W, Han X, Saunders TL, Bond JS. Targeted disruption of the meprin beta gene in mice leads to underrepresentation of knockout mice and changes in renal gene expression profiles. *Molecular and cellular biology* 2003; 23(4):1221–30.
128. Peters F. Pathology-associated expression and function of the metalloproteases meprin α and meprin β [Dissertation]. Kiel: Christian-Albrechts-Universität; 2019.
129. Becker-Pauly C, Höwel M, Walker T, Vlad A, Aufenvenne K, Oji V, Lottaz D, Sterchi EE, Debela M, Magdolen V, Traupe H, Stöcker W. The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol* 2007; 127(5):1115–25.
130. Carbonell LF, Klowden MJ, Miller LK. Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *J Virol* 1985; 56(1):153–60.
131. Davis TR, Trotter KM, Granados RR, Wood HA. Baculovirus expression of alkaline phosphatase as a reporter gene for evaluation of production, glycosylation and secretion. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 1992; 10(10):1148–50.
132. invitrogen blt. USER GUIDE Bac-to-Bac ® Baculovirus Expression System [cited 2022 Mar 30]. Available from: URL: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf.
133. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 1985; 150(1):76–85.
134. Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 1999; 21(1):70–1.
135. Feil S, Valtcheva N, Feil R. Inducible Cre Mice. In: Wurst W, Kühn R, editors. *Gene knockout protocols*. 2. ed. New York, NY: Humana Press; 2009. p. 343–63 (Springer protocols; vol. 530).

136. Roberts LM, Woodford K, Zhou M, Black DS, Haggerty JE, Tate EH, Grindstaff KK, Mengesha W, Raman C, Zerangue N. Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology* 2008; 149(12):6251–61.
137. Ridder DA, Lang M-F, Salinin S, Röderer J-P, Struss M, Maser-Gluth C, Schwaninger M. TAK1 in brain endothelial cells mediates fever and lethargy. *The Journal of Experimental Medicine* 2011; 208(13):2615–23.
138. Kunert SK, Hartmann H, Haffner D, Leifheit-Nestler M. Klotho and fibroblast growth factor 23 in cerebrospinal fluid in children. *Journal of bone and mineral metabolism* 2017; 35(2):215–26.
139. Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, Suárez-Alvarez B, Lopez-Larrea C, Jakubowski A, Blanco J, Ramirez R, Selgas R, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A, Sanz AB. The inflammatory cytokines TWEAK and TNF α reduce renal klotho expression through NF κ B. *JASN* 2011; 22(7):1315–25.
140. Kruse M-N, Becker C, Lottaz D, Köhler D, Yiallourous I, Krell H-W, Sterchi EE, Stöcker W. Human meprin alpha and beta homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors. *Biochem J* 2004; 378(Pt 2):383–9.
141. Bertenshaw GP, Turk BE, Hubbard SJ, Matters GL, Bylander JE, Crisman JM, Cantley LC, Bond JS. Marked differences between metalloproteases meprin A and B in substrate and peptide bond specificity. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(16):13248–55.
142. Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 7. Aufl. 2016. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. (Experimentator).
143. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 2014; 5:172.
144. Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology* 1995; 6(5):494–500.
145. Miroux B, Walker JE. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of molecular biology* 1996; 260(3):289–98.
146. R. Novy, D. Drott, K. Yaeger, R. Mierendorf. Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression; 2001. (vol 12). Available from: URL: https://www.researchgate.net/publication/285853236_Overcoming_the_codon_bias_of_E_coli_for_enhanced_protein_expression.
147. Siller E, DeZwaan DC, Anderson JF, Freeman BC, Barral JM. Slowing bacterial translation speed enhances eukaryotic protein folding efficiency. *Journal of molecular biology* 2010; 396(5):1310–8.
148. Murphy CI, Piwnica-Worms H. Overview of the baculovirus expression system. *Current protocols in protein science* 2001; Chapter 5:Unit5.4.
149. Rohrmann GF. *Baculovirus Molecular Biology*. 3rd. Bethesda (MD); 2013. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24479205/>.
150. Xu Y, Sun Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. *Endocr Rev* 2015; 36(2):174–93.

151. Shi X, Jarvis DL. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system. *Curr Drug Targets* 2007; 8(10):1116–25.
152. van Die I, van Tetering A, Bakker H, van den Eijnden DH, Joziassse DH. Glycosylation in lepidopteran insect cells: identification of a beta 1--4-N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the synthesis of complex-type oligosaccharide chains. *Glycobiology* 1996; 6(2):157–64.
153. Arolas JL, Broder C, Jefferson T, Guevara T, Sterchi EE, Bode W, Stöcker W, Becker-Pauly C, Gomis-Rüth FX. Structural basis for the sheddase function of human meprin β metalloproteinase at the plasma membrane. *PNAS* 2012; 109(40):16131–6.

9 Anhang

9.1 Vektorkarten

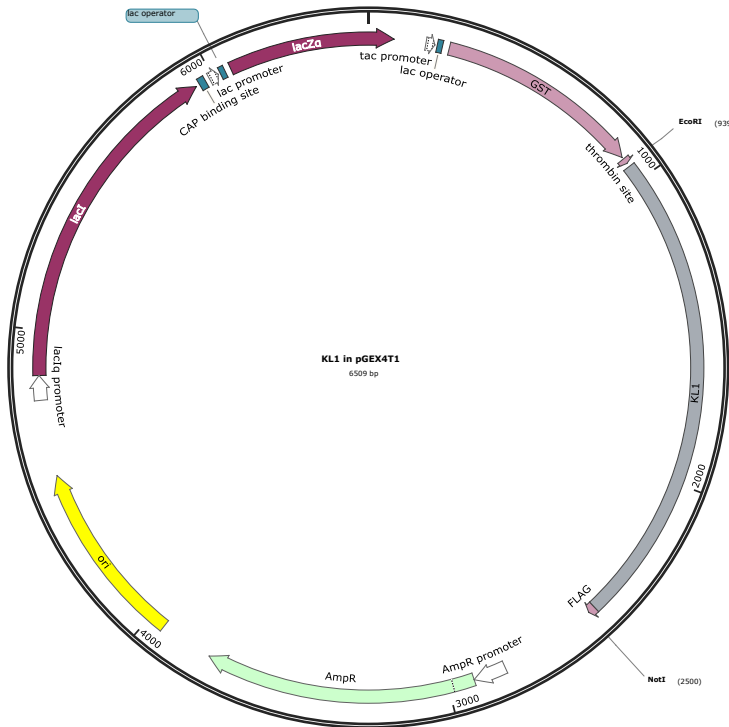


Abbildung 23: KL1 in pGEX4T-1

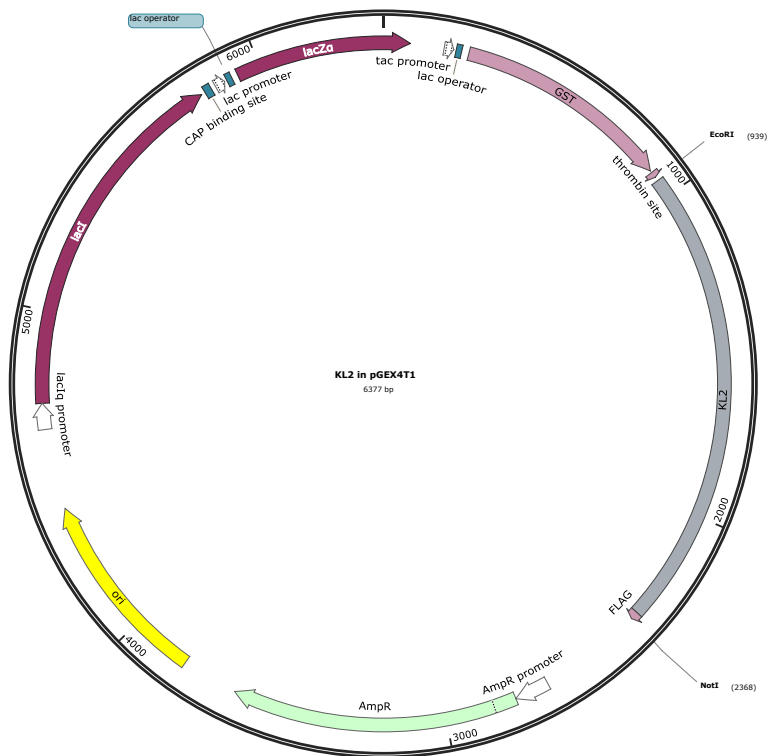


Abbildung 24: KL2 in pGEX4T-1

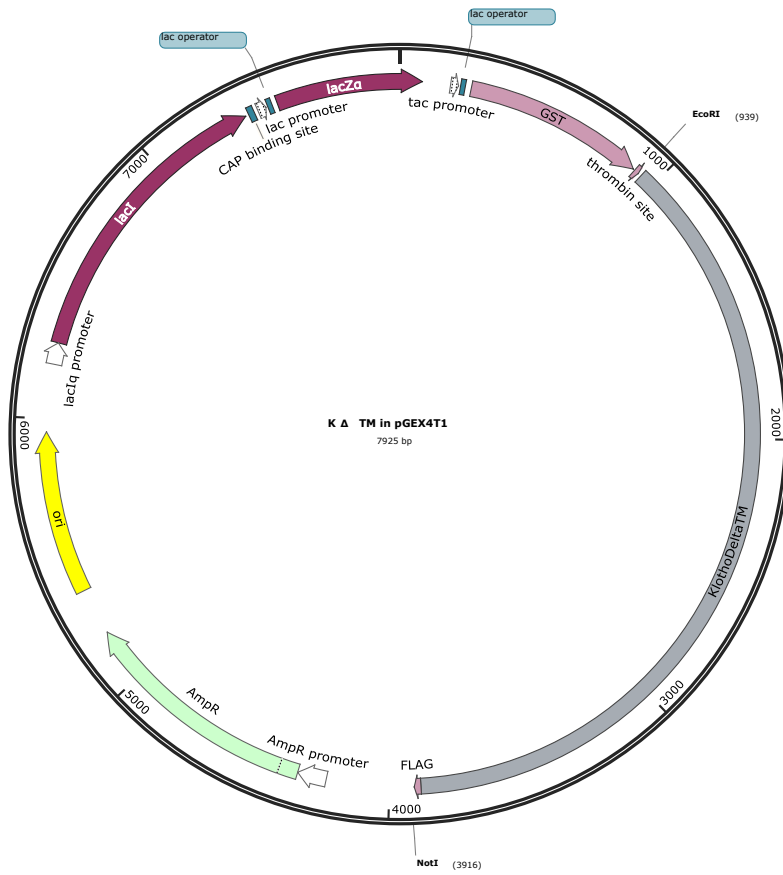


Abbildung 25: Klotho Δ TM in pGEX4T-1

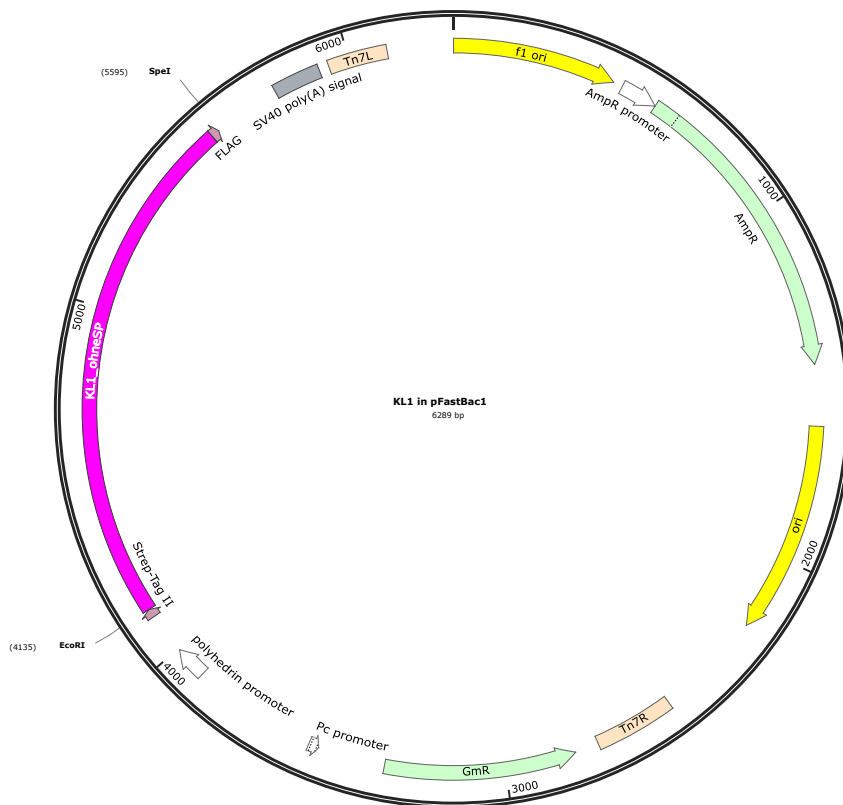


Abbildung 26: KL1 in pFastBac1

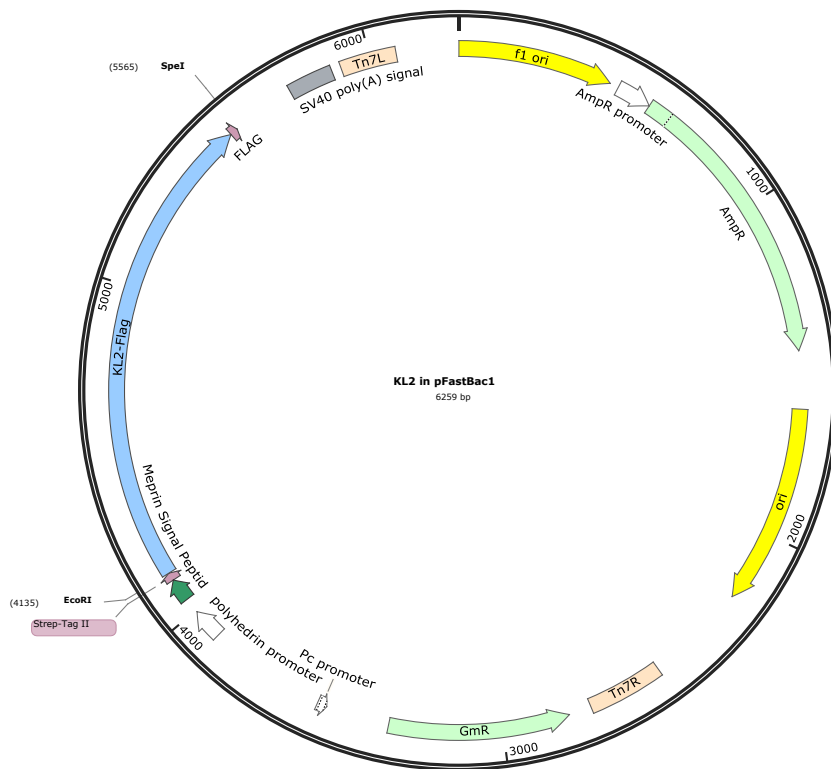


Abbildung 27: KL2 in pFastBac1

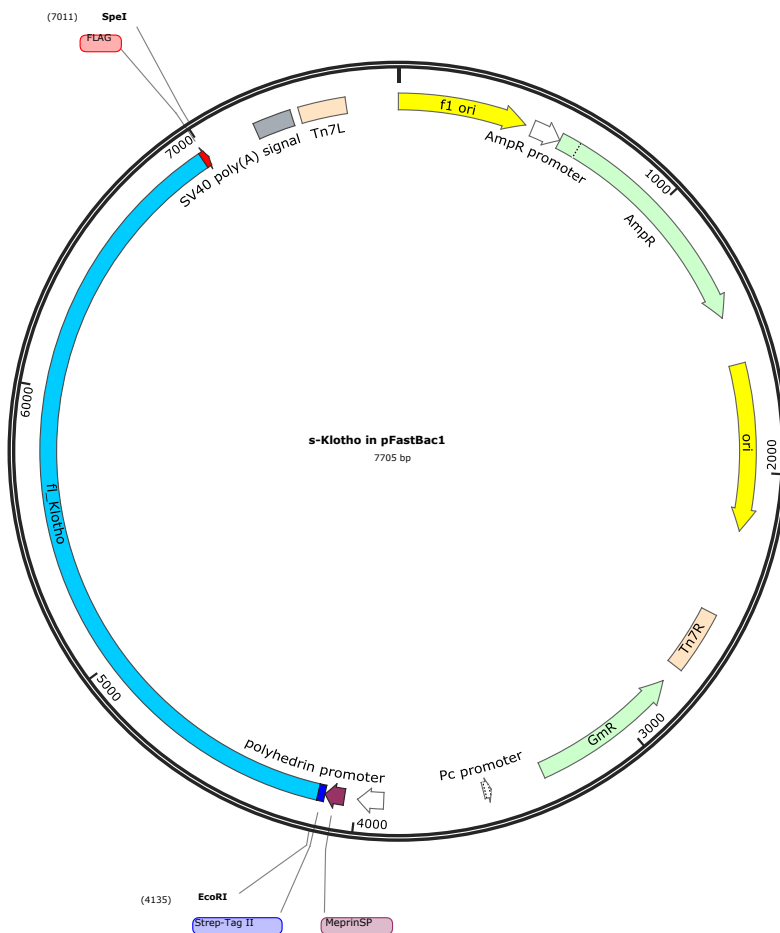


Abbildung 28: Klotho Δ TM in pFastBac1

9.2 Genehmigung für Abbildung 2

THE AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Apr 13, 2022

This Agreement between Universitätsmedizin Mainz -- Greta Böhme ("You") and The American Physiological Society ("The American Physiological Society") consists of your license details and the terms and conditions provided by The American Physiological Society and Copyright Clearance Center.

License Number	5287061486164
License date	Apr 13, 2022
Licensed Content Publisher	The American Physiological Society
Licensed Content Publication	Am J Physiol-Renal Physiology
Licensed Content Title	Shedding of klotho by ADAMs in the kidney
Licensed Content Author	Ellen P. M. van Loon, Wilco P. Pulskens, Eline A. E. van der Hagen, et al
Licensed Content Date	Aug 15, 2015
Licensed Content Volume	309
Licensed Content Issue	4
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	non-profit academic/educational
Readers being charged a fee for this work	No
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/images
Number of figures/tables/images	1
Will you be translating?	yes
Number of languages	1
Languages	German
World Rights	no
Order reference number	1
Title	Meprin β ist eine neue Sekretase für das Anti-Aging Protein Klotho
Institution name	Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Expected presentation date	Dec 2022
Order reference number	1
Portions	Figure 1
Specific Languages	German
Requestor Location	

Billing Type
Billing Address



Attn: Universitätsmedizin Mainz

Total

0.00 EUR