

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

Transport der Klotho-Untereinheit KL1 über die Blut-Hirn-Schranke

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

Vorgelegt von

Julian Bastelberger
aus Boppard

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 18.09.2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Klotho, ein Hoffnungsträger.....	1
1.2 Ziel der Dissertation.....	2
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Klotho	3
2.1.1 Der dem Altern ähnliche Phänotyp	3
2.1.2 Formen und Modifikationen des Proteins Klotho	3
2.1.3 Expressionsorte des lokalen und zirkulierenden Klothos	5
2.1.4 Regulatorische Einflüsse	6
2.1.5 Zelluläre und enzymatische Wirkung Klothos	8
2.1.6 Klotho und Krebserkrankungen	10
2.1.7 Die Rolle Klothos im Gehirn.....	11
2.1.8 Genetische Polymorphismen Klothos im Menschen	15
2.1.9 Klotho und Morbus Alzheimer	16
2.1.10 Therapie mit Klotho.....	18
2.2 Morbus Alzheimer	22
2.2.1 Bedeutung für Patienten, Umfeld und Gesellschaft	22
2.2.2 Ätiologische Einteilung und Risikofaktoren.....	23
2.2.3 Pathologie und Pathophysiologie	24
2.2.4 Clearance-Hypothese	25
3 Materialien	27
3.1 Chemikalien	27
3.2 Puffer, Lösungen, Gele.....	28
3.3 Plasmide	30
3.4 Zellen	30
3.5 Antikörper	32
3.6 Geräte	33
3.7 Verbrauchsmaterialien	35
3.8 Software	35
4 Methoden.....	37
4.1 Zellkultur	37
4.1.1 Allgemeine Bedingungen	37
4.1.2 Kultivierung	37
4.1.3 Zellzahl-Bestimmung	37
4.1.4 Revitalisierung und Kryokonservierung.....	37
4.1.5 Kultivierung der Insektenzellen.....	38
4.1.6 Transiente Transfektion von HEK-Zellen.....	38

4.1.7	Zell-Lyse.....	38
4.2	Proteinanalytik.....	39
4.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay.....	39
4.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Nano-Drop Spektrometrie	39
4.2.3	TCA-Präzipitation.....	39
4.2.4	SDS-PAGE	40
4.2.5	Western Blot.....	40
4.2.6	Inkubation mit Antikörper und Chemilumineszenz-Assay.....	40
4.2.7	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	41
4.3	Antikörper-Aufreinigung.....	41
4.3.1	Aufreinigung mittels Äkta™ Start.....	41
4.3.2	Konzentrationsbestimmung der eluierten Antikörper.....	41
4.4	Rekombinante Protein-Expression und Aufreinigung.....	42
4.4.1	Protein-Expression in High-Five-Zellen	42
4.4.2	Aufreinigung mittels ÄKTA™ start.....	43
4.4.3	Ammoniumsulfat-Präzipitation und Ultrafiltration mit Amicon-Gefäßen...44	
4.5	Uptake-Versuch von rekombinatem KL1 in HEK 293T-Zellen	45
4.5.1	Design	45
4.5.2	Durchführung	46
4.6	Transport rk-Klothes über ein Blut-Hirnschranken-Modell.....	46
4.6.1	Design	46
4.6.2	Kultivierung von bEND.3-Zellen im CellZcope	47
4.6.3	Radioaktive Markierung von KL1 mit ¹²⁵ Iod.....	48
4.6.4	Generelles Prozedere des Transportversuchs	49
4.7	Statistische Auswertung	50
5	Ergebnisse	51
5.1	Charakterisierung und Aufreinigung des Klotho-Antikörpers.....	51
5.1.1	Identifikation eines Kandidaten.....	51
5.1.2	Aufreinigung des Antiserums mittels ÄKTA™ start.....	53
5.1.3	Funktionstest und Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers.....	53
5.2	Expression von rekombinatem KL1 und KLΔTM.....	55
5.2.1	Definition der Virusverdünnung für rk-KL1	55
5.2.2	Definition des Konditionierungsmodus für rk-KL1.....	56
5.2.3	KL1-Aufreinigung mit ÄKTA™ start.....	58
5.2.4	Evaluation des Expressions- und Aufreinigungsprozesses.....	59
5.2.5	Optimierungsversuch mithilfe der Ammoniumsulfat-Fällung	61
5.2.6	Expression und Aufreinigung von rk-KLΔTM	63
5.3	Uptake rk-Klothes in HEK293T-Zellen.....	65
5.3.1	KL1-Aufnahme durch Zellen?	65
5.3.2	Nebenbefund APP-Änderung.....	66
5.4	Transport rk-Klothes über ein Blut-Hirnschranken-Modell.....	68

5.4.1	KL1 wird aktiv transportiert	68
5.4.2	KL1-Antikörper PA-KL1/1 vermindert den Transport von KL1	70
5.4.3	Reduktion des Transports durch LRP1- und LDL-R.-Blockade.....	72
6	Diskussion.....	73
6.1	Pa-KL1/1 erkennt full-length Klotho und seine UE KL1.....	73
6.2	Expression von rekombinatem KL1 und KLΔTM.....	74
6.2.1	Optimierung der Expressionsbedingungen	74
6.2.2	Aufreinigung von rekombinatem KL1.....	75
6.3	Uptake-Versuch.....	78
6.4	Transport rk-Klothos über ein Blut-Hirnschranken-Modell.....	80
6.4.1	KL1 wird aktiv transportiert	80
6.4.2	PA-KL1/1 vermindert den KL1-Transport	82
6.4.3	Reduktion des Transports durch LRP1- und LDL-R.-Blockade.....	83
7	Zusammenfassung	85
8	Literaturverzeichnis.....	87
9	Danksagung	99
10	Tabellarischer Lebenslauf – Julian Bastelberger	100

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
A β	Amyloid-beta
AD	Alzheimer's Disease =Alzheimer-Krankheit
AS	Aminosäure
BACE	β -Sekretase β -APP Cleaving Enzyme 1
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CAAT-Box	Teil DNA-Sequenz (CAAT) in der Promotorregion eukaryotischer Gene
cDNA	Complementary-DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary - Zellen
CpG	Cytosin-Phosphatrest-Guanin
CSF	cerebrospinale Flüssigkeit
CRP	C-reaktives Protein
	doppelt deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic-Acid
etc.	Et cetera
EDSS	Expanded-Disability-Status-Scale
ELISA	Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay
FGF	Fibroblast-Growth-Factor
FGFR	Fibroblast-Growth-Factor-Receptor
h	Stunde

H ₂ O	Wasser
HRP	Horseradish-Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IGF1	<i>Insulin-like-Growth-Factor 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IFN-γ	Interferon-γ
IL-1β	Interleukin-1β
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KL1	Klotho-Untereinheit KL1
KL2	Klotho-Untereinheit KL2
kl/kl-Maus	Transgene-Maus, mit hypomorphem Klotho-Genen (1)
KL-/- Mäuse	Voller Knock-out der Klotho Gene(2)
Klotho	α-Klotho
Full-length Klotho	Siehe fl-Klotho
fl-Klotho	Full-length Klotho = Transmembran-Klotho
KLΔTM	Klotho ohne Transmembran-Domäne
LRP1	Low-Density-Lipoprotein-Receptor-related Protein-1
LTP	Long-Term-Potential (Langzeitpotenzierung)
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar (Mol/Liter)
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA
MS	Multiple Sklerose
mTor	Mammalian-Target of Rapamycin
MMSE	Mini-Mental-State-Examination, (deutsch MMST)
NF-κB	Nuclear-Factor-κ-B
ng	Nanogramm
NMD	Nonsense-mediated-mRNA-Decay
NMDA-R.	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor

PBS	Phosphate Buffered Saline
PEI	Polyethylenimin
P-gp	P-Glykoprotein
PSEN1 und 2	Präsenilin 1 und Präsenilin 2
rk	rekombinant
RT	Raumtemperatur
PTC	Premature Termination Codons
RNA	Ribonucleic-Acid
RRMS	Replapse-Remitting-Multiple-Sclerosis
s	Sekunde
Soluble-Klotho	fl-Klotho ohne Transmembrananteile und intrazytoplasmatische Anteile
s-Klotho	
s-	soluble = löslich
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)
Sf9	Spodoptera-Frugiperda-9
SNP	Single-Nucleotide-Polymorphismus
sog.	sogenannte
SOD	Superoxid-Dismutase
SP1-Motiv	Bindungsregionen für den Transkriptionsfaktoren Sp1
TATA-Box	Teil DNA-Sequenz in der Promotorregion eukaryotischer Gene
TGF- β	Transforming-Growth-Factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TBS-T	Tris Buffered Saline mit (0,1%) Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembran
TRPV5	Transiente Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie V, Subtyp 5
USD	US-Dollar
VE-H ₂ O	Vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp

z.B.
ZNS

zum Beispiel
zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Identifizierung polyklonaler Antiseren gegen KL1 und KL2.....	51
Abbildung 2: Vergleich KL1-gerichteter Antiseren und mit kommerziellem KM2076.	52
Abbildung 3: Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten Antikörper PA-KL1/1.	53
Abbildung 4: Vergleich der Antikörper PA-KL1/1 und dem kommerziellen KM2076.....	54
Abbildung 5: KL1-Expression in Abhängigkeit von der Virusverdünnung.	55
Abbildung 6: Akkumulationsmethode über 72h.....	56
Abbildung 7: Wiederholte Mediumsabnahme alle 24h.....	57
Abbildung 8: Gesamtprozesseffektivität der KL1-Expression und Aufreinigung.	58
Abbildung 9: Evaluation des KL1-Aufreinigungsprozesses zweier Läufe.	60
Abbildung 10: Fällung von KL1 bei verschiedenen AS-Konzentrationen.....	61
Abbildung 11: Kombinierte AS-Fällung mit Amiconzentrifugation.....	62
Abbildung 12: Aufreinigung von rk-KL Δ TM.	63
Abbildung 13: KL1-Uptake-Versuch durch HEK293T.	65
Abbildung 14: Beeinflusst KL1-Exposition sAPP-Produktion in HEK293T?.....	66
Abbildung 15: KL1 wird aktiv transportiert.....	68
Abbildung 16: Wiederfindung des KL1-Signals und Präzipitats-Überstands-Quotient.....	69
Abbildung 17: Der KL1-gerichtete Antikörper PA-KL1/1 reduziert den KL1-Transport.	70
Abbildung 18: Sekundäre Datenpunkte bei Blockade des KL1-Transports.	71
Abbildung 19: Inhibition des Transports durch LRP1- und LDL-Blockierende Antikörper.....	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	27
Tabelle 2: Puffer, Lösungen, Gele für die Proteinbiochemie.....	28
Tabelle 3: Puffer für die Antikörper-Aufreinigung über die Protein A Säule.....	29
Tabelle 4: Puffer für die Protein-Aufreinigung über die Strep-Tactin-Säule.....	29
Tabelle 5: Puffer für die radioaktive Markierung von Proteinen.....	30
Tabelle 6: Plasmide.....	30
Tabelle 7: Insektenzellen.....	30
Tabelle 8: Säugetierzellen.....	31
Tabelle 9: Basis-Zellkulturmedien.....	31
Tabelle 10: Puffer und Coating-Lösungen.....	31
Tabelle 11: Wachstums-, Versuchs- und Konservierungsmedien.....	31
Tabelle 12: Antibiotika.....	32
Tabelle 13: Primäre Antikörper.....	32
Tabelle 14: Sekundäre Antikörper.....	33
Tabelle 15: Geräte.....	33
Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien.....	35
Tabelle 17: Software.....	35
Tabelle 18: BSA-Standardreihe-Pipettierschema.....	39
Tabelle 19: Definitionen für die Evaluation der Strep-Tag-Aufreinigung und Infektion.....	44
Tabelle 20: Pipettierschema für die AS-Fällungsreihe.....	45
Tabelle 21: Zusätze der verschiedenen Transportversuche.....	47
Tabelle 22: Schema der Radiomarkierung.....	49
Tabelle 23: Proben der Transportversuche.....	49
Tabelle 24: Konzentrationen der eluierten Antikörper PA-KL1/1.....	53
Tabelle 25: Konzentrationen der KL1-Eluate (Nano-Drop).....	59
Tabelle 26: Konzentrationen der KL Δ TM-Eluate (Nano-Drop).....	64

Hinweis zum generischen Maskulinum

In dieser Doktorarbeit wird aus Gründen der Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Selbstverständlich sind damit alle Geschlechter gleichermaßen gemeint. Ich lege großen Wert auf die Gleichbehandlung aller Menschen und bitte um Verständnis für diese sprachliche Vereinfachung.

1 Einleitung

1.1 Klotho, ein Hoffnungsträger

Klotho - die Lebensfaden spinnende Göttin aus der griechischen Mythologie - dient als Namensgeberin des Gens, welches Makoto Kuro-o und seine Kollegen 1997 entdeckten. So wie die antike Klotho das Schicksal der Menschen bestimmen soll, bestimmte eine Mutation des Gens die Mäuse für einen Phänotyp, der dem menschlichen Altersphänotyp ähnelt (1). Heute wird α -Klotho auch als Anti-Ageing-Protein bezeichnet (3) oder an anderer Stelle ein „Elefant der Altersforschung“ genannt (4). α -Klotho wird als Tumor-Suppressor vermutet (5), gewinnt in der Nephrologie klinisch bereits an Bedeutung (6) und ist Hoffnungsträger in der Forschung zur Neurodegeneration (7).

Die ursprünglichen α -Klotho-defizienten transgenen -kl/kl-Mäuse von Kuro-o et al. zeichnen sich durch eine reduzierte Lebensspanne aus, durch vaskuläre Veränderungen, neurologische Symptome, die dem Parkinson-Syndrom ähneln, Osteoporose, Hautatrophie und vielen weiteren Alterns-assoziierten Erscheinungen (1). Eine α -Klotho-Überexpression wiederum verlängert die Lebensspanne, um bis zu 30% (3). Die α -Klotho-defizienten transgenen-kl/kl-Mäuse können durch Wiedereinführung Klothos vor dem Altersphänotyp bewahrt werden und teilweise sogar alternstypische Erscheinungen rückgängig gemacht werden (1, 8).

Das α -Klotho Protein ist Teil der Klotho-Proteinfamilie, die sich über die Gemeinsamkeit des Glykosid-Hydrolase-Motivs charakterisiert (1). Im Folgenden wird α -Klotho besprochen. Sollte nur von „Klotho“ die Rede sein, ist α -Klotho insinuiert. Ob Klotho als Glykosidase wirken kann ist umstritten (9). Gesichert ist jedoch die Wirkung auf den FGF23-Weg und die damit verbundene Einflussnahme auf den Mineralhaushalt (9, 10). Dazu kommen weitere assoziierte Wege, die mit zellulärer Seneszenz, Apoptose, Entzündung, Dysfunktion der Immunsteuerung, Fibrose und Neoplasie verbunden sind (11).

Physiologische und pathologische Prozesse nehmen Einfluss auf die Klotho-Expression und die Spiegel im Serum (11, 12). Das Alter ist mit niedrigeren Klotho-Serum-Spiegeln verbunden (13). Der Klotho-Serum-Spiegel wird sogar als Marker für Mortalität diskutiert (14).

Bei älteren Menschen mit normaler Kognition ist die CSF-Konzentration im Vergleich zu jungen Menschen erniedrigt, noch niedriger ist sie bei Morbus-Alzheimer-Patienten. Außerdem korrelieren die Klotho-CSF-Konzentrationen mit dem MMST-Score, einem neuropsychologischen Test, der bei der Einschätzung kognitiver Defizite hilft (15).

Die Einflüsse Klothos auf das ZNS sind vielfältig und dessen Rolle auf Neurodegeneration wird diskutiert (7). Klotho defiziente Mäuse präsentieren nicht nur Alterserscheinungen, sondern auch kognitive Einschränkungen mit fortschreitendem Lebensalter (16). Kehrseitig stärkt Klotho-Überexpression die Kognition und neuronale Resilienz in gesunden und kranken Mäusen (17, 18).

Die Klotho-Spiegel sind im CSF bei psychiatrischen wie auch neurologischen Erkrankungen wie Multiple Sklerose und Morbus Alzheimer erniedrigt (15, 19). Es finden sich jedoch noch weitere Überschneidungen, wie es exemplarisch am Morbus Alzheimer dargestellt werden soll.

Morbus Alzheimer (AD) ist eine neurodegenerative Erkrankung und stellt die häufigste Form der Demenz dar (20). Durch den demografischen Wandel bedingt könnten 2050 weltweit 152 Millionen Menschen an AD erkrankt sein, 2019 waren es 50-65 Millionen (21). Durch die typische Klinik entstehen Belastungen für Patienten, Umfeld und medizinisches Personal. Daraus resultieren gesellschaftliche Herausforderungen. M. Alzheimer ist dabei eine der teuersten und tödlichsten und äußerst belastenden Erkrankungen dieses Jahrhunderts zu werden (22, 23).

Die Pathogenese der Erkrankung ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Im Vordergrund steht weiterhin die Amyloid-Hypothese (24, 25). Krankheitsverlauf-modifizierende Therapien sind nicht flächendeckend verfügbar (22, 24).

Neuere Therapieansätze wie der Anti-Amyloid-Antikörper Aducanumab sind in ihrer klinischen Wirksamkeit der Verbesserung der Kognition zumindest umstritten (26).

Weiterentwicklungen wie Lecanemab sind Grund für Hoffnung in der Therapie der Erkrankung, aber weiterhin keine Heilung. Die Antikörper-Therapie geht zudem mit sehr hohen Therapiekosten, hohem Bedarf an Monitoring und mit nennenswerten Nebenwirkungen einher (27). Es besteht also weiter Bedarf nach neuen Wegen der Therapie.

In AD-Mausmodellen finden sich Klotho-assoziierte Verbesserungen des Phänotyps auf Kognition und den Phänotyp (28-31). Dabei mildert sowohl globale Überexpression (18, 28), sowie periphere Gabe von Klotho den Phänotyp von Neurodegeneration und verbessert die Kognition (32, 33).

Exogenes, peripher appliziertes Klotho wurde bislang nicht jenseits der BHS im Gehirn nachgewiesen (32, 34). Unklar bleibt deswegen der Mechanismus, wie peripheres Klotho zentrale Prozesse beeinflussen könnte.

Denkbar wäre der Transport eines kleineren Fragments Klothos mit anschließender Wirkung im ZNS, aber auch dies ist bislang unklar (33). Die Klotho-Untereinheit KL1 allein verbessert die Kognition und verändert hippocampale Prozesse rapide nach Gabe und das sogar stärker als das fl-Klotho (33). Der Nachweis der Klotho-Untereinheit jenseits der Blut-Hirnschranke nach peripherer KL1-Gabe wurde nach Wissen des Autors zum Zeitpunkt des Verfassens der Arbeit jedoch nicht erbracht. Das Verständnis des Mechanismus peripherer Klotho-Applikation ist auf dem Weg für die therapeutische Anwendung von großer Bedeutung.

1.2 Ziel der Dissertation

Ziel dieser hier vorliegenden Arbeit war die Evaluation eines möglichen Transports der Klotho-Untereinheit KL1 von der Blut-Seite zur Gehirn-Seite über die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Dazu wurde ein BHS-Modell mit auf Transwells kultivierten b.END3-Zellen genutzt. Als möglicher Teil des Transportmechanismus wurden die Blockade des für die A β -Clearance wichtige Rezeptor LRP1 (35) und die Blockade aller LDL-Rezeptoren durch das Protein RAP (36) untersucht.

Als Vorversuch erfolgte die Untersuchung einer Aufnahme von KL1 durch HEK-293T Zellen.

Die KL1-Untereinheit wurde für diese Experimente rekombinant hergestellt und aufgereinigt. Es lag bereits ein Baculovirus zur Infektion von Insektenzellen vor (hergestellt von Greta Böhme), sowie gab es bereits erste Erfahrung mit der Expression und der Aufreinigung (37). Diese Erkenntnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit vertieft. Außerdem wurde ein polyklonaler Antikörper charakterisiert, um diesen zur Detektion Klothos und in experimentellen Settings zu nutzen. Es wurde die Fähigkeit des Antikörpers untersucht den potenziellen Transport von KL1 zu inhibieren.

2 Literaturdiskussion

2.1 Klotho

2.1.1 Der dem Altern ähnliche Phänotyp

1997 berichten Makoto Kuro-o et al. die Identifizierung eines neuen Gens - Klotho, das in der Suppression eines dem menschlichen Alterns ähnelnden Phänotyps beteiligt sei (1). Sie nennen das Gen Klotho, nach der Lebensfaden-spinne Götting aus der griechischen Mythologie, deren Tun das Schicksal der Menschen bestimmt (1). Das Protein wird heute auch als Anti-Ageing-Protein bezeichnet (3).

Kuro-o et al. erzeugen transgene kl/kl-Mäuse, deren Fähigkeit das Gen zu exprimieren massiv eingeschränkt ist. Durch eine Insertions-Mutation im 5'-Promoter kommt es zu einem hypomorphen Allel (1). Folgend generierte Mäuse mit einem vollen Knock-out (KL-/Mäuse) sind diesem Phänotyp von Kuro-o et. al sehr ähnlich (2). Die betreffenden Mäuse zeigen eine reduzierte Lebensspanne, Wachstumsretardation, sowie weitere klinische Veränderungen, die sich 3-4 Wochen nach der Geburt beginnen zu manifestieren (1). Eine Klotho Überexpression wiederum verlängert die Lebensspanne in Mäusen hingegen im Vergleich zum Wildtyp bis zu 30% in männlichen und bis zu 20% in weiblichen Mäusen (3).

Die kl/kl-Mäuse zeigen neurologische Symptome wie reduzierte Spontanmotorik (Hypokinese) und einem parkinsonoiden Gangbild mit reduzierter Schrittlänge. Auch progrediente Arteriosklerose, v.a. mit Fokus auf die Tunica Media, sind ab der vierten Lebenswoche zu beobachten. Dabei ähnelt der histologische Befund der Mönckeberg-Arteriosklerose. Dazu zeigen sich einerseits ektopische Calcifizierungen in verschiedensten Organen, wie sie auch typisch im menschlichen Altern sind. Andererseits leiden die Mäuse an Osteoporose. Ebenfalls ist eine Hautatrophie mit reduzierter Haarfollikelzahl und reduzierter epidermaler und dermaler Dicke festzustellen. Die Lunge zeigt eine dem Altersemphysem ähnliche Veränderung. Zusätzlich präsentieren sich atrophierte Genitale und eingeschränkte Reifung der Gonaden und Infertilität. Zudem finden sich Abnormalitäten in der Hypophyse. Im Serum und Blut ist eine leichte Hypercalciämie und Hyperphosphatämie nachweisbar (1).

Kuro et al. demonstrieren, dass kl/kl-Mäuse in Rahmen eines *Rescue*-Versuchs (Rettungs-Versuch) nicht mehr von den Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden waren. Dazu injizieren sie den kl/kl-Mäusen kl-cDNA. Die Rettung der Mäuse vor dem kl/kl-Phänotyp zeigt die entscheidende Rolle des Gens für den beobachteten Altersphänotyp (1). Eine andere Möglichkeit des *Rescues* zeigen Masuda et al. 2005. Sie induzieren bei kl/kl-Mäusen nach 5 und 8 Wochen die Expression von Klotho und zeigen, dass die altersphänotypischen Veränderungen sogar umgekehrt werden können (8).

2.1.2 Formen und Modifikationen des Proteins Klotho

Das humane **α -Klotho-Gen** ist auf Chromosom 13q12 lokalisiert und kodiert für das α -Klotho-Protein. Das Gen besteht aus 5 Exons und 4 Introns und spannt sich über ca. 50kbp in Menschen, Mäusen und Ratten. Transkribiert bestehen sie aus 3036, 3042, 3042 Nukleotid-mRNAs (bei Menschen/Mäusen/Ratten) (12, 38, 39). Die Homologie zwischen dem humanen und murinen Klotho-Gen beträgt 86% (1). Der Promoter des Klotho-Gen besitzt keine TATA-Box oder CAAT-Motiv, besitzt dafür aber über ein Sp1-Motiv, das Klotho Expression fördert, wie es sich häufig in TATA-losen Promoter-Regionen findet (38). Der Promoter und Exon 1 weisen in hohem Maße Cytosin und Guanin auf, was auf CpG-Inseln hindeutet (38).

Das humane **α -Klotho-Protein** ist ein Typ1-Transmembranprotein und hat 1012 Aminosäuren (135kDa). Das Protein besteht aus einer extrazellulären Domäne, die sich aus einem N-terminalen Signalpeptid und aus den zwei internalen Untereinheiten KL1 und KL2 zusammensetzt. Die Untereinheiten weisen ca. 21% Homologie auf und bestehen beide aus ca. 450 Aminosäuren (AS). Die Transmembran-Domäne umfasst 21 AS und die intrazelluläre Domäne 10 AS (38). Für das kleine intrazytoplasmatische Segment von 10 AS ist die biologische Funktion weiterhin unklar (4). Die Untereinheiten KL1- und KL2 weisen eine

Homologie mit den β -Glykosidasen aus Pflanzen und Bakterien und einer Lactase-Pholizin Hydrolase von Säugetieren von 20-40% auf (1). Das α -Klotho-Protein der Maus hat 1014 AS (39) und die Homologie der Proteinsequenz ist 98% zwischen Menschen und Mäusen (12).

Man vermutete lange, dass es auch eine **sekretierte Form α -Klothos** in Mäusen und Menschen gäbe, die aus dem α -Klotho-Gen durch alternatives Splicing entstünde. Das mutmaßliche Transkript enthält kurz nach Exon 3 durch die Insertion von 50bp ein vorzeitiges Stoppcodon (sog. Premature termination codon, PTC), sodass man glaubte, es handle sich um ein sekretiertes, ca. 70 kDa großes Protein. Dieses vermutete Protein besäße einen besonderen C-Terminus, der so nicht beim full-length-Klotho und der Untereinheit KL1 vorkäme (38, 39). Es wurde ursprünglich sogar angenommen, dass es die dominante Form Klothos im Körper sei (38) Sie wurde jedoch nicht in humanem oder murinem Serum oder CSF nachgewiesen (40, 41). Li et al. nutzten einen für das den C-Terminus spezifischen Antikörper und können das sekretierte Klotho nicht nachweisen (41).

Mencke et al. liefern dafür einen Erklärungsansatz. Das kurze mRNA-Transkript aus dem alternativen Splicing dient einer Regulationsmöglichkeit für mRNA-Translation in Form des sog. nonsense-mediated mRNA-decay (NMD) (42). Ein hoher Anteil der alternativen mRNA ist mit niedriger α -Klotho-Expression assoziiert und umgekehrt. Oxidativer Stress führte zu hohem Anteil an der alternativen mRNA (42). Außerdem weisen sie nach, dass das alternative mRNA-Transkript nicht mit Polysomen assoziiert ist, was für eine Translation nötig wäre. Dies ist bei dem mRNA-Transkript des full-length-Klotho anders, was für eine aktive Translation spräche (42).

Posttranslational kann das Protein Klotho geschnitten werden (40, 43). Im Zuge des sog. **α -Cuts** durch die α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17 und die β -Sekretase wird das anschließend lösliche *soluble*-Klotho (130kDa) von seiner Transmembrandomäne und intrazellulären Domäne abgetrennt (44). Diese nun freigewordene extrazelluläre Komponente kommt so von der Zelloberfläche ins Blut, Urin und CSF (40). Es bleiben dadurch die Transmembran- und intrazellulären Domänen übrig, diese werden dann von der γ -Sekretase weiter geschnitten (44). Dieser Prozess lässt sich durch Insulin stimulieren (40, 43). Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , sowie TGF- β und LPS können ebenso für eine Aktivitäts-Erhöhung der α -Sekretase ADAM10 sorgen (45). Als weitere Sekretase für die posttranslationale Prozessierung wird die Metalloprotease Meprin β diskutiert (37).

Beim sog. **β -Cut** wird Klotho zwischen KL1 und KL2 geschnitten, sodass zwei Fragmente entstehen mit einer Größe von ca. 70kDa (43, 46). Dabei handelt es sich vermutlich um ein seltenes Event und in den meisten Zellen und Flüssigkeiten ist die 130kDa-Form die dominante Form (7).

Es gibt **zusammenfassend** verschiedene **Formen des α -Klotho-Proteins**: Das full-length-Transmembranprotein (fl-Klotho; 135kDa), das lösliche α -Klotho-Protein nach α -Cut (soluble-Klotho, s-Klotho, 130kDa; Cave: In der Literatur wird s-Klotho auch für eine vermutete sekretierte Form verwandt), und KL1 nach dem β -Cut, das bislang aber nur im CSF und nicht im Blut nachgewiesen wurde (11).

Abhängig vom Expressionsort könnte es zu verschiedenen **posttranslationalen Glykosylierungen** kommen, die Einfluss auf die Funktionsfähigkeit und auch Halbwertszeiten in vivo des Proteins nehmen können (47). So zeigt s-Klotho unterschiedliche Glykosylierungsmuster, abhängig davon, ob es in HEK-Zellen oder in CHO-Zellen produziert wurde. Zusätzlich zeigen sich Unterschiede in der Glykosidase-Aktivität (CHO schwach, HEK nicht detektierbar) und der FGF-Co-Rezeptor-Aktivität (47).

α -Klotho gehört zu einer Protein-Familie. Die **Klotho-Protein Familie** zeichnen sich durch die Gemeinsamkeit des Glykosid-Hydrolase-Motivs aus. Dieses Motiv weist Homologie mit β -Glykosidasen aus Pflanzen und Bakterien und einer Lactase-Pholizin-Hydrolase von Säugetieren auf (1). Der Klotho-Protein-Familie fehlt jedoch für eine Glutamat-Aminosäure an einer für enzymatische Aktivität kritischer Stelle (48). Fügt man das Glutamat wieder hinzu, erhöht sich enzymatische Aktivität und senkt sich die FGF-Co-Rezeptor-Funktion (47).

Neben α -Klotho gibt es β -Klotho mit ebenfalls 2 Hydrolase-Motiven, sowie KLP (Klotho-lactase-phlorizin-Hydrolase (LPH)-related-protein) und Klotho-related-peptide (KLRP) mit je nur einem Hydrolase Motiv (48, 49). KLP mRNA wurde in höchstem Ausmaß in Niere und Haut gefunden. Die Biologische Funktion ist bislang unklar (48). KLRP zeigt die Aktivität einer Glucocerebrosidase (49).

β -Klotho wird vor allem in Leber, Pancreas und Adipozyten synthetisiert und hat zu ca. 41% Ähnlichkeit zu α -Klotho in der Aminosäuresequenz (12, 50). Es nimmt dabei über die FGF19- und FGF21-Wege Einfluss auf Steuerung des Metabolismus, die Glucose-Aufnahme, Gallensäure-Synthese und Fettstoffwechsel (51, 52). Inwieweit die unterschiedlichen Klotho-Homologe funktional zusammenhängen, ist nicht abschließend geklärt (4, 51). Umstand dieser hier vorliegenden Arbeit ist jedoch das α -Klotho-Protein.

2.1.3 Expressionsorte des lokalen und zirkulierenden Klothos

Hauptproduzenten sind insbesondere die Niere in den distalen konvoluten Tubuli und der Plexus choroideus in der Maus (1, 53). Zudem findet starke Expression in der Nebenschilddrüse, dem sinuatrialen Knoten bei Nagetieren statt (53). Weitere Organe, in denen es zumindest ein wenig Klotho exprimiert wird, sind die Hypophyse, Placenta, Skelettmuskel, Blase, Aorta, Pancreas, Hoden, Ovar, Kolon und die Schilddrüse in Mäusen (1).

2015 untersuchen Lim et al. systematisch und multimodal die Expression des transmembranlokalisierten α -Klotho im Menschen (54). Im Menschen gibt es Klotho auch in den Epithelialzellen der proximalen und distalen konvoluten Tubuli der Niere, sowie innerhalb des arteriellen Baumes von Aorta über Arterien, sowie weiter distal in den vaskulären Betten der Niere, Schilddrüse, Prostata und Hoden. Dabei fand sich das α -Klotho sowohl in Intima als auch der Media, besonders stark jedoch in Vasa vasorum der großen Gefäße. In der Leber wurde nichts gefunden, hier ist β -Klotho exprimiert (51, 54). In weiterem epithelialem Gewebe wie Epidermis, Haarfollikeln, Nebenschilddrüse, Pancreas, sowie Jejunum und Kolon konnte man ebenfalls α -Klotho finden. Ebenso in den Sertolizellen des Hoden, dem epithelialem Gewebe der Prostata und der Mamma, dem Endometrium und Eileiter. In den Follikelzellen der Schilddrüse, den B-Zellen des Pancreas, im Mark der Nebenniere und auch in den Leydigzellen im Hoden fand man Klotho. Neuronal fand man α -Klotho im cerebralen Kortex, in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns, sowie im Rückenmark in den Motoneuronen des ventralen Horns, sowie im Plexus myentericus (54). Auch in Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten wird Klotho exprimiert (55).

Sonstige Orte der Klotho-Expression im Gehirn werden diskutiert. Vorgeschlagen sind der Hypothalamus, Thalamus, Striatum, Substantia nigra, Amygdala, Kleinhirn, cerebraler Kortex, Gyrus dentatus, Medulla oblongata, Corpus callosum, Hippocampus und das Rückenmark (53).

Da Klotho nur in bestimmten Geweben exprimiert wird, legen die den ganzen Körper betreffenden Veränderungen, eine hormonelle Komponente der Klotho-Wirkung nahe. Eine hormonelle Wirkung wird vermutlich durch das soluble- α -Klotho (KL1+KL2) oder die singuläre Untereinheit KL1 getragen (1, 40, 44). Parabiose-Studien zeigen, dass wt/kl-Mäuse (Phänotyp mit erniedrigten Klothospiegeln), die kardiovaskuläre Schädigungsmuster zeigen, durch die Verbindung mit wt/wt-Mäusen (höhere Klothospiegel) eine Verbesserung ihrer Befunde erleben, was die humorale Komponente unterstreicht (56).

Zunächst war fraglich, welche Gewebe die **Hauptproduzenten des löslichen Klothos** sind. Im Zuge dieser Suche weisen Hu et al. nach, dass sich bei nephrektomierte Mäusen innerhalb eines Tages nach der Nierenentfernung die zirkulierenden Klotho-Level halbieren (57). Ebenso sind durch die kombinierte oder einzelne Blockade der α - bzw. der β -Sekretasen die Level soluble-Klothos in Mäusen erniedrigt (57). Lindberg et al. erzeugen eine Maus mit einer selektiven Klotho-Deletion im Nephron (Six2-KL-/-) (58). Der Serum-Spiegel des soluble-Klotho war um ca. 80% herabgesetzt, sie entwickelten einen ähnlichen Phänotyp wie die kl/kl-Mäuse von Kuro-o et al. Diese Befunde legen die Niere als hauptsächliche Quelle des zirkulierenden soluble-Klotho nahe (58). Beim Menschen zeigen Daten von Spendern einer

Niere 5 Tage nach Explantation einen Abfall von 30% der soluble-Klotho-Spiegel (59). Außerdem zeigen Messungen der Klotho-Konzentrationen der infra- und suprarenalen Vena Cava einen Anstieg mit der Richtung des Blutflusses nach der Passage der Niere auch beim Menschen (57).

Auch die **Entfernung des soluble-Klothos** aus dem Blutstrom scheint zumindest partiell über die Niere zu laufen. Exogenes, wie endogenes Klotho hat in anephrischen Mäusen eine deutlich erhöhte Halbwertszeit im Vergleich zu normalen Mäusen. Klotho wird von der Niere aus dem Blut in den Urin exkretiert (57), Dies legen die Nachverfolgung von radioaktiv-markiertem Klotho und dessen Nachweis im Urin nahe (57).

Klotho wird mit seiner Größe von 130kDa nicht filtriert und nimmt auch keinen Einfluss auf die negativ geladene glomeruläre Basalmembran, was ein Leck der Membran zugunsten der Filtrierung Klothos erklären könnte (57). Markiertes, exogenes appliziertes Klotho ist zwar in den Glomeruli, jedoch nicht in der Bowman-Kapsel nachweisbar, dafür jedoch im peritubulären kapillären Lumen. Es ist im Cytoplasma der proximalen und distalen Tubuluszellen, sowie im Lumen der Tubuli zu detektieren. In Zusammenschau deuten die Befunde auf eine Sekretion Klothos in die Tubuli und nicht auf eine Filtration. Im Rahmen dieser Studie weisen sie einen unidirektionalen Transport von der basalen zur apikalen Seite in vitro nach. Die Autoren schlossen andere Ausscheidungswege jedoch nicht aus (57).

2.1.4 Regulatorische Einflüsse

Physiologische und **pathologische Prozesse** nehmen Einfluss auf die Klotho-Expression (11, 12). Modulierende pathologische Zustände sind zum Beispiel mehrere Alterns-assoziierte Erkrankungen wie Krebs, Bluthochdruck und chronischer Niereninsuffizienz (5, 6, 11, 60). Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ist s-Klotho erniedrigt und höhere Level sind mit einem niedrigeren Risiko für Funktionsverlust assoziiert (61).

Der Soluble-Klotho-Spiegel ist bei gesunden Menschen mit dem **Alter** negativ korreliert (13, 14). Espuch et al. schlagen für soluble-Klotho altersstratifizierte Referenzwerte vor. Sie erheben diese Referenzwerte mittels ELISA anhand einer 346 gesunder Menschen umfassenden Kohorte. Sie sehen keinen Unterschied zwischen Männern und Frauen bezüglich der Klotho-Level (14). Einen geschlechtsspezifischen Unterschied könnte es zu Gunsten männlicher Kinder im CSF geben (62).

Klotho-Spiegel könnten sogar als **Marker des Mortalitätsrisikos** verwendet werden. Sowohl in europäischen als auch in amerikanischen Kohorten korrelieren die Klotho-Level negativ mit dem generellen Mortalitätsrisiko unter Betrachtung des niedrigsten Quartils (63, 64).

Der **Promoter** des Klotho-Gen besitzt keine TATA-Box oder CAAT-Motiv, besitzt dafür aber über ein Sp1-Motiv, das Klotho Expression fördert. Dies findet man häufig in TATA-losen Promoter-Regionen (38). Der Promoter und Exon 1 weisen in hohem Maße Cytosin und Guanin auf, was auf eine CpG-Insel hindeutet (38). Passend dazu kann der Promoter durch Hypermethylierung beeinflusst werden, wie zum Beispiel beim Zervix-Carcinom oder Kolorektalen-Carcinom (65, 66). Die Hypermethylierung des Klotho-Promoters, die mit folgender Suppression einhergeht, findet sich auch bei der chronischen Niereninsuffizienz, bei der die Ansammlung urämischer Toxine mit der Hochregulierung von DNA-Methyltransferase einhergeht (67, 68). Auch die Abnahme der Klothospiegel im Alter könnten durch die Methylierung bedingt sein, wie Befunde der weißen Substanz im Gehirn alternder Rhesus-Affen zeigen (69, 70). Andererseits kann eine De-Methylierung in Muskelstammzellen mit folgender Erhöhung der Expression der Regeneration beitragen (71).

Inflammation führt zu einer Senkung der Klotho-Expression. Soluble-Klotho könnte sogar als Biomarker für systemische Inflammation dienen, da es negativ mit den klassischen Entzündungsmarkern CRP, Harnsäure und Leukozytenzahl korreliert (72). Ein für Klotho modulierender Weg ist die inhibierende Bindung des Transkriptionsfaktors NFkappaB am Promoter Klothos. Entzündungsmediatoren wie TNF- α oder TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) führen zu einer Aktivierung von NFkappaB und somit zu einer Senkung

der Klotho Expression in vitro und in vivo im Rahmen des akuten Nierenversagens bei Mäusen (73).

Angiotensin II ist ein starker Inhibitor der Klotho-Transkription. Vermutet wird, dass über Angiotensin II eine TGF- β -medierte Suppression des Transkription-steigernden Regulatoren Sp1 erwirkt (74). Angiotensin II ist der hauptsächliche Effektor des Renin-Angiotensin-Systems. Seine Blockade durch ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptor-Blocker spielt Blutdruck-unabhängig eine Rolle in der nephroprotektiven Wirkung (74). In einem Modell für chronische Nephropathie induziert durch Cyclosporin zeigt bei zeitgleicher Losartan-Gabe eine Aufhebung der erwarteten Klotho-Abfalls (75).

Statine sind HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren und haben pleiotrope Effekte neben der Senkung der LDL-Konzentration im Blut, wie z.B. Stabilisierung atherosklerotischer Plaques, Reduktion des oxidativen Stress und der vaskulären Inflammation. Verantwortlich für die Pleiotropie ist das Fehlen der Intermediate der Cholesterol-Produktion durch die Statin-Wirkung. Sie werden für posttranslationale Modifikation von G-Proteinen wie der GTPase Rho gebraucht (76). Die erhöhte Aktivität von Rho supprimiert die Klotho-Expression in vitro. Durch die Minderung der Aktivität von Rho im Rahmen einer Statintherapie oder eines spezifischen Rho-Inhibitors wird die Wirkung umgedreht und Klotho wird vermehrt exprimiert (76). Die Klotho-Expression wird durch die Inhibition der HMG-Coa-Reduktase auch in vivo in einem Atherosklerose-Modell erhöht (77).

FGF23 wird im Knochen produziert und ist ein starker negativer Regulator der Klotho-Transkription, sodass Zustände, die FGF23 erhöhen, zu einer Reduktion Klothos führen. Transgene FGF23-überexprimierende Mäuse zeigen reduzierte Klotho-Expression (78). Ein Beispiel für einen solchen Zustand mit Überhang an FGF23 ist die chronische Niereninsuffizienz (79).

Vitamin D bindet über das Vitamin-D-Response-Element am Promoter Klothos und sorgt für eine Steigerung der Expression (80). Vitamin D bewirkt bei niedrigen Calcium-Spiegeln eine Steigerung des Calciums. Dabei hilft die Hochregulierung Klothos und FGF23s durch die gemeinsame phosphaturische Wirkung Phosphat auszuschleiden und toxische hyperphosphatämische Zustände zu vermeiden (80).

Weitere transkriptionelle Regulatoren sind der epidermale Growth Factor (EGF) (81) und PPAR γ (82, 83), die beide die Expression steigern. PPAR γ ist in Adipogenese, Glucose-Homöostase, Knochen-Stoffwechsel und Inflammation beteiligt (83).

Eine weitere Regulationsmöglichkeit sind die **microRNAs**. Es sind kleine, 18-25 Nukleotide umfassende, nicht-codierende RNAs, die posttranskriptionell auf die Genexpression Einfluss nehmen. Klotho ist ein Ziel verschiedener miRNAs bei unterschiedlichen Krebsentitäten (84). Ein Beispiel ist die miR-15b miRNA im Kolorektalen-Carcinom (CRC) (85). Hohe Level dieser miRNA sind mit niedriger Klotho-Expression assoziiert. In vitro zeigt die Inhibition dieser miRNA eine Anhebung des Klotho Levels. Diese miRNA ist bei Patienten mit kolorektalem Carcinom im Vergleich zu gesunden Kontrollen und bei Patienten mit Metastasen höher als bei Patienten ohne Metastasierung. Ob all diese Effekte allein Klotho zuzuschreiben sind, ist fraglich, da die betreffende miRNA auch das sog. MTSS1-Protein (metastasis suppressor protein 1) beeinflusst (85). Dennoch zeigt dieses Beispiel, wie Klotho über miRNA reguliert werden kann.

Auch das oben besprochene nonsense-mediated mRNA-decay (NMD) könnte eine Regulationsmechanismus darstellen, da eine hohe Anzahl an alternativen Transkripten mit niedrigerer Expression assoziiert ist und diese wiederum bei oxidativem Stress vermehrt vorkommen (42).

2.1.5 Zelluläre und enzymatische Wirkung Klothos

Enzymatische Wirkung

Ob eine Klotho selbst eine Glykosidaseaktivität besitzt und welche Rolle diese spielen könnte, ist nicht abschließend geklärt. Chang et al. zeigen, dass im distalen Tubulus die Calcium-Resorption in Gegenwart von Klotho durch erhöhte Retentionszeit eines Calciumtransporters (TRPV5) an der Zellmembranoberfläche verstärkt wird (86, 87). Dabei wird die Retentionszeit des Kanals durch die Modifikation seines N-Glykans verlängert. Durch die Modifikation einer Sialyltransferase - vermittelt durch die Anwesenheit von Klotho oder Klotho selbst - wird eine Bindestelle für Galectin-1 frei, was wiederum die Retentionszeit an der Membranoberfläche erhöht (87). Der Kaliumkanal ROMK wird über den gleichen Mechanismus stabilisiert (88). Chen et al. wiederum postulieren, dass die Struktur α -Klothos nicht mit einer Glykosidase-Aktivität zu vereinbaren sei, da im katalytischen Zentrum entscheidende Veränderungen im Vergleich zu aktiven Glykosidasen vorliegen (9). Es ist also wahrscheinlicher, dass Klotho nur eine vermittelnde Rolle bei enzymatischen Glykosidase-Effekten spielt und keine eigenständige Glykosidase-Funktion besitzt (7).

FGF-assozierte Funktion

FGF23 ist ein besonderes Mitglied der FGF-Familie (Fibroblast Growth Factor), da es als Hormon aktiv wird. Es gehört somit zu den endokrinen FGF (weitere sind FGF19 und FGF21) (89). FGF23 wird vom Knochen gebildet und ist an der Regulation des Phosphat-Haushalts zusammen mit Vitamin D und Parathormon beteiligt (89). Dabei spielt die Klotho-Protein-Familie mit α - und β -Klotho eine entscheidende Rolle in der Funktionalität von FGF und deren Rezeptoren (10, 52).

Die extrazelluläre Domäne Klothos bindet an den Rezeptoruntereinheiten FGFR1c, -3c, oder 4 und erhöht dessen Affinität für FGF23 – es induziert Nähe und Stabilität (9, 10). Dabei kann sowohl die membran-gebundene Form also auch die s-Klotho-Form diesen Effekt vermitteln (9). FGFR1c reguliert Phosphat und Calcium-Austausch in der Niere. Dazu werden die Phosphattransporter NPT-2a und 2c im proximalen Tubulus blockiert, folglich wird Phosphat ausgeschieden (11, 90, 91).

Außerdem wird durch den aktiven FGF23-Weg die Vitamin D-Aktivierung inhibiert. Dies geschieht durch die Suppression der 1α -Hydroxylase im proximalen Tubulus (92). Die Erniedrigung der Vitamin-D-Spiegel führt zu geringeren Calciumspiegeln. Zusätzlich reduziert FGF23 die Sekretion von Parathormon (93). Andererseits erniedrigen Parathormon und Vitaminen D3 die Produktion von FGF23, sodass sich das Bild eines Feedback-Mechanismus ergibt (94).

Die Bedeutung der Klotho/FGF23-Achse für den Mineralhaushalt wird bei Fehlen eines oder mehrerer der Komponenten klar. Eine Klotho- oder FGF23-Defizienz in Mäusen führt zu exzessiver 1α -Hydroxylase Aktivität, Vitamin D-Überschuss, mangelnder Phosphatausscheidung und damit assoziierte Hyperphosphatämie und Hypercalcämie, die zum Alters-Phänotyp beitragen (79, 95). Dabei scheinen die α -Klotho-Effekte auf die Mineralhaushalt FGF23-abhängig (91, 95). Eine Phosphat-arme-Diät schwächt diese Pathologie ab, obwohl Vitamin D weiter steigt, was die Bedeutung der Hyperphosphatämie hervorhebt. Demgegenüber steht, dass die kombinierte Depletion von Vitamin D plus Klotho- oder FGF23-Defizienz phänotypisch schwächer ausfällt als nur Klotho- oder FGF23-Defizienz. Dies stellt eine von Vitamin-D-unabhängige Wirkung Klothos in Frage (95, 96).

Eine möglicher Pathomechanismus für die toxische Wirkung des dysfunktionalen Mineralhaushalts stellen die Entwicklung sog. sekundärer Calciprotein-Partikel dar (97). Sie sind definiert als Mineral-Protein-Komplexe bestehend aus Calcium-Phosphat und dem Serum-Protein-Fetuin-A (98). Sie entstehen bei der Präzipitation des Calcium-Phosphats in Folge der hohen Phosphatspiegel. Sobald die Löslichkeit des Calcium-Phosphats überschritten wird, werden die Präzipitate von Fetuin-A absorbiert. Über den Verlauf werden sie dann immer größer (99).

Primäre Calciproteine sind physiologisch Trigger für die FGF23-Produktion in Osteoblasten, um die Serumspiegel von Phosphat (durch phosphaturische Wirkung) und Calcium (durch Suppression der Aktivierung von Vitamin D) zu senken (99). Werden die Calciproteine jedoch zu groß, triggern sie pathologische Prozesse. Sie führen zu Zellschaden, ektooper Calcifikation und Inflammation, sowie Arteriosklerose und Fibrose in der Niere (97).

Im Menschen gibt es seltene Mutationen im FGF23 und auch im Klotho-Gen, die zu vermehrte Inaktivierung des FGF oder zur verminderten biologischen Aktivität führen. Diese kongenitalen hyperphosphatämischen Zustände sind mit massiver ektooper Calcifikation (sog. tumoröse Calcinose), Hyperostose und systemischer Inflammation verbunden (100).

Weitere Pathways

Neben der FGF23/Klotho-Achse inhibiert das α -Klotho weitere wichtige Wege, die mit zellulärer Seneszenz, Apoptose, Entzündung, Dysfunktion der Immunsteuerung, Fibrose und Neoplasie assoziiert sind (11). Es handelt sich dabei um Transforming growth factor β (TGF- β), Insulin-like growth factor (IGF-1), Wnt und NF-kappaB (101-104). Andererseits werden protektive, antioxidative Transkriptionsfaktoren FoxO und NrF2 durch Klotho positiv beeinflusst (105, 106).

Klotho-defiziente Mäuse entwickeln fibrotische Prozesse in verschiedenen Organen wie im Herz, der Lunge und der Niere (1, 101). Fibrose kann als dysregulierte Antwort auf Gewebsschaden mit exzessiver Ablagerung von extrazellulärer Matrix definiert werden (101). Ein niedriger Klotho-Spiegel kann Fibrose induzieren oder bei Abwesenheit verschlimmern; wohingegen die Erhöhung der Spiegel zur Besserung führt (67, 101, 107).

TGF- β spielt u.a. bei der Entstehung von Fibrose eine große Rolle (weiterhin beeinflusst TGF- β z.B. das Immunsystem, die Modulierung der extrazellulären Matrix; hat Einfluss auf Tumorgenese und Metastasierung) (102, 108). Das soluble-Klotho kann Fibrose-bildende Prozesse abschwächen (101). Klotho bindet an den TGF- β Rezeptor Typ 2 und verhindert so die weitere Signaltransduktion (102).

Ein Beispiel ist die Idiopathische pulmonale Fibrose (IPF), sie bildet sich im mittleren bis höheren Lebensalter aus und ist nach Diagnosestellung mit einer schlechten Prognose von einer medianen Lebenszeit von 2-4 Jahren verbunden (109). Hier sind Klotho-Spiegel erniedrigt und TGF- β -assoziierte Pathways hochreguliert. In einem ex vivo Lungen-Modell einer IPF-Maus konnte die durch TGF- β vorangetriebene Fibrose durch Gabe von rekombinantem Klotho gemildert werden (109). Wichtig anzumerken ist, dass TGF- β nicht der einzige wichtige Treiber für Fibrose ist und die Inhibition durch Klotho nicht hinreichend ist, jedoch kann die Fibrose partiell beeinflusst werden (101, 107).

Fibrosierung wird nicht nur durch einen Weg gesteuert. Ein weiterer wichtiger Pathway für Fibrose, Alterung und Tumorbilologie, aber v.a. auch Embryogenese und der Stammzellbiologie ist der **Wnt**-Weg (110). Klotho-Defizienz aktiviert den Wnt-Weg und trägt so zu Seneszenz und Depletion von Stammzellen bei (111). Stammzellen sind für die Gewebshomöostase und für die Regeneration von Geweben wichtig. Beim Altern kommt es zu Veränderung der Funktionalität dieser Fähigkeiten, was zu Apoptose und Seneszenz führt (111) Klotho kann Wnt binden, antagonisieren und verhindert so weitere Signaltransduktion (103). Ein Beispiel zeigen in vivo Experimente von Zhou et al, dass durch den sinkenden Klotho-Level und somit die gesteigerte Wnt-Aktivität ebenso zu Fibrose beiträgt (112).

Soluble-Klotho blockiert den **IGF-1**-Weg und könnte so Einfluss auf Altern und Neurodegeneration nehmen (3, 30, 113). Dieser Pathway wird schon lange in Bezug auf Langlebigkeit, Altern und Alterns-assoziierte Erkrankungen betrachtet (114). So führt beispielsweise die Downstream-Inhibition durch Rapamycin (mTor-Blockade) zum Herausögern des Alterns (115). Ebenso hat kalorische Restriktion Einfluss auf Langlebigkeit (114). Interessanterweise sorgt intermittierendes Fasten von Mäusen für eine Anhebung der Klotho Level (116). Einen Hinweis für die Bedeutung der IGF-1 Blockade zeigen Kurosu et al. (3). Sie erzeugten KL-/- Mäuse und mit zusätzlicher heterozygoter loss of function-Mutation im

IRS-1-Gen. Diese Mäuse hatten im Vergleich mit den reinen KL -/- Mäusen reduzierte Altersphänotypische Symptome und Pathologien (3). Auch in anderen Tiermodellen verlängert die Blockade des IGF-1-Weges das Leben (114, 115).

Des Weiteren hängt an dem IGF-1-Weg eine negative Regulation antioxidativer Enzyme. Die Inhibition des IGF1-Weges durch Klotho führt also zur Steigerung der Expression solcher, antioxidativer Enzyme wie zum Beispiel die Mangan-Superoxid-Dismutase (105). Der aktive IGF1-Weg blockiert die sog. FoxO forkhead Transkriptionsfaktoren, wird dies durch Klotho aufgelöst, wird die Resistenz für Oxidativen Stress erhöht und kann so zu Langlebigkeit beitragen (105).

Klotho inhibiert aber auch die Translokation von **NF-kappa B** in den Nucleus, ein wichtiger Mediator der Inflammation und Seneszenz. Andererseits reguliert die NF-kappa B auch die Klotho-Expression herunter (73, 104). Beispielhaft zeigen Buendia et al., dass bei Endothelzellen durch Klotho-Exposition, die durch Urämie ausgelöste Seneszenz abgemildert werden kann. Klotho verhindert hier die durch Urämie getriggerte NF-kappaB Erhöhung (104). Guo et al zeigen ähnliches für durch Glucose gestresste Kardiomyozyten (106). Der Transkriptionsfaktor NrF2 spielt dabei eine wichtige Rolle. NrF2 ist ein Regulator zahlreicher wichtiger antioxidativer Enzyme (106). Klotho sorgt für eine Hochregulierung des Proteins und somit für eine höhere oxidative Resistenz und inhibiert zusätzlich den NF-KappaB-Weg (106, 117).

2.1.6 Klotho und Krebserkrankungen

Bei bestimmten Krebsarten zeigen sich häufig starke Methylierungsmuster an CpG-Inseln der Promoter-Region Klothos. Beispiele sind Zervix-CA, Kolorektales-CA, Magen-CA, Pancreas-CA und Brust-Krebs. Diese Befunde legen nahe, dass α -Klotho eine Funktion als Tumorsuppressor haben könnte (5, 12, 118-121).

Bei Brust-Krebs zeigt sich die Klotho-Expression reduziert im Vergleich zur gesunden Brust. Höhere Expressionsraten waren mit kleinerer Tumorgroße und kleineren Wachstumsraten (Ki-67) assoziiert (118).

Erklärt werden die Tumor-suppressiven Eigenschaften durch die pleiotrope Wirkung Klothos auf viele oben beschriebene biologische Wege wie IGF1, Wnt/ β -catenin, TGF- β 1 und FGF23, die auch in der Tumorbilogie eine wichtige Rolle bezüglich Zelldifferenzierung, Metastasierung und Proliferation spielen (5, 84, 120, 122).

IGF-1 ist für Proliferation von Krebszellen wichtig, Klotho hemmt diesen Pathway und könnte so tumorsuppressiv wirken (3, 79, 121). Im Pancreas-CA führen Klotho und KL1 sowohl in vivo als auch in vitro zu einem reduzierten Wachstum von Krebszellen und blockieren den IGF-1-Weg (121).

Ein weiteres Beispiel ist die Interaktion mit TGF- β (102). TGF- β ist ein wichtiger Bestandteil der für Metastasierung wichtigen Epithelialen-Zu-Mesenchymalen-Transition (EMT). Dabei verlieren epitheliale Krebszellen ihre Charakteristika und werden zu mesenchymalen Zellen, was für die Fähigkeit zur Migration und Proliferation wichtig ist. Diese Migration ist für Metastasierung wichtig (79, 122). Klotho inhibiert die Signaltransduktion von TGF- β und konnte in Mäusen auch die Metastasierung eindämmen (102).

2.1.7 Die Rolle Klothos im Gehirn

Klotho-defiziente kl/kl-Mäuse zeigen nicht nur erhebliche Alterserscheinungen, sondern auch ab Lebenswoche 7 kognitive Einschränkungen bezüglich des Lernens (16). Gleichzeitig fördert globale Klotho-Überexpression Kognition und neuronale Resilienz in gesunden und kranken Mäusen (17, 18).

Klotho wird im Gehirn hauptsächlich im Plexus Choroideus produziert (53). Es kommt in verschiedenen Regionen des Gehirns wie dem Hippocampus, Kortex, Cerebellum, Substantia Nigra und weiteren Orten vor (1, 53, 123) und wird von Neuronen und Oligodendrozyten synthetisiert (69, 70).

Außerdem kommt es im CSF als lösliche Form vor (40). Die Klotho-Spiegel sind im Blut-Plasma deutlich höher als im CSF (62). Die CSF-Spiegel scheinen keinem circadianen Rhythmus zu unterliegen (15). Der Klotho-Spiegel hängt vermutlich stark von der Gehirneigenen Produktion ab (62). Die Korrelation zwischen Serum und CSF ist zumindest umstritten, Kunert et al. sehen eine solche nicht (62), während Kundu et al. eine solche nahelegen (124).

Die Spiegel im CSF fallen im Menschen mit dem Alter (15), sowie die Klotho-Level in Gehirnen von Mäusen (125), Ratten und in der weißen Gehirnmasse in Rhesus-Affen abfallen (69).

Die lösliche Klotho-Spiegel im CSF sind bei psychiatrischen wie auch neurologischen Erkrankungen wie Multiple Sklerose und AD erniedrigt (15, 19). Bei älteren Menschen mit normaler Kognition ist die CSF-Konzentration im Vergleich zu jungen Menschen erniedrigt; noch niedriger ist sie bei Alzheimer-Patienten, v.a. bei Frauen. Außerdem korrelieren die CSF-Konzentrationen mit dem MMST-Score (15). In der prospektiven inCHIANTI-Studie können Shardell et al. feststellen, dass höhere Plasma Klotho-Konzentrationen mit niedrigerem Risiko für eine Verschlechterung im MMST korrelieren und auch mit einer generell kleineren Verschlechterung über 3 Jahre (126). Auch Kundu et al. zeigen eine Korrelation zwischen den Klotho-Spiegeln im CSF und eine prädiktive Kraft für Scores im MMST und des Clinical Dementia Rating unabhängig von Geschlecht und ApoE4 Status (124).

Klotho könnte neuroprotektive Wirkung über viele Wege vermitteln: Stimulation des antioxidativen Systems, Reduktion von Inflammation und Immunmodulation, sowie Optimierung der synaptischen Funktion durch NMDA-Rezeptoren, Modulation der adulten Neurogenese und Stärkung der Autophagie (11, 127). Klotho nimmt auch Einfluss auf nicht-neuronales, gliales Gewebe (69). Außerdem wirkt Klotho durch die Steigerung Clearance von Amyloid- β im Alzheimer -Modell (*siehe: Klotho und Alzheimer*).

Einen Hinweis auf den Zusammenhang von Klotho und **oxidativem Stress** geben Untersuchungen an MS-Patienten, da sich eine Korrelation zwischen den antioxidativen Kapazität des CSF und Klothospiegeln in MS-Patienten findet (19).

Klotho-defiziente kl/kl-Mäuse haben kognitive Einschränkungen bezüglich des Lernens (16). Es finden sich im Hippocampus ein erhöhtes Vorkommen der Produkte oxidativen Stresses: Lipid-Peroxide und oxidativer DNA-Schaden, sowie eine erhöhte Anzahl an apoptotischen neuronalen Zellen (16). Die Gabe des Antioxidants α -Tocopherol trägt dazu bei, die Mäuse vor dem oxidativen Stress zu schützen und somit die kognitiven Einschränkungen signifikant abzumildern (16).

Oxidativer Stress führt mittelbar auch zu einer Reaktion der Regulatoren der Apoptose, die Bcl-2-Proteine und deren funktionellen Verwandten. Bei kl/kl-Mäusen kommt es zu Verschiebung hin zu proapoptotischen Proteine im Hippocampus (16, 128).

Klotho aktiviert das antioxidative System peripher im Körper über verschiedene Wege wie Steigerung der Aktivierung des FoxO1-Transkriptionsfaktors und folgende Induktion der Mn-SOD, sowie bewirkt es die Hochregulierung des antioxidativen Transkriptionsfaktors Nrf2 (105, 106, 117). Klotho schützt so in vitro Zellen vor durch oxidativen Stress induzierter Apoptose und Seneszenz (129).

Dies könnte auch im Gehirn auf ähnliche Weise geschehen. Eine in vitro Studie an A β -

Oligomeren exponierten Neuroblastom-Zellen zeigt sich schützende Wirkung Klothos gegen die Neurotoxizität des A β s. Durch die Autoren wird eine überwiegend oxidativ-vermittelte Toxizität des oligomeren A β angenommen. Klotho vermittelt hier antioxidative Wirkung und die Reduktion der Inflammation (130). Dabei fand sich bei mit Klotho vorbehandelten Zellen eine Erhöhung des antioxidativen Transkriptionsfaktors Nrf2, eine erhöhte Aktivität der Superoxid-Dismutase und reduzierte Zeichen des oxidativ bedingten Zellschadens in Form von DNA-Fragmentierung und Caspase-3-Aktivität. Außerdem waren wichtige Inflammationsmarker (u.a. NF-kB und TNF α) reduziert (130). Auch Zeldich et al. demonstrieren, dass exogenes sowie endogenes Klotho hippocampale Neurone aus Ratten *in vitro* gegen die oxidativen Stressoren L-Glutamat und oligomeres A β schützt (131). In einer *in vivo* Studie von Zhou et al. induzieren die Autoren mittels einmaliger intraventrikulärer Injektion eines Lentivirus die Hochregulation Klothos in einem Modell der Seneszenz (7 Monate alte SAMP8-Mäuse) (132). Dabei verbessert die Überexpression Klothos 3 Monate später das Gedächtnis in dem Alterungsmodell, mildert den neuronalen Verlust und erhöht das synaptische Protein Synaptophysin. Der oxidative Stress ist gemindert, während Mn-SOD und Catalase hochreguliert sind. Klotho nimmt Einfluss auf den FoxO1 Transkriptionsfaktor, sodass antioxidative Pathways überwiegen (132).

Neben der antioxidativen Wirkung Klothos könnte auch die immunmodulierende Wirkung eine wichtige Rolle bei der assoziierten Neuroprotektion spielen. Zhu et al. verdeutlichen, die Bedeutung der Klotho-Produktion im Plexus Choroideus mit Effekten auf das zerebrale **Immunsystem** (133). Bei Klotho-Defizienz, isoliert im Plexus Choroideus, tritt Inflammation innerhalb dieser Struktur auf, sowie Aktivierung der angeborenen Immunantwort samt Einwanderung von peripheren Makrophagen und Steigerung von proinflammatorischen Zytokinen (133).

Dabei führt die Depletion von Klotho im Plexus Choroideus jedoch nicht nur zu einer Veränderung im Plexus selbst, sondern auch in Bezug auf mikrogliale Aktivierung im Hippocampus nach peripherer LPS-Gabe. Dies deutet auf einen modulierenden Effekt des Klothos im Plexus. Die Klothospiegel des Hippocampus verändern sich durch den die Klotho Defizienz im Plexus nicht, die Klotho-Level im Hirnparenchym sind also nicht von Plexus abhängig (133).

Globale Klotho-Überexpression fördert **Kognition und neuronale Resilienz** in gesunden und kranken Mäusen (17, 18).

Ein denkbarer Mechanismus ist die direkte oder indirekte Beeinflussung der synaptischen Funktionalität über NMDA-Rezeptoren (17, 18). Mäuse mit moderater globaler Überexpression zeigen besseres Hippocampus-abhängiges Lernen und Gedächtnis als wildtypische Mäuse unabhängig des Alters (17).

Außerdem schützt die Überexpression Klothos auch ein AD-Modell (hAPP) und bewahrt das Modell vor kognitiven Verfall trotz unverändert hoher Level an A β und Phospho-Tau (18). In den korrespondierenden Hippocampus-Homogenisaten der hAPP-Mäusen ist die zu erwartende Depletion von Glutamat-Rezeptor-Untereinheiten (GluN1 und GluN2A, beide wichtig für den NMDA-Glutamat-Rezeptor) durch Klotho-Überexpression vermindert. Klotho führt zusätzlich zu einer Erhöhung der synaptisch platzierten GluN2B, welches für eine langsamere Deaktivierung der NMDAs sorgt.

In Langzeitpotenzierungs (LTP)-Versuchen mit Gyrus Dentatus-Schnitten waren KL/hAPP Mäuse besser als reine hAPP-Mäuse (18). Hingegen führt die gleichzeitige Inhibition der GluN2B-Untereinheit zur Egalisierung der Klotho-Effekte auf die Kognition. Dies legt die Bedeutung der NMDA-vermittelten Effekte nahe (17).

Dennoch ist die Beeinflussung der synaptischen Plastizität in Form der LTP durch Klotho ist nicht ganz eindeutig und scheint eventuell regionsabhängig (18, 123). Klotho findet sich sowohl prä-als auch postsynaptisch im Hippocampus (123). Li et al. zeigen bei Klotho-Defizienz zuerst verstärkte LTP des Hippocampus und dann einen raschen Abfall im kurzen Leben von KL -/- Mäusen. Außerdem finden sie bei Klotho-überexprimierenden Mäusen eine eingeschränkte LTP (123).

Der Hippocampus nimmt für Lernen und Gedächtnis eine besondere Rolle im Gehirn ein, gleichzeitig ist er für Prozesse des Alterns und der Neurodegeneration empfindlich (134). Der Gyrus Dentatus des Hippocampus ist einer der wenigen Orte, an dem **adulte Neurogenese** zu beobachten ist. Sie nimmt während des Alterns stark ab und kann als Teil des Alterns des Gehirns gesehen werden. Dabei beeinflusst die Neurogenese im Hippocampus auch Lernen und Gedächtnis (134). Klotho-überexprimierende Mäuse zeigen dabei zumindest im frühen Erwachsenenalter verstärkte Neurogenese, während Klotho-defiziente Mäuse entweder eine schnellere Abnahme der Neurogenese (135) zeigen oder über Vitamin D-abhängige kompensatorische Signale wiederum erhöhte Neurogenese (136). Diese Befunde legen nahe, dass Klotho an der Stimulation der Proliferation und der Reifung der neuronalen Stammzellen beteiligt ist, sodass die Abnahme der Klotho-Konzentration im Körper für die Abnahme der neuronalen Stammzellen während des Alterns eine Rolle spielen könnte (135, 136). Auch in vitro Daten von humanen hippocampalen Progenitor-Zellen lassen sich durch die Überexpression/Knock-out Klothos in ihrer Differenzierung beeinflussen (116).

Autophagie ist ein wichtiger Weg für die Erhaltung zellulärer Homöostase. Bei dem Prozess kommt es zum Abbau und Entfernung von verschiedenen Substraten wie Proteinen, geschädigte Organellen und sogar Bakterien (127). Für Neuronen ist Autophagie besonders wichtig, da sie ein Leben lang intrazellulär Alterns-assoziierte Proteine akkumulieren. Diese führen zu zellulärem Stress und Zelltod. Defekte im Zuge der Autophagie finden sich in neurodegenerativen Erkrankungen wie AD (127). Autophagie spielt in der A β -Clearance eine wichtige Rolle (137). Klotho kann autophagische Prozesse stimulieren. Die Protein Kinase AMPK stimuliert in seiner Funktion als Energie-Sensor die Autophagie, während das Protein mTor die Autophagie inhibiert (127, 138). Klotho wirkt aktivierend auf den pro-autophagischen-AMPK-Weg (138) und inhibierend auf den Autophagie-inhibitorischen-Weg mTor (31). Zu dem wirkt Klotho inhibitorisch auf einer höheren Stufe des mTor-Weges durch die Inhibition des IGF1-Weges (3). Der ULK1/ATG13/FIP200-Komplex ist wichtig für die Autophagie-Initiation (127, 139). Klotho könnte bei dieser Komplexierung unterstützend wirken (139). Fehlt Klotho durch miRNA-Silencing in vitro, ist die Komplexierung inhibiert und das ATG13-Protein herunterreguliert. So könnte Klotho-Defizienz Apoptose statt Autophagie unter Stress begünstigen (139). Außerdem scheint Klotho in Verbindung mit der Beclin-1/BCL2-vermittelten Inhibition der Autophagie zu stehen (140). BCL2 inhibiert durch seine Interaktion mit Beclin-1 die Autophagie. Rekombinantes Klotho führt in vitro zu einer verminderten Interaktion Bcn1/BCL2-Interaktion (140). KL-defiziente Mäuse zeigen den „klassischen“-Altersphänotyp (1, 2), aber auch vermehrte Bcn1/BCL2-Interaktion und verminderte Autophagie (140). Stört man die Bcn1/BCL2-Interaktion durch eine gezielte Mutation im Bcn1, erhöht sich das Level an Autophagie und es kommt zu einem Rescue vor dem Altersphänotypen der kl/kl-Maus (140).

Neben Neuronen und Immunzellen werden auch die Glia des Gehirns, vor allem **Oligodendrozyten** und Astrozyten durch Klotho beeinflusst. Duce et al. zeigen transkriptionelle Unterschiede u.a. auch das Klotho-Gen betreffend in der weißen Gehirnmasse in alternden Rhesus-Affen (69, 70). Sowohl die mRNA als auch die Expression des Proteins sind linear mit ansteigendem Alter erniedrigt. Dabei bleibt das Klotho-Level in der grauen Substanz konstant (69, 70). Ein Grund für den Abfall der Klotho Expression könnte dabei die Hypermethylierung der GC-reichen Areale im Promoter sein, welche im Alter zunimmt und durch oxidativen Stress getriggert werden könnte (70). Klotho spielt außerdem eine Rolle in der Oligodendrozyten-Reifung und der Entwicklung der Myelinisierung des ZNS (141). So ist die Anzahl der Oligodendrozyten in Klotho-Knock-Out Mäusen erniedrigt und zeigen schlechtere Myelinisierung im Bereich des Corpus Callosum und des Nervus Opticus. Außerdem demonstrieren in vitro und in vivo Studien bei Klotho-Anwesenheit die Ausbildung von Reifemarkern in Oligodendrozyten und die Expression von wichtigen Myelin-Proteinen, die für die Integrität und Funktion der Myelinscheide wichtig sind (141).

Die häufigste Form der Multiplen Sklerose, die schubförmige-remittierende-MS,

kennzeichnet sich durch Schübe von Demyelinisierung und folgender Re-Myelinisierung, einhergehend mit vollständigem oder partiellem Rückgang der Symptome. In einem Multiple Sklerose-Modell zeigen Klotho-überexprimierende Mäusen nach induzierter Demyelinisierung mittels Cuprizone eine deutliche bessere spontan Re-Myelinisierung (142). In MS-Patienten findet sich eine reduzierte Klotho-Konzentration. Zudem korreliert der Spiegel negativ mit dem Ausmaß der Behinderung gemessen am EDSS (Expanded-Disability-Status-Scale) (19).

Eine weitere Art der Glia, die **Astroglia**, wird in vitro ebenfalls durch Klotho beeinflusst (143). Klotho erhöht in der Astroglia die aerobe Glykolyse, wodurch es zur Steigerung der Ausschüttung von Stoffwechselfsubstraten kommt. Diese könnten wiederum von Neuronen genutzt werden (143).

Da sowohl globale Überexpression und Knock-out Klothos Auswirkungen auf die Kognition implizieren (16, 17), aber auch die ZNS-bezogene Überexpression bzw. Knock-out mit Folgen für die Kognition einhergehen (133, 144), ist die Frage über den Zusammenhang von **peripherem** (v.a. aus der Niere kommendem) **soluble-Klotho und Effekten auf das ZNS** bedeutend.

Leon et al. zeigen, dass die intraperitoneale Zuführung des rekombinanten Klotho-Fragment (α KL-F) Kognition und neuronale Resilienz in unterschiedlichen Mausmodellen fördert, ohne im CSF nachweisbar zu sein und ohne im Hippocampus die Klotho-Spiegel anzuheben (32). Das Fragment ähnelt dem Maus-sekretiertem soluble-Klotho. Auch Hu et al. können peripher-appliziertes Klotho nicht im Gehirn nachweisen (57).

Wird peripher appliziertes Klotho jedoch im CSF nicht nachgewiesen, ergibt sich die These, dass die Klotho-Konzentration im CSF stark von der Gehirn-eigenen Produktion abhängig ist. Neben diesen empirischen Daten gibt es auch theoretische Überlegungen, warum Klotho nicht die Blut-Hirn-Schranke überschreitet.

Kunert et al. führen an, dass das Protein zu groß für passive Diffusion über die Blut-Hirn-Schranke ist (62). Die Autoren dieser Studie legen den Stokes-Einstein-Radius Klothos, sowie dessen zu erwartendes Plasma/CSF-Verhältnis und das beobachtete Plasma/CSF-Verhältnis Klothos zu Grunde. Sie berechneten für die nachgewiesenen soluble-Klotho und KL1 jeweils einen durch intrathekalen Synthese zu attributierbaren Anteil von je 98,49% und 97,74% (62).

Andererseits weisen Hu et al. in renalen Tubuluszellen einen unidirektionalen Transport von der basalen zur apikalen Seite in vitro nach, ohne jedoch einen verantwortlichen Transporter benennen zu können. Dies deutet jedoch die Möglichkeit eines aktiven Transports über die Blut-Hirn-Schranke an (57).

Nichtsdestotrotz legen die Befunde von Leon et al. und Hu et al. nahe, dass peripheres Klotho auf zentralnervöse Prozesse Einfluss nimmt. Denn Leon et al. zeigen eine Förderung der Kognition und neuronalen Resilienz durch peripher applizierte α KL-F in jungen Mäusen, alternden Mäusen und einem α -Synuclein-Parkinson-Modell (32).

Die Autoren schreiben diesen Effekt einer gesteigerten Glutamat-Rezeptor-Signaling und damit verbundener verbesserter LTP im Hippocampus zu. Dabei ähneln die Befunde denen von Dubal et al., wo Klotho im ganzen Körper überexprimiert ist (17, 32). Dabei ist die Untereinheit GluN2B für die Verbesserung der Kognition wichtig, die durch Klotho in ihrer Aktivität gesteigert wird und dazu beiträgt, dass der NMDA-Rezeptor länger aktiv bleibt. Blockiert man die Untereinheit spezifisch, werden die durch α -Klotho-F vermittelten Effekte auf die Kognition egalisiert (32). NMDA-Dysfunktion ist mit Altern und Neurodegeneration wie zum Beispiel bei Morbus Alzheimer assoziiert (145).

Wie peripheres Klotho auf das Glutamat-Rezeptor-Signaling-Einfluss nehmen soll, ohne die BHS zu überschreiten, ist unklar.

Auch Gupta et al. untersuchen die neuroprotektive Kompetenz des peripheren Klothos und erweitern ihre Betrachtung um die **Untereinheit KL1**. Sie untersuchen die Wirkung Klothos und von KL1 in Bezug auf ihre Auswirkungen auf den hippocampalen Metabolismus im Mausmodell. Exogen appliziertes Klotho und KL1 führen zu einer Anregung des hippocampalen Metabolismus. Außerdem überschneiden sich die metabolischen Muster zu

55% zwischen KL und KL1, was darauf schließen lässt das KL1 die Mehrheit der metabolischen Veränderungen zu verantworten hat (33).

KL1 ist ebenfalls fähig die LTP in Mäuse-Gehirnschnitten des CA1 Segments de Hippocampus zu verbessern und führt zu vergleichbaren Ergebnissen in kognitiven Tests wie Klotho (33).

KL1 hat auch in weiteren Zellsystemen vergleichbare Wirkung wie full-length Klotho. KL1 reduziert in vivo Wachstum von Brustkrebs-Zellen und Pancreascarcinomzellen und blockiert in beiden Systemen den IGF-1Weg (146). Die Autoren geben an, dass KL1 nicht den FGF23-Weg aktivieren würde. Dies führe zu einem besseren Sicherheitsprofil bei etwaigem therapeutischem Einsatz, wenn sich so das Wirkungsprofil verschmälere (121, 146).

2.1.8 Genetische Polymorphismen Klothos im Menschen

Bei der vielfältigen, protektiven Wirkung Klothos in vitro und in vivo, sowie der Korrelation von niedrigen Klotho-Spiegeln beim Altern und krankhaften Zuständen, ist genetische Disposition und prädiktive Kraft genetischer Varianten Klothos für Krankheiten, Kognition und Langlebigkeit interessant.

Der humane Klotho-**Polymorphismus G395A** ist im Promoter lokalisiert und beeinflusst vermutlich die Transkriptionsfaktoren-Bindungsaffinität (147). Der Genotyp GG repräsentiert den Wildtypen, während GA und AA die mutierten Allele sind (148). Die Allele GG, GA und AA sind dabei mit unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert. Das Allel-A ist in einer japanischen Population mit essentieller Hypertonie (60) und kardioembolischem Schlaganfall bei Koreanischen Frauen assoziiert (149), während G das Risiko für Arthrose bei Kaukasierinnen erhöht (150). Hingegen war in einer koreanischen Population höherer systolischer Blutdruck mit dem A-Allel assoziiert, diese widersprüchlichen Ergebnisse in Bezug auf Blutdruck unterstreichen die Bedeutung größer angelegter Kohorten bei zukünftigen Studien (151).

Die Rolle des Polymorphismus bezogen auf Kognition ist noch nicht abschließend geklärt. In einer japanischen Population haben Menschen mit G395A unter 60 Jahren keinen signifikanten kognitiven Vorteil, aber über 60-79 Jahren haben sie einen leicht höheren IQ und MMST-Score (152). Menschen einer Han-Chinesischen Community über 90 Jahren zeigen mit dem Polymorphismus weniger kognitive Verschlechterung im MMST (148). Die Autoren spekulieren darüber, dass der Unterschied durch den Polymorphismus erst im Alter zum Tragen kommen könnte (148).

Ein weiterer viel diskutierter Polymorphismus ist sog. **KL-VS Allel** (153). Dieses Allel besteht aus sechs kombinierten Mutationen, wobei nur drei davon in Exons vorkommen und nur zwei davon - F352 und C370S- zu einem Aminosäuren-Austausch führen (153, 154). Die Genfrequenz liegt bei 0,16 in der globalen Population und tritt heterozygot bei ca. 20-25% in europäischen Populationen auf (153, 154). Tritt es homozygot auf, ist es mit erniedrigter Lebensspanne bei verschiedenen Populationen assoziiert. Heterozygotie kann abhängig von der Kohorte sogar mit erhöhter Lebensspanne assoziiert sein (153).

Die Autoren weisen darauf hin, dass es weitere Beispiele für eine solche Konstellation mit Vorteilen bei Heterozygotie und Nachteilen bei Homozygotie in der Humangenetik gibt, wie Hämoglobin S bei Sichelzellanämie und Δ -F508 beim CFTR-Gen bei Mukoviszidose. Die Mutationen seien vermutlich durch Selektionsdruck von Umweltfaktoren entstanden – wie bei den angeführten Beispielen die Malaria und Cholera (153).

Weitere Studien in anderen Populationen bestätigen den Vorteil der Heterozygotie und den Nachteil durch Homozygotie in Bezug auf Langlebigkeit und erweitern das Spektrum in Bezug auf kardiovaskuläre Gesundheit, Schlaganfall und Kognition (154, 155).

Eine weitere Studie untersucht den Zusammenhang des Klotho-Polymorphismus und das Abschneiden in Intelligenztests im Kindesalter und mittleren Erwachsenenalter oder hohem Erwachsenenalter. Dabei korreliert das gemeinsame Vorliegen höherer Intelligenz und des KL-VS-Polymorphismus nicht in der Gruppe „Testung im Kindesalter und mittleres Erwachsenenalter“, dafür jedoch in der Gruppe „Testung im Kindesalter und hohes Erwachsenenalter“ (155).

Des Weiteren stellen Yokohama et al. 2015 fest, dass KL-VS-Heterozygotie mit höherem Volumen des rechten dorsolateralen präfrontalen Kortex assoziiert ist. Der Bereich des Gehirns ist wichtig für die exekutive Funktion und steht mit besserer Kognition in Zusammenhang (156). In einer exploratorischen sekundären Analyse untersuchen sie die Effekte der Homozygotie auf das Volumen und die Kognition. Dabei zeichnet sich ein Trend zum kleineren Volumen und ein Hinweis auf schlechtere Kognition (156).

Meta-Analysen von Belloy et al. machen jedoch Abhängigkeiten vom ApoE4-Polymorphismus und Alter aufmerksam. Hier geht eine Heterozygotie des KL-VS-Polymorphismus mit einem reduzierten Risiko für ein Amyloid-positiven PET-Scan bei kognitiv-normalen ApoE4-Trägern im Alter von 60-80 Jahren und mit einem reduzierten AD-Risiko einher (157, 158). ApoE4 ist der wichtigste genetische Risikofaktor für Late-Onset-AD (Erklärung siehe unten). Sind die die Probanden ApoE4-negativ, findet sich kein Hinweis auf Protektion (157, 158).

Eine weitere Studie zeigt, dass der Heterozygotie-Status mit niedrigeren Tau-Leveln und auch mit besserer Kognition in einer mittelalten Kohorte einhergeht (159). Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine ApoE4-unabhängigen Einfluss. Andere Autoren sehen auch unabhängig von Alter, Geschlecht und ApoE4-Status bei KL-VS-Heterozygotie in einer kaukasischen Kohorte eine Assoziation zur besseren Kognition und auch höheren Klotho Serum-Spiegeln (17).

Jedoch gibt es auch der These widerläufige Befunde, KL-VS-Heterozygotie sei mit besser Kognition und Neuroprotektion assoziiert. Almeida et al. bringen den KL-VS-Polymorphismus mit der Entwicklung einer Demenz in Verbindung (160). Dabei nehmen sie die Betrachtung eines Registers für klinische Diagnosen ohne gezielte studienärztliche Untersuchung vor. Nicht-Träger haben das Niedrigste, Heterozygote ein höheres und Homozygote das höchste Risiko für eine Demenz in einer mehr als 10-jährigen Betrachtung von überwiegend kaukasischen Männern älter 71 Jahren (160). Sie räumen ein, dass für die die Evaluation der Homozygotie aufgrund der niedrigen Probandenzahl größere Kohorten nötig seien. Dennoch stehen diese Ergebnisse in Kontrast zu der vorher positiven Konnotation der Heterozygotie des KL-VS-Polymorphismus. Eine weitere Studie aus Dänemark sieht ähnliche Ergebnisse. KL-VS-Träger zeigen schlechtere kognitive Performance und einen Trend zur größeren kognitiven Verschlechterung (161).

Wie sich KL-VS neben den epidemiologischen Daten biologisch-funktionell von dem Wildtyp-Klotho unterscheidet ist nur wenig beleuchtet.

Arkin et al. vergleichen 2002 den Einfluss der Mutationen auf das extrazelluläre KL1. Die Mutation V352 reduziert extrazelluläres KL1 um das 6-fache in vitro. Hingegen erhöht S370 es 2,9-fach. Die Doppel-Mutation zeigt einen Anstieg des extrazellulären KL1 von 1,6 (153). Die Einzelmutationen kommen beim Menschen nicht ungekoppelt vor.

Dubal et al. fanden bei Heterozygotie des KL-VS-Allels erhöhte Klotho-Spiegel im Menschen (17).

Weitere Untersuchungen am full-length-VS-Klotho zeigen, dass die Aminosäureaustausche allein (also die Doppelmutation VS kombiniert, ohne die weiteren vier SNPs) in vitro keine wesentlichen veränderte Eigenschaften bei der Prozessierung (Schneiden durch Sekretasen und Halbwertszeit) aufzeigen. Dafür scheinen sie aber weniger zu dimerisieren und zu einem verbesserten FGF-Signaling beitragen (162). Die einzelnen Mutation V oder S führen zu vergleichbaren Effekten wie bei Arking et al. (153, 162).

2.1.9 Klotho und Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer ist mit niedrigeren Klotho-CSF-Spiegeln assoziiert und diese wiederum korrelieren mit dem schlechteren Abschneiden in kognitiven Tests (15, 124). Höhere Spiegel sind mit geringerem Risiko für die Verschlechterung im MMST verbunden (126). Zudem finden sich Assoziationen zwischen dem Vorliegen genetischer Polymorphismen (KL-VS) und dem Vorhandensein für die AD-Pathologie assoziierter Marker und auch dem AD-Risiko selbst

(157, 158). Andere Studien zeigen mögliche Zusammenhänge des KL-VS-Polymorphismus mit schlechterer Kognition und Demenz (160). Diese Daten aus dem Menschen deuten auf eine Verbindung zwischen Klotho und AD.

Die α -, β - und γ -Sekretasen sind mutmaßlich entscheidend an der vermuteten Pathophysiologie des Morbus Alzheimer (weitere Erklärung siehe unten) beteiligt. Die Prozessierung des Proteins APP, an deren Ende das mit Neurotoxizität assoziierte Peptid A β steht, wird u.a. durch eben diese Enzyme durchgeführt (163). Auch Klotho ist Substrat dieser Sekretasen, wie es für Transmembranproteine häufig ist (43, 44, 46).

Ein Beispiel für das Zusammenspiel von Sekretasen, Klotho und AD demonstrieren Kuang et al. mit **Ligustilide**, einem Inhaltsstoff der medizinischen Pflanzen *Radix angelicae sinensis* und *Ligusticum chuanxiong*.

Ligustilide ist in einem Maus-Modell für AD protektiv. Es erhöht sowohl die Expression und Aktivität von ADAM 10 als auch die Expression und Prozessierung Klothos (30, 31). In der Studie werden 8,5 Monate alte APP/PS1-Mäuse für 14 Wochen mit Ligustilide intragastral supplementiert. Die Ligustilide-Gabe zeigt sich protektiv bezogen auf Gedächtnis, neuronalem Verlust und Neuropathologie, sowie A β -Oligomer-Belastung. Mechanistisch machen die Autoren folgende Beobachtungen: ADAM10-Inhibition führt zu einer Reduktion der Klotho-Level in vitro, was die Bedeutung der Prozessierung Klothos durch ADAM10 für die Ligustilide-Wirkung andeutet. Andererseits führt der in vitro knock-down von Klotho zur Steigerung des mTor-Weges, dem negativen Regulator der Autophagie. Dies ist mit einer schlechteren Clearance durch inhibierte Autophagie verbunden (31, 127). Ligustilide ist bei Präsenz Klothos mit der Steigerung der Autophagie assoziiert. Die Aktivitäts- und Expressionssteigerung von ADAM10 begünstigt den neuroprotektiven non-amyloiden Weg (30, 31).

Die Überschneidung Klothos als Substrat der α -, β - und γ -Sekretase hat jedoch die Implikation, dass es sich bei BACE1 und den γ -Sekretasen um potentielle Targets der Alzheimer-Behandlung handelt und eventuelle Nebenwirkungen durch die veränderte Biologie Klothos entstehen könnten (44).

Eine in vivo-Studie von Zeng et al. beleuchtet die Klotho-Wirkung auf ein AD-Modell ohne direkte Einwirkung auf die Sekretasen und rückt die Autophagie in den Vordergrund. Sie zeigen die Verbesserung der Pathologie und der kognitiven Defizite in einem AD-Modell (APP/Presenilin1-transgene Maus) durch die lentivirale-vermittelte Überexpression Klothos 3 Monate nach Applikation (29).

Auch hier weisen sie induzierte Autophagie nach und die Inhibition von mTor. APP/Presenilin1 Mäuse ohne Klotho-Überexpression zeigen hingegen Zeichen der Autophagie-Dysfunktion (29, 127). In vitro stimulierte Klotho den Abbau von A β 1-42 mittels Autophagie in muriner Mikroglia (29).

Zhao et al. zeigen die Verbesserung der A β -Clearance durch lentiviral-erhöhte Klotho-Expression in 13-Monate-alten APP/PS1-Mäusen unter besonderer Betrachtung der Rolle der Mikroglia (28). Sie finden eine reduzierte Verschlechterung der Kognition, sowie eine reduzierte A β -Belastung und einen reduzierten Synapsen- und neuronalen Verlust. Mikroglia-Aktivierung und Akkumulation ist Teil der charakteristischen Pathologie von AD. Mikrogliale Aufgaben sind vielfältig, eine davon ist die Beteiligung an der Elimination sterbender Zellen, fehlgefalteter Proteine, zellulären Überresten (Debris). Mikroglia liegt ruhend oder aktiviert vor. Es gibt im aktivierten Stadium den M1-proinflammatorischen-Phänotyp und den M2-antiinflammatorischen-Phänotyp (127). Der M1-Typ ist mit Neuroinflammation, Neurotoxizität, A β -Ablagerung und Neurodegeneration assoziiert. M2 hingegen ist mit Neuroprotektion, neurotrophen Faktoren und antiinflammatorischen Zytokinen, die Phagozytose und Clearance wie von A β verbunden (127). Klotho ist mit dem protektiven M2-Typ assoziiert, was die Mikroglia-vermittelte Clearance stärken könnte (28).

Klotho inhibiert den NLRP3/Caspase-1-Weg, der bedeutsam für Neuroinflammation ist (28). A β -Aggregation ist mit in der Pathologie des Morbus Alzheimer mit sog. NLRP3-Inflammasomen assoziiert (28, 127). Inflammasome sind Proteinkomplexe und NLRP3 ist Teil dieser. Es kommt über den NLRP3/Caspase-1-Weg zu IL-1 β -Zytokin Ausschüttung. IL-1 β ist ein bedeutender Regulator der Neuroinflammation. Neben dem Vorantreiben der Inflammation kommt es zu Steigerung der APP-Produktion mit folgender Steigerung der A β -Belastung, sowie der gesteigerten Transformation von M2-Mikroglia zu M1-Mikroglia, die zur Ausweitung der Entzündungsreaktion führt (127).

NLRP3-Defizienz unterdrückt Caspase-1 und IL-1 β -Hochregulierung (127). Klotho inhibiert den NLRP3/Caspase-1-Weg und führt somit zu einer Reduktion der Inflammation und Steigerung der Autophagie durch Mikroglia (28).

Klotho-Überexpression beeinflusst bei Zhao et al. zudem die A β -Transporter-Expression in vivo, die für die Clearance wichtig sind. Klotho-Überexpression führt zu einer Hochregulation der Transporter P-gp und LRP1- was den Efflux A β s aus dem Gehirn stärkt - und zu einer Reduktion von ABCA1 und RAGE- was den Influx ins Gehirn schwächt. Dieser Effekt findet sich im Kortex, Plexus Choroideus und Endothel-Zellen (28).

Zusätzlich untersuchen sie die Effekt von Klotho auf den A β -Transport in vitro in primären menschlichen Plexus Choroideus Epithelzellen (HCPEpiCs, primary human choroid plexus epithelial cells) unter den Bedingungen eines Klotho-Knockdowns (28). Der Knock-Down führt zu erheblicher Einschränkung der Clearance Fähigkeit in HCPEpiCs, gleichzeitig wird eine Reduktion der mRNA-Level von P-gp und LRP1, sowie eine Steigerung der mRNA-Level von ABCA1 und RAGE (28). Klotho könnte so zur Steigerung der Effektivität der Clearance beitragen.

2.1.10 Therapie mit Klotho

Da Krankheit und Altern mit niedrigen Klotho-Spiegel assoziiert ist und höhere Spiegel mit Verbesserungen des Zustands, ist es naheliegend die Spiegel erhöhen zu wollen, um Patienten zu helfen. Dazu gibt es verschiedene denkbare Wege. Einerseits könnte man Klotho exogen zuführen, andererseits die endogene Expression erhöhen. Dazu könnte man bereits zugelassene Medikamente, freiverkäufliche Supplemente und/oder Lifestyle-Maßnahmen nutzen (4). Weitere Möglichkeiten sind kleine Moleküle, die Verfügbarkeit Klothos steigern (164) oder mittels Gen-Therapie die Expression entweder gezielt organotrop oder global im Körper erhöhen. Ein mögliches Langzeitziel könnte die Beeinflussung des Alterns des Organismus sein, näher liegen klinische Studien bezogen auf mit dem Alter assoziierte Krankheiten (4).

Bei bereits etablierten Therapien, Supplementationen und Lifestyle-Maßnahmen ist kritisch zu hinterfragen, ob Klotho selbst wirkt -zumindest partiell- oder Klotho als Nebenprodukt der verbesserten Umstände wieder ansteigt. Ebenso ist unklar, ob die Steigerung der Klotho-Spiegel bei Patienten zu Verbesserung klinischer Endpunkte wie verbesserte Kognition hinreicht.

Ein Beispiel für eine klinisch etablierte Therapie, die gleichzeitig mit einer Anhebung der Klotho-Level assoziiert sind, sind die **RAAS-Inhibitoren**. Losartan und auch Valsartan (AT1-Rezeptor-Blocker) erhöhen in Diabetes mellitus Typ2 Patienten mit diabetischer Nephropathie die Klotho Spiegel (165, 166). Angiotensin II steht als Effektor des aktivierten RAAS-Systems und gilt als starker Inhibitor der Klotho-Expression (74).

Auch Kombinationstherapie mit **Statinen** (hier Fluvastatin) zeigt in Verbindung mit Losartan eine Anhebung der Klotho-Spiegel, die alleinige Therapie veränderte die Klotho-Spiegel jeweils nicht (167). Jedoch zeigen sowohl in vitro als in vivo Studien, dass Klotho-mRNA-Level durch Statine positiv beeinflusst werden kann (76, 77).

Das antidiabetische Medikament **Metformin** erhöht Klotho-Level im Serum und der Niere in diabetischen Mäusen und reduziert in vitro mTor-Level. Die Blockade der Klotho Expression wiederum führt zu einem Verlust der Metforminwirkung auf mTor, was auf Verbindung

zwischen der Metforminwirkung und Klotho hindeutet. Der stimulierte mTor-Weg wird als Teil der Pathophysiologie der diabetischen Nephropathie gesehen (168).

Ebenso gibt es pflanzliche Pharmazeutika wie **Ligustilide**, die in Tierexperimenten Steigerung der Klotho-Spiegel und Milderung der Gedächtnisstörung, sowie pathologischen Veränderungen bei alternden Mäusen und APP/PS1-Mäusen zeigen können (30, 31).

Neben Pharmazeutika können auch **Lifestyle-Maßnahmen** mit Erhöhung der Klotho-Spiegel assoziiert sein.

Vermehrte **körperliche Aktivität** und Fitness ist mit höheren Klotho-Leveln in einer mittelalten Kohorte assoziiert (169). Außerdem zeigt sich in einer RCT mit 74 Probanden, die über 4 Wochen verschiedene Trainingsformen vergleicht, einen Anstieg der Klotho-Spiegel im Vergleich zu Kontrollgruppe (170). Eine kleine Studie, zeigt einen temporären Anstieg Klotho durch bereits eine Trainingseinheit mit schnellem anschließendem Abfall aufs Basisniveau (171). Eine weitere kleine Studie mit 23 AD gefährdeten Probanden (durch Alter, familiären Hintergrund) zeigt jedoch keine Veränderung der Klotho-Spiegel durch körperliche Aktivität nach 26 Wochen (172).

Curcumin ist ein Beispiel für einen **ernährungsbezogenen Einfluss** auf Klotho. Es ist ein Inhaltsstoff in Kurkuma, das häufig Bestandteil von Currypulvern ist. Curcumin kann in einem Modell für renale Fibrose - induziert durch Cyclosporin A - in vivo Klotho-abhängig protektiv wirken (173). Curcumin verhindert in vitro die Hypermethylierung im Klotho-Promoter und folglich dessen Suppression. Die weiterhin höheren Klotho-Spiegel sind mit einer antifibrotischen Wirkung über die Inhibition des TGF-beta-Weges assoziiert (173). Neben Supplementation von Stoffen wie Curcumin könnte auch **intermittierendes Fasten** hilfreich sein, um Klotho-Spiegel zu erhöhen, wie ein Mausmodell demonstriert (116).

Als weiterer Lifestyle-assozierte Maßnahme ist auch **Schlaf** und dessen Auswirkungen auf die Klotho-Level interessant. In einer Studie mit 74 Probanden wurde die Assoziation von objektiver und subjektiver Schlafqualität mit den Klothospiegeln betrachtet. Hierbei zeigte sich insbesondere eine Assoziation zu subjektiv als gut empfundenen Schlaf und auch gab es Hinweise auf bessere objektive Schlafqualität und kürzere Einschlafzeit (174).

Neben den oben genannten Strategien können auch Klotho-spezifische Intervention in Betracht gezogen werden.

Einen möglichen Ansatz **kleine Moleküle** zu identifizieren, die Promoter-Aktivität bei der Genexpression zu steigern, zeigen Abraham et al. im Rahmen eines groß angelegten Substanzscreening. Mittels eines sog. „high-throughput-Screen“-Verfahrens, bei dem 150.000 Substanzen getestet wurden, selektierten Abraham et al. auf die Fähigkeit den Promoter und die Expression in vitro zu stimulieren (164). Die Substanzen wurden nicht veröffentlicht.

Die Niere ist der Hauptproduzent des s-Klotho in der Maus und dem Menschen (57-59). Die Anhebung der Klotho-Spiegel könnte eine Strategie in der Therapie von Nierenerkrankungen wie der chronischen Niereninsuffizienz (6, 112). Hu et al. demonstrieren durch Gabe von exogenem Klotho in einem Modell der chronischen Niereninsuffizienz die Verbesserung der Nierenfunktion und Histologie und des assoziierten kardialen Remodelings (175). Auch eine prophylaktische Gabe wäre interessant. Rekombinantes-Klotho wird von Hu et al. zur Prävention der Progression eines Post-akuten-Nierenschadens zum chronischen Schaden verwendet. In der Studie reduziert eine kurze viertägige Klotho-Gabe in zeitlichem Zusammenhang zur Schädigung das Progressionsrisiko zum chronischen Nierenschaden (175). Die Klotho-Spiegel bleiben auch nach Absetzen der exogenen Klotho-Gabe durch Steigerung der endogenen Produktion höher als in der Vergleichsgruppe (175). Gleichzeitig reduziert Klotho-Gabe auch das Entwickeln einer urämischen Kardiomyopathie im gleichen Modell (175).

Neyra et al. fassen in ihrem Review die Möglichkeiten Klothos in der **nephrologischen Therapie** zusammen, die sich durch Studien an Mäusen ergaben: Multimodal synthetisiertes exogenes/endogenes Klotho könnte in Rahmen der Therapie der akuten Niereninsuffizienz

die Prävention, die Rehabilitation des Akutstadiums therapeutisch unterstützen und die Transition in die chronische Form verhindern und Progression dieser Erkrankung abmildern (6).

Bis heute gibt es noch keine Therapie mit Klotho im Menschen für **neurodegenerative Erkrankungen** (11). Studien in Mäusen zeigen durch die Überexpression Klothos, eine Anhebung der Lebensspanne durch Überexpression (3, 17), der Kognition in jungen wie alten Mäusen (17), sowie Verbesserungen der Klinik in AD-Modellen (18, 28). Aber auch die periphere Gabe von Klotho führt ohne die Überschreitung der BHS zur Verbesserung der Kognition und motorischer Symptome bei einem Parkinson-Modell, sowie der Verbesserung der Kognition in gesunden jungen und alten Mäusen (32). Auch eine Adeno-Virus-gestützte Gen-Therapie zeigt sich effektiv in Mäusen (144).

Adenoviren besitzen ein gutes Sicherheitsprofil durch die Nicht-Integrierung des Genoms in das Patientenerbgut sowie die niedrige eigene Immunogenität. Außerdem haben sie die Fähigkeit eine große Zahl an Zellen (auch Neuronen) zu infizieren und eine langfristige Genexpression zu gewährleisten (176, 177). Zugelassen ist die Therapie bereits u.a. bei der Behandlung der SCID (severe combined immunodeficiency) und ist noch bei vielen anderen Krankheiten denkbar und/oder schon in klinischen Studien wie zum Beispiel bei monogenetischen Stoffwechselkrankheiten, neuromuskulären Erkrankungen wie der muskulären Dystrophie Typ Duchenne oder der spinalen Muskelatrophie oder an pathophysiologisch komplexeren Krankheiten wie Morbus Alzheimer (176, 177). Es gab bereits Studien an Betroffenen mit AD. Dabei wurde der Nervous Growth Factor (NGF) überexprimiert (178). Perspektivisch sind eventuell auch andere gentherapeutische Vektoren im Blickfeld, da auch lentiviral-gestützte Systeme in der Maus gute Ergebnisse zeigen (28, 29, 132).

Neben der weiteren Exploration des Modus der Klotho-Spiegelerhöhung wird vertiefende Forschung und Verständnis gebraucht werden, um für die jeweilige Indikation ein geeignetes **therapeutisches Fenster** zu identifizieren (4).

Sahu et al. demonstrieren, dass nach einer Muskelverletzung eine exogene Klotho-Gabe die Regeneration des Muskels in alten Mäusen gefördert wird (71). Dabei war der Zeitpunkt sehr wichtig für den therapeutischen Effekt. Die spätere Gabe am 3-5. Tag nach Verletzung war effektiver als die Gabe an Tag 1-3. Nach Verletzungen werden Muskelstammzellen aktiviert. Die Regenerationsfähigkeit des Muskels nimmt mit dem Altern ab und die Muskelstammzellen zeigen senescente Eigenschaften (71). Junge Muskeln sind also älteren bei der Regeneration überlegen. Bei jungen Muskeln von Mäusen kommt es nach Schädigung zur De-Methylierung der CpG-Inseln Klothos in den Stammzellen und somit zu einer Steigerung der Expression. Klotho scheint an der Aktivierung von Muskelstammzellen und an deren Proliferation und Reifung beteiligt zu sein (71). Bei Muskeln von älteren Mäusen bleibt dieser Effekt aus. Nimmt man einen knock-down Klothos in den Muskeln der jungen vor, egalisieren sich die besseren regenerativen Fähigkeiten (71).

Auch altersbezogene Vorteile durch den KL-VS-Polymorphismus könnten auf therapeutische Fenster hinweisen, innerhalb Klotho positive Effekte haben kann. So haben Heterozygote eine höhere Wahrscheinlichkeit über 70 Jahre alt zu werden, über einem Lebensalter von 90-Jahren zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied des Vorkommens bezüglich des Polymorphismus (179). Im mittleren Erwachsenenalter gibt es keine Assoziation mit höherer Intelligenz, im höheren Erwachsenenalter schon (155).

Auch bei der **Auswahl der Patienten** für die Therapie könnte zu beachten sein, dass bei einer Steigerung der endogenen Klotho-Expression unterschiedliche Effekte zu erwarten sein könnten. Neben den häufig vorkommenden SNPs und Varianten fanden Cheikhi et al. in der Analyse von 123.126 Exomen und 15.496 vollständigen Genomen, 1.287 bzw. 1.508 Klotho Varianten. Die Autoren geben zu bedenken, dass diese Mutationen Unterschiede in Expressionsleveln und Funktionalität bedingen könnten (4). Dies wiederum könnte auch auf

die Auswahl von geeigneten Personen Einfluss haben, die von einer Klotho-Gabe profitieren könnten (4).

Fraglich sind potentielle **Nebenwirkungen** einer Klotho-Therapie. Zum Beispiel könnten im Menschen Probleme wie die Insulin-Resistenz zum Tragen kommen (3). Zudem stammen die Daten zu Behandlung auf Klotho-Basis hauptsächlich aus Nagetieren (11). Daten zu Sicherheit von Klotho-Gabe in Mäusen über einen längeren Zeitraum (5 Wochen) zeigen Abramowitz et al. Sowohl fl-Klotho als auch KL1 führen zu keiner Veränderung der Leberwerte und des Blutbilds. Dafür sind jedoch leichte Veränderungen Cholesterin und Phosphat-Spiegel, und eine leichte Hyperglykämie bei der Behandlung mit fl-Klotho, aber nicht mit KL1 festzustellen (121).

2.2 Morbus Alzheimer

2.2.1 Bedeutung für Patienten, Umfeld und Gesellschaft

Demenzen bezeichnen Krankheiten, deren chronischer Verlauf sich durch eine Abnahme kognitiver Funktionen und der Alltagsfähigkeiten äußern (180). Dies umfasst Gedächtniseinschränkungen, Rückgang der Fähigkeit der zeitlich-örtlichen Orientierung und Kommunikation, sowie alle anderen höheren kortikalen Funktionen wie Rechnen, Lernen und auch Veränderungen der Persönlichkeit und des Sozialverhaltens (180). Demenz sind eine wichtige Ursache für Behinderung, Abhängigkeit und Mortalität (24).

Es wird geschätzt das 2019 zwischen ca. 50 und 65 Millionen Menschen weltweit an Demenzen erkrankt waren; 2050 zeigen **Projektionen**, könnten es 152 Millionen sein (21). In Europa könnten 14,1 Millionen Menschen heute (2019) zu 25 Millionen (2050) betroffen sein. In Deutschland leiden 1,8 Millionen Menschen an einer Demenz und 2050 könnten es bis zu 2,8 Millionen Betroffene werden (23, 181).

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung und stellt die häufigste Form der Demenz dar (20). Die typische Klinik der Alzheimer-Demenz zeichnet sich durch, einen langsamen Symptombeginn mit kognitiver Verschlechterung und bestimmten Symptomen wie Defizite episodischer Gedächtnisfunktionen, sowie sprachbezogener Symptome oder Verlust exekutiver Kompetenzen aus (180).

Die Klinik kann als Kontinuum verstanden werden. Von der beginnenden AD-Pathologie mit einhergehendem Zelltod bis hin zur manifesten Demenz liegen 15-25 Jahre. Dazwischen steht eine langsame Zunahme der Pathologie mit primär asymptomatischen Patienten. Es kommt zur milden kognitiven Einschränkung (*Mild Cognitive Impairment, MCI*) bis hin zu immer weiter zunehmenden Beschwerden und Demenz (22).

AD ist dabei auch mit einer hohen Mortalität versehen und zeigt eine mediane Überlebenszeit von 6,2 Jahren nach Diagnosestellung (22). AD ist die siebt-häufigste Todesursache in den USA (182). AD tötet mehr Menschen als Brust- und Prostata-Krebs zusammen (183). AD geht mit einem erhöhten Risiko für Immobilität, Schluckstörungen und Malnutrition einher. Dies wiederum geht mit erhöhtem Risiko für Erkrankungen wie Lungenentzündungen einher (182).

Die Pflege der Patienten ist aufwändig, psychisch belastend und teuer. 83% der Hilfe für ältere Personen kommt von Familie, Freunden oder unbezahlten Pflegenden in den USA. Knapp die Hälfte tut dies für Demenzkranke (182). 16,1 Millionen Menschen pflegten im Jahr 2018 ca. 5,7 Millionen Patienten in den USA. Dabei kam es zu schätzungsweise zu 18,4 Milliarden Stunden unbezahlter Care-Arbeit, also über 20h zusätzlicher Arbeitsbelastung in der Woche pro pflegender Person (183). 277 Milliarden USD zahlten Krankenversicherungen in den USA für Demenzkranke 2018 aus. Außerdem muss ein Großteil der Kosten durch die Privatpersonen getragen werden (183). Die zusätzliche Care-Arbeit führt zu Verschlechterung der Arbeitsfähigkeit auf dem konventionellen Arbeitsmarkt und somit Reduktion von Stunden, Wechsel in weniger beanspruchende Tätigkeiten, Abmahnungen wegen reduzierter Arbeits-Performance oder Abwesenheit (183). Pflegende Personen haben erhöhtes Depressionsrisiko und Risiko für Angststörungen (182).

In einer Metaanalyse analysieren Jönsson et al. im Jahr 2022 die Kosten, die durch eine Person mit Demenz in Europa entstehen. In Westeuropa -hierzu gehörten u.a. Österreich und Deutschland- zeigen sich dabei durchschnittliche jährliche Kosten von 38.249 Euro pro Patienten mit Demenz. Betrachtet man die Kosten bezogen auf die Schwere der Erkrankung entstehen, zeigt sich, dass diese mit der Schwere ansteigen. Ein mild betroffener Patient erzeugt jährlich Kosten von 31.984 Euro, moderate betroffene Kosten von 47.934 Euro und schwere betroffene von 56.104 Euro (184). Dabei werden bis zu $\frac{3}{4}$ der Kosten durch Privatpersonen getragen (182). Die Herausforderung der Umsorgung der Personen mit Demenz führen zu hoher Belastung bei den Angehörigen, den Pflegenden und auch dem Gesundheitssystem (184).

Krankheitsverlauf-modifizierende Therapien sind flächendeckend nicht verfügbar (22, 24). Cholinesterase-Inhibitoren oder der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin mildern kognitive Symptome für eine begrenzte Zeit. Es besteht also dringender Bedarf für Progressionsverlangsamende Medikamente oder solche, die den Anfang der Erkrankung verhindern (185). Der Anti-Amyloid-Antikörper Aducanumab senkt die A β -Belastung und ist mit Veränderungen der Tau-Pathologie assoziiert, seine klinische Wirksamkeit für Verbesserung der Kognition ist zumindest weiterhin umstritten (26). Neuere Entwicklungen wie Lecanemab oder Donanemab stellen Fortschritte dar und zeigen Wirkung auf die Kognition (27). Die Antikörper-Therapie geht zudem mit sehr hohen Therapiekosten, hohem Bedarf an Monitoring und mit nennenswerten Nebenwirkungen einher. Es besteht somit weiterhin Bedarf für Fortentwicklung (27). Die lange präklinische Phase mit bereits eingetretenem Zelltod der Neuronen und der spät auftretenden Symptome, stellt eine Herausforderung für kausale Therapieansätze zum Zeitpunkt des Auftretens von Symptomen dar (178). Ein früherer Therapiebeginn wäre also erstrebenswert, um ein höheres Funktionsniveau zu erhalten (178). Weiterhin haben nicht-medikamentöse Therapien in der Behandlung von Demenzen entscheidende Bedeutung (180).

2.2.2 Ätiologische Einteilung und Risikofaktoren

Es werden seltene, autosomal-vererbte Formen ADs beschrieben, die zu ca. 1% aller Alzheimer-Erkrankungen führen. Dieser Form liegen Mutationen im APP-Gen (Amyloid-Precursor-Protein) oder PSEN1 und PSEN2 (Präsenilin 1 und 2) zu Grunde. Erste Symptome äußern sich hier bereits im Alter von 30-50 Jahren oder noch früher (186). Bei Trisomie 21 führt das zusätzliche APP-Gen zu einer lebenslangen Überexpression, sodass diese Menschen einen AD-typischen Phänotyp entwickeln können (25). Auf der anderen Seite sorgt eine APP-missense-Mutation (A673T) für eine lebenslang verminderte Spaltung durch die β -Sekretase und somit für ein reduziertes AD-Risiko (187).

Die sog. "Late-Onset"-Variante scheint durch ein Zusammenspiel von genetischen und umweltbedingten Faktoren zu entstehen und macht einen Großteil der Alzheimer Erkrankungen aus. Es wird vermutet, dass bis zu 70% des AD Risikos auf genetische Faktoren zurückgeht (24). Dennoch scheinen Lifestyle und Umweltfaktoren auf den Verlauf und die Progression der Erkrankung zu haben. Diese nehmen durch epigenetische und andere Mechanismen Einfluss auf die Genexpression. Ebenso könnten modifizierbare Risikofaktoren an der Pathogenese beteiligt sein (188).

Altern scheint der wichtigste Risikofaktor für Neurodegeneration zu sein (189). Die Inzidenz des Morbus Alzheimer verdoppelt sich alle zehn Jahre nach dem Erreichen des 60.

Lebensjahr (190), sodass die Prävalenz mit dem Alter dramatisch steigt:

Von 5,3% bei Menschen zwischen 65 und 74, zu 13,8% zwischen 75 und 85 und 34% bei den noch älteren (191). Die große Mehrheit der AD-Fälle ist über dem 75. Lebensjahr angesiedelt (192). Dennoch ist festzuhalten, dass AD keinen normalen Alterungsprozess darstellt und nicht allein durch Altern zu erklären ist (193). Außerdem haben Frauen ein erhöhtes Risiko v.a. jenseits des 80. Lebensjahrs (22).

Familiäre Vorbelastung erhöht bei Erkrankten eines Elternteils vor dem 75 Lebensjahr unabhängig von bekannten genetischen Prädispositionen das relative Risiko zweifach (194).

Das Gen **APOE-e4**-Gene codiert für ein Protein, das für den Transport Cholesterols ins Blut verantwortlich ist. Es gibt verschiedene Allele dieses Gens (e2, e3 und e4). Dabei ist das e4-Allel mit einer deutlich erhöhten Plaque- und vaskulären Akkumulation und einem deutlich erhöhten AD-Risiko verbunden. Im Vergleich zu der homozygoten e3-Variante haben heterozygote e4-Träger ein dreifach erhöhtes Risiko, homozygote e4-Träger sogar ein 8- bis 12-fach erhöhtes Risiko (195). Die Frequenz bei AD-Patienten liegt zwischen 56-65% für Heterozygotie und bei 11% bei Homozygotie (196, 197), während die Genfrequenz in der Normalbevölkerung bei 0,14 liegt (178). Auf der anderen Seite ist das e2-Allel mit weniger kognitivem Verfall während des Alterns assoziiert (198).

Es sind mehr als 20 **weitere Gene** mit der Late-Onset-Variante von assoziiert, die man mit unterschiedlichen Bestandteilen der Pathologie in Verbindung bringt. Die jeweiligen Genfunktionen umfassen dabei den Cholesterolem-Stoffwechsel, die Endozytose, das Zytoskelett und immunsystemmodulierende Gene. Diese Gene und deren Polymorphismen nehmen in unterschiedlichem Ausmaß Einfluss auf Amyloid- und Tau-Pathologie. Dabei deutet die Vielfalt der assoziierten Gene auf die vermutliche Komplexität der Pathogenese (188).

Neben der genetischen Disposition wird vermutet das 30-50% der AD-Fälle auf **modifizierbare Risikofaktoren** zurückgehen (199). Serrano-Pozo et al. nennen Bluthochdruck im mittleren Lebensalter, metabolische Faktoren wie Diabetes, Rauchen und weitere als Risikofaktoren für die Entwicklung von Demenz im Alter. Auf der anderen Seite scheinen Bildung, soziale Einbindung und eine mediterrane Ernährung protektiv assoziiert zu sein (200).

Die hohe Zahl an attribuierbaren Fällen zeigt die Bedeutung der Präventionsarbeit in diesem Feld, auch wenn die Mehrheit der Fälle so nicht allein verhinderbar erscheint (22). Interessanterweise scheinen vaskuläre Risikofaktoren nicht das Risiko der AD-Pathologie selbst zu verändern (gemessen an Biomarkern), sondern das Demenzrisiko (22). Es gibt Hinweise auf eine, sich verringernde Inzidenzrate in wohlhabenderen Ländern. Dies wird mit der Reduktion von kardiovaskulären Risikofaktoren, sowie Anhebung des Bildungsniveaus in Verbindung gebracht (182).

2.2.3 Pathologie und Pathophysiologie

Pathologisch wird das Krankheitsbild von AD durch extrazelluläre A β -Amyloid Plaques und der neurofibrillären Tau-Tangles, die aus akkumulierten hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen, geprägt. Zusätzlich treten sog. dystrophe Neuriten, Astroglie und mikrogliale Aktivierung auf. Ebenfalls finden sich häufig eine Zerebrale-Amyloid-Angiopathie (24, 201). Folge dessen ist Neurodegeneration mit Verlust von Synapsen und Neuronen sowie makroskopischer Atrophie (24). Sicher kann die Diagnose aktuell nur histopathologisch post-mortem gestellt werden (202).

AD kennzeichnet sich durch eine **lange asymptomatische, präklinische Phase** (22), die Jahrzehnte andauern kann und geprägt ist von Veränderungen in Neuronen, Mikroglia und Astroglia, bevor milde kognitive Einschränkungen bemerkbar werden (22). Es zeigen sich pathologische Veränderungen wie Amyloid-Ablagerung und Tau-Pathologien, sowie hippocampaler Volumenverlust und erniedrigter Glucose-Metabolismus (202).

Gleichzeitig scheint jedoch auch die **Präsenz anderer Pathologien** eine wichtige Rolle bei der Betrachtung der Neurodegeneration der Betroffenen zu spielen (202, 203). Seltener kommt eine „pure“ AD-Pathologie vor. Der Regelfall ist das Vorliegen mindestens einer Co-Pathologie, wobei das zeitgleiche Vorhandensein zweier oder mehrerer Pathologien stark mit dem Alter assoziiert ist. So wird geschätzt, dass 60-80% der Demenzen, pathologisch als AD klassifiziert sind. Davon aber weniger als die Hälfte ist mit einer „puren“ AD-typischen Pathologie verbunden. Die verbundenen Co-Pathologien findet man so bei beispielsweise bei vaskulären Demenzen und Lewy Body Pathologien (202). Das Vorliegen einer weiteren Pathologie erhöht das Risiko der Entwicklung einer manifesten Demenz und ist mit einer schnelleren Progression assoziiert (203).

Die **Amyloid-Hypothese** steht im Vordergrund der vermuteten Pathogenese des Morbus Alzheimer (24, 25).

Die Amyloid-Plaques stellen eine extrazelluläre, nicht-vaskuläre Akkumulation von A β 40 und insbesondere A β 42-Peptiden dar. Die Peptide gehen auf eine abnormale Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) durch die β - und γ -Sekretasen zurück und sammeln sich durch eine Imbalance von Produktion und Clearance an (24, 25, 202). Die Formation von neurofibrillären Tau-Tangles, die neuronale Dysfunktion und Neurodegeneration vermittelt durch Inflammation sind anschließend folgende Prozesse (204).

APP ist ein Transmembranprotein, das von Neuronen, Endothel und Astrozyten exprimiert wird. Seine physiologische Rolle bleibt bislang unklar, es scheint jedoch eine wichtige Rolle für die Entwicklung des Gehirns, Gedächtnis und synaptischer Plastizität zu spielen (205). Es kann auf zwei unterschiedliche Arten gespalten werden, dem nicht-amyloidogenen Weg und dem pathologischen amyloidogenen Weg.

Die sog. α -Sekretasen (die wichtigsten sind ADAM10 und ADAM17) werden dem **nicht-amyloidogenem Weg** zugeschrieben. Sie spalten APP in n-terminale APPs- α extrazellulär und C-terminale Fragment C83. Das C-terminale Peptid wird weiter von der γ -Sekretase zum Fragment P3 prozessiert. APPs- α gilt als neuroprotektiver Faktor (163).

Der **amyloidogene Weg** führt zu der Freisetzung von A β -Peptiden. Hier spaltet die β -Sekretase (die wichtigste ist BACE-1) APP zu APPs β und den C-terminalem Fragment C99. Die γ -Sekretase (Komplex bestehend aus Presenilin, Nicastrin, Aph1 und Presenilin 2) produziert aus C99 die A β -Fragmente (163).

Die freiwerdenden 4,2kDa großen A β -Peptiden bestehen aus 40-42 Aminosäuren und sind durch ihre vornehmlich β -Faltblattstruktur hoch fibrillogen und sind der Hauptbestandteil der **Plaques** (202).

Neuere Studien legen nahe, dass dabei die exogenen A β -Fibrillen toxisch sind und nicht das Vorhandensein der Plaques allein (24, 202) Die löslichen **A β -Oligomere** sorgen in vitro für eine geschädigte Langzeitpotenzierung und führen synaptische Dysfunktionen und neuronalen Tod (24, 206, 207). Außerdem lösen sie eine Hyperphosphorylierung von Tau (24, 25, 208) aus. Eine Theorie ist, dass die Plaques protektive Lager darstellen, bis diese übersättigen und die toxische Wirkung der Oligomere zum Tragen kommt. Dies passt auch gut zu dem Befund, dass viele Menschen große Mengen an A β -Ablagerungen zeigen, aber nicht erkranken und die A β -Oligomer Level in AD-Patienten erhöht sind (24, 25).

2.2.4 Clearance-Hypothese

Mawuenyega et al. untersuchen 2010 die Produktionsraten und Clearance-Raten von A β 40 und -42 bei gesunden und AD-erkrankter Probanden. Sie zeigen eine bis zu 30% Einschränkung der Clearance bei AD Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (209). Ein weiterer Hinweis Richtung der Bedeutung der eingeschränkten Clearance gibt ApoE4. Das Risikoallel ApoE4 ist mit einer verminderten Eliminierung A β s aus dem Gehirn assoziiert und führt somit zu einer Akkumulation und nicht über erhöhte Produktion (25).

Der Mensch hat mehrere Clearance-Mechanismen zur Verfügung, um Proteine aus dem Gehirn zu eliminieren: Intrazelluläre Protein-Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System und durch das Autophagie-Lysosom-System; sowie extrazelluläre Protein-Degradation über Proteasen, mikrogliale Phagozytose oder den Transport über die Blut-Hirn-Schranke oder auch den Transport über die Blut-Cerebrospinale-Schranke in den Blutstrom; sowie perivaskulären, glymphatischen und lymphatischen Abtransport (137). Anschließend wird das nun periphere A β von Erythrozyten und Monozyten, sowie Leber und Nieren weiter abgebaut (137).

Die **Blut-Hirn-Schranke** schafft eine selektive Grenze für u.a. Proteine. Manche Proteine können sie frei passieren, andere werden über Transporter aus dem Gehirn ins Blut transportiert (137). Es wird geschätzt, dass ca. 50% der totalen Clearance A β s zu jeweils der Hälfte über die Blut-Hirn-Schranke und die Blut-Liquor-Schranke erfolgt (210).

Dabei muss die Weiterleitung A β s über Transport-Proteine vermittelt werden.

Beispiele für beteiligte Proteine am Transport über die Bluthirnschranke aus der interstitiellen Flüssigkeit (ISF) sind PICALM, LRP1, P-Glykoprotein (P-gp) und RAGE (185, 205).

PICALM reguliert den durch LRP1- und P-gp-vermittelten Transport A β s (211). Außerdem gehört PICALM zu einem der Übereinstimmungen in GWAS (Genome-wide association studies), und ist bei bestimmten Polymorphismen mit einem erhöhten AD-Risiko verbunden (188). PICALM mRNA ist alternden Endothelzellen reduziert und somit die A β -Transzytose

eingeschränkt, PICALM könnte dabei die Clathrin-abhängige Transzytose des an LRP1 gebundene A β fördern (185).

LRP1 ist ein Mitglied der low-density-receptor-family (LDLR). LRP1 befindet sich abluminal an der Bluthirnschranke und kann A β -Clearance von Gehirn ins Blut fördern (137). Es transportiert A β über die Blut-Hirn-Schranke vom Gehirn ins Blut. Der Transzytose-Mechanismus ist dabei noch nicht vollends verstanden, allerdings scheinen PICALM, LRP1 und P-gp dafür wichtig (211). P-gp ist ein Efflux-Transporter, der zum Lumen an der Blut-Hirn-Schranke exprimiert ist. Bei AD ist die Aktivität eingeschränkt, was zur Akkumulation A β s beiträgt (137). LRP1 könnte A β abluminal binden und die Peptide zu sog. Sorting-Endosomen bringen und dort mit P-gp interagieren, sodass dieses A β übernimmt. P-gp könnte samt A β zu luminalen Seite gelangen und dort A β freisetzen. PICALM übernimmt die Koordinierung dieser Protein-Interaktion (211).

Außerdem kann LRP1 von der Zelloberfläche geschnitten werden und als lösliches Soluble-LRP1 (sLRP1) vorliegen und kann im ISF und Blut vorkommen. Es kann dort A β -Peptide binden und somit die periphere Clearance fördern (185).

Seine Expressionsrate nimmt mit dem Alter ab und ist bei AD-Patienten besonders niedrig (185). Eine niedrigere Expression von LRP1, wie sie bei AD-Patienten festzustellen ist, führt zu einer reduzierten Clearance A β s (205).

RAGE hingegen ist ein Influx-Transporter, vermittelt Transport A β vom Blut ins Gehirn (137, 185). Dieser Transporter ist bei AD-Patienten hochreguliert (185).

Die Steigerung der Clearance ist eine wichtige Strategie für kommende Therapien des Morbus Alzheimer, um den A β -Belastung der Patienten zu verbessern (212, 213).

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien.

Bezeichnung	Herstellfirma
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bis-Acrylamid Lösung (29:1) 40%	BioRad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Amplifikationslösung für Szintillationszähler, (Ultima Gold LLT)	PerkinElmer, USA
BCA 200 Protein Assay Kit	Pierce, Bonn
BioLock-Biotin-Blocking-Lösung	IBA, Göttingen
Bis-Tris	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Pierce, Bonn
Calcium-Chlorid (CaCl)	Sigma, Deisenhofen
Chloroquin	Sigma Aldrich, Steinheim
Chlorwasserstoff (HCl)	Roth, Karlsruhe
Collagen IV 1mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blau	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Paisley, Schottland
Fibronectin 1mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
Heparin	Sigma, Deisenhofen
Hydrocortison 550 nM	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Immobilon™ Western Kit (Chemiluminescent-HRP-Substratreagenz)	Millipore, Schwalbach
¹⁴ C-Inulin	Perkin Elmer, MA, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCL)	Sigma, Deisenhofen
Kalium-Dihydrogen-Phosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
L-Glutamin 200 mM	Invitrogen, Karlsruhe
MAPSII Binding Puffer	BioRad, München
MAPSII Elution-Puffer	BioRad, München
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natrium- ¹²⁵ Iod 1mCi	PerkinElmer, USA
Natriumpyruvat 100mM	Gibco Paisley, Schottland
NP-40 (Nonidet P40)	Roche, Mannheim
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	ThermoScientific, Dreieich

PBS	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK
Polyethylenimin	Polyscience, Warrington
Poly-L-Ornithin	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteasehemmer-Cocktailpulver	Roche, Mannheim
Prestained-Protein-Ladder (ab116029), Protein-Marker-Abcam	Abcam, Cambridge
ROTI-Load-1, reduzierend (4x Ladepuffer)	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	BioRad, München
Tetramethylethylendiamin, TEMED	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure, TCA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-Base (Tris-OH)	Roth, Karlsruhe
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth, Karlsruhe
Trypan Blau	Sigma, Steinheim
Trypsin-EDTA (0,5 %), ohne Phenolrot	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK
TWEEN® 20	Roth, Karlsruhe
Tyrosin	Roth, Karlsruhe

3.2 Puffer, Lösungen, Gele

Tabelle 2: Puffer, Lösungen, Gele für die Proteinbiochemie.

Name	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	1x TBS-T 5% (w/V) Magermilchpulver
Blockierungspuffer für Anti-Strep-Antikörper	1x TBS 5% (w/V) BSA
Coomassie-Entfärbelösung I	20 % (v/v) Ethanol (99,9 %) 7 % (v/v) Essigsäure Rest VE-H ₂ O
Coomassie-Entfärbelösung II	10 % (v/v) Essigsäure Rest VE- H ₂ O
Coomassie-Färbelösung Brillant Blue Stain	50% Ethanol 0,7% Essigsäure 0,0175% Brilliant Blue Rest VE- H ₂ O
Lauf-Gel-Puffer 4%, Trenngel-Buffer (pH 8,8)	1,5 M Tris-Base pH 8,8 0,4% SDS
NP40-Lyse-Puffer	150 mN NaCl 50 mM Tris-Base pH 8,0 1% (v/v) Nonidet P40 0,02% NaN ₃
1x PBS und 10x PBS	<u>1x PBS:</u> 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM NaH ₂ PO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
PBS +/-	1x PBS 0,9 mM Calcium Chlorid

	0,5 mM Magnesium Chlorid
Polyacrylamid-Gele	<u>Sammelgel:</u> 625 µl Sammelgel-Puffer pH 6.8 312 µl Acrylamid 40% (29:1) 1,563 ml VE-H ₂ O 25 µl APS 10% 2,5 µl TEMED <u>Beispielhaft: 10%-Trenngel-Gel:</u> 2,5 ml Trenngel-Puffer pH 8.8 2,5 ml Acrylamid 40% (29:1) 5 ml VE-H ₂ O 100 µl APS 10% 10 µl TEMED
Ponceau-Färbe-Lösung	0,1% Ponceau S 5% Essigsäure
Sammelgel-Puffer (pH 6.8)	0.6 M Tris-HCl 0.4 % (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer (pH 8,3)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0.1 % (w/v) SDS
TBS-T	Gelöst in 1x TBS 0,05% (v/v) TWEEN 20
TCA-Präzipitation	100% TCA
TCA-Resuspensionspuffer	10 mM Tris pH 7.5 10 mM NaHCO ₃ in VE-H ₂ O
Western-Blot Puffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol VE-H ₂ O

Tabelle 3: Puffer für die Antikörper-Aufreinigung über die Protein A Säule.

MAPS II-Puffer-Feststoffe wurden von der Herstellerfirma Biorad, München erworben und dann selbst zu 1xPuffer mit dH₂O verdünnt und folgend nach Herstellerangaben filtriert.

Name	Zusammensetzung
MAPSII-Bindungs-Puffer	314g MAPS II-Bindungs-Puffer-Feststoff Rest zu 1000 ml VE-H ₂ O
MAPS II-Elutionspuffer	2.2g MAPSII-Elutions-Puffer-Feststoff Rest zu 1000 ml VE-H ₂ O
Neutralisation	10M NaOH
Lösungen für Waschschrte	1. 20% Ethanol 2. 100% Methanol 3. VE-H ₂ O

Tabelle 4: Puffer für die Protein-Aufreinigung über die Strep-Tactin-Säule.

Alle 10x Puffer wurden von der Herstellerfirma IBA, Göttingen erworben und dann selbst zu 1x Puffern mit dH₂O verdünnt.

Name	Zusammensetzung
10x Elutionspuffer, Puffer E (pH 8)	1 M Tris-Cl 1.5 M NaCl 10 mM EDTA

	25 mM Desthiobiotin
10x Regenerationspuffer Puffer R (pH 8)	1 M Tris-Cl 1.5 M NaCl 10 mM EDTA 10 mM HABA
10x Waschpuffer Puffer W (pH 8)	1 M Tris-HCl pH 8 1.5 M NaCl 10 mM EDTA
10x Waschpuffer Puffer W (pH 10)	1 M Tris/HCl pH 8 1.5 M NaCl 10 mM EDTA

Tabelle 5: Puffer für die radioaktive Markierung von Proteinen.

Name	Zusammensetzung
Tris-Iodinierungspuffer	25 mM Tris pH 7,5 0,4M NaCl In VE-H ₂ O
Tris/EDTA-Puffer	25 mM Tris pH 7,5 0,4 M NaCl 5 mM EDTA 0,05% Natriumazid
Tris/BSA-Puffer	0,25% 1mg/ml BSA 25mM Tris pH 7,5 0,4M NaCl 5 mM EDTA 0,05% Natriumazid
Scavenging-Puffer	10mg/ml Tyrosin in PBS pH 7,4

3.3 Plasmide

Tabelle 6: Plasmide.

Konstrukt und Vektor	Spezies
KlothoFlag pLBCX	Maus
pcDNA	Leervektor

3.4 Zellen

Alle verwendeten Bestandteile der Zellkulturmedien wurden verwendungsbereit erworben oder vor dem Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert.

Tabelle 7: Insektenzellen.

Die Zellen wurden mit in Tabelle 11 beschriebenen Mediumszusammensetzungen kultiviert bzw. auch konserviert.

Name	Zelltyp	Referenz
High-Five = kommerzieller Name, auch BTI-TN-5B1-4	<i>Trichopulsia ni</i> , Ovar	Wickham et al. (214)

Tabelle 8: Säugetierzellen.

Verwendete Medien werden in Tabelle 11 beschrieben.

Zelllinie	Zelltyp	Referenz/Beschreibung
HEK293-T	Humane embryonale Nierenzelle	Aiello et al. (215)
bEnd.3	Maushirnendothelzelle	Montesano et al. (216)

Tabelle 9: Basis-Zellkulturmedien.

Diese Medien lagen den unten aufgeführten Wachstums-, Versuchs- und Konservierungsmedien zu Grunde.

Name	Herstellfirma
DMEM (1x), (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK
Express Five SFM	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK
Opti-MEM	GIBCO, Life Technologies, Paisley, UK

Tabelle 10: Puffer und Coating-Lösungen.

Diese Puffer und Coating-Lösungen fanden in der Zellkultur Anwendung.

Name	Zusammensetzung
bEND.3-Coating-Lösung	40% Collagen IV (1mg/ml) 10% Fibronectin (1mg/ml) zu 1 ml mit VE-H ₂ O
HEK 293T-Coating-Lösung	1:2000 Poly-Ornithin in PBS
1x PBS und 10x PBS	<u>1x PBS:</u> 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM NaH ₂ PO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
PBS +/-	1x PBS 0,9 mM Calcium Chlorid 0,5 mM Magnesium Chlorid
Trypsin/EDTA in PBS (pH 7,4)	0,05% (w/V) Trypsin 0,02% (w/V) EDTA

Tabelle 11: Wachstums-, Versuchs- und Konservierungsmedien.

Name	Medium	Zusätze (v/v)
bEND.3-Kulturmedium	DMEM	10% FCS 2mM L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin
bEND.3-Konservierungsmedium	bEND.3-Kulturmedium	10% DMSO
bEND.3-Stimulationsmedium	OPTI-MEM	1% L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin 550 nM Hydrocortison
bEND3.-Transportmedium	OPTI-MEM	1% L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin 550 nM Hydrocortison

			10% eluiertes KL1
HEK-Kulturmedium	DMEM		10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 2mM L-Glutamin 1% Natrium-Pyruvat (100 mM)
HEK-Konservierungsmedium	HEK-Kulturmedium auf DMEM-Basis	auf	10% DMSO
HEK-Uptake-Vorbereitungsmedium	OPTI-MEM		1% Penicillin/Streptomycin 2mM L-Glutamin 1% Natrium-Pyruvat (100 mM)
HEK-Uptake-Medium	OPTI-MEM		50% Puffer E +/- rk-KL1 1% Penicillin/Streptomycin 2mM L-Glutamin 1% Natrium-Pyruvat (100 mM)
High-Five-Kulturmedium	Express Five Insect SFM		10 % L-Glutamin (200 mM) 1 % Penicillin/Streptomycin
High-Five-Suspensionkulturmedium	Express Five Insect SFM		10 % L-Glutamin (200 mM) 10U/ml Heparin 1 % Penicillin/Streptomycin
High-Five-Konservierungsmedium	High-Five-Kulturmedium auf Express Five Insect SFM-Basis		10% DMSO
Serumfreies DMEM	DMEM		1% Penicillin/Streptomycin

Tabelle 12: Antibiotika.

Name	Herstellfirma
Penicillin-Streptomycin	Sigma, Deisenhofen

3.5 Antikörper

Die Antikörper wurden in TBS-T + 5% (w/v) Magermilchpulver (MMP) gelöst, sofern nicht anders angegeben.

Tabelle 13: Primäre Antikörper.

Name	Antigen	Verdünnung	Spezies	Hergestellt durch
Albumin	aa540-569 (C-Terminus)	1:1000	Kaninchen	Abcam, Cambridge
Anti-KL1-Antisera <i>Aus Tier 1 (KL1/1)</i> <i>Aus Tier 2 (KL1/2)</i>	KL1 des Proteins Klotho (HWINPRRMTDY NIREC)	variierend	Kaninchen	Pineda, Berlin
Anti-KL2-Antisera <i>Aus Tier 1 (KL2/1)</i> <i>Aus Tier 2 (KL2/2)</i>	KL2 des Proteins Klotho (EPACPFSQKDK EVAE)	variierend	Kaninchen	Pineda, Berlin
PA-KL1/1	KL1 des Proteins Klotho	variierend	Kaninchen	Pineda, Berlin und selbst aufgereinigt (siehe 5.1.2)
KM2076 (217)	KL1-Domäne von Klotho (aa55-261)	1:500	Ratte	TransGenic Inc., Kobe, Japan

Tubulin	Tubulin	1:1000	Maus	Invitrogen, Karlsruhe
APP A4 (22C11) (218)	aa66-81	1:1000	Maus	Sigma-Aldrich, Steinheim
Unspezifisches IgG	unspezifisch	10 µg/ml	Maus	Santa Cruz, Dallas, Texas
RAP	(7F1)		Maus	D. Strickland
LRP1 (B411E2)	Domänen 2 und 4	15 µg/ml	Maus	Laboreigene Produktion (211)

Tabelle 14: Sekundäre Antikörper.

Die Antikörper wurden in TBS-T + 5% (w/v) Magermilchpulver (MMP) gelöst, sofern nicht anders angegeben.

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, UK
Anti-Huhn-IgG	Esel	HRP	1:10000	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Ratte-IgG	Ziege	HRP	1:5000	BioRad, München
Anti-Maus-IgG	Huhn	HRP	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe

3.6 Geräte

Tabelle 15: Geräte.

Bezeichnung	Herstellfirma
ÄKTA™ start	GE Healthcare Europe, Freiburg
Anthos 2010 Mikrotiterplatten-Photometer	Anthos Mikrosysteme, Friesoythe
BioRad PowerPac 300	BioRad, München
CO ₂ -Inkubator	New Brunswick, Edison, USA
CellZcope	Nano Analytics, Münster
ChemiDoc MP	BioRad, München
Countess II FL	Invitrogen, Karlsruhe
Eppendorf ThermoMixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben 300/500ml	Schott, Mainz
Kipp-Laborschüttler Rocky®	Fröbel Labortechnik, Lindau
Folienschweißgerät	Krupps, Solingen
Counter Wizard2	Perkin Elmer, Billerica, USA
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Kirchdorf
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau
Glaspipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL	Hirschmann Techcolor, Germany
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	Infors AG, Buttmingen, Schweiz
Inkubator WiseVen	WiseVen

Inkubator HERAcell 240i	ThermoScientific, Waltham, USA
Kühlschrank +4 °C	Liebherr, Kirchdorf
LAS3000 mini Imager	Fujifilm, Japan
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Magnetrührer MR 3000D	Heidolph, Schwabach
Mikrowelle	Micromaxx, Real
Mini Trans-Blot Cell Western Blot System	BioRad, München
Mini-PROTEAN 3 Cell Elektrophorese System	BioRad, München
Mr. Frosty Gefrierbehälter, NALGENE-Cryo1°C-Freezing-Container	ThermoScientific, Waltham, USA
NanoDrop One C	ThermoScientific, Waltham, USA
pH-Meter, Seven-Compact	Mettler-Toledo, Gießen
Pipetten (1 µl-1 ml)	Eppendorf, Hamburg
Pipetboy 2, Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Biebertal
Rotator mit Drehteller	Baacklab Armin Baack, Schwerin
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Sterilwerkbank Safemate 1.2 Vision	Euroclone, Pero, Italien
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tri-Carb 2800 TR Liquid Scintillation Analyzer	Perkin Elmer MA, USA
Vakuum Pumpe	Hofer Scientific Instruments, San Francisco California
Vacunsafe Comfort Absaugsystem	Integra Biosciences, Biebertal
Vortexer MS 2 Mini Shaker	IKA Labortechnik, Staufen
Waage AE160	Mettler-Toledo, Göttingen
Waage Kern PCB	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Waage BL 150S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad GFL 1092	GFL, Burgwedel
Wasserbad SUB6	Grant Instruments, Cambridgeshire, UK
Tischzentrifuge, Mini Centrifuge	Starlab International GmbH
Zentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg

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

3.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien.

Artikel	Herstellfirma
Aluminiumfolie	Aro, Metro
Amicon Vivaspin 15-10k MWCO	Sartorius, Göttingen
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
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dasse
Gewebekulturschalen (mit Durchmessern von 6 cm, 10 cm, 15cm)	Greiner, Frickenhausen / Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturschalen (6- und 12-Lochplatten)	Greiner, Frickenhausen / Sarstedt, Nümbrecht
IODOGEN-Röhrchen	Thermo Fisher, Waltham, USA
Kryoröhrchen (Cryo Tubes™)	Thermo Fisher Scientific, Denmark
Mikrotest Platten 96-well	Sarstedt, Nümbrecht
NAP-5-Säule	GE Healthcare, Freiburg
Nitrocellulose-Blotting-Membran Amersham Protan 0,2 µm NC	GE Healthcare Life Science, Freiburg
Parafilm® American National Can™	Neeah, USA
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 0,1 µl-1000 µl	Starlab, Ahrensburg
Bio-Scale™ Mini Affi-Prep® Protein A Säule 1 ml	Bio-Rad Laboratories, USA
Serologische Pipette, steril 1-50 ml	Greiner, Frickenhausen
Strep-Tactin Superflow 5 ml-Säule	IBA, Göttingen
Transwelleinsätze, (0.4 µm, 33.6 mm ²)	Greiner, Frickenhausen/ Sarstedt, Nümbrecht
T25 Zellkultur-Flasche	Thermo Scientific, Waltham, USA
T75 und T175 Zellkultur-Flasche	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	TPP, Trasadingen Schweiz

3.8 Software

Tabelle 17: Software.

Programm	Hersteller
ADAP	Anthos
ChemiDoc MP	BioRad
EndNote 20	Clarivate
GraphPad Prism	GraphPadSoftware
ImageJ	Open Source

LAS-3.000 UnicornStart	FujiFilm
Microsoft Office 2016	Microsoft
Online-Tool: Protein Extinction Coefficients and Concentration Calculation (https://www.novoprolabs.com/tools/protein-extinction-coefficient-calculation)	Novoprolabs

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Allgemeine Bedingungen

Alle Handlungen, die der Kultivierung und Erhaltung von sowohl Säugetier-, als auch Insektenzellen, dienen, wurden unter einer Sterilwerkbank mit Abzug unter möglichst aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die Werkbank und alle dafür notwendigen Materialien wurden vorher mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Sterilwerkbank wurde einmal in der Woche zusätzlich mit UV-Licht behandelt.

Alle Säugetierzellen wurden in Form einer Adhärenz-Kultur in Gewebekulturschalen (Ø 6-15cm Petrischalen oder Lochplatten (6-24-Well-Platten) bei 37°C und einem CO₂-Partialdruck von 5% und eine Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

Das verwendete, zur Zellart korrespondierende Kulturmedium und alle anderen Medien wurden in einem Wasserbad vor Einsatz auf 37°C erwärmt.

Auf die besonderen Anforderungen der Insektenzellen wird unten eingegangen.

4.1.2 Kultivierung

Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf ihre Konfluenz und Vitalität, sowie auf potentielle Kontaminationen unter dem Mikroskop beurteilt.

Lag eine Konfluenz von 90% vor, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt. Darauf wurden die Zellen 2-mal mit 2ml warmen PBS -/- schonend gewaschen. Anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA für 1-10 min (abhängig von Zellreihe) bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 8 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gemäß der Versuchsprotokolle ausgesät oder für die Weiterführung der Kultur in Verhältnissen von 1:10 – 1:50 auf neuen Petrischalen ausgebracht.

Die Kultur von HEK-Zellen erforderte eine Vorbehandlung der Schalen mit Poly-L-Ornithin, um die Zelladhärenz zu stärken.

4.1.3 Zellzahl-Bestimmung

Um die Zellzahlen zu bestimmen, wurde eine Neubauer-Zählkammer verwandt. Dafür wurde eine repräsentative Probe aus der zuvor mit 2ml trypsinieren und dann in 8ml Kulturmedium gelösten Zellenlösung gezogen. Diese wurde dann 1:1 mit Trypan Blau versetzt und darauf je 20 µl wurden in die Zählkammern gefüllt. Darauf wurden die Quadrate gezählt und deren Mittelwert bestimmt. Aufgrund der Verdünnung mit Trypan-Blau, musste die Verdünnungsfaktor in die Berechnung mit einfließen.

$$\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert} * 2 * 10^4$$

4.1.4 Revitalisierung und Kryokonservierung

Zur **Revitalisierung** wurden die Zellen aus der Lagerung im Flüssigstickstofftank, der der langfristigen Lagerung bei -196°C diente, entnommen. Die Zellen wurden mittels wiederholter Resuspension in 9 ml auf 37°C vorgewärmten Kulturmedium in Lösung gebracht. Darauf wurde die Zellsuspension mit 140RCF für 4 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in frischem Kulturmedium erneut suspendiert und auf einer 10 cm Schale ausgebracht. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Das wiederholte Wechseln von Medium während des Prozesses diente der Verdünnung des im Kryomedium enthaltenen DMSO. Dieses ist für Zellen toxisch.

Zur **Kryokonservierung** wurden 80% konfluente Zellen, gelöst in Kryo-Medium, in Kryokonservierungsröhrchen überführt. Davor wurde das Kryomedium vorbereitet. Die Zellen wurden mit 2 ml PBS -/- gewaschen und 2 ml trypsinieren. Die Zellen wurden zu 10ml Kulturmedium aufgenommen und bei 10 RCF für 4min zentrifugiert. Das Pellet wurde in mit

Kryomedium suspendiert und auf 4 Kryokonservierungsröhrchen verteilt. Diese wurden darauf mit Isopropanol gefüllten Mr. Frosty-Gefrierbehälter überführt. Dieser Gefrierbehälter wurde für 24 h bei -80°C gelagert und am nächsten Tag in den oben beschriebenen Flüssigstickstofftank für die Lagerung überführt. Am nächsten Tag wurde ein Survival-Test in Form des Auftauens eines der Röhrchen gemäß des oben beschriebenen Revitalisierungsprotokolls durchgeführt und die Vitalität der Zellen anhand ihrer Kultivierung beurteilt.

4.1.5 Kultivierung der Insektenzellen

Die High-Five-Insektenzellen wurden in **Adhärenzkultur** in einem Inkubator bei 27°C ohne CO_2 -Zufuhr geführt. Sie wurden in 20 ml Kulturmedium auf T-75-Flaschen ausgebracht.

Für das Passagieren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml Kulturmedium von der Oberfläche abgespült. Dazu wurde kein Trypsin benötigt, da die Zellen lose genug auf der Kulturfläche anheften. Anschließend wurden sie im gewünschten Verhältnis von 1:5 – 1:30 in 20 ml High-Five-Kulturmedium in einer neuen Flasche ausgesät. Für die Revitalisierung wurden zunächst T-25 Flaschen oder Petrischalen genutzt.

Für Versuche der Kultivierung in **Suspensionskultur** wurden die Zellen in Hitze-sterilisierten und zusätzlich autoklavierten 300 ml-Glas-Kolben bei 27°C bei 70-130 RPM geschüttelt. Die doppelte Reinigung war notwendig, um das Baculovirus sicher zu eliminieren. Als Bedeckung der offenen Kolben dienten zu Deckeln geformte mehrschichtige Alufolie, die ebenso im Zuge des gleichen Verfahrens wie die Kolben sterilisiert und autoklaviert wurden. Die Zellzahl wurde täglich mittels Neubauer-Zählkammer gezählt, sowie die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Das Kulturmedium enthielt 10U/ml Heparin. Waren viele aggregierte Zellhaufen zu erkennen wurde weiteres Heparin hinzugegeben.

Zur Überführung von der Adhärenzkultur in die Suspensionskultur wurden $2-4 \times 10^5$ Zellen/ml mit 30 ml mit heparinisiertem Kulturmedium in den Kolben aus den Kulturflaschen überführt und bei 80-90 RPM rotiert. Bei Zunahme von Zellen auf 2×10^6 Zellen/ml wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden $3-5 \times 10^5$ Zellen mit frischem Medium inkubiert, die Rotationsgeschwindigkeit wurde dann zwischen 70-130RPM eingestellt. Auch wurde versucht, als Alternative zur Passage täglich 5ml frisches Medium hinzuzufügen.

4.1.6 Transiente Transfektion von HEK-Zellen

Im Vorfeld waren HEK-Zellen auf zwei 10 cm-Petrischalen ausgesät worden und der Moment für die Transfektion bei 70% Konfluenz festgelegt. Die Kultivierung erfolgte wie oben beschrieben. 30 min vor der transienten Transfektion wurde das Kulturmedium gewechselt. Die HEK293-T-Zellen wurden im Anschluss mit Klotho transient transfiziert. Als Negativ-Kontrolle wurde parallel mit einem pcDNA-Leervektor transfiziert. Für die Transfektion wurden $4\mu\text{g}$ Plasmid-DNA, $16\mu\text{l}$ Polyethylenimin (PEI) in $120\mu\text{l}$ serumfreien DMEM in separaten Gefäßen gelöst. Darauf wurden die Lösungen durch einen Vortexer gemischt und 15min auf Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nun wurden beide Lösungen miteinander wieder per Vortexer gemischt und weiter 15min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung zu den jeweiligen Schalen hinzugegeben und die Schale vorsichtig geschwenkt. Nach 6h wurde das Medium erneut gewechselt, um das PEI zu entfernen. Nach 48h wurden die transfizierten Zellen lysiert.

4.1.7 Zell-Lyse

Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die zu lysierende Zellen wurden aus dem Inkubator auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und mit PBS $-/-$ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Einmalspatel abgekratzt und in 1 ml PBS resuspendiert, und ein Eppendorf-Gefäß überführt. Mit weiteren 0,5ml PBS wurde der Schritt wiederholt. Anschließend wurden die 1,5ml PBS samt gelöster bei 4250 RCF bei 4°C pelletiert. Im Folgenden wurde den Überstand abgesaugt, das verbliebene Pellet gewogen und $4\mu\text{l}/\mu\text{g}$ NP40-Lyse-Puffer und Protease-Inhibitor hinzugegeben. Darauf wurde das Gemisch 20min auf Eis inkubiert, alle 5 min auf dem Vortexer durchgemischt und dann 20min auf 18000 RCF

zentrifugiert. Der Überstand wurde für Proteinanalysen weiterverwendet, Das Pellet wurde verworfen.

4.2 Proteinanalytik

4.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay

Um Proteinkonzentrationen in Lysaten oder auch Eluaten zu bestimmen, wurde ein BCA-Assay (BCA, Bicinchoninsäure) angewandt, Eine Standardreihe wurde mittels 1µg/µl BSA, VE-Wasser und den Pierce Protein Assay Reagenzien erstellt. Dazu wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Tabelle 18: BSA-Standardreihe-Pipettierschema.

Standardreihe	Zusatz in ul	VE-H ₂ O in µl
0	-----	50
1	5 BSA	45
2	10 BSA	40
3	15 BSA	35
4	20 BSA	30
5	25 BSA	25
Probe	5 Lysat	45 VE-H ₂ O

Darauf wurde 1 ml der Pierce Reagenzien (A+B, 50:1-Verhältnis) hinzugefügt und nun 30min bei 60°C auf einem Schüttler inkubiert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden das Photometer „Anthos 2010“ und die Software ADAP genutzt.

4.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Nano-Drop Spektrometrie

Die spektrometrische Messung beruht auf der Messung der absorbierten Wellenlänge von 280nm. Diese Methode kommt im Unterschied zur BCA-Messung ohne Generation einer Standardkurve aus und eignet sich besonders für die Konzentrationsbestimmung von aufgereinigten Proteinlösungen.

Das Nano-Drop-Messgerät wurde mit dem der Proteinlösung entsprechenden Puffer äquilibriert. 1 ul der Proteinlösung wurden auf den Messungssockel pipettiert. Darauf erfolgte die Messung nach Herstellerangaben. Für jede Probe wurde die Messung 3 x wiederholt und dann gemittelt. Für die Bestimmung der IgG-Konzentration wurde das vorprogrammierte IgG-Programm genutzt. Für die Konzentrationsbestimmung der rekombinant-hergestellten Proteine wurden die Sequenzen mittels des Online Tools „Protein Extinction Coefficients and Concentration Calculation“ der Firma Novoprolabs ausgewertet. Dieses Tool gab dann einen molaren Extinktionskoeffizienten an.

4.2.3 TCA-Präzipitation

TCA-Präzipitation (TCA, Trichloressigsäure) wird für die Fällung von Proteinen aus einer Lösung (hier Überstände bzw. aus konditioniertem Kulturmedium) verwendet (219).

Um ein sicheres Pelletieren der Probe zu gewährleisten, wurde 0,3 mg/ml BSA zugesetzt. Dann wurde 5% TCA zugesetzt und mit einem Vortexer für 20 s gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert und wiederholt gevortext. Es folgte eine Zentrifugation bei 18000 RCF für 15min. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit eiskaltem Aceton (500 µl) gewaschen und gevortext. Danach folgte eine erneute Zentrifugation für 5min bei 18000 RCF. Das überstehende Aceton wurde abpipettiert und das Pellet für unter einem Abzug offen gelagert, um das restliche Aceton verdunsten zu lassen. Um das Pellet zu resuspendieren, wurde es in

10mM Tris pH7,5 Puffer und 10mM NaHCO₃ (50/50) unter Rotation auf einem Drehrad innerhalb von 15 min gelöst. Mit Hilfe der Tischzentrifuge wurden entstehende Blasen reduziert.

Die entstehende Lösung wurde mit 2x Roti-Load-1 versetzt und anschließend für 3 min bei 95°C gekocht.

4.2.4 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihrer molekularen Masse innerhalb eines elektrischen Feldes (220). Der zugesetzte 4x ROTI-Load 1 Ladepuffer sorgt für die Denaturierung und negative Ladung der Proteine, sodass diese zur Anode innerhalb des Gels wandern.

Die Proben (Lysate, Überstände, Durchläufe, Eluate etc. wurden auf gleiche Volumina und Proteinkonzentrationen angepasst, also ggf. mit Wasser aufgefüllt und 4x ROTI-Load 1 versetzt. Die finale Proteinkonzentration variierte zwischen 20 und 30 µg (bzw. war nicht bestimmbar). Dann wurden die vorbereiteten Proben für 5 min bei 95°C auf einem Schüttler gekocht.

Die genutzten Polyacrylamid-Gele (6%, 8%, 10%, Bis/Acrylamid 29:1) wurden selbst gegossen und polymerisierten im Mini-PROTEAN 3 System von Biorad. Beispielhaft ist in Tabelle 2 die Zusammensetzung eines 10%-Polyacrylamid-Gels zu sehen.

Die Proben und Marker wurden in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Zu Beginn wurde eine Spannung von 100V für 30 min verwendet, um einen besseren Einlauf ins Sammelgel zu gewährleisten. Im Anschluss wurde die Spannung auf 130V erhöht und abgewartet, bis die Lauffront der Proben am unteren Bereich des Polyacrylamid-Gels angekommen war. Nun folgten entweder der Western Blot oder auch eine Coomassie Färbung.

4.2.5 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel sollen nun auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden, um diese mittels Primär- und Sekundär-Antikörper und Chemilumineszenz zu nachzuweisen. Die Nitrozellulosemembran, die für den Blotting Vorgang nötigen Schwämme und Filter-Papiere wurden zuvor in Transfer-Puffer eingeweicht. Darauf wurde gemäß Herstellerangaben die Mini-Trans-Blot-Electrophoretic-Transfer-Cell zusammengesetzt und mit auf 4°C gekühltem Transfer-Puffer gefüllt. Nach dem Aufbau nach Herstellerangaben erfolgte der elektrophoretische Transfer für 90min bei 85V auf Eis. Nach dem erfolgten Transfer wurde die Membran mit TBS für 1x 1min gewaschen.

Zur Signalverstärkung des immunochemischen Verfahrens wurde eine Methanol-Fixierung durchgeführt. Dazu wurde die Membran nun mit 50% MeOH für 1h bei 50°C bei 50rpm inkubiert. Darauf für 3min in TBS gewaschen.

Nun wurde die Membran mit Ponceau-Lösung inkubiert, um die transferierten Proteine sichtbar zu machen und den Erfolg des Transfers zu validieren und ggf. das gezielte Zuschneiden der Membran zu ermöglichen, um auf unterschiedliche Bereiche verschiedene Antikörper zu applizieren. Durch Waschen mit TBS-T wurde die Ponceau-Lösung entfernt. Nun wurden die Membranen mit 5% Magermilchpulver gelöst in TBS-T blockiert, um unspezifisches Binden der Antikörper zu minimieren.

4.2.6 Inkubation mit Antikörper und Chemilumineszenz-Assay

Die Nitrozellulosemembran wurde über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit dem gewünschten Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper zu Wiederverwendung entfernt und bei 4°C gelagert. Die Membran wurde nun 3x mal 3 min mit

TBS-T gewaschen und nun für 1h mit dem Sekundärantikörper bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Der Sekundärantikörper ist mit der Meerrettich-Peroxidase (horseradich, HRP-) gekoppelt. Im Anschluss wurde die Membran erneut 3x 3 min gewaschen (2x mit TBS-T, 1x mit TBS)

Die Chemilumineszenzreaktion wurde mit dem LAS-3000 mini Imaging System oder dem ChemiDoc MP detektiert. Diese Reaktion erfolgte durch Zugabe der Immobilon-Western-HRP-Substrate in einem 1:1 Mix auf die Membran. Die Substrate enthalten Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Luminol.

4.2.7 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Ein Verfahren, um die Proteinkonzentration zu bestimmen, ist die Färbung des SDS-Gels mit Coomassie Brilliant Blau. Dazu wird eine Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentration mit BSA auf das Gel aufgetragen und diese mit der zu messenden Proteinbande mit dem Programm Image J verglichen und analysiert. Nach dem Lauf der SDS-PAGE wurde das Polyacrylamidgel 2h bei RT mit der Coomassie-Färbe-Lösung inkubiert, anschließend mit der Entfärbelösung 1 über Nacht und folgend mit Entfärbelösung 2 für 1h inkubiert.

4.3 Antikörper-Aufreinigung

4.3.1 Aufreinigung mittels Äkta™ Start

Die Protein-Aufreinigung mittels Affinitäts-Chromatographie beruht auf einer spezifischen Bindung einer stationären Phase (in einer Säule) und den gewünschten Molekülen als Teil der mobilen Phase. Diese Methode kann auch für Antikörper-Purifikation aus Seren genutzt werden (221). Nach Durchlauf der mobilen Phase (hier Serum) und folglich Bindung von Liganden der Säule mit dem gewünschten Molekül (hier Antikörper), erfolgt ein Waschschrift, um ungebundene bzw. ungewünschte Moleküle aus dem Medium zu entfernen. Anschließend erfolgt ein Elutionsschrift mit einem Puffer die die Interaktion von Liganden und targetierten Molekülen stört und somit für eine Mobilisierung des Moleküls, wie dem Antikörper sorgt (221).

Für die folgende Aufreinigung wurden das ÄKTA™ start Chromatographie-System und Bio-Scale™ Mini Affi-Prep® Protein A Säulen verwendet. Die Protein-A-Säulen nutzen das Protein A aus Staphylokokkus Aureus, das Immunglobuline binden kann.

Das Serum wurde zu Beginn 1:1 mit MAPS II-Bindepuffer verdünnt. Zur Vorbereitung des Systems wurde die Protein-A-Säule 10 CV (Column Volume, Säulenvolumina) von hochreinem Wasser bei einer Flussrate von 2 ml/min gespült. Darauf wurde die Säule mit 10 CV MAPS II-Elutionspuffer, sowie folgend mit 10 CV MAPS II- Bindepuffer bei gleicher Flussrate gespült.

Nun wurde das verdünnte Serum bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. appliziert und dann mit 20 CV MAPS II-Bindepuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen. Es folgte die Elution mit dem MAPS II-Elutionspuffer bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die entstehenden Eluate wurden von 1-5 fraktioniert. Die Eluate wurden mit 10M NaOH neutralisiert.

Die Regeneration der Säule folgte bei einer Flussrate von 3 ml/min mit 10CV 50% Methanol, 8 CV 0,1 NaOH und 8 CV hochreinem Wasser. Das ÄKTA™ start -System und die Säule wurden mit 20% Ethanol befüllt.

4.3.2 Konzentrationsbestimmung der eluierten Antikörper

KL1/1-Antiserum wurde über die Protein-A-Säule aufgereinigt und in die Eluate 1-3 fraktioniert. Zunächst wurde mittels Nano Drop-Messung die Konzentration der Eluate geschätzt.

Für die densitometrische Messung eines mit Coomassie gefärbten Gels wurde sich an den Konzentrationen aus der Nano Drop Messung orientiert. Auf das Gel wurde 20µg Protein geladen. Die BSA-Standardreihe wurde an der durch die Nano Drop-Bestimmung vermuteten Konzentration der Eluate orientiert.

Für die Konzentrationsbestimmung wurde nach der Färbung densitometrisch die Intensität des Signals der BSA-Standards mit denen der Eluate auf Höhe der schweren Ketten mit dem Programm Image J ins Verhältnis gesetzt. Aus dem BSA-Standard und deren Konzentration konnte über eine lineare Regression auf die Konzentration der schweren Ketten der Eluate geschlossen werden.

Die Eluate wurden anschließend verdünnt, fraktioniert und bei -20°C und unter dem Namen **paKL1/1** (*purified antibody @KL1 from animal 1*). Die nun vorliegende Konzentration des Antikörpers ist 3µg/µl.

4.4 Rekombinante Protein-Expression und Aufreinigung

Für die Expression von rekombinatem KL1 bzw. KLΔTM wurden High-Five-Insektenzellen und ein Baculovirus-System genutzt. Die Baculoviren wurden in unserem Labor von Greta Boehme hergestellt (37). Ein Virus führte zu Expressierung von mit einem Strep-Tag-markierten-KL1, das andere zu KLΔTM. Die Viren lagen als Medium Passage 4 aus der Virusamplifikation mit Sf9-Insektenzellen vor. Dieses Virus-enthaltende Medium wurde für die Infektion von High-Five-Insektenzellen genutzt. Diese exprimierten das Protein und sekretierten es ins Medium. Es wurden sowohl adhärenzte Kulturen als auch Suspensionskulturen verwendet. Die exprimierten Proteine enthielten einen Strep-Tag für die Purifikation.

Dieses KL1- bzw. KLΔTM -enthaltende Medium wurde mittels Affinitäts-Chromatographie mit dem System ÄKTA™start und der Strep-Tactin-Superflow-Säule (analog zu der oben beschriebenen Aufreinigung der polyklonalen-Antikörper oben mit der Protein A-Säule) aufgereinigt.

Die Eluate wurden mittels BCA-Assay, Coomassie Färbung und spektrometrischer Nano Drop Messung auf ihre Konzentration untersucht und für weitere Versuch aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Um den Prozess optimieren zu können wurden zwischendurch Proben entnommen. Darauf wurden die Proben mittels SDS-PAGE/Western Blot untersucht.

4.4.1 Protein-Expression in High-Five-Zellen

Zuerst wird das Verfahren in Adhärenzkultur beschrieben. Mindestens 90% konfluente Zellen wurden mit frischem Kulturmedium, dem das Virus in der entsprechenden Konzentration zugesetzt war, infiziert. Zuvor wurden von zwei 175cm²-großen konfluenten Flaschen (T175) die Zellen wie oben beschrieben abgelöst und anschließend auf vier weitere T175-Flaschen mit ca. 7-10 Mio. Zellen/Flasche aufgeteilt. Ca. zwei Tage später erfolgt die Infektion bei annähernder Konfluenz.

Zur Bestimmung der optimalen Virusverdünnung wurde vier T-75-Flaschen genutzt. Sie enthielten in Adhärenzkultur mindestens 90% konfluente High-Five-Zellen. Eine Flasche diente als Negativ-Kontrolle für die Gewinnung von KL1-negativen, konditioniertem Medium und als Kontrolle der Vitalität der Zellen ohne Infektion. Die drei anderen Flaschen wurden mit 3 verschiedenen Verdünnungen infiziert (1:20, 1:100, 1:300 Virusmedium oder 1:5, 1:10, 1:20). Dazu wurde dem High-Five-Kulturmedium das Virusmedium in entsprechender Verdünnung zugesetzt.

Außerdem wurde der optimale Zeitpunkt (zwischen 24-, 48- und 72h, T1-3) und der optimale Mediumsabnahme-Modus getestet. Zwei Verfahren wurden dabei evaluiert:

1. Akkumulation (einmalige Abnahme des nach 3 Tagen), dabei wurden täglich Proben genommen, um den zeitlichen Verlauf im Medium nachzuvollziehen
2. Wiederholte Abnahme des Mediums alle 24h für 3-5 Tage und die jeweilige Beprobung der entstehenden Intervalle; nach Abnahme erfolgte die erneute Inkubation mit frischem Kulturmedium zur Konditionierung

In vier Flaschen mit High-Five-Zellen diente eine als eine Negativ-Kontrolle C und Flaschen 1-3 zur Infektion mit variabler Virusverdünnung.

Nach Abnahme des Mediums erfolgte eine Poolung der verschiedenen Flaschen (aus Flaschen 1-3) mit infiziertem Medium, um rekombinante Protein aus allen Ansätzen aufzureinigen. Alle folgenden Prozesse wurden möglichst auf Eis durchgeführt, um die Stabilität des Proteins zu erhöhen.

4.4.2 Aufreinigung mittels ÄKTA™ start

Für den Vergleich zweier Läufe der Aufreinigung wurden je 45 ml des gleichen konditionierten Mediums über die gleiche Säule an unterschiedlichen Tagen dargestellt. 90ml Medium aus 3 infizierten Flaschen war dazu gepoolt, zu zwei Fraktionen á 45ml aufgeteilt und dann weggefroren worden. Für die Durchläufe wurden dann 45 ml auf Eis aufgetaut.

Nun erfolgte eine Biotin-Blockierung. Dies war nötig, da das Kulturmedium (Express Five SFM) Biotin enthält. Dieses bindet an den Liganden der Säule, Streptavidin (222). Um zu verhindern, dass die Säule ihre Valenzen durch Bindung an Biotin verliert, musste dieses geblockt und abzentrifugiert werden. Dazu wurde das Medium mit 10x Buffer W und 2,4ml/l BioLock-Solution (enthält Avidin) vermischt. Nach einer Inkubation von 15min auf Eis, wurde das Medium für 20 min bei 10.000 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und weiterverwendet. Der Überstand wurde auf seinen pH-Wert überprüft und ggf. auf seinen Zielwert (pH=8) eingestellt.

Das ÄKTA™ start -System wurde mit der Strep-Tactin-Superflow Säule nach Herstellerangaben konnektiert. Und das System wurde zu Vorbereitung zunächst mit 10CV (50ml bei 5ml Säule) hochreinem Wasser mit einer Flussrate von 2 ml gespült. Anschließend mit 2 CV Buffer W bei gleicher Flussrate.

Nun wurde das Medium bei einer Flussrate von 0,5 ml/min in das System infundiert. Das durchgelaufene Medium wurde gesondert aufgefangen und in 5ml Schritten fraktioniert (sog. Durchlauf). Darauf erfolgte der Waschschrift mit Buffer W von 5 CV bei einer Flussrate von 1 ml/min, um ungebundene Proteine zu entfernen. Dabei wurde alle 5ml fraktioniert, um einen zeitlichen Verlauf darstellen zu können.

Es folgte der Elutionsschritt mit 3CV Puffer E bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Eluate von in 4 ml Schritten fraktioniert.

Die Regeneration der Säule wurde wie folgt bei einer Flussrate von 2 ml/min durchgeführt: 15CV Buffer R und 8 CV Buffer W wurden durch das System geleitet. Die Säule wurde diskonnektiert und bei 4°C gelagert. Das System wurde mit 8 CV hochreinem Wasser und abschließend mit 20% Ethanol weitergespült.

Für die Evaluation des Gesamtprozesses wurden die verschiedenen Schritte beprobt:

1. Das konditionierte Medium aus den verschiedenen Flaschen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion,
2. das gepoolte konditionierte Medium nach Abnahme für die Aufreinigung,
3. das Medium nach der Avidin-Blockierung und Einfrieren/Auftauen vor Applikation auf die Säule,
4. das fraktionierte Durchlauf,

5. der fraktionierte Waschschrift und
6. die Eluate.

Diese Proben wurden durch SDS-PAGE/Western Blot auf ihren KL1- bzw. KL Δ TM-Gehalt geprüft.

Für die Evaluation wurden verschiedene Quotienten gebildet:

Tabelle 19: Definitionen für die Evaluation der Strep-Tag-Aufreinigung und Infektion.

Quotient	Definition [in %]	Fragestellung
Gesamtprozess-Effektivität	Eluat 1/Gepooltes Medium direkt nach Abnahme	Verhältnis des KL1-Gehalts nach Poolung zu resultierenden Eluat
Überbrückungswert	Medium vor der Säule/Gepooltes Medium direkt nach Abnahme	Verlust von KL1 während Einfrieren, Auftauen, Biotin-Blockade
Aufreinigungs-Effektivität	Eluat 1/Medium vor der Säule	Effektivität der Aufreinigung
Durchlaufs-Proteinanteil	Durchlauf fraktionen//Medium vor der Säule	Anteil ungebundenes KL1 im Durchlauf
Waschschrift-Proteinanteil	Waschschrift fraktionen/Medium vor der Säule	Anteil nicht-sicher gebundenes KL1 im Waschschrift

Anschließend wurden die Eluate auf ihre KL1-Konzentration untersucht werden. Dazu wurden Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen, BCA-Assays und spektrometrische Messungen mittels Nano Drop durchgeführt.

4.4.3 Ammoniumsulfat-Präzipitation und Ultrafiltration mit Amicon-Gefäßen

Als Alternative zur Biotin-Blockierung wurde die Kombination aus Ammoniumsulfat-Fällung und einer Ultrafiltration mit Amicon-Gefäßen in Erwägung gezogen.

Die Ammoniumsulfat-Fällung diente dabei der Volumenreduktion des konditionierten Mediums, der Erhöhung der Reinheit sowie Konzentration und Erhöhung der Stabilität des Proteins (219). Denn Salze wie Ammoniumsulfat führen zu einer Reduktion der Löslichkeit, ohne das Protein zu denaturieren. Niedrige Konzentrationen führen zu Ausfällung von großmolekularen Proteinen, während hohe Konzentrationen kleinere Proteine präzipitieren (219).

Um eine 100% gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung zu erhalten, wurde Ammoniumsulfat als Feststoff langsam in dH₂O unter mit einem Magnetrührer gelöst, sodass der Überschuss an Kristallen auch noch nach einer Nacht bei 4°C vorlag. Es wurden 71,76 g Ammoniumsulfat 100ml Wasser zugesetzt. Es entstand 100% Lösung mit einem finalen Volumen von ca. 140ml. Auch alle folgenden Vorgänge wurden bei 4°C durchgeführt, da die Temperatur einen erheblichen Einfluss auf die Löslichkeit des Ammoniumsulfats besitzt.

Am nächsten Tag wurde die 100% gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung dem Insektenmedium in der Menge zugegeben, um die gewünschte Konzentration an Ammoniumsulfat zu erreichen (0-90%). Dies wurde über Nacht bei langsamer Rotation auf einem Drehrad oder einem Magnetrührer bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag folgte eine Zentrifugation bei 10.000g für 15min. Das Pellet wurde in einem Zehntel des Ausgangsvolumens mit Buffer W gelöst und weiter mit einer Dialyse für die chromatografische Aufreinigung mittels ÄKTA™ Start vorbereitet.

Eine Adaptation des Protokolls fand für die Definierung der richtigen Konzentration für die Ammoniumsulfat-Fällung für KL1 statt. Es wurde frisches High-Five-Kulturmedium dem konditionierten KL1-Medium zugesetzt, um das Zielvolumen von 500 µl zu erreichen (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Pipettierschema für die AS-Fällungsreihe.

Volumen der 100%-AS-Lösung wurden auf gerade Beträge gerundet. Hier wurde konditioniertes Medium mit einem Auffüllvolumen (Kulturmedium High-Five) versetzt, um final immer 500 µl zu erreichen. Anderenfalls hätte die Lösung nicht innerhalb des Eppendorfgefäßes rotiert. Es wurde frisches Kulturmedium statt konditioniertem Medium gewählt, um die Proteinmenge konstant zu halten.

Finale % in Lösung	Multiplikationsfaktor für Vol. 100% AS-Lösung	KL1-Medium in µl	Auffüll-Vol.	Medium und Auffüllvol.	Vol. 100 % AS	Gesamt-volumen
10	0,111	50	400	450	50	500
20	0,25	50	350	400	100	500
30	0,429	50	300	350	150	500
40	0,667	50	250	300	200	500
50	1	50	200	250	250	500
60	2	50	150	200	300	500
70	2	50	100	150	350	500
80	4	50	50	100	400	500
90	9	50	0	50	450	500

Anschließend wurde wie oben beschrieben inkubiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS gelöst und TCA-präzipitiert. Der Überstand nach Zentrifugation der Ammoniumsulfatfällung wurde auch TCA-präzipitiert. Das entstehende Pellet wurde dann mit 2x Roti-Load im Verhältnis 4µl/mg Pellet aufgelöst, bei 95°C für 5min gekocht und für eine SDS-PAGE vorbereitet.

Die Amicon-Ultrafiltration eignet sich zum Pufferwechsel und dem Abzentrifugation von Molekülen, die kleiner sind als der eingesetzte Filter. Die Amiconröhrchen besitzen einen definierten Filter, dass die Passage größerer Moleküle bei Zentrifugation verhindert, sodass das Ziel war, das kleine Biotin im Anteil zu reduzieren, während KL1 zurückbleibt.

Aufgrund der Erkenntnisse der Fällungsreihe, wurde zuerst mit 30% AS gefällt. da unter 30% Ammoniumsulfat-Konzentration kaum KL1 gefällt worden war. Das Pellet wurde verworfen um nicht benötigte, v.a. große Proteine zu entfernen. Darauf wurde eine Fällung des verbliebenen Überstands mit 70- und 80%-Lösung durchgeführt. Das resuspendierte Pellet wurde anschließend in die Amicon-Gefäße überführt und zentrifugiert. Das im obigen Kompartiment erhaltene Restvolumen wurde anschließend auf seinen KL1-Gehalt mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

4.5 Uptake-Versuch von rekombinantem KL1 in HEK 293T-Zellen

4.5.1 Design

Adhärente HEK-293T-Zellen wurden mit rekombinantem KL1 inkubiert, anschließend sollte geprüft werden, ob das Protein aufgenommen wird. Dazu wurden 2 Petrischalen mit diesen Zellen mit KL1-haltigem HEK-Uptake-Medium (50% Puffer E + rk-KL1) und 2 Petrischalen einer Negativ-Kontrolle (50% Puffer E ohne rk-KL1) für 1h inkubiert. Das Geschehen wurde mit der SDS-PAGE/Western-Blot von dem Medium nach 1h, der Zelloberflächen-gebundenen

Proteinen (PBS ph-2-Fraktion) und den Zell-Lysaten untersucht. Das Medium und die PBS ph-2-Fraktion wurde auch TCA-präzipitiert, um auch geringere Konzentrationen nachweisen zu können.

4.5.2 Durchführung

Am Vortag wurden auf vier 6-cm-Petrischalen jeweils $2,65 \times 10^6$ HEK-293T-Zellen ausgesät und mit 5 ml frischem HEK-Kulturmedium (FCS-haltig) kultiviert. Vorher waren die Petrischalen einem Coating mit Poly-Ornithin unterzogen worden.

1h vor dem Uptake waren die Zellen mit 2×2 ml PBS +/- gewaschen worden, um den Rest des FCS des HEK-Kulturmediums zu entfernen und einen Mediumswechsel zum Uptake-Vorbereitungs-Medium (kein FCS) durchzuführen.

Nun wurden rekombinante KL1-Eluate aufgetaut. Es wurde ein Mastermix mit Uptake-Medium für den Versuch erstellt und eine positive und negative Probe entnommen. Pro Petrischale wurden 1,5 ml Uptake-Vorbereitungs-Medium und 1,5 ml Puffer E (+/- rk-KL1) und 100uM Chloroquin zur Blockade intrazellulärer Protein-Degradation hinzugefügt.

Dieses +/- KL1-Uptake-Medium wurde nun 1h mit den Zellen inkubiert, gleichzeitig wurde aus dem Mastermix eine Fraktion im Inkubator für 1h ohne Zellkontakt gelagert, um die KL1-Stabilität von KL1 innerhalb des +/- KL1-Uptake-Medium evaluieren zu können.

Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und zentrifugiert (4min, 3400RCF), um abgelöste Zellen zu entfernen und TCA-präzipitiert. Die Zellen wurden mit 2 ml PBS +/- gewaschen. Anschließend wurde mit 2×5 min mit 2ml PBS pH2 gewaschen, um an der Zelloberfläche gebundene Proteine zu lösen. Die ersten 2ml dieser Waschung wurden nach einer Zentrifugation (4min, 3400RCF) ebenfalls für eine TCA-Präzipitation verwendet.

Nun wurden die Zellen lysiert und folgend die Konzentration der Lysate mit BCA-Assay gemessen.

Als nächster Schritt schlossen sich SDS-PAGE/Western-Blot und der immunochemische Nachweis an.

4.6 Transport rk-Klothos über ein Blut-Hirnschranken-Modell

4.6.1 Design

Zur Untersuchung eines potentiellen Transports der Klotho-Untereinheit KL1 über die Blut-Hirn-Schranke wurde ein vitro Modell genutzt.

Dazu wurden bEND.3-Endothelzellen auf 24-well Transwell-Kulturschaleneinsätze (von nun an als „Transwells“ oder „Wells“ referiert) ausgebracht. Die Transwells dienen der Schaffung zweier Kompartimente, die durch eine konfluente Zellschicht voneinander getrennt sind (223). Diese Transwells werden auf eine 24-Well-Kulturplatte oder in das cellZcope-Gerät (Erklärung siehe 4.6.2) eingesetzt, sodass ein Kompartiment außerhalb des Transwells (Gehirn-Seite, abluminale Seite) und eines innerhalb des Transwells (Blut-Seite, luminale Seite) entstand.

Luminal wurde dem Transportmedium radioaktiv-markiertes, rekombinantes KL1 zugesetzt. Als Marker diente ^{125}I od. Nach 1h der Inkubation des Transportversuchs wurden folgenden Fraktionen erhoben: Das Medium luminal und abluminal, die Lysate der Zellen und die Zelloberfläche assoziierte Fraktion (PBS pH2-Waschungsfraktion). Als Ausgangspunkt wurde auch noch der Mastermix des luminalen Mediums vor dem Versuch gemessen (im folgenden Input oder Mastermix). Dieser wurde als 100% gesetzt.

Es folgte eine TCA-Präzipitation aller genannten Fraktionen. Die TCA-Präzipitation fällt Proteine aus Lösungen, so dass durch die Separation von Protein-assoziiertem ^{125}I -Signal (im Pellet) und freiem- ^{125}I od (im Überstand) vollzogen wurde. Sowohl Pellet als auch

Überstand einer Fraktion wurden mit dem γ -Counter Wizard2 1x60s gemessen. Die Einheit des Zerfalls ist Counts per Minute (CPM). Die oben genannten Fraktionen wurden in Prozent zu dem Mastermix angegeben.

Um die Frage nach aktivem Transport über das BHS-Modell beantworten zu können, musste die Menge an parazellulärer Diffusion geschätzt werden. Dazu wurde ^{14}C -Inulin in den luminalen Mastermix zugesetzt. Dieses wird nicht aktiv transportiert (224). Die Messung erfolgte mit einem Tri-Carb-2800- Flüssigszintillationsmessgerät.

Es folgte die Berechnung des **Transzytose-Quotienten (TQ)** mit der Formel:

$$TQ = \frac{([^{125}\text{I}] - \text{KL1 Medium abluminal} / [^{125}\text{I}] - \text{KL1} - \text{Mastermix})}{([^{14}\text{C}] - \text{Inulin Medium abluminal} / [^{14}\text{C}] - \text{Inulin Mastermix})}$$

Der TQ ist dimensionslos und sagt aus, ob das Protein abluminal vermehrt auftritt, als durch parazelluläre Diffusion zu erwarten wäre (35, 225).

Nach der TCA-Präzipitation wurde aus dem Protein-assoziiertem ^{125}I -Signal (im Pellet) und freiem- ^{125}I (im Überstand) ein Quotient gebildet (ab hier sog. **Präzipitats-Überstands-Quotient**) und dieser auf den gleichen Quotienten des Mastermixes normiert. So sollte untersucht werden, ob KL1 in einer Fraktion besonders anreichert.

Den Gruppen der Transwells wurden je nach Zuteilung und Lauf unterschiedliche Zusätze hinzugefügt. Dies diente der Beantwortung unterschiedlicher Fragestellungen. Gruppen und Läufe sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 21: Zusätze der verschiedenen Transportversuche. Die Zusätze wurden dem Transportmedium hinzugegeben. ^{14}C -Inulin wurde allen Transwells luminal für die Bestimmung der parazellulären Diffusion zugesetzt

Primäre Fragestellung	Kontrolle	Intervention	Kapitel
TQ größer/gleich 1?	10% PBS	10% ^{125}I -KL1 in PBS	5.4.1
Blockiert KL1-AK den Transport?	10% ^{125}I -KL1 in PBS + 10 $\mu\text{g/ml}$ IgG@unspezifisch	10% ^{125}I -KL1 in PBS + 15 $\mu\text{g/ml}$ PA-KL1/1	5.4.2
Beeinflussung des Transports durch Blockade von LRP1 und anderen LDL-Rezeptoren?	10% ^{125}I -KL1 in PBS + 10 $\mu\text{g/ml}$ gG@unspezifisch	1. Gruppe: 10% ^{125}I -KL1 in PBS + 15 $\mu\text{g/ml}$ B411E2 2. Gruppe: 10% ^{125}I -KL1 in PBS + 500 nM RAP	5.4.3

Es folgt die detaillierte Darstellung der einzelnen Schritte.

4.6.2 Kultivierung von bEND.3-Zellen im CellZcope

Das cellZcope ist ein Zell-Monitoring-System, um die Kapazität (CCI) der Zellschicht auf den Kulturschaleneinsätzen durch Impedanzspektroskopie und den transendothelialelektrischen Widerstand (TER) über die Zeit zu messen (226). Die Kapazität ist ein Parameter zur Bestimmung der Konfluenz der Zellschicht; die Konfluenz verhält sich antiproportional zur gemessenen CCI. Der TER hingegen ist ein Surrogat der Barrierefunktion der Zellschicht. Höhere Werte geben eine höhere Dichte der Barriere an, biologisch wird diese Dichte über die Ausbildungen von Zell-Zellkontakten, den Tight-Junctions vermittelt (223). Die Präparation und Reinigung des cellZcope-Geräts erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Kultivierung der bend.3-Zellen wurde im cellZcope-Gerät unter Bedingungen von 37°C und 5% CO₂ durchgeführt. Die Transwells (Porengröße 0.4 µm; Oberfläche, 33.6 mm²) wurden vor der Aussaat der Zellen mit einer Coating-Lösung (0,4 mg/ml Collagen IV und 0,1 mg/ml Fibronectin) präpariert, um die Haftung der Zellen zu stärken und Polarisation der Zellen zu induzieren. Die Lösung inkubierte für 1h.

Nach Aussaat von 15-30.000 Zellen pro Transwell wurden die Zellen für mindestens 6h Stunden in einem normalen Inkubator in bEND.3-Kulturmedium auf einer 24-Well-Platte, deren Wells mit dem gleichen Kulturmedium gefüllt waren, zwischengelagert, um das Festsetzen auf dem Transwell abzuwarten. Anschließend wurden die Zellen in das cellZcope-Gerät umgesetzt.

Bei Erreichen der CCI von ~1 µF/cm² oder niedriger wurde das Kulturmedium gegen bEND.3-Stimulationsmedium ausgetauscht. Dies enthielt 550nM Hydrocortison, welches der Stimulation der Tight-Junction-Bildung diente. 20h später wurde die letzte TER-Messung durchgeführt. Anhand der TER-Werte erfolgte die Zuteilung in Gruppen. Dazu wurden die Wells der Höhe des TER-Wertes nach geordnet und abwechselnd jeweils der einen oder der anderen Gruppe zugeteilt, sodass ungefähr gleiche Verteilung zwischen den Gruppen bezüglich der TER-Werte entstand. Nun konnten die Transportversuche im Radioaktivlabor durchgeführt werden.

Die Präparation und Reinigung des cellZcope-Geräts erfolgte nach Herstellerangaben.

4.6.3 Radioaktive Markierung von KL1 mit ¹²⁵Iod

Das rekombinante KL1, gelöst in Puffer E nach der Aufreinigung mit der Strep-Tag-Säule, sollte nun mit ¹²⁵Iod markiert werden. Um das radioaktive ¹²⁵Iod zu oxidieren und so bindungsfähig zu machen wurde ein IODOGEN-Röhrchen mit 1 ml Tris-Iodinierungspuffer gespült. Der Puffer wurde verworfen und anschließend wurde erneut 100 µl Tris-Iodinierungspuffer in das Röhrchen pipettiert. Diesem Puffer wurden nun 10µl 1mCi Na¹²⁵Iod zugesetzt und für 6 min bei Raumtemperatur inkubiert und alle 30 s vorsichtig geschwenkt. Das ¹²⁵Iod war jetzt aktiviert.

Nun für wurden 340 µl frisch aufgetautes KL1-Eluat in einem low-binding-1,5ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Diesem wurde nun die 110 µl des aktivierten ¹²⁵Iod zugefügt und für 9 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut alle 30 s vorsichtig geschwenkt.

Folgend wurde 50 µl Scavenging-Puffer dazugegeben und für 5 min inkubiert und bei Minute 1 und 4 geschwenkt. Abschließend wurde 1ml Tris/EDTA-Puffer hinzugefügt.

Um das nicht-gebundene Iod zu entfernen und das markierte KL1 zu fraktionieren, erfolgte eine Schwerkraft-Gelfiltration mit der NAP-5-Säule. Diese war mit Sephadex™ gefüllt und diente der Entsalzung, sowie dem Pufferaustausch. Große Moleküle wie Proteine durchfließen die Säule am schnellsten, während kleine Moleküle wie länger brauchen. Das Verfahren startet mit einer Äquilibration mit 10x und 1x PBS. Darauf wird die zu entsalzende Probe appliziert. Abschließend wird mit 1x PBS eluiert.

Dieser Vorgang wurde in Rahmen eines Vorversuchs außerhalb des Radioaktivlabors mit nicht radioaktiv-markiertem KL1 durchgeführt, um die jeweiligen Fraktionen auf KL1 mittels Western Blot und Antikörpern zu testen. Aufgrund der Ergebnisse im Vorversuch wurde das Protokoll etwas angepasst, um den KL1-Anteil zu maximieren. Die genauen Volumina und Fraktionierungen, sowie die des Vorversuchs sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 22: Schema der Radiomarkierung.

Schritt	Puffer	Volumen	Fraktionierungen	Proben-Nennung	Unterschied im Vor-Versuch
Äquilibration	10x PBS	1ml	--	Verwerfen	--
Äquilibration	1x PBS	1ml	--	Verwerfen	--
Applikation	¹²⁵ Iod-KL1-Tris/EDTA-Puffer	1ml	3 x 330 µl	P6 a-c	Im Vorversuch waren es noch 1,5ml KL1/PBS-Lösung, in 500 µl Schritten
Elution	1x PBS	1m	3x 330 µl	E1-E3	---

Die Eluate wurden fraktioniert und durch Kontakt mit Flüssigstickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

4.6.4 Generelles Prozedere des Transportversuchs

Im Radioaktivlabor wurde den Gruppen das luminale Medium gegen das jeweilige bEND.3-Transportmedium gewechselt (siehe oben, Tabelle 21). Für das luminale Transportmedium wurde zuvor ein Mastermix erstellt, um eine Homogenität der initialen KL1-Konzentration zu schaffen, dieser wurde auch beprobt.

Der Transport wurde durch das Umsetzen des Transwells nach 1h in ein leeres Well beendet. Nun wurde sowohl die luminale als auch abluminale Medium abgenommen und für die ¹²⁵Iod-Messung TCA-präzipitiert. Auch eine Probe für die Kohlenstoffmessung wurde entnommen.

Um die Zelloberflächen-gebundenen Proteine zu lösen, wurde zuerst mit 100 µl PBS +/- jedes Transwell gewaschen, dies wurde verworfen. Anschließend wurde zwei Mal mit 50 µl PBS pH2 für 5 min gewaschen und dann aus die zwei Waschungen gepoolt und TCA-präzipitiert. Die Zellen innerhalb der Transwells mit 50 NaOH für 1min inkubiert und so lysiert. 2-3 Transwells wurden gepoolt und dann TCA-präzipitiert.

Die Zusammensetzung und Kennzeichnung, sowie der Probenvorbereitung für die TCA-Präzipitation ist dieser Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 23: Proben der Transportversuche.

Fractionen	Kennzeichnung	Typ	Vorbereitung vor Messung	Isotop
Mastermix	Mas +/-	TCA-P.	80+ 400PBS+ 3µl BSA (100mg/ml) + 160 TCA15%	¹²⁵ -Iod
Mastermix	Mas SN +/-	TCA-Überstand	Überstand	¹²⁵ -Iod
Medium luminal	MTL	TCA-P.	80+ 400PBS+ 3µl BSA (100mg/ml) + 160 TCA15	¹²⁵ -Iod
Medium abluminal	MTA	TCA-P.	480µl+ 3µl BSA (100mg/ml) + 160 TCA15	¹²⁵ -Iod

Medium luminal	MSL	TCA-SN	Überstand	¹²⁵ I-iod
Medium abluminal	MSA	TCA-SN	Überstand	¹²⁵ I-iod
pH2 Fraktion	PT	TCA-P.	2x50µl + + 3µl BSA (100mg/ml) + 35,33 TCA15	¹²⁵ I-iod
pH2 Fraktion	PS	TCA-SN	Überstand	¹²⁵ I-iod
Lysate (2-3 Wells gepoolt;	LT	TCA-P.	3x50µl+ 3µl BSA + 52,98 TCA15	¹²⁵ I-iod
Lysat	LS	TCA-SN	Überstand	¹²⁵ I-iod
Mastermix	Mas +/-	nur abgenommenes Medium	80 µl +1ml Amplifier	¹⁴ C-Inulin-Messung
Medium luminal für ¹⁴C-Inulin-Messung	CL	nur abgenommenes Medium	15µl + 1ml Amplifier	¹⁴ C-Inulin-Messung
Medium abluminal für ¹⁴C-Inulin-Messung	CA	nur abgenommenes Medium	80µl + 1ml Amplifier	¹⁴ C-Inulin-Messung

4.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes Graph Pad Prism 9. Es wurden ungepaarte, parametrische T-Tests für den Vergleich zweier Gruppen oder eine one-way-ANOVA beim Vergleich von mehr als 2 Gruppen durchgeführt. Außerdem wurde ein Dunnetts-Test beim Vergleich mehrerer Variablen verwendet. Ein Unterschied galt bei einem p-Wert von kleiner 0,05 als signifikant. Graphen wurden ebenfalls mit Graph Pad Prism 9 erstellt.

Signifikante Unterschiede wurden in den Graphen folgendermaßen dargestellt:

* $P \leq 0,05$

** , $P \leq 0,01$

***, $P \leq 0,005$

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung und Aufreinigung des Klotho-Antikörpers

Es wurden vier polyklonale Antiseren gegen jeweils zwei Zielsequenzen in den zwei Klotho-Untereinheiten KL1 oder KL2 getestet. Diese stammten aus immunisierten Kaninchen. Das letzte polyklonale Serum stammte von Tag 160 nach Immunisierung.

Zuerst wurden die Kandidaten auf ihre Fähigkeit geprüft, fl-Klotho aus transient-transfizierten HEK293T-Lysaten nach SDS-PAGE und Western Blot zu erkennen. Nach der Identifikation eines geeigneten Kandidaten wurde dieser auf seine optimale Konzentration zur Detektion geprüft. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mit Affinitäts-Chromatografie. Der aufgereinigte polyklonale Antikörper wurde auf seine Funktionalität geprüft und die optimale Konzentration, sowie die Magermilchkonzentration des tragenden Puffers bestimmt. Es folgte ein Vergleich des kommerziellen Anti-KL1-Antikörper KM2076 (217) gegen den aufgereinigten Kandidaten.

5.1.1 Identifikation eines Kandidaten

Die Anti-Seren KL1/1 und KL1/2 (Anti-Seren gegen KL1 aus Tier 1 und 2) und KL2/1 und KL2/2 (Anti-Seren gegen KL2 aus Tier 1 und 2) wurden auf ihre Fähigkeit Klotho zu erkennen getestet. Dazu wurde Zell-Lysate von transient-transfizierten HEK293T mit fl-Klotho genutzt (Abbildung 1).

KL1/1 und KL1/2 zeigten auf der erwarteten Höhe von 130-135kDa in den Lysaten von mit Klotho transient-transfizierten Zellen Doppelbanden, die so nicht in der Kontrolle sichtbar war.

KL2/1 und KL2/2-Anti-Seren hingegen schienen kein Klotho-spezifisches Signal zu detektieren (Abbildung 1). Dieser Befund erhärtete sich bei einer Wiederholung des Versuchs fl-Klotho aus dem gleichen HEK-Zell-Lysat zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

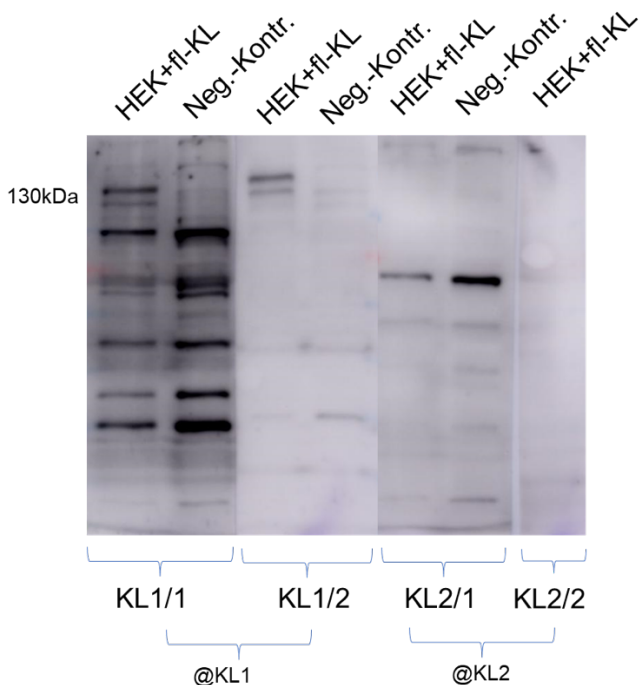


Abbildung 1: Identifizierung polyklonaler Antiseren gegen KL1 und KL2. Es wurden HEK293T-Zellen transient mit Klotho (+KL) transfiziert; die Kontrolle C mit einem Leervektor (pcDNA). Die Zellen wurden 24h später lysiert. Die Lysate (20µg) wurden paarweise +KL und C 4-mal auf ein Polyacrylamid Gel 10% aufgetragen. Später folgte die Inkubation mit den verschiedenen primären Antiseren 1:1000 in TBS-T mit 5% Milchpulver. Danach wurde der sekundäre Antikörper Ziege@Kaninchen 1:10000 appliziert. PAGE-Ruler wurde als Marker verwendet.

Darauf folgte der Vergleich des vielversprechenden KL1/1- und KL1/2-Anti-Serum mit dem kommerziellen KL1-Antikörper KM2076. In Abbildung 2 zeigte sich recht spezifische Detektion des fl-Klotho aus Lysat von transient-transfizierten HEK-Zellen durch beide KL1-Kandidaten. Der kommerzielle Antikörper KM2076 zeigt auf identischer Höhe Doppelbanden. Interessanterweise zeigte sich hier keine Doppelbande bei KL1/1.

Abbildung 2 zeigte zusätzlich, dass das KL1/2-Antiserum auch niedrigeren Verdünnungen (1:2000-1:3000) zuverlässig Klotho detektierte.

Für das KL1/1-Antiserum hingegen ergab sich ein Bereich spezifischer Detektionsbereich in den Verdünnungen von 1:500-1:2000 (Daten nicht gezeigt).

Sowohl das KL1/1- und KL1/2-Antiserum stellten somit vielversprechende Kandidaten dar. Für das weitere Projekt wurde das KL1/1-Anti-Serum ausgewählt, um aufgereinigt zu werden. KL2/1 und KL2/2 detektierten keine spezifische Bande in den Lysaten.

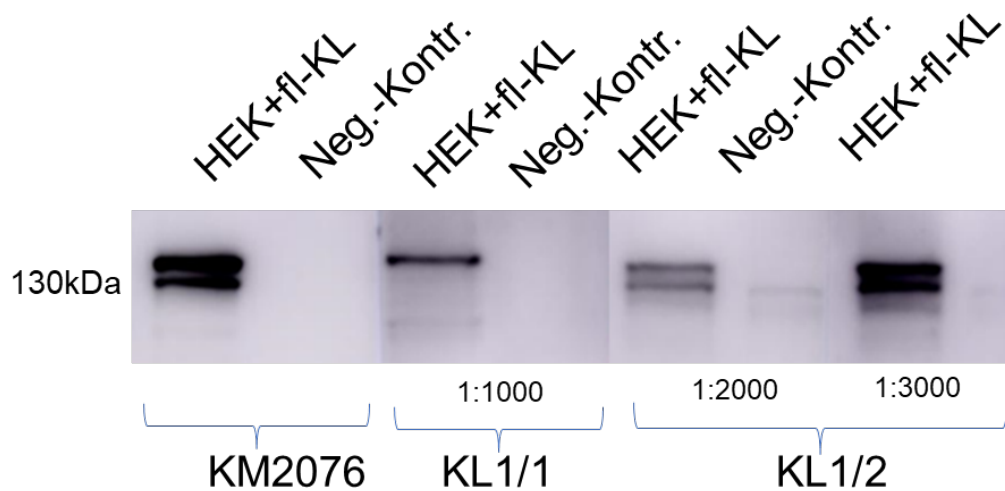


Abbildung 2: Vergleich KL1-gerichteter Antiseren und mit kommerziellem KM2076. Es wurden HEK293T-Zellen transient mit Klotho (+KL) transfiziert. Die Kontrolle C mit einem Leervektor (pcDNA). Die Zellen wurden 24h später lysiert. Die Lysate (20µg) wurden paarweise +KL und C 4-mal auf ein Polyacrylamid Gel 10% aufgetragen. Die verschiedenen Abschnitte der Membran wurden mit KM2076 (1:1000), KL1/1 (1:1000), KL1/2 in 1:2000 und 1:3000 inkubiert. Als sekundäre Antikörper dienten Ziege@Ratte 1:10.000 bei KM2076 und für die anderen Ziege@Kaninchen 1:10.000. PAGE-Ruler wurde als Marker verwendet.

5.1.2 Aufreinigung des Antiserums mittels ÄKTA™ start

Das Anti-Serum KL1/1 wurde nun durch eine Affinitäts-Chromatographie mit einer Protein-A-Säule aufgereinigt. Darauf folgte die Konzentrationsbestimmung. Zuerst wurde sie mit einer Nano-Drop-Messung geschätzt und wurde anschließend mit einer Coomassie-Färbung und densitometrischen Messung näher bestimmt.

Abbildung 3 zeigt das Coomassie-gefärbte Polyacrylamid-Gel nach SDS-PAGE. Die drei Eluate mit der höchsten Proteinkonzentration in der spektrometrischen Nano Drop-Messung wurden fortlaufend aufgetragen. Tabelle 24 fasst die Konzentrationen in den Nano Drop-Messungen und die aus der Coomassie-Färbung densitomerisch-bestimmten Konzentrationen zusammen.

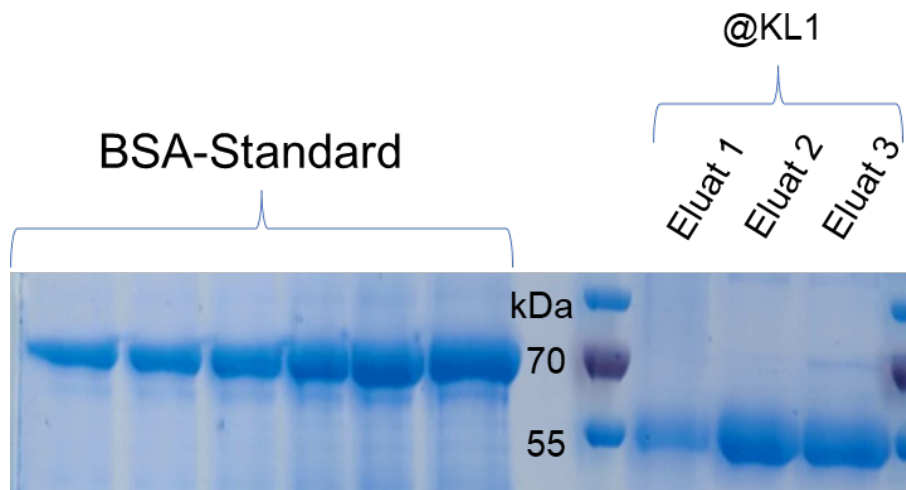


Abbildung 3: Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten Antikörpers PA-KL1/1. Coomassie Färbung eines 10% Polyacrylamid-Gels. Aufgetragen ist ein BSA-Standard (4,5µg/5µg/7,5µg/10µg/12,5µg/15µg). Außerdem wurden je 20µg der fraktionierten Eluate des Antiserums KL1/1 nach Aufreinigung über die Protein-A-Säule aufgetragen. Eluate 1 und 2 des Antikörpers gegen KL1 wurden nur 10µg aufgetragen, um im Bereich der Standardreihe zu liegen.

Tabelle 24: Konzentrationen der eluierten Antikörper PA-KL1/1. Bei der Aufreinigung der Antiseren entstanden fraktionierte Eluate. KL1-E1 bis E3 stellen die Eluate des KL1/1-Antiserums dar. Hier sind die Messergebnisse der Konzentration der Fraktionen nach Nano-Drop und der densitometrischen Bestimmung nach Coomassie-Färbung und deren Auswertung mittels Image J dargestellt. Für die Konzentrationsbestimmung wurde densitometrisch die Intensität des Signals der BSA-Standards bei bekannten Konzentrationen) mit den der Eluate auf Höhe der schweren Ketten ins Verhältnis gesetzt. Aus dem BSA-Standard und der Konzentration konnte über eine lineare Regression auf die Konzentration der Antikörper in den Eluaten geschlossen werden.

Eluate	Nano Drop in µg/µl	Errechnete Konzentration der Eluate in µg/µl (basierend auf Coomassie-Färbung)
KL1-E1	8,15	9,79
KL1-E2	10,2	25,74
KL1-E3	0,82	0,51

Die Eluate wurden anschließend verdünnt, fraktioniert und bei -20°C gelagert und unter dem Namen PA-KL1/1 (*purified antibody @KL1 from animal 1*) weitergeführt.

5.1.3 Funktionstest und Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers

Um die optimale Konzentration weiter zu bestimmen, wurden verschiedene Verdünnungen (1:100-1:2000) bzw. Konzentrationen (1,5-30 µg/ml) zur Detektion von rk-KL1 bei ca. 60kDa

in Insektenmedium getestet. Bei niedrigen Verdünnungen (1:100-1:250) zeigte sich die Zunahme einer unspezifischen Bande knapp oberhalb der relevanten Bande. Verdünnungen von 1:1000-2000 zeigten diese Bande nicht. KL1 wurde bis hin zu einer Verdünnung von 1:2000 detektiert (Daten nicht gezeigt).

Um die Spezifität zu erhöhen, wurden verschiedene Milchpulverkonzentrationen in dem Puffer TBS-T getestet (1-5%). Der Antikörper war bei Zusatz von 5% Magermilchpulver am spezifischsten. 1-4% Zusatz ergab unspezifischere Signale (Daten nicht gezeigt).

Um ein komplettiertes Bild von der Spezifität im Vergleich zu dem kommerziellen Antikörper KM2076 zu bekommen, wurden auf einem Blot verschiedene Proben aufgebracht, die wichtig im Rahmen dieses Projektes waren. Es handelte sich dabei um konditioniertes Insektenmedium mit sekretiertem rekombinanten KL1, aufgereinigtes rekombinantes KL1 und KL Δ TM (Herstellung siehe 4.4 und 5.2), und noch einmal Lysate von Klotho-positiven Zellen. Um die Spezifität abzuschätzen, wurden entsprechende negative Kontrollen aufgetragen.

Auf Abbildung 4 ist erkennbar das KM2076 (links) insgesamt spezifischer ist und weniger unspezifische Banden zeigt. Allerdings detektierten beide Antikörper sowohl das rekombinante KL1 bei ca. 60kDa in Insektenmedium als auch als eluiertes, rekombinantes Protein nach erfolgter Aufreinigung. Das aufgereinigte rekombinante KL Δ TM bei 130kDa und das Klotho aus Lysaten von Klotho-transfizierten Zellen werden ebenso detektiert.

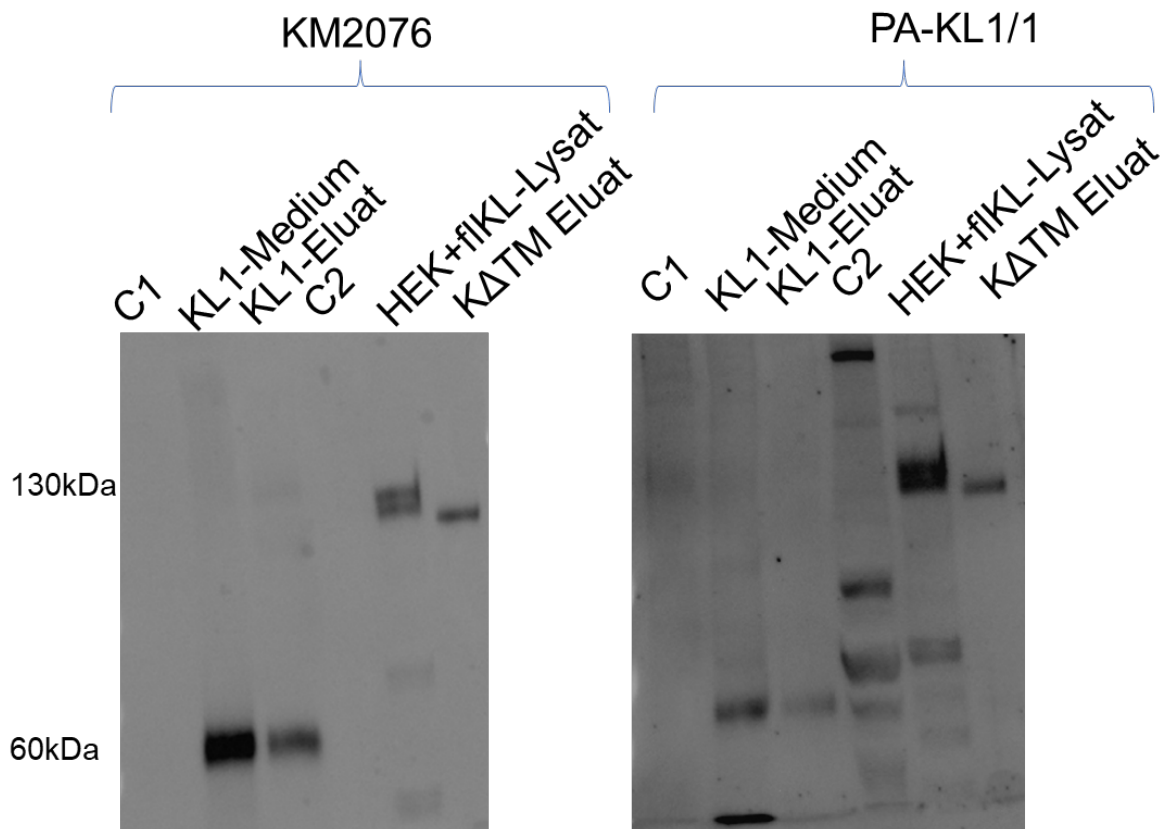


Abbildung 4: Vergleich der Antikörper PA-KL1/1 und dem kommerziellen KM2076. Auf der linken Seite erkennt man die Inkubation mit 1:1000 KM2076 (sekundär Ziege@Ratte, 1:10000), auf der rechten Seite erkennt man die Inkubation mit PA-KL1/1 1:1000, sekundär Ziege@Kaninchen). Auf ein 6%-Polyacrylamid Gel wurden je 25 μ g Protein (bei den Lysaten) bzw. 25 μ l des konditionierten High-Five-Insektenmediums oder Eluats aufgetragen. C1 ist konditioniertes Medium von nicht-infizierten High-Five-Zellen. C2 sind mit einem Leervektor (pcDNA) transient transfizierte HEK293T Zellen. Als Marker wurde PAGE-Ruler verwendet. KL1-Medium war konditioniertes Medium von Insektenzellen, die mit einem KL1-Baculovirus infiziert worden waren. Das KL1/KL Δ TM-Eluat ist das über ein Strep-Tag-Säule aufgereinigte rk-KL1 bzw. KL Δ TM. HEK+fl-KL-Lysat ist das Lysat von transient mit fl-KL-transfizierten HEK293T-Zellen.

5.2 Expression von rekombinatem KL1 und KL Δ TM

Für die Produktion von rekombinatem KL1 bzw. KL Δ TM wurden High-Five-Insektenzellen und ein Baculovirus-System genutzt. KL1 ist eine ca. 60kDa große, extrazelluläre Untereinheit des α -Klotho. KL Δ TM besteht aus den ca. 120kDa großen extrazellulären Anteil Klothos, also KL1 und KL2. Es fehlt die Transmembran-Domäne, sowie der intrazelluläre Anteil. Die Proteine enthielten für die Aufreinigung einen Strep-Tag.

Im Vordergrund der Expression und Aufreinigung stand die rekombinante Klotho-Untereinheit KL1. Jedoch wurde auch KL Δ TM exprimiert und aufgereinigt. Zur Infektion der High-Five-Insektenzellen standen ein KL1- und ein KL Δ TM-Baculovirus von Greta Boehme zu Verfügung (37). Durch ihre Arbeit bestanden bereits erste Erfahrungen in der Expression und Aufreinigung der genannten rekombinanten Proteine (37). Die Herstellung sollte weiter charakterisiert und optimiert werden.

Als erstes wurde die optimale Verdünnung des Virusmediums bestimmt, sowie die Konditionierungszeit nach Infektion. Zudem wurde getestet, welcher Abnahmemodus des Mediums geeignet ist, um mehr KL1 zu gewinnen (Akkumulativ und oder durch wiederholte Abnahme, Erklärung siehe unten).

Das entstandene konditionierte Medium wurde mit Hilfe einer Affinitätschromatografie mit einer Strep-Tactin-Superflow-Säule durch den Strep-Tag am rekombinanten Protein aufgereinigt. Dieser Prozess wurde evaluiert.

Um das konditionierte Medium im Volumen zu minimieren, eine höhere Reinheit zu generieren und auch eine höhere Konzentration des rekombinanten KL1 bzw. des KL Δ TM-Eluats zu erreichen, wurde eine Ammoniumsulfat-Fällung mit einer anschließenden Ultrafiltration evaluiert.

5.2.1 Definition der Virusverdünnung für rk-KL1

Als erstes wurde die produktivste Verdünnung des Virusmediums für die KL1-Expression bestimmt.

Im rechten Teil der Abbildung 5 wurden die Verdünnungen 1:20, 1:100: 1:300 nach 72h kumulativer Sammlung des konditionierten Mediums dargestellt. 1:20 zeigte dabei das intensivste Signal beim Nachweis von KL1 im Western Blot, sodass sie als produktivste Verdünnung angenommen wurde. Noch höhere Viruskonzentrationen brachten keinen weiteren Vorteil (Abbildung 5, Konzentrationen bis 1:5, Cave: anderes Konditionierungsverfahren).

Im folgenden wurde die Verdünnung 1:20 als produktivste für die Infektionen angenommen.

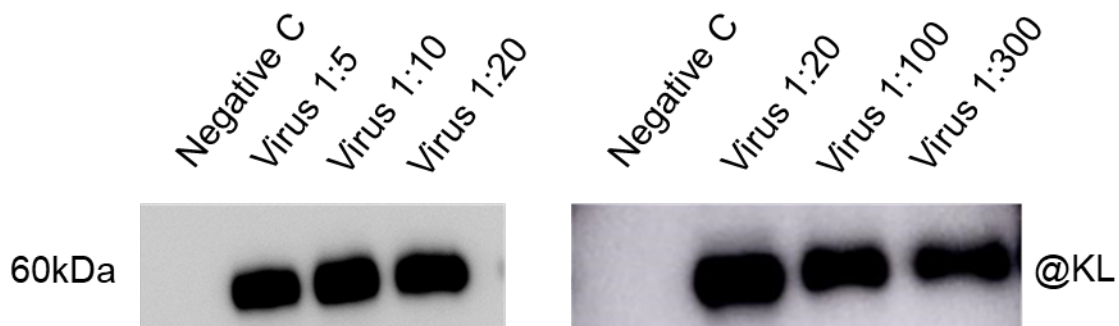


Abbildung 5: KL1-Expression in Abhängigkeit von der Virusverdünnung. Das KL1-Baculovirus wurde dem High-Five-Kulturmedium in verschiedenen Konzentrationen (1:5-1:300) zugesetzt. Das konditionierte Medium wurde abgenommen und auf seinen KL1-Gehalt geprüft. Der linke Teil der Abbildung ist das Bild nach 48h nach wiederholter Abnahme des Mediums (Intervall 24-48h). Hier wurden 25 μ l auf ein 6%-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Der rechte Teil der Abbildung stellt das Medium nach kumulativer Abnahme nach 72h dar. Hier auf einem 10%-Polyacrylamid-Gel. Kontrolle war jeweils das konditionierte Medium von nicht-infizierten Zellen. Primär

Antikörper war KM2076 (1:1000). Sekundär Antikörper war Ziege@Kaninchen (1:10.000). Als Marker wurde PAGE-Ruler verwendet.

5.2.2 Definition des Konditionierungsmodus für rk-KL1

Zwei Konditionierungsmodi des Insektenmediums wurden getestet, um zu evaluieren, wie und wann am meisten KL1 pro Infektion zu gewinnen war:

1. Akkumulation (einmalige Abnahme des Mediums nach 3 Tagen)
2. Wiederholte Abnahme des Mediums alle 24h für 3-5 Tage, nach Abnahme erneute Inkubation mit frischem Kulturmedium zur Konditionierung.

Zuerst wird die Akkumulationsmethode (1.) dargestellt. Abbildung 6 zeigt unterschiedliche Zeitpunkte (24-72h) nach Infektion mit dem KL1-Baculovirus bei gleicher Viruskonzentration (1:20) in 4 unterschiedlichen Flaschen mit High-Five-Zellen (eine Negativ-Kontrolle C und Flaschen 1-3 zur Infektion). Vom Zeitpunkt 24h auf 48h zeigte sich ein deutlicher Zugewinn an KL1-Signal, während es in den folgenden 24h Stunden nicht mehr bedeutend zunahm. Dafür ließ sich eine Zunahme unspezifischer Banden unterhalb der 60 kDa erkennen.

Durch die Akkumulationsmethode entstand so pro infizierter Flasche 33ml konditioniertes Medium pro Infektionsdurchlauf.

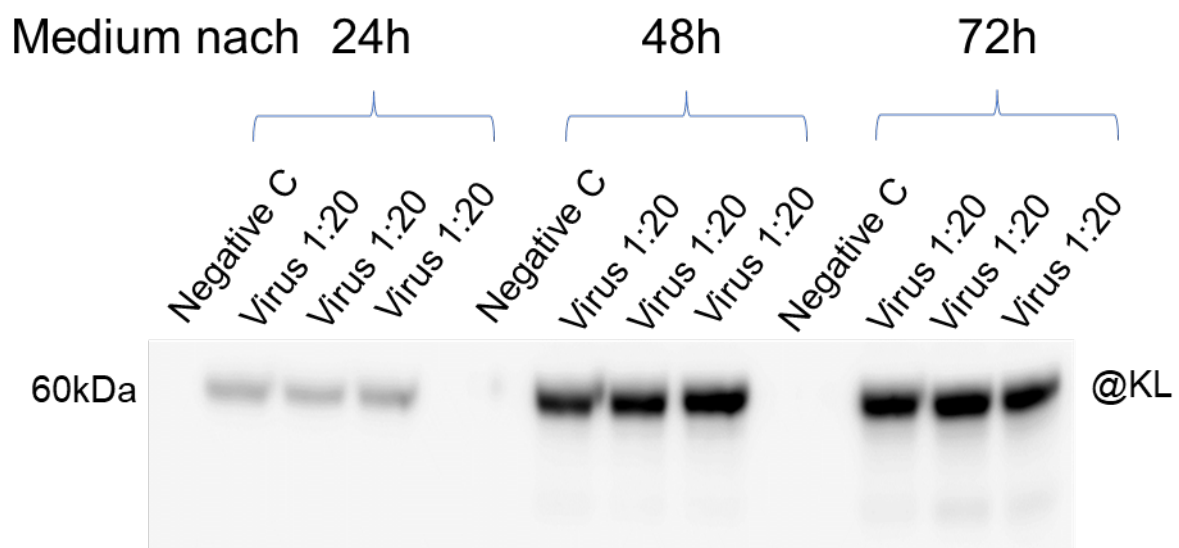


Abbildung 6: Akkumulationsmethode über 72h. Auf ein 8%-Polyacrylamid-Gel wurden je 25µl des konditionierten Mediums zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgetragen. Dabei wurde alle 24h 100µl aus den 4 Flaschen entnommen, der Rest des Mediums jedoch belassen. Jede Flasche war mit der gleichen Virusverdünnung (1:20) infiziert worden. Als Marker diente der ABCAM-Protein-Marker. Primär Antikörper war KM2076 (1:1000). Sekundär Antikörper war Ziege@Kaninchen (1:10.000).

Als nächstes wurde die wiederholte Abnahme des Mediums alle 24h getestet (Methode 2.).

Durch die Testung der wiederholten Abnahme war es auch möglich auf die Expressionsleistung innerhalb verschiedener Intervalle nach Infektion zu schließen. In dem konditionierten Medium im Zeitraum von 0-24 h zeigte sich dabei ein schwaches KL1-Signal (Abbildung 7), was einen analogen Befund zu Abbildung 6 (Akkumulationsmethode darstellt). Während im Intervall von 24-48h und dem folgenden Intervall 48-72h etwa gleich starke Signale entstehen, die jedoch beide deutlich intensiver waren als das Signal des Intervalls 0-24h. In den folgenden Intervallen (ab 72 bis 120h) sank das Signal stark ab (Abbildung 7).

Auch die Adhärenz der Zellen am Flaschenboden wurde über den zeitlichen Verlauf beobachtet. Bis zu 30-40% der Zellen waren nach 72h abgelöst, nach 96h waren es über 50% und nach 120h über 70%.

Pro abgelaufenem 24h Intervall einer infizierten Flasche entstanden 33ml konditioniertes Medium.

Der Vergleich der Abnahme-Modi ist ebenfalls auf Abbildung 7 dargestellt. Hier war die Positivkontrolle „+“ das gepoolte Medium aus der kumulativen Abnahme-Methode. Das entstehende Signal ist dabei nicht wesentlich intensiver als das bei den Intervallen 24-48h und 48-72h in der Wiederholten-Abnahme Methode.

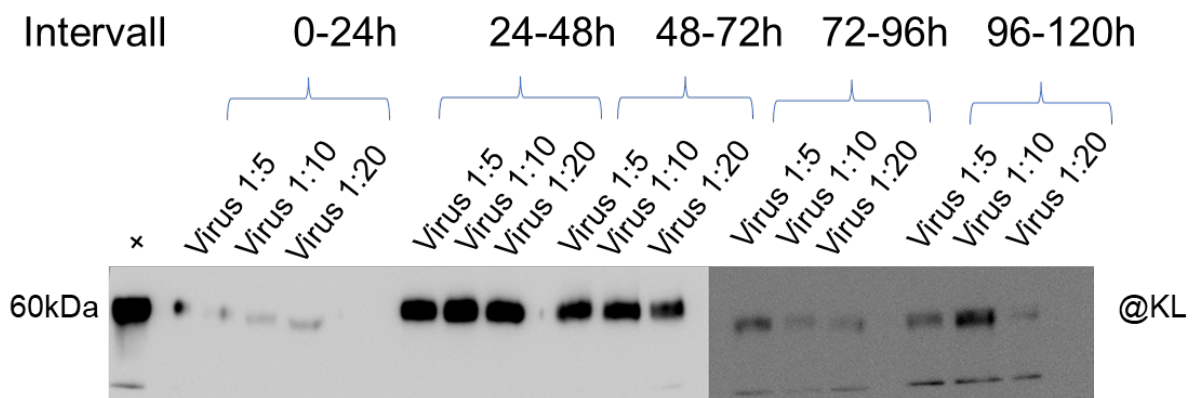


Abbildung 7: Wiederholte Mediumsabnahme alle 24h. Es wurden 3 Flaschen mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen infiziert (1:5, 1:10, 1:20; Flaschen 1-3). Dabei wurde alle 24h 33ml des Mediums erneuert. Aus dem abgenommenen Medium wurden 100µl zur Testung gesichert. Auf ein 6%-Polyacrylamid-Gel wurden je 25µl des konditionierten Mediums der verschiedenen Intervalle aufgetragen. Die Positiv-Kontrolle „+“ war gepooltes Medium aus einer mittels Akkumulationsmethode geführten Mediums nach 72h. Als Marker diente ABCAM Protein-Marker. Primär Antikörper war KM2076 (1:1000). Sekundär Antikörper war Ziege@Kaninchen (1:10.000). Die Intervalle 72-120h liefen auf einem anderen Gel. Jedoch war das Intervall 48-72h ähnlich intensiv bezüglich des KL1 Signals, wie auf dem Gel mit den Intervallen 0-72h, sodass von einer Vergleichbarkeit ausgegangen wurde.

5.2.3 KL1-Aufreinigung mit ÄKTA™ start

Die Aufreinigung des konditionierten Mediums erfolgte mit der Affinitäts-Chromatografie über die ÄKTA™ start und eine Strep-Tactin-Säule. Dieser Prozess wurde Schritt für Schritt evaluiert, um feststellen zu können, wie effektiv die Aufreinigung war.

Abbildung 8 zeigt den Vergleich vom Startpunkt des Aufreinigungsprozesses nach Poolung des KL1-Insektenmediums und das Ende mit den resultierenden KL1-Eluaten. Hier sind zwei Läufe der Aufreinigung des gleichen konditionierten Mediums über die gleiche Säule dargestellt ((A) war Lauf 1, (B) war Lauf 2). Daraus ließ sich densitometrisch die Gesamtprozesseffektivität bestimmen (Definitionen siehe Tabelle 19 in 4.4.2)

In beiden Durchläufen zeigt sich beim gepoolten Medium ein deutliches KL1-Signal auf Höhe von ca. 60kDa. Eluat 1 entsprach ca. 58% im Vergleich zum gepoolten Medium, also einer Gesamtprozesseffektivität von 58%. Im Verlauf der Eluate von 1-4 nahm die KL1-Konzentration weiter ab (E2 hatte noch 21,1%, E3 9,5%).

Im Lauf 2 war die Gesamtprozesseffektivität noch stärker reduziert als bei Lauf 1 (statt 58% nur noch 42,4%). Der Vergleich von Eluat 1 aus dem ersten Lauf mit dem aus dem zweiten Lauf zeigte eine Verminderung der Signalintensität von ca. 77% in Lauf 2.

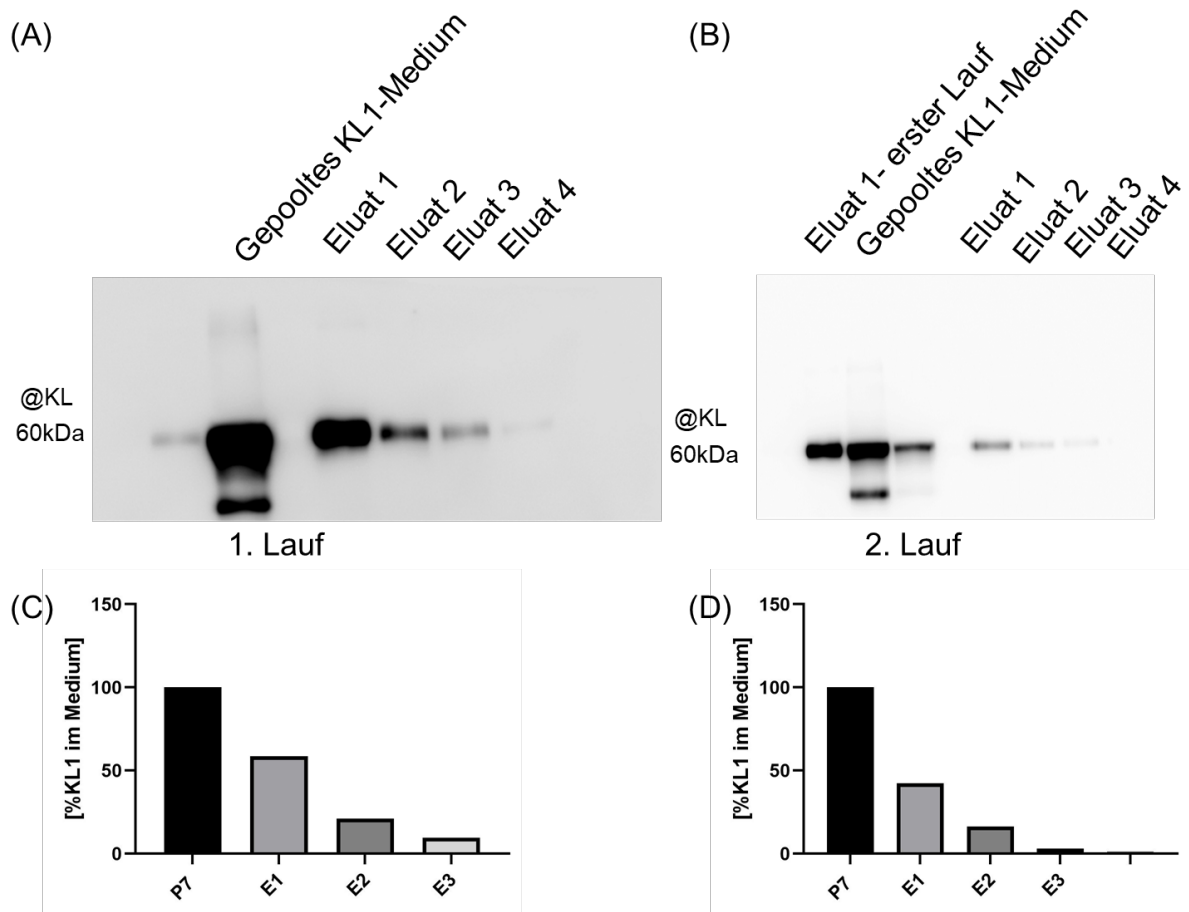


Abbildung 8: Gesamtprozesseffektivität der KL1-Expression und Aufreinigung. Dargestellt sind Aufreinigung zweier Durchgänge des gleichen konditionierten Mediums (war gepoolt, halbiert und dann weggefroren worden) nach dem gleichen Aufreinigungsprotokoll über dieselbe Säule. Je 25µl des gepoolten, nach Akkumulationsmethode abgenommenen Mediums wurden aufgetragen (P7) wurden auf eine 8%-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Als Marker diente der ABCAM-Protein-Marker. Primär Antikörper war KM2076 (1:1000). Sekundärer Antikörper war Ziege@Kaninchen (1:10.000). Darunter ist die densitometrische Auswertung der KL1-Signale mittels Image J dargestellt. Die ermittelten Werte wurden auf das gepoolte Medium normiert (P7).

Als nächstes erfolgte die Bestimmung der Protein-Konzentration der Eluate. Die Ponceau-Färbung von Membranen, die Eluate enthielten, machten keine Bande auf der Höhe sichtbar, auf der später Signale KL1 mittels Antikörper detektiert wurde. Ebenso konnte durch eine Coomassie-Färbung keine Bestimmung erzielt werden, da auch hier keine Färbung auf der KL1-korrespondierenden 60 kDa-Höhe möglich war (Daten nicht gezeigt). Die BCA-Messung zeigte nur Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze (Protokollnachweisgrenze 0,3 µg/µl, Daten nicht gezeigt).

Die Schätzungen der Konzentration mit dem Nano-Drop-Gerät zeigte bei gemittelter Messung folgende Ergebnisse (Tabelle 25). Die geschätzte Konzentration der stärksten Eluate der beiden vorher gezeigten Läufe betrug 0,222 mg/ml (Lauf 1) und 0,104 mg/ml (Lauf 2). Auch hier zeigte sich eine Reduktion von 53% in Lauf 2 im Vergleich zum stärksten Eluat aus Lauf 1.

Tabelle 25: Konzentrationen der KL1-Eluate (Nano-Drop). Die Tabelle zeigt die Konzentrationen der Eluate 1-3 der Läufe 1 und 2, sowie deren Volumen. Mittels dem Nano-Drop-Spektrometer wurde die Absorption bei 280nm gemessen. Das Gerät berechnete dann anhand des molaren Extinktionskoeffizienten die Konzentration. Dazu wurde die Sequenz der KL1 Glucosidase (AS-Position 57-506) mittels des Online Tools „Protein Extinction Coefficients and Concentration Calculation“ der Firma Novoprolabs ausgewertet. Diese berechnete einen ϵ_{molar} von $113790 M^{-1}cm^{-1}$ bei einem geschätzten Molekularen Gewicht von 51,46kDa.

Resultierende Eluate	Volumen	Konzentration mg/ml (Nanodrop)	In A280
Lauf 1			
E1	4	0,222	0,49
E2	4	0,011	0,025
E3	4	0,005	0,01
Lauf 2			
E1	4	0,104	0,23
E2	4	0,020	0,045
E3	4	0,009	0,02

5.2.4 Evaluation des Expressions- und Aufreinigungsprozesses

Für die Evaluation des Expressions- und Aufreinigungsprozesses schlossen sich noch detailliertere Analysen an. Es wurden die Gesamtprozesseffektivität, der Überbrückungswert und die Aufreinigungs-Effektivität bestimmt (Definitionen siehe Tabelle 19 in 4.4.2). Außerdem wurde der Proteinanteil im Durchlauf und in den Waschschrinen bestimmt.

Mittels densitometrischer Analyse der Westernblots in Abbildung 9 wurde die Evaluation durchgeführt. Die Gesamtprozesseffektivität zeigte einen Abfall des KL1-Gehaltes an, denn bei Durchlauf 1 war das Eluat 1 noch 66% so intensiv wie gepoolte Medium. Bei Durchlauf 2 waren es nur 45,5%. Diese Ergebnisse decken sich mit denen in 5.2.4. Hier waren es in Lauf 1 58%, in Lauf 2 42,4% (vgl. Abbildung 8; Cave: keine biologischen Replikate, sondern nur erneute Erhebung durch Western Blot/Densitometrie der gleichen Probe).

Der Überbrückungswert zeigte bei Durchlauf 1, dass das Medium vor der Säule nur noch 53,5% so intensiv wie nach dem Poolen war. In Durchlauf 2 wurde dagegen im Medium vor der Säule sogar mehr KL1 gemessen als im gepoolten Medium (118,2%).

Um aber den eigentlichen Aufreinigungsprozess zu beurteilen, wurde die Aufreinigungs-Effektivität bestimmt. Bei Durchlauf 1 konnte sogar eine geringe Aufkonzentrierung erreicht werden. Das stärkste Eluat ist 123,3% so intensiv wie das Medium vor der Säule. Bei Durchlauf 2 war das Eluat jedoch deutlich schwächer, nämlich nur 38,4%

Ebenso wurde der Durchlaufs-Proteinanteil erhoben. Bei Lauf 1 war das durchgelaufene Medium (P6a-c) nur ca. konstant um 30% so intensiv wie das Medium vor der Säule. Im zweiten Durchlauf waren die Signale des Durchlaufs im Mittel 65,1% so stark wie vor Applikation auf die Säule.

Der Waschschrift-Proteinanteil lag beim ersten Waschschrift im ersten Lauf bei 37,8% und im letzten bei 6,8%. Dazwischen ging es unter die Schwelle der Nachweisbarkeit.

Lauf 2 zeigte ein anderes Bild bezüglich des Waschschrift-Proteinanteils. Hier blieb die Waschfraktionen ungefähr konstant mit geringen Schwankungen um 20% Signalstärke bei den ersten vier Waschschriften. Dafür stieg im letzten Waschschrift das Signal stark auf einen Waschschrift-Protein-Anteil von 95,4%.

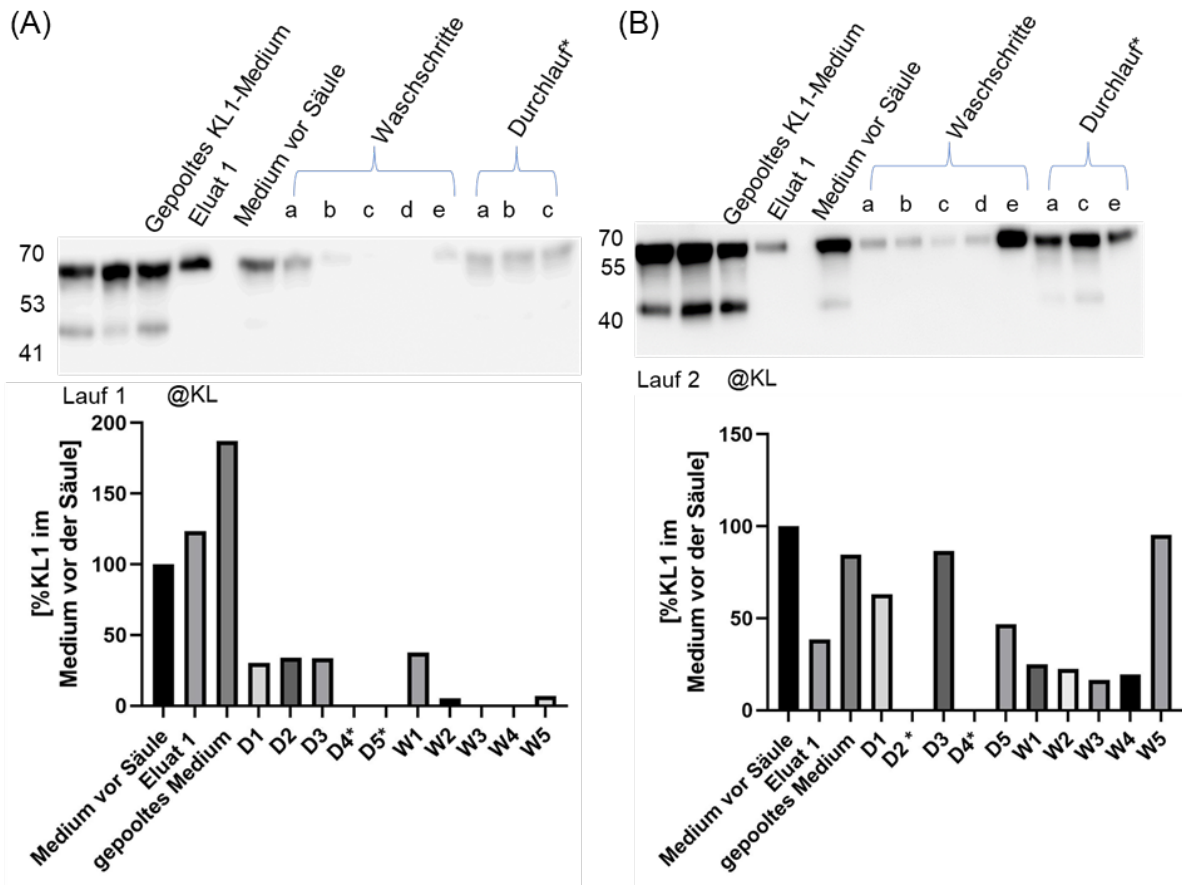


Abbildung 9: Evaluation des KL1-Aufreinigungsprozesses zweier Läufe. In Abbildung A erkennt man den ersten Aufreinigungslauf. In Abbildung (B) den zweiten Aufreinigungslauf. Oben ist die Western Blot Analyse, unten die graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung. Sie wurden auf die Fraktion „Medium vor der Säule“ normiert. Zu erkennen ist das gepoolte KL1-Medium, das beste Eluat des entsprechenden Laufs und das Medium in dem Moment bevor auf die Säule appliziert wird. Außerdem erkennt man die fraktionierten Waschschrift a-e und den Durchlauf (*a-c in Lauf 1; a, c, e in Lauf 2; mit D* sind Fraktionen gekennzeichnet, die nicht erhoben wurden). Als Marker diente der ABCAM-Protein-Marker auf dem oberen Gel, auf dem unteren war es PAGE-Ruler. Primär Antikörper war KM2076 (1:1000). Sekundär Antikörper war Ziege@Kaninchen (1:10.000). Die densitometrische Auswertung der KL1-Signale wurde mittels Image J durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mit Graph Pad Prism.

5.2.5 Optimierungsversuch mithilfe der Ammoniumsulfat-Fällung

Um das konditionierte Insektenmedium im Volumen zu minimieren, eine höhere Reinheit zu generieren und auch eine höhere Konzentration und Stabilität des rekombinanten KL1 zu erreichen, wurde eine Ammoniumsulfat-Fällung getestet.

Um zu genauer definieren, ab wann KL1 ausgefällt wird, wurde eine gleichbleibende Menge KL1-Medium mit Ammoniumsulfat-Lösung versetzt. Sodass KL1-Medium/Ammoniumsulfat-Lösungen entstanden, die final 10-90% Ammoniumsulfat enthielten. Dabei war erkennbar das ab 30-40% aufsteigender Ammoniumsulfat-Konzentration mehr KL1 ausfiel und pelletiert wurde (Abbildung 10). Die Überstände zeigten korrespondierende gegenläufige Trends. Ab 30% fiel der KL1-Anteil (Daten nicht gezeigt).

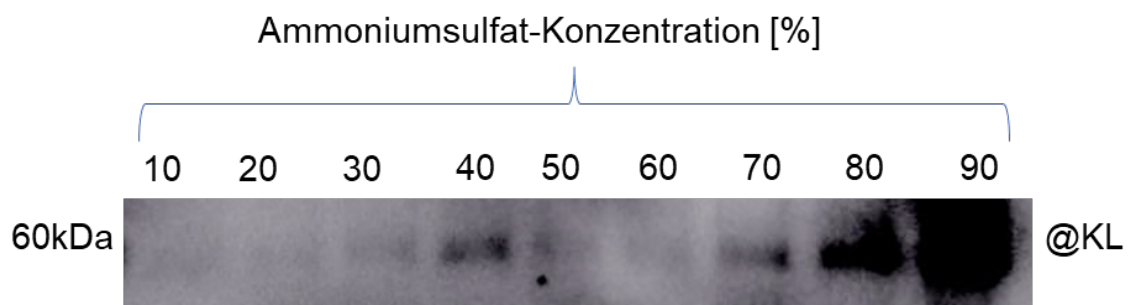


Abbildung 10: Fällung von KL1 bei verschiedenen AS-Konzentrationen. KL1-Insektenmedium wurde mit 100%-Ammoniumsulfatlösung versetzt und ggf. mit PBS auf ein Zielvolumen und der jeweiligen Zielkonzentration aufgefüllt. Die Ansätze wurden über Nacht inkubiert und dann zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert und auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Primär-Antikörper war PA-KL1/1 (1:1000) und Sekundär-Antikörper war Ziege@Kaninchen 1:10.000.

Als nächstes wurde die Ammoniumsulfat-Fällung mit dem Amicon-Ultrafiltrationsverfahren kombiniert. Dieses ermöglicht ebenfalls einen Pufferwechsel und eine weitere Volumenreduktion.

Aufgrund der Erkenntnisse der Fällungsreihe in Abbildung 10, wurde zuerst mit 30% AS gefällt. Darauf wurde eine Fällung des verbliebenen Überstands mit 70- und 80%-Lösung durchgeführt. Das resuspendierte Pellet wurde anschließend in die Amicon-Gefäße überführt und zentrifugiert. Das erhaltene Restvolumen wurde anschließend auf seinen KL1-Gehalt untersucht (Abbildung 11).

Die mit 70%-AS aufbereitete Fraktion zeigte im Mittel 63,9% des Signals wie das Ausgangs KL1-High-Five-Insektenmedium, die mit 80%-AS aufbereitete Fraktion 69,2%. In der 80%-AS-Fraktion trat zu dem ein KL1-assoziertes Signal bei ca. 40kDa auf, es war im Mittel 12,3% so intensiv wie das Referenzmedium.

Die gelösten Präzipitate wurden jedoch nicht mehr aufgereinigt.

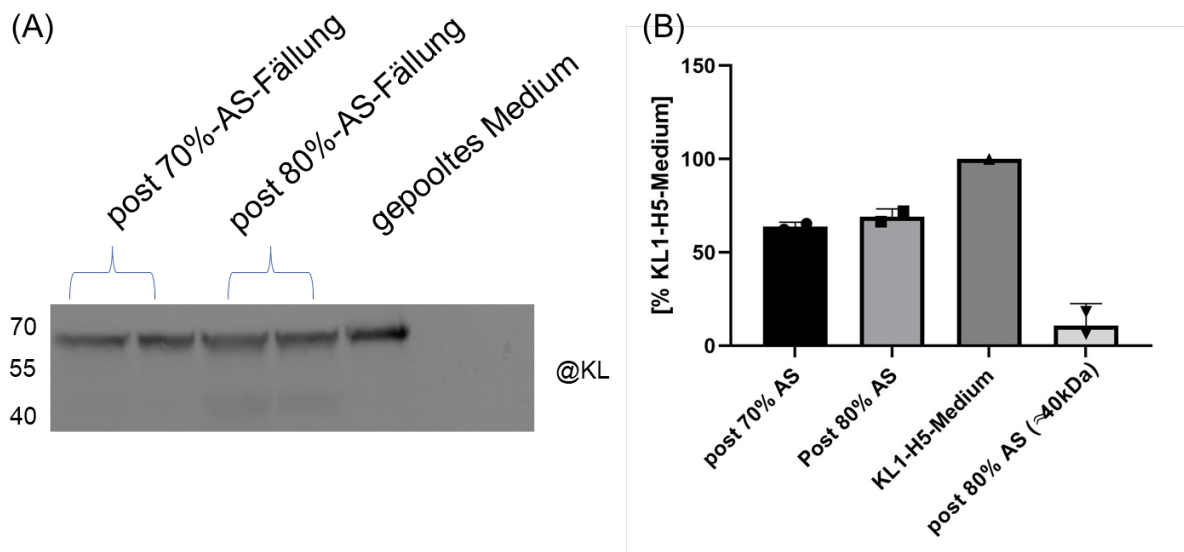


Abbildung 11: Kombinierte AS-Fällung mit Amiconzentrifugation. (A) Western Blot-Analyse der Proben. Das konditionierte, KL1-Medium wurde mit 100% AS-Lösung zur finalen Konzentration von 30% versetzt. Dies wurde über Nacht inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde erneut 100% AS-Lösung zu einer den finalen Konzentrationen von 70- und 80% im Doppelansatz hinzugegeben. Erneut folgte Inkubation über Nacht und Zentrifugation. Das Pellet wurde in Resuspensionspuffer aufgenommen und darauf folgte die Überführung in Amicon-Gefäße sowie deren Zentrifugation. Das verbliebene Restvolumen im obigen Kompartiment wurde für weitere Analysen beprobt. 35 μ l der Proben und die gleiche Menge Ausgangsmedium wurden auf ein 8%-Polyacrylamid-Gel geladen. Primär-Antikörper war KM2076 (1:1000) und der Sekundärantikörper Ziege@Ratte (1:10.000). Als Marker diente PAGE-Ruler. (B) Darstellung der Ergebnisse der densitometrischen Auswertung des Western Blots in (A). Die Auswertung erfolgte mittels des Programms Image J, sowie die graphische Darstellung mit dem Programm Graph Pad Prism. Die Ergebnisse der Fällungen mit 70- und 80% wurden auf das Ausgangs-KL1-Medium normiert. Angabe des Medians und des 95%-Konfidenzintervalls.

5.2.6 Expression und Aufreinigung von rk-KL Δ TM

Auch KL Δ TM-Klotho wurde über das gleiche Verfahren exprimiert und aufgereinigt. Hier wurde im Akkumulationsverfahren gearbeitet (siehe KL1-Abnahmemodi in 5.2.2). Es wurden die Konzentration der Eluate bestimmt und der Prozess evaluiert.

Analog zur Expression von KL1 wurden zunächst verschiedene Virusverdünnungen getestet. Erst ab 48h ließ sich KL Δ TM nachweisen (siehe Abbildung 12 (A)). Am stärksten war die Expression bei Virusverdünnung 1:20, am schwächsten bei Virusverdünnung 1:300. Bei 72h ließ sich dieser Trend nicht bestätigen. Hier ist zwar die Bande bei 1:20 Virusverdünnung am stärksten, jedoch fand sich bei 1:300-Virusverdünnung eine Doppelbande.

Abbildung 12 (B) zeigt den Vergleich von gepooltem KL Δ TM-Medium und den entstehenden Eluaten zur Bestimmung der Gesamtprozess-Effektivität. Die beiden höchstkonzentrierten Eluate E1 und E2 zeigten mit 136,4% und 104,1% im Vergleich zum gepoolten Medium.

Wie bei KL1 wurde der Prozess wieder detaillierter beleuchtet (Abbildung 12 (C)). Das höchstkonzentrierte Eluat 1 erbrachte eine Gesamtprozess-Effektivität von 86,5%. Die Auswertung von Abbildung 12 (B) hatte noch 136,4% ergeben.

Der Überbrückungswert zeigte einen Erhalt des KL1-Gehaltes im Vergleich des Mediums vor Applikation auf die Säule und dem gepoolten Medium von 88,4%. Die Aufreinigungseffektivität betrug beim Betrachten des Verhältnisses von Eluat 1 und des Mediums vor der Säule 97,8%. Der Durchlaufs-Proteinanteil hatte eine Spanne von 10-31%. Zuerst steigt die Konzentration von Fraktion a-c von 10 auf 31%. In der letzten Fraktion fiel sie jedoch wieder auf 26,8%. Im Waschschritt zeigten sich in der ersten Fraktion P4a noch etwas Signal (9,2% Waschschritts-Proteinanteil), verschwand dann jedoch gänzlich unter die Nachweisgrenze.

Die Konzentration der Eluate wurde wieder mit Nano Drop-Messung gemessen (Tabelle 26). Eluate 1 und 2 wiesen eine Konzentration von 0,67 und 0,12 mg/ml auf.

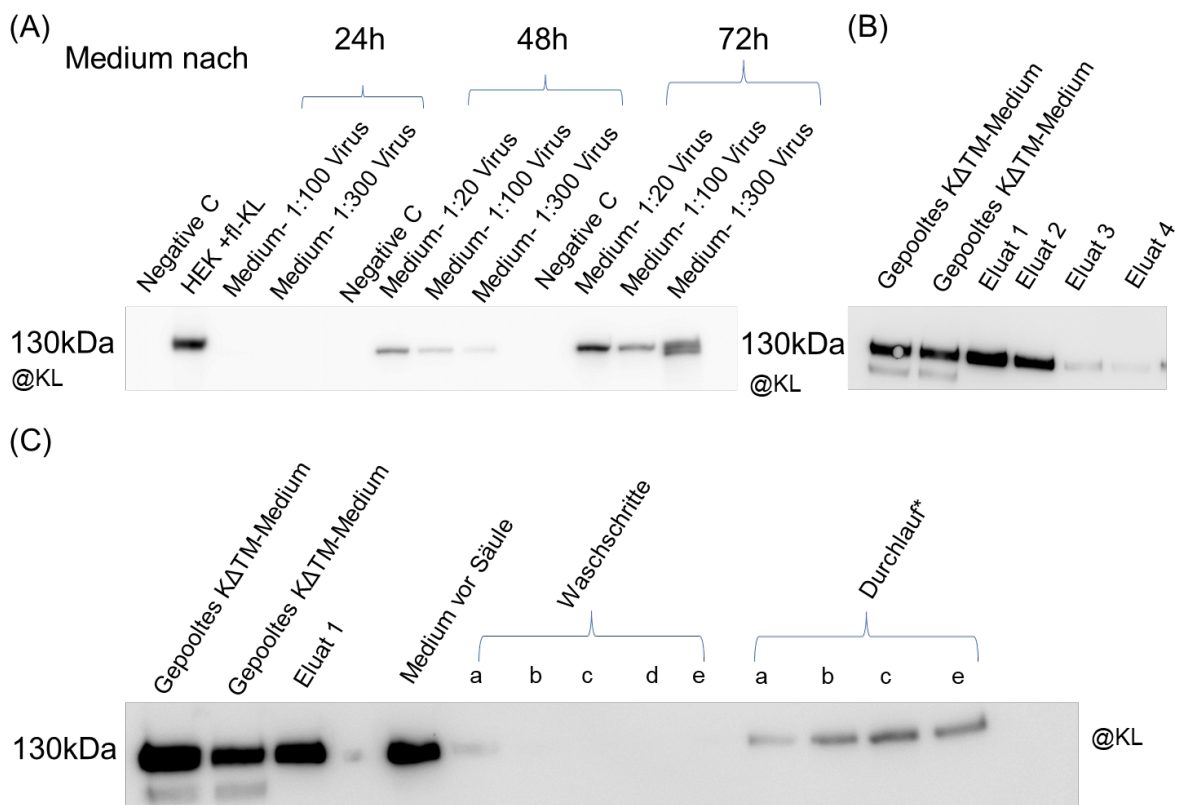


Abbildung 12: Aufreinigung von rk-KL Δ TM. (A) Vier T75-Flaschen wurden für den die Infektion genutzt (eine als nicht-infizierte Kontrolle, und drei für die Infektion mit unterschiedlichen Virus-Verdünnungen (1:20, 1:100, 1:300)). Das Medium wurde im Akkumulationsverfahren abgenommen und alle 24h beprobt. Die Proben wurden auf ein 8%-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Positiv-Kontrolle war transient mit fl-Klotho transfiziertes HEK293T-Lysat.

Negativ-Kontrolle war nicht-infiziertes, konditioniertes Medium. Als Marker diente PAGE-Ruler. Primär-Antikörper war KM2076 (1:1000) und der Sekundärantikörper Ziege@Ratte (1:10.000). (B) Vergleich des gepoolten rK- Δ TM-Mediums nach 72h im Akkumulationsverfahren mit den ersten vier Eluaten nach Aufreinigung über die Strep-Säule. Die Proben wurden auf ein 8%-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Primär-Antikörper war KM2076 (1:1000) und der Sekundärantikörper Ziege@Ratte (1:10.000). (C) Evaluation des K Δ TM-Aufreinigungsprozesses. Analog zu den Betrachtungen der Aufreinigung von KL1 in 5.2.5 erfolgte auch hier die Untersuchung der K Δ TM-Konzentration in den einzelnen Fraktionen. Zu erkennen sind das gepoolte KL1-Medium, das beste Eluat des entsprechenden Laufs und das Medium in dem Moment bevor auf die Säule appliziert wird. Außerdem erkennt man die fraktionierten Waschröte a-e und den Durchlauf (a-c und e). Primär-Antikörper war KM2076 (1:1000) und der Sekundärantikörper Ziege@Ratte (1:10.000). Als Marker diente PAGE-Ruler. Es wurden 25 μ l aufgetragen.

Tabelle 26: Konzentrationen der K Δ TM-Eluate (Nano-Drop). Die Tabelle zeigt die Konzentrationen der Eluate 1-4, sowie deren Volumen. Mittels dem Nano-Drop-Spektrometer wurde die Absorption bei 280nm gemessen. Das Gerät errechnete nun die Konzentration der Eluate. Nötig war dazu den Molaren Extinktionskoeffizienten zu kennen. Dazu wurde die Sequenz Klothos ohne Transmembranären-Anteil (AS-Position 37-981) mittels des Online Tools „Protein Extinction Coefficients and Concentration Calculation“ der Firma Novoprolabs ausgewertet. Diese berechnete einen ϵ_{molar} von 233540 $M^{-1}cm^{-1}$ bei einem geschätzten Molekularen Gewicht von 109,04kDa.

Resultierende Eluate	Volumen	Konzentration In mg/ml (Nanodrop)	A280
E1	4	0,672	1,44
E2	4	0,121	0,26
E3	4	0,014	0,03
E4	4	0,005	0,01

5.3 Uptake rk-Klothos in HEK293T-Zellen

Es wurde untersucht, ob rekombinantes KL1 durch adhärenente HEK 293T-Zellen aufgenommen wird und im Lysat nachweisbar ist. Außerdem war von Interesse, ob sich KL1 an der Zelloberfläche befindet und ob sich die KL1-Konzentration im Medium analog zur Klotho-Aufnahme verändert.

5.3.1 KL1-Aufnahme durch Zellen?

Zuerst wurde die potentielle Aufnahme von KL1 durch HEK293T Zellen untersucht. KL1 konnte nicht im Lysat der KL1-exponierten Zellen detektiert werden. Die Ladekontrolle Tubulin hingegen wurde in allen Lysaten festgestellt (Abbildung 13). Auch in anderen Durchgängen des Experiments konnte KL1 nicht im Lysat detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Außerdem war interessant, ob sich der KL1-Gehalt in Gegenwart der Zellen verändern würde. Abbildung 13 zeigt außerdem Positiv-Kontrolle rk-KL1 auf Höhe von ca. 60kDa. Ebenso zeigt sich auf der gleichen Höhe das KL1-positive Medium vor Applikation auf die Zellen mit abgeschwächter Intensität von 50,5% zur Positivkontrolle. Zum Zeitpunkt T1 (nach einer 1h auf den Zellen) war das Signal im Durchschnitt nur noch 20,8% zur Positivkontrolle. Zwischen T0 und T1 reduzierte sich das KL1 Signal somit um 58,7%. Diese Reduktion fand sich auch in anderen Experimenten gleicher Art (Daten nicht gezeigt).

Auf einem anderen Blot wurde geprüft, ob auch ohne Zellkontakt KL1 nach Inkubation über 1h bei 37°C reduziert wäre. Im Vergleich zum Ausgang zeigte sich diese Fraktion ohne Zellkontakt gleichwertig (115% zur Positiv-Kontrolle; Daten nicht gezeigt).

Um niedrige Konzentrationen Klothos in der Zelloberflächen-assoziierten Fraktion (PBS pH2) nachzuweisen, wurde eine TCA-Präzipitation durchgeführt. Dort konnte im KL1-zugesetzten Medium KL1 detektiert werden, jedoch wurde KL1 nicht in den PBS pH2-Fractionen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

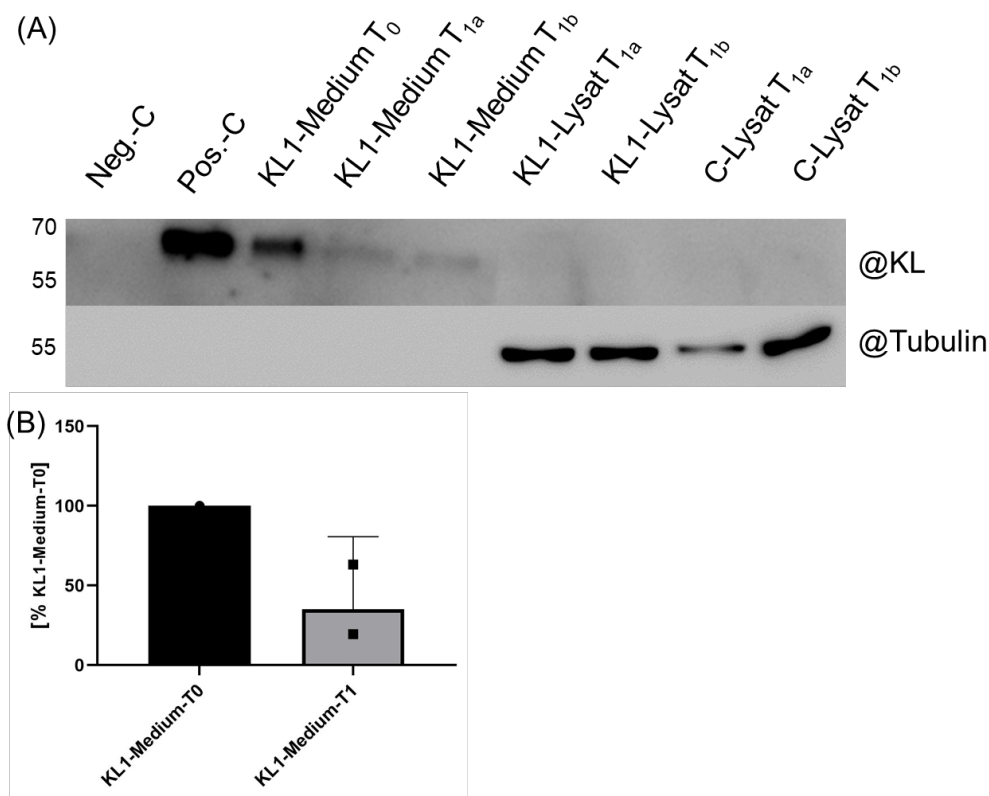


Abbildung 13: KL1-Uptake-Versuch durch HEK293T. (A) Western Blot der Proben des Uptake-Versuchs. rk-KL1-Eluat-Fractionen wurden aufgetaut und gepoolt (~Pos.C). Dies wurde 1:1 mit HEK-Kulturmedium versetzt, und

beprobte (~KL1-Medium T₀). Dieses Medium wurde auf zwei 6cm-Petrischalen mit HEK293T-Zellen appliziert, auf die Kontrollgruppe wurde 1:1 Medium mit Puffer E versetzt. Bei beiden Gruppen war 100µM Chloroquin zur Blockade intrazellulärer Protein-Degradation zugesetzt. Eine Stunde später wurde das Medium aufgenommen und beprobt (~Medium T_{1a/b}). Die Zellen wurden lysiert. Ein BCA-Assay der Lysate wurde durchgeführt. 20µl der Proben und 20µg der Lysate wurde auf ein 8%-Polyacrylamid-Gel geladen. Primär-Antikörper war KM2076 (1:1000) und der Sekundärantikörper Ziege@Ratte (1:10.000). Die Ladekontrolle erfolgte mit einem Antikörper gegen Tubulin (Maus@tubulin 1:1000) und als Sekundär-Antikörper diente Esel@Maus (1:5000). Als Marker fungierte PAGE-Ruler. (B) Densitometrische Auswertung der Reduktion des KL1-Signals im Medium nach 1h und dessen graphische Darstellung mittels Graph Pad Prism.

5.3.2 Nebenbefund APP-Änderung

Exploratorisch wurde das APP-Signal im Medium und in den Lysaten mithilfe des murinen APP-Antikörpers 22C11 untersucht.

Abbildung 14 (A) und (C) zeigen den Vergleich von Lysaten von KL1-exponierten Zellen und von nicht-KL1-exponierten Zellen. Das APP-Signal in den Klotho-exponierten Zellen nahm im Durchschnitt um 57,03 % (± 14,10 SEM) im Vergleich zur Kontrolle zu. Das Ergebnis war jedoch nicht statistisch signifikant.

Im konditionierten Medium stieg nach 1h Exposition mit KL1 das APP-Signal um 98,71% (± 44,91 SEM) im Vergleich zur nicht-KL1-exponierten Kontrolle (vgl. Abbildung 14 (B) und (D)).

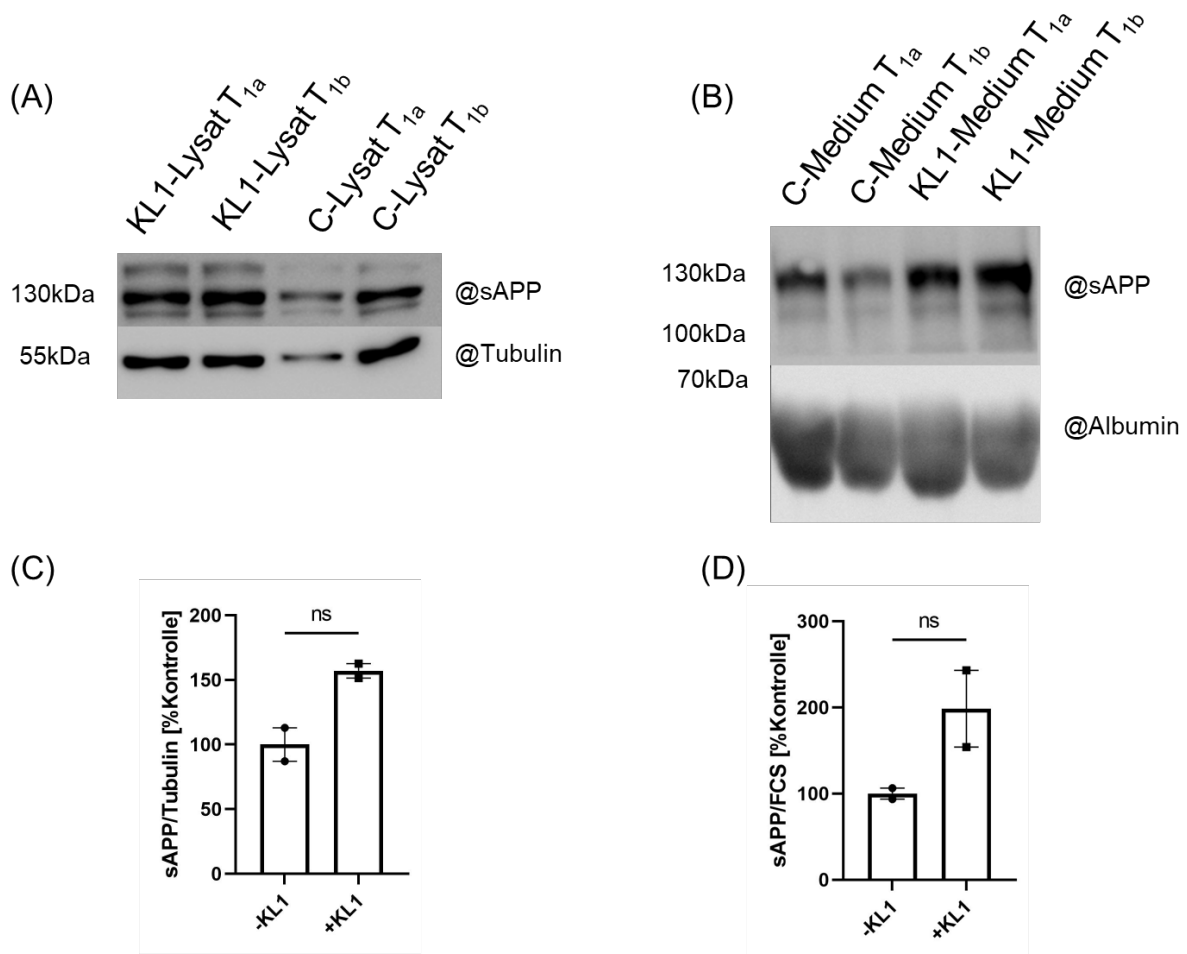


Abbildung 14: Beeinflusst KL1-Exposition sAPP-Produktion in HEK293T? Western Blot Darstellung der Lysate der KL1-exponierten Zellen und der Kontrollgruppe nach 1h im Uptake-Aufbau. Nach der Lyse waren die Konzentrationen der Lysate mit BCA-Assay bestimmt worden. 20µg der Lysate wurden auf ein 8%-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Primär-Antikörper war Maus@sAPP (22C11; 1:1000). Sekundär-Antikörper war Esel@Maus (1:5000). Als Marker diente Abcam. (B) Western Blot Darstellung des TCA-präzipitierten Mediums der KL1-exponierten Zellen und der Kontrollgruppe nach 1h im Uptake-Aufbau. Das Medium wurde abgenommen und

abzentrifugiert, um Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde protokollgemäß TCA-präzipitiert. Zur Augmentation eines Pellets wurde vorher BSA zugesetzt. Das Pellet wurde in Resuspensionspuffer aufgenommen und für die SDS-PAGE präpariert. 20µl der Proben wurden auf ein 8%-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Antikörper und Marker wie in (A). (C) und (D): Densitometrische Auswertung der vorigen Western Blots und anschließende Darstellung mittels Graph Pad Prism. (C) Auswertung der Lysate, normiert auf das Tubulin-Signal. Dies wiederum wurde auf die nicht KL1 exponierte Kontrolle normiert. (D) Auswertung des präzipitierten Mediums, normiert auf das zugesetzte BSA. Dies wiederum wurde auf die Kontrolle normiert. Es erfolgte ein ungepaarte, parametrischer T-Test bei einem Signifikanzniveau von $p=0,05$, $n=2$.

5.4 Transport rekombinanter Klothos über ein Blut-Hirnschranken-Modell

5.4.1 KL1 wird aktiv transportiert

An einem Blut-Hirn-Schranke-Modell sollte der potentielle Transport von rekombinantem, mit ^{125}I -markiertem KL1 von der Blutseite (luminal) zur Gehirnseite (abluminal) untersucht werden. Dazu wurde der Transzytose-Quotient unter Einbezug der parazellulären Diffusion herangezogen (siehe 4.6.1).

Außerdem wurde untersucht, wie sich KL1-assoziiertes Signal nach 1h verteilt und ob sich der Präzipitats-Überstands-Quotient in den Fraktionen verändert (Erklärung siehe 4.6.1).

Zunächst wurde ein Vorversuch mit 6 Wells/Gruppe durchgeführt. Eine +KL-Gruppe enthielt ^{125}I -markiertes KL1 und ^{14}C -Inulin. Die Kontrolle enthielt lediglich PBS und ^{14}C -Inulin, also keine γ -strahlende Kontrolle. Die Kontrolle sollte erstmal nur als Vergleich der parazellulären Diffusion dienen.

Abbildung 15 zeigt den TQ der beiden Gruppen des Versuchs. In der -KL1-Gruppe war erwartungsgemäß kein Transport-Signal (TQ=0) zu erkennen. In der +KL1-Gruppe war der TQ im Durchschnitt bei 2,5. Es wurde also 2,5-mal mehr KL1 abluminal gefunden als durch alleinige parazelluläre Diffusion zu erwarten war.

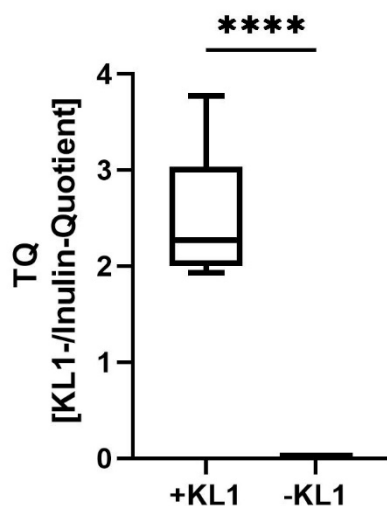


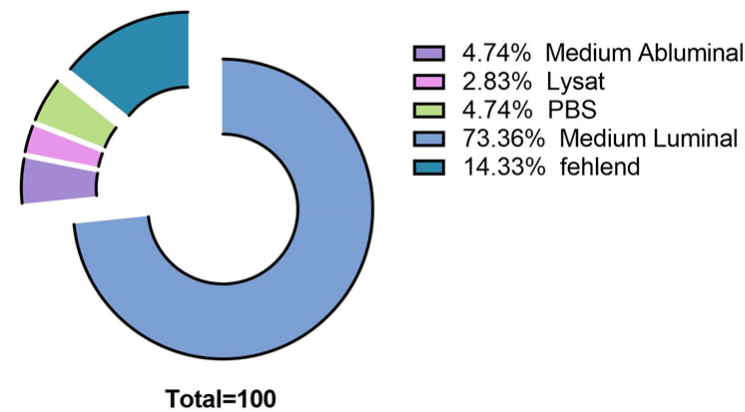
Abbildung 15: KL1 wird aktiv transportiert. Graphische Darstellung des TQ der KL1-Gruppe und Gruppe ohne KL1. Für die ^{14}C -Inulin-Messung wurde eine Probe des Mastermixes und des abluminalen Mediums abgenommen, den Proben wurde 1ml Amplifier-Lösung zugesetzt. Die Messung erfolgte mit dem Flüssigkeitsszintillationsmessgerät. Für die ^{125}I -Messung wurde das abluminale Medium nach 1h abgenommen und TCA-präzipitiert. Das Pellet und der Überstand wurden separat mit dem Γ Counter Wizard2 1x60s gemessen. Gleiches geschah mit dem Mastermix als Input-Signal. Für beide Graphen wurde die Software Graph Pad verwendet. Dargestellt ist der Median und die 5-95% Perzentile. Signifikanzniveau war $p=0.05$, es wurde ein ungepaarter, parametrischer T-Test angewandt ($n=6$).

Abbildung 16 (A) zeigt die Wiederfindung von KL1-assoziiertem Signal in verschiedenen Fraktionen nach 1h. Diese wurden auf den Mastermix, also auf die initial applizierte KL1-Menge normiert. Betrachtet wurden das Medium luminal und abluminal, der Lysate der Zellen und der Zelloberfläche assoziierten Fraktion (PBS pH2-Waschungsfraktion). Das größte Signal fand sich luminal, also auf Seite der Zugabe mit durchschnittlich 73,4%. 4,7% finden sich nach 1h abluminal. In der PBS-Fraktion finden sich 4,7% und im Lysat 2,8%. 14,3% konnten nicht mehr detektiert werden.

In Abbildung 16 (B) stellt den Präzipitats-Überstands-Quotient (siehe 4.6.1 für die Definition) dar. Luminal blieb das Verhältnis nach 1h mit 98,5% konstant. Abluminal war es reduziert

(64,2%), sodass mehr freies Iod im abluminalen Medium, als im Mastermix auftrat. Sowohl in den Lysaten (195,3%) als auch in der PBS-Fraktion (253%) zeigte sich eine statistisch signifikante Steigerung des Verhältnisses, was im Verhältnis mehr KL1-assoziiertes Signal in diesen Fraktionen bedeutete als im Mastermix.

(A)



(B)

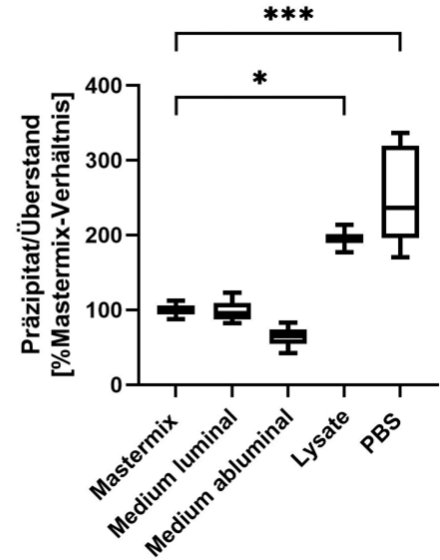


Abbildung 16: Wiederfindung des KL1-Signals und Präzipitats-Überstands-Quotient. (A) Darstellung der Wiederfindung des hinzugefügten Signals nach 1h. Die durchschnittlichen Ergebnisse der ^{125}I -CPM-Messungen der protein-assoziierten Fraktionen (Pellets) wurden ins Verhältnis zum Mastermix gesetzt, die Ergebnisse wurden anschließend auf den Mastermix normiert. (B) Darstellung des Präzipitat-Überstands-Quotienten nach 1h. Die Ergebnisse der ^{125}I -CPM-Messungen der protein-assoziierten Fraktionen (Pellets) und des freien Iods (Überstand) wurden ins Verhältnis gesetzt. Dieses wurde wiederum auf den gleichen Quotienten des Mastermixes normiert. Für den Graphen wurde die Software Graph Pad verwendet. Dargestellt ist der Median und die 5-95% Perzentile. Signifikanzniveau war $p=0.05$, es wurde ein ungepaarter, parametrischer T-Test angewandt (n Mastermix =2, n Mediumsfraktionen =6, n PBS-Fraktion=5, n Lysate =2).

5.4.2 KL1-Antikörper PA-KL1/1 vermindert den Transport von KL1

In der folgend zusammen dargestellten Versuchsreihe sollte zum einen bestätigt werden, ob erneut mehr KL1 Signal abluminal auftreten würde, als durch alleinig parazelluläre Diffusion zu erwarten war (also TQ >1 in der Kontrollgruppe). Zum anderen sollte evaluiert werden, ob sich dieses Signal durch die Zugabe des gegen KL1 gerichteten Antikörper PA-KL1/1 verändern ließ.

Als Kontrolle diente eine Gruppe mit zugesetztem ^{125}I -KL1 und unspezifischem Kaninchen-IgG. Für beide Gruppen wurde wieder der TQ berechnet.

Der TQ der Kontrolle lag im Mittelwert bei 3,7 und in der Interventionsgruppe mit dem KL1-Antikörper bei 2,369. Somit lagen beide Gruppen über die drei Läufe oberhalb dessen, was alleine durch parazelluläre Diffusion zu erwarten gewesen wäre.

Für den weiteren Vergleich der potentiellen Einwirkung des KL1-Antikörpers auf den TQ wurde die Gruppen auf die Kontrolle normiert (Abbildung 17). Bei der KL1-Antikörper-Gruppe war der TQ durchschnittlich bei 66,31% zur Kontrolle. Der Differenz zwischen den beiden Gruppen betrug im Durchschnitt - 33,69% ($\pm 11,04$ SEM). Die Reduktion von Kontrolle zu Intervention war mit $p=0,0037$ signifikant unterschiedlich.

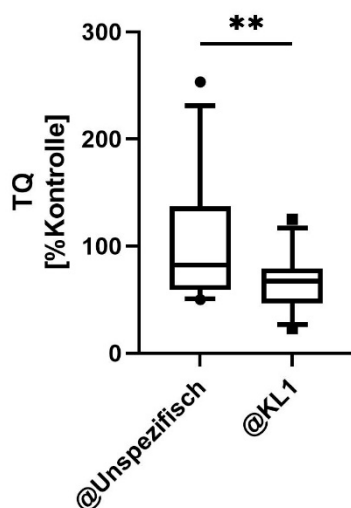


Abbildung 17: Der KL1-gerichtete Antikörper PA-KL1/1 reduziert den KL1-Transport. Der Kontrollgruppe wurde 10ug/ml unspezifischer Kaninchen IgG zugesetzt, der Interventionsgruppe 15ug/ml PA-KL1/1. In beiden Gruppen wurde das abluminale ^{125}I -Signal der Wells durch den Input geteilt. Gleiches geschah mit dem ^{14}C -Inulin-Signal. Anschließend wurde für jedes Well der TQ berechnet. Der TQ-Mittelwert der Kontrollgruppe wurde zur Normierung eingesetzt. Für den Graphen wurde die Software Graph Pad verwendet. Dargestellt ist der Median und die 5-95% Perzentile. Signifikanzniveau war $p=0,05$, es wurde ein ungepaarter, parametrischer T-Test angewandt ($n=26$ für unspezifische Kontrolle und $n=25$ für @KL1). In einem der Experimente der Versuchsreihe wurden auch die Lysate betrachtet. Abbildung 18 (A) zeigt den Vergleich der KL1-assozierten Signal beider Gruppen bezogen auf die Kontrolle. Der Median der PA-KL1/1-Gruppe lag zwar unterhalb der Kontrolle, was eine niedrigere Aufnahme durch die bEND.3-Zellen hindeuten könnte, jedoch war der Unterschied nicht statistisch signifikant.

Ähnliches galt auch für den Präzipitats-Überstands-Quotienten der Lysate beider Gruppen (Abbildung 18 (B)). Auch hier war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu erkennen oder ein Unterschied zum Input selbst. Lediglich der Median der PA-KL1/1-Gruppe lag unterhalb der Kontrolle, was auf einen Trend zu weniger KL1-assoziertem Signal im Lysat des KL1-Antikörper-Gruppe deuten andeuten könnte.

Analog zum oben dargestellten abluminalem TQ, wurde auch für die luminale KL1-Fraktion ein TQ berechnet. Hier war eine signifikante Verminderung ($p=0,0006$) in der PA-KL1/1 -Gruppe zu erkennen (siehe Abbildung 18 (C)).

Der Präzipitats-Überstands-Quotient wurde für das abluminale und lumenale Medium erhoben. Der Vergleich der Quotienten beider Gruppen ist in Abbildung 18 (D) dargestellt. Der Median luminal lag in der Kontrolle luminal bei 93,15% und in der Interventionsgruppe 89,30% im Vergleich zum Mastermix. Abluminal war in der Kontrolle das Signal im Median 79,80% und bei der Intervention bei 93,25%. Der Vergleich der Gruppen in Bezug auf die unterschiedlichen Fraktionen war nicht statistisch signifikant.

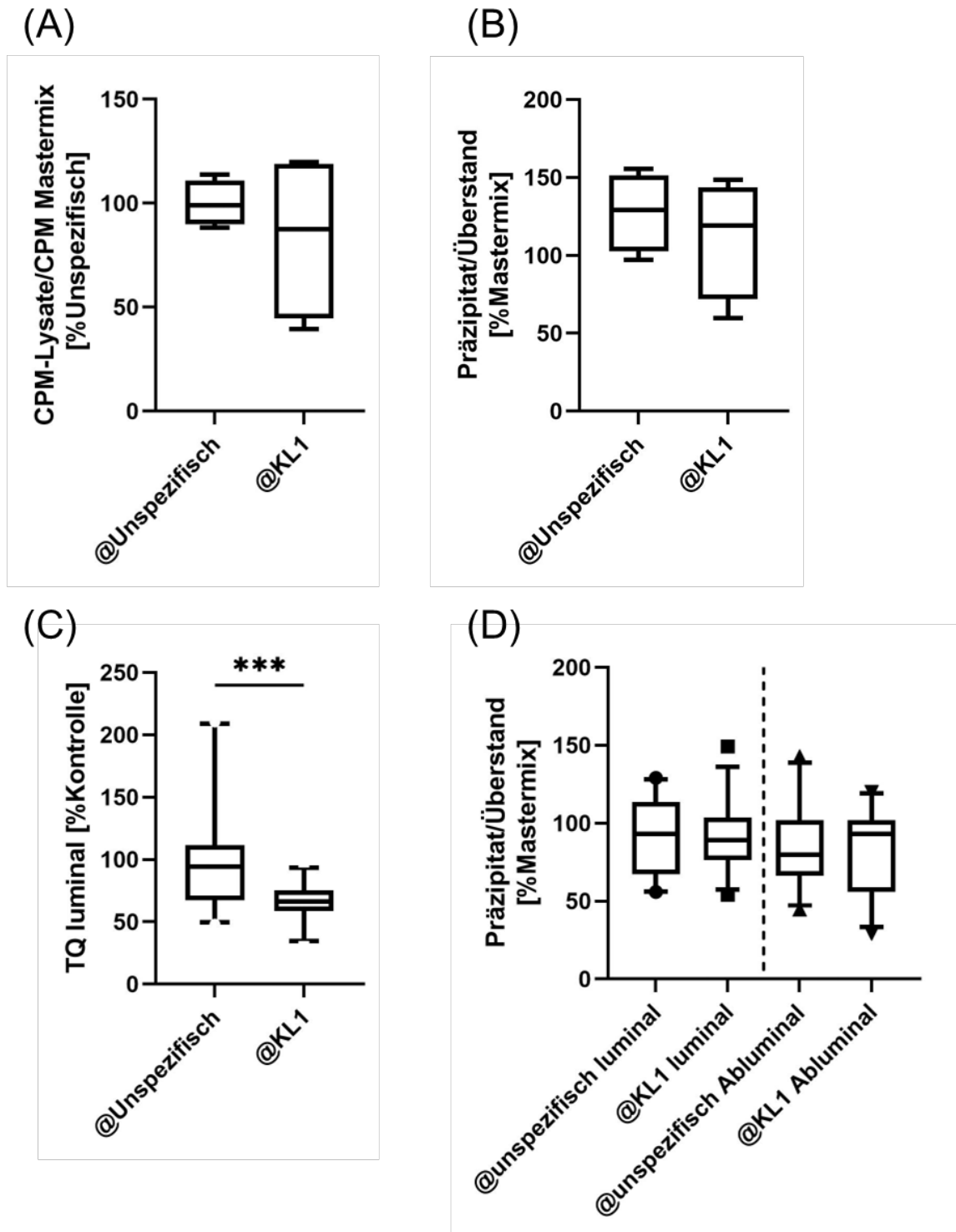


Abbildung 18: Sekundäre Datenpunkte bei Blockade des KL1-Transports. (A) Vergleich der KL1-Signale in den Lysaten. In beiden Gruppen wurde das ^{125}I -Signal der gepoolten Lysate durch den Input geteilt. Anschließend wurde auf die Kontrolle normiert. (B) Vergleich des Präzipitats-Überstands-Quotienten in den Lysaten. Der Quotient wurde ins Verhältnis mit dem Quotienten des Mastermixes gesetzt. Der Quotient des Inputs wurde als 100% normiert. (C) TQ des luminalen Signals im Gruppenvergleich. Analog zum TQ der normalerweise mit dem

abluminalen Signal berechnet wird, wurde mit dem luminalen Signal gerechnet. Dadurch sollte festgestellt werden, ob luminal mehr Signal verbleibt, als durch reine parazellulär Diffusion zu erwarten wäre. (D) Vergleich des Quotienten des protein-assoziierten und des freien ^{125}I -Signal zwischen luminal und abluminal, sowie der Gruppen. Dabei wurde auf den Quotienten des Mastermix normiert. Für die Datenerhebung aller vier Graphen galten folgende Bedingungen. Der Kontrollgruppe wurde $10\mu\text{g/ml}$ unspezifischer Kaninchen IgG zugesetzt, der Interventionsgruppe $15\mu\text{g/ml}$ PA-KL1/1. Für den Graphen wurde die Software Graph Pad verwendet. Dargestellt ist der Median und die 5-95% Perzentile. Signifikanzniveau war $p=0.05$, es wurde ein ungepaarter, parametrischer T-Test angewandt (n der Lysate=4, durch die Poolung der Lysate; n Mediumsfraktionen = 26).

5.4.3 Reduktion des Transports durch LRP1- und LDL-R.-Blockade

Nun sollte getestet werden, ob sich der Transzytose-Quotient durch Blockade von LRP1 (durch den LRP1-blockierenden Antikörper B411E2 (211)) bzw. aller LDL-Rezeptoren durch RAP (receptor-associated-Protein, (36)) verändert, um diese als potentiellen Teil eines Transportmechanismus in Betracht zu ziehen.

In Abbildung 19 (A) sind die TQs der Gruppen bezogen auf die Kontrolle (unspezifisches Kaninchen-IgG) gezeigt. Der Mittelwert des TQ der B411E2-Gruppe war um $20,11\%$ ($\pm 10,9\%$ SEM) und der der RAP-Gruppe um $23,24\%$ ($\pm 12,3\%$ SEM) zur Kontrolle reduziert. Diese waren jedoch nicht statistisch signifikant.

In den Lysaten fand sich in der B411E2-Gruppe durchschnittlich $35,5\%$ ($\pm 19,76\%$ SEM) mehr KL1-assoziiertes Signal als in der Kontrolle (Abbildung 19 (B)). In der RAP-Gruppe war in den Lysaten sogar $107,5\%$ ($36,02\%$ SEM) mehr als in der Kontrollgruppe ($p=0,0342$). Es fand sich keine relevante Änderung im Präzipitats-Überstands-Quotienten der Lysate (Daten nicht gezeigt).

In der PBS-Fraktion fand sich ebenfalls statistisch signifikant mehr Signal in beiden Interventionsgruppen als in der Kontrolle (Abbildung 19 (C)). In der B411E2-Gruppe wurde eine Steigerung von im Mittel $72,3\%$ ($27,94\%$ SEM; $p=0,0401$) im Vergleich zur Kontrolle gemessen. In der RAP-Gruppe betrug die Steigerung $114,5\%$ ($15,40\%$ SEM; $p=0,0020$).

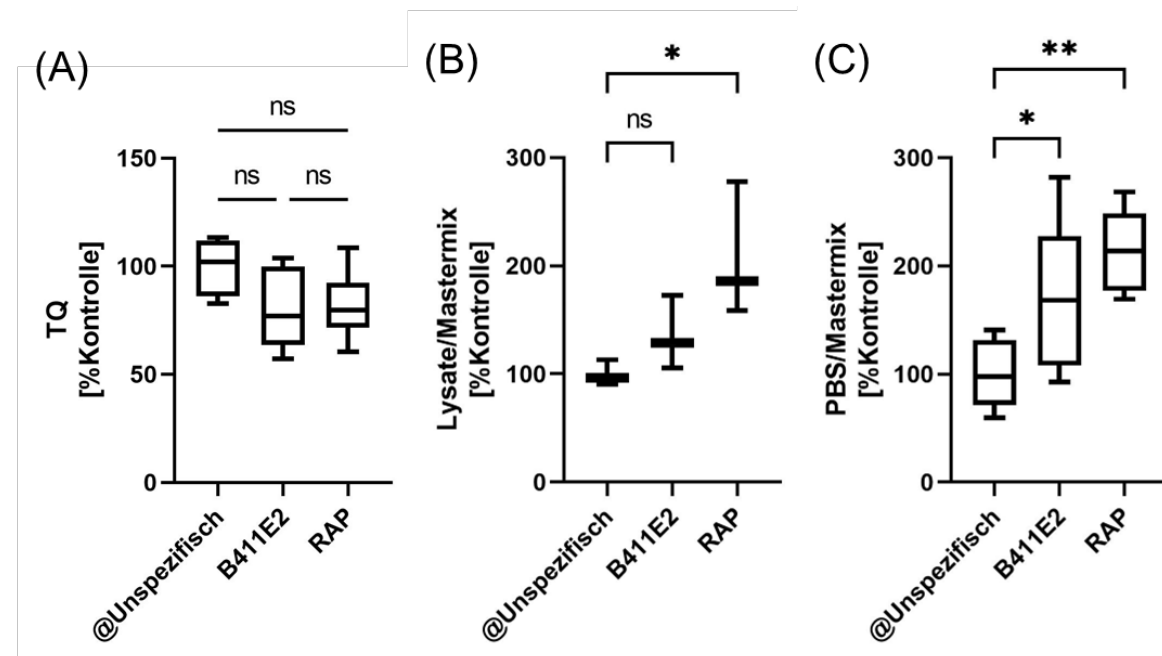


Abbildung 19: Inhibition des Transports durch LRP1- und LDL-Blockierende Antikörper. (A) KL1-TQ der Kontrolle, der LRP1-Blockade durch B4E11E2 und der Blockade der LDL-Rezeptoren durch RAP nach 1h. (B) KL1-Signal der Lysate/Input normiert auf die Kontrolle. (C) Zelloberflächen-assoziiertes Signal/Mastermix normiert auf die Kontrolle. Der Kontrolle wurde $10\mu\text{g/ml}$ unspezifischer Kaninchen-IgG zugesetzt, für die LRP1-Blockade $15\mu\text{g/ml}$ B411E2-Antikörper, für die generelle LDL-Blockade 500 nM RAP. Für die Graphen wurde die Software Graph Pad verwendet. Dargestellt ist der Median und die 5-95% Perzentile. Signifikanzniveau war $p=0.05$, es wurde ein ungepaarter, parametrischer T-Test angewandt ($n=6$, bei Lysaten $n=3$, jeweils 2 Wells gepoolt).

6 Diskussion

6.1 Pa-KL1/1 erkennt full-length Klotho und seine UE KL1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde einer neuer polyklonaler Antikörper gegen die Klotho-Untereinheit KL1 charakterisiert. Im Vorfeld waren dazu zwei Kaninchen gegen Sequenzen aus KL1 und zwei Kaninchen gegen KL2 immunisiert worden. Die Antiseren wurden auf ihre Fähigkeit geprüft, Klotho aus Lysaten mit fl-Klotho-transient transfizierten HEK293T-Zellen zu erkennen. Beide gegen KL1-gerichteten Antiseren zeigten sich dabei vielversprechend und detektierten Klotho nach SDS-PAGE/Western Blot. Die gegen KL2-gerichteten Antiseren detektierten kein Klotho in den Lysaten (Abbildung 1). Einer der KL1-Kandidaten (KL1/1) wurde anschließend mittels Affinitätschromatografie mit einer Protein A-Säule aufgereinigt und seine Konzentration bestimmt. Das gewählte Verfahren führt zu hohen Konzentrationen und hoher Reinheit (221). Der erste Nachweis des Erfolges der Aufreinigung wurde mit der Detektion von schweren und leichten Ketten in der Coomassie Färbung der Eluate erbracht (Abbildung 3).

Anschließend folgten Funktionstests, sowie nähere Spezifizierungen gemäß der Konzentration und der zuzusetzenden Milchpulver-Konzentration. Aus den vorliegenden Ergebnissen leitete sich eine Konzentration von 1,5-3 µg/ml PA-KL1/1 bei 5% Milchpulverzusatz für ein SDS-PAGE/Western Blot-Prozedere als Nutzungsempfehlung ab.

Der Vergleich mit dem monoklonalen KM2076 (Abbildung 4) zeigte die erwartbare geringere Spezifität eines polyklonalen Antikörpers bei PA-KL1/1. KM2076 gilt als sehr gut validierter und zuverlässiger monoklonaler Antikörper (53, 217). Aus polyklonalen Antiseren erkennen i.d.R. nur 0,5-5% der Antikörper das intendierte Protein (227). Ein weiterer Nachteil polyklonaler Antikörper kann die mangelnde Kompetenz sein, kleine Unterschiede wie Einzelaminosäureaustausche oder post-translationale Modifikationen zu erkennen (228). Andererseits bieten polyklonale Antikörper den Vorteil der Erkennung multipler Epitope, sodass sie sensitiver sein können als monoklonale Antikörper (228).

PA-KL1/1 präsentierte sich in den gewählten Applikationen als zuverlässigen Antikörper, um Klotho oder KL1 in den vorliegenden Lysaten oder im konditionierten Insektenmedium bzw. das aufgereinigte rekombinante Protein nachzuweisen (siehe Abbildung 4).

In zukünftigen Tests wäre die Verlässlichkeit in schwierigeren Nachweis-Situationen mit geringeren Konzentrationen der Probe oder generell geringer aufgetragener Klotho-Menge wie man sie häufig bei in vivo Experimenten vorfindet - relevant. Eine Bestimmung der konkreten Sensitivitätsgrenze mittels bekannter Klotho-Konzentrationen wäre sinnvoll. Aufgrund der geringen Spezifität des vorliegenden Antikörpers muss diese bei Verwendung niedrig konzentrierter Proben mitgedacht werden.

Außerdem sollte der Nachweis erfolgen, dass der Antikörper das native Klotho bzw. KL1 erkennt. Alle durchgeführten Tests erfolgten am denaturierten Proben. Für das oben beschriebene Transportexperiment über ein BHS-Modell (5.4) wurde angenommen, dass dieser das native Protein bindet. Der Nachweis erfolgte aber nicht.

Zusätzlich sollte der Versuch erfolgen mit dem Antikörper immunhistochemisch zu arbeiten. Polyklonale Antikörper können sich grundsätzlich gut für IHC eignen, da sie höhere Sensitivität durch die multiple Bindung an Antigene aufweisen können (228). Bei dem hier vorliegenden Antikörper muss die Eignung jedoch erst nachgewiesen werden, da auch hohe Hintergrund-Detektion zu erwarten ist (vgl. Abbildung 4).

Aufgrund des wiederholten fehlenden Nachweises von Klotho mit den gegen KL2-gerichteten Antikörpern aus transient infizierten HEK293T-Lysaten (exemplarisch Abbildung 1) wurde im Rahmen dieses Projektes nicht weiter mit ihnen gearbeitet. Es wäre jedoch möglich, dass aufgrund von einer niedrigen Spezifität in einem Lysat kein Klotho-Nachweis gelang, da dieses Signal vor dem Hintergrund unspezifischer Signale nicht detektiert wurde. In Proben, die höhere Reinheit als ein Lysat aufweisen, wie zum Beispiel rekombinantes KL2 oder fl-Klotho,

könnte ein Nachweis trotzdem gelingen, sodass mit diesen Antikörpern also dennoch gearbeitet werden könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre das Testen der Antikörper unter nativen Bedingungen, da es möglich wäre, dass der Antikörper das Protein nur nativ erkennt.

6.2 Expression von rekombinantem KL1 und KL Δ TM

6.2.1 Optimierung der Expressionsbedingungen

Für die Produktion von rekombinantem KL1 bzw. KL Δ TM wurden High-Five-Insektenzellen und ein Baculovirus-System genutzt. Dieses System wird verwendet, um große Mengen eukaryotisch produzierte rekombinante Proteine herzustellen (229). Die Proteine enthielten für die Aufreinigung einen Strep-Tag. Der Strep Tag II ist bietet Vorteile aufgrund der hohen Affinität und der fehlenden biologischen Einflussnahme auf das rekombinante Protein in Faltung und Aktivität (222).

Zur Infektion der High-Five-Insektenzellen standen ein KL1- und ein KL Δ TM-Baculovirus von Greta Böhme zu Verfügung (37).

Im Vordergrund der Expression und Aufreinigung stand die rekombinante Klotho-Untereinheit KL1. Jedoch wurde auch KL Δ TM exprimiert und aufgereinigt.

Als erstes wurde die optimale Verdünnung des KL1-Virusmediums bestimmt. Die in 5.2.1 gezeigten Ergebnisse legten eine Verdünnung von 1:20 des Virus als produktivste für die Infektion nahe (Abbildung 6). Bei Frau Böhme betrug die produktivste Verdünnung 1:100 im Vergleich zu 1:20 (37). Fraglich bleibt die quantitative Relevanz des Unterschiedes, da auch die in Abbildung 5 gezeigten densitometrischen Unterschiede marginal waren. Neu war die Erkenntnis, dass auch niedrigere Verdünnungen keinen zusätzlichen Expressions-Vorteil bringen.

Außerdem wurden verschiedene Abnahmemodi und Zeitpunkte des Mediums beurteilt und verglichen, um letztlich mehr KL1 zu gewinnen (Akkumulativ und oder durch wiederholte Abnahme). Dazu wurde die KL1-Konzentration im Medium bei beiden Verfahren alle 24h analysiert. Der normale lytische Viruszyklus führt zu einer recht späten Aktivierung des dem rekombinanten Protein vorgeschalteten Promoters nach stattgehabter Infektion, sodass eine individuelle Bestimmung des Expressions- und Akkumulationsmaximums empfohlen wird (229). Außerdem schwankt die Stabilität des rekombinant hergestellten Proteins in Gegenwart von Insektenzellen, somit auch eine Evaluation dieser angeraten wird (229).

Beim Akkumulationsverfahren fand sich nach 24h wenig KL1 im Medium. Nach 48h war schon erheblich mehr Protein nachzuweisen. In den nächsten 24h fand kaum Zuwachs statt (vgl. Abbildung 6). Diese Ergebnisse waren konkordant zu denen von Frau Böhme (37).

Bei der Methode der wiederholten Abnahme zeigte sich im Intervall 0-24h ein schwaches Signal und in dem beiden folgenden 24h-Intervallen eine etwa gleich starke Zunahme der Intensität (Abbildung 7). In den Intervallen nach 72h bis hin zu 120h nahm das KL1-Signal stark ab. Dies sprach für die stärkste Expressionsleistung zwischen 24-72h. Die schwächere Expression nach länger zurück liegender Infektion könnte durch den Zellverlust zu erklären sein. Der Zellverlust durch Ablösung bei Mediumswechsel und/oder Tod war ein erheblicher Faktor. Bis zu 30-40% der Zellen waren nach 72h abgelöst, nach 96h waren es über 50% und nach 120h über 70%.

Nun wurde die Phase der höchsten KL1-Konzentration im Akkumulationsverfahren (also nach 72h) mit den produktiven Intervallen bei der wiederholten Abnahme verglichen. Hier deutete sich qualitative Gleichwertigkeit der beiden Verfahren an (vergleiche Abbildung 7).

Bei letzterer Methode ist jedoch der Vorteil, dass hier die mindestens die doppelte Menge an konditioniertem Medium entsteht, da zwei gute Intervalle 24-48 und 48-72h vorliegen und

abgenommen werden, in denen vergleichbare KL1-Mengen erzeugt werden können. Bei der Akkumulationsmethode entsteht nur einmal konditioniertes Medium.

Ein weiteres Kriterium für Qualität des Abnahmeverfahrens ist das Ausmaß an Degradation (229). Bei der wiederholten Abnahmemethode sah man keine Banden die unterhalb 60kDa in den drei 24h-Intervallen nach 72h (siehe Abbildung 7), während der direkte Vergleich bei Akkumulationsmethode nach 72h Konditionierungszeit mehr Degradation hervorbrachte (Abbildung 6). Lagerung von Klotho ist aufgrund seiner Instabilität selbst bei 4°C über drei Tage von Degradation begleitet (4), sodass die beobachtete Degradation bei 27°C über drei Tage nicht verwunderlich ist.

Aus diesen Ergebnissen ließe sich eine kombinierte Abnahmemethode ableiten: Die 1. Abnahme nach 48h, sodass die schwache Expressionsleistung bis 24h abgewartet wird und dann bis 48h KL1 akkumuliert. Nach der Abnahme würde erneut Medium für weitere 24h konditioniert, um die hohe Expressionsleistung in diesem Intervall auszunutzen.

Normalerweise würde sich zur Steigerung der Expressionsleistung die Überführung der Insektenzellen aus der Adhärenzkultur in die Suspensionskultur anbieten (229, 230). Der Versuch die Insektenzellen in Suspensionskultur zu führen, gestaltete sich als sehr schwierig. Die überführten Zellen überlebten selten länger als eine Woche in Suspensionkultur. Trotz Anpassungen der Rotationsgeschwindigkeit, des Modus des Mediumswechsels (Passage oder Hinzufügen von Medium) und des wiederholten Auftauens neuer High-Five-Zellen gelang die Etablierung einer stabilen Kultur nicht (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Schwierigkeiten mit der Stabilität der Insektenzellen in Suspensionkultur wurde dieses Konzept zugunsten der Adhärenzkultur verlassen.

Zur näheren Bestimmung der Konzentration des exprimierten, rekombinanten Proteins im Medium könnte eine Silberfärbung verwendet werden. Die Sensitivität liegt Protokoll-abhängig im Nanogrammbereich (231). Niedrig konzentrierte Ausgangsmidien stellen bei der Aufreinigung ein Problem dar und können zu niedriger Aufreinigungsrate führen (222). Eine potentiell niedrige Expressionsrate könnte über eine Silberfärbung objektiviert werden.

Außerdem sollte zukünftig validiert werden, ob KL1 wirklich vornehmlich sekretiert wird, wie vorgesehen. Dazu böte sich ein Vergleich des Insektenzelllysats mit dem konditionierten Medium mittels SDS-PAGE/Western Blot an.

Zur Überprüfung der optimalen Expression durch die Insektenzellen stellt eine sog. metabolische Markierung mit radioaktivmarkierten Aminosäuren wie ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein eine Möglichkeit dar. Hier wird radiographisch analysiert, ob die Expression der Insektenzellen, wie gewünscht, hauptsächlich das rekombinante Protein exprimieren (229). Mit erfolgter Infektion stellen die Insektenzellen ihre Expressionsmaschinerie zu Gunsten des rekombinanten Proteins um (232).

6.2.2 Aufreinigung von rekombinatem KL1

Die Aufreinigung des konditionierten KL1-Mediums erfolgte mit der Affinitäts-Chromatografie über die ÄKTA™ start und einer Strep-Tactin-Säule. Anschließend wurde der Prozess mittels SDS-PAGE/Western Blot evaluiert und die Konzentration der Eluate mit den Verfahren BCA-Assay, Coomassie-Färbung und mit der spektrometrischen Messung (Nano Drop) bestimmt.

In 5.2 wurden für KL1 zwei Aufreinigungsdurchläufe dargestellt. Diese erfolgten an dem gleichen konditionierten Medium über die gleiche Säule an unterschiedlichen Tagen.

In der Regel entstanden aus einem Lauf mindestens zwei Eluatsfraktion á 4 ml mit höheren KL1-Konzentrationen aus 45ml Medium. Die beste Näherung der Konzentration war dabei die Messung mittels des Nano-Drop. Das höchstkonzentrierte Eluat wurde mit einer Konzentration von 0,222mg/ml taxiert.

Das Fehlen von Ergebnissen zur Konzentration durch Methoden wie BCA-Assay und Coomassie legte nahe, dass die Konzentration des aufgereinigten Proteins in den Eluaten unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Protokolle lag. Das verwandte Standard-Coomassie-250G-Färbungsprotokoll besitzt eine Sensitivitätsgrenze zwischen 10 und 100 µg Protein auf einer Bande im Polyacrylamidgel (233).

Legt man die im Nano Drop bestimmte Konzentration zu Grunde (0,222 mg/ml), wurden durch das Auftragen von 40 µl auf ein Polyacrylamidgel (maximales Taschenvolumen) 8,8 µg KL1 geladen. Dies war folglich unter der Nachweisgrenze der Coomassie Färbung. Andererseits lag die Konzentration in den Eluaten zumindest oberhalb der Nachweisschwelle des Antikörpers KM2076 (20ng/ml; (217)).

Folgend wurde der Prozess näher evaluiert, um festzustellen, wo KL1 verloren ging.

Gemessen an der Gesamtprozesseffektivität (Definitionen in Tabelle 19 in 4.4.2) zeigte sich ein Verlust an KL1-Konzentration von durchschnittlich 38% vom abgenommenen Medium bis zum Eluat im ersten Lauf und 56% im zweiten Lauf (Abbildung 8 und Abbildung 9).

Ein Grund für die Reduktion der Konzentration war der KL1-Verlust zwischen den Zeitpunkten der Abnahme des konditionierten Mediums und der Applikation des Mediums auf die Säule, wie am Überbrückungswert ermittelt wurde.

Dazwischen lagen der Biotin-Blockade-Schritt und ein Einfrieren/Auftauen-Zyklus. Wie oben erwähnt, wird von längerer Lagerung Klothos bei 4°C abgeraten, aber auch von einer Häufung des Einfrierens und Auftauens (4). Gerade – wie hier vorliegend - bei niedriger Konzentration eines Proteins führen das Einfrieren/Auftauen zu größerer Schädigung des Proteins (234), so fanden sich bei Cao et al. zwischen ca.75-95% der Beispielproteine nach Auftauen wieder (234).

Der Überbrückungswert lag in Lauf 1 bei 53,5% zum Medium nach dem Poolen. In Durchlauf 2 wurde dagegen im Medium vor der Säule sogar mehr KL1 gemessen als im gepoolten Medium (118,2%). Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu Durchlauf 1 und auch vorangegangen, hier nicht dargestellten Aufreinigungsdurchläufen. Hier waren zu Lauf 1 ähnliche Ergebnisse mit einer Reduktion von ca. 25% gemessen worden. Dies wurde so gedeutet, dass durch das Wegfrieren und Auftauen, sowie die folgende Avidin-Blockierung KL1-Konzentration minderte. Unklar bleibt anhand dieser Ergebnisse der konkrete Einfluss des Biotin-Blockade-Schritts.

Ein Versuch den Überbrückungswert zu steigern, war die Fällung von KL1 mit Ammoniumsulfat (AS) mit einer Kombination einer Ultrafiltration. Diese Methode führt zu Volumenreduktion des konditionierten Mediums, der Erhöhung der Reinheit sowie Konzentration und Erhöhung der Stabilität des Proteins (219).

Zunächst wurde eine Bestimmung der nötigen AS-Konzentration durchgeführt. Für das ca. 60kDa große KL1 wurde initial eine mittlere Konzentration (50%) erwartet, da Beispielproteine wie Interleukin-1β (ca. 30kDa) bei 50-70% und IgG bei ca. 40-45% ausfallen (219).

Ab 30% Ammoniumsulfat präzipitierte KL1. Der KL1-Anteil nahm erwartungsgemäß mit zunehmender AS-Konzentration stetig zu (siehe Fällungsreihe in Abbildung 10), während der KL1-Anteil im Überstand abnahm. In einem Pilot-Versuch wurde aufgrund der Erkenntnisse der Fällungsreihe wurde zuerst mit 30% AS gefällt, um nicht benötigte, v.a. große Proteine zu entfernen. Darauf wurde eine Fällung des verbliebenen Überstands mit 70- und 80%-Lösung durchgeführt.

Die mit 70%-AS aufbereitete Fraktion zeigte im Mittel 63,9% Überbrückungswert, die mit 80%-AS aufbereitete Fraktion 69,2%. Die Steigerung, wenn auch nicht statistisch signifikant, ist plausibel, da höhere Ammoniumsulfatkonzentration zur Präzipitation kleinerer Proteine steigert (219). In der 80%-AS-Fraktion trat zu dem ein KL1-assoziiertes Signal bei ca. 40kDa auf, es war im Mittel 12,3% so intensiv wie das Referenzmedium. Es wurde wohl ein kleineres KL1-Sub-Fragment erst ab 80%-Ammoniumsulfat mit präzipitiert.

Es ist fraglich, ob diese Methode sich zur Erhöhung der Konzentration eignet, da sich Überbrückungswert als Ausgangspunkt vor der Aufreinigung nicht verbesserte. Dafür aber reduzierte sich das Volumen deutlich (30ml zu ca. 1,6ml). Dies führte so zu einem Verlust von KL1. Außerdem führte dieses Protokoll zu zwei Inkubationen über Nacht, die wie oben angemerkt aufgrund der Instabilität Klothos kritisch zu sehen sind. Dennoch ist die Volumenreduktion und Erhöhung der Konzentration eine Möglichkeit der Aufreinigungserfolg zu steigern (222). Eine Möglichkeit wäre die Inkubationsintervalle drastisch zu kürzen, um das Protokoll anwendbarer zu machen.

Auch der eigentliche Aufreinigungsprozess über die Säule erbrachte im besten Fall eine schwache Steigerung der Konzentration mit einer Aufreinigungseffektivität von 123,3%. Jedoch führte die Aufreinigung zu einer enormen Volumenreduktion (von 45ml konditioniertem Medium zu 4-8ml stärker KL1-haltiges Eluat), sodass einiges an KL1 verloren ging.

Einerseits war der Verlust im Durchlauf mit ca. 30% der KL1-Konzentration im Vergleich zum Medium vor der Säule zu einem Faktor. Es wurde ein großer Anteil des KL1 nicht an die Säule gebunden. Andererseits wurde auch ein Anteil des gebundenen KL1 abgewaschen (Abbildung 9 (A)).

Die genannten KL1-Verluste verstärkten sich erheblich beim erneuten Nutzen der Säule wie der Vergleich der Eluate aus Lauf 1 und Lauf 2 nahelegt. Die Aufreinigungseffektivität sank auf 38,4% ab. Im Durchlauf ging mehr verloren (Durchlauf war im Mittel 65,1% so intensiv konzentrierte wie das Medium vor der Säule) und im Waschschrift ging ebenso mehr KL1 verloren (vgl. Abbildung 9 (B)). Die Wiederbenutzung der Säule ging folglich mit geringerem Konzentrierungsvermögen einher.

Analog zur KL1-Expression und Aufreinigung wurde auch KL Δ TM produziert und prozessiert. Zu Erzeugung des konditionierten Mediums wurde im Akkumulationsverfahren gearbeitet. Es wurden die Konzentration der Eluate bestimmt und der Prozess evaluiert.

Der Vergleich der KL1- und der KL Δ TM-Aufreinigung zeigte, dass sich der Erfolg dieser Prozesse ähnelte mit leichten Vorteilen zugunsten der KL Δ TM-Aufreinigung. Hier war die finale Konzentration im Eluat höher.

Um den Aufreinigungsprozess zukünftig noch näher zu charakterisieren, sollte bei gleichem Protokoll eine definierte Menge Kontroll-Protein, das mit dem Strep-Tag markiert ist, aufgereinigt werden, um die dort die Aufreinigungseffektivität zu bestimmen. Dies würde sicherstellen, dass das Protokoll richtig durchgeführt wird. Herstellerangaben zu Folge sind bis zu 3mg/ml Säulenvolumen an aufgereinigtem Protein möglich.

Um eine genauere Eingrenzung der Konzentration der Eluate zu erhalten, wäre eine Silberfärbung möglich.

Ebenso ist der Strep-Tag nochmals kritisch zu hinterfragen. Zum einen muss geklärt werden, ob dieser überhaupt am Protein vorhanden ist, dazu wäre eine erneute Sequenzierung der Viren möglich. Außerdem sollte ein Nachweis des Strep-Tags mittels Strep-Antikörper erfolgen, Greta Böhme hatte ihn noch nachgewiesen (37).

In zukünftigen Tests sollte die biologisch erhaltene Aktivität des aufgereinigten KL1 gesichert werden (229). Dazu böte sich ein IGF1-Assay an. Klotho und KL1 blockieren den Insulin- und IGF-1-Weg (3, 146). Dazu könnten Zellen mit IGF1 stimuliert und gleichzeitig das rekombinante KL1 supplementiert werden. Eine Aktivität würde dann bei erniedrigter Phosphorylierung des IGF-1-Rezeptors und weiterer Proteine des Weges nachgewiesen (146).

Dazu sollten die Zellen für den Aktivitätsassay so gewählt werden, dass diese mit den eingesetzten Zellen der später folgenden Experimente übereinstimmen, um störende Einflüsse der Insektenspezifischen Glykosylierung mitzudenken. Insektenzellen produzieren andere Glykosylierungsmuster als Säugetierzellen (232, 235). Es ist bekannt, dass N-glycosylierte Proteine in Insektenzellen auch glykosyliert werden, jedoch sind die Glykosylierungsmuster

dabei simpler, v.a. Mannose-haltig und enthalten keine komplexeren Oligosaccheride wie Fucose, Galaktose oder Sialin-Säure (235). Doch diese komplexeren Glykosylierungen treten bei Proteinen von Säugtierzellen-produzierte Zellen auf (47, 232).

Die Glykosylierung des rekombinanten Klothos nimmt Einfluss auf Funktionsfähigkeit abhängig von den herstellenden Zellen. Es können sogar verschiedene Funktionen eines Proteins unterschiedlich beeinflusst werden. Dies kann dazu führen, dass rekombinantes KL1 stammend aus unterschiedlichen Expressionssystemen auf identische Fragestellungen abweichende Ergebnisse produziert (47, 236). So zeigten rekombinante Klothoproteine unterschiedliche Eigenschaften in Funktionsassays abhängig von der Herkunft aus HEK-Zellen oder CHO-Zellen(47).

Deshalb sollte im besten Fall noch mindestens ein weiterer Aktivitätsassay, z.B. ein FGF23-Signal-Transduktions-Assay wie von Chen et al. beschrieben, angeschlossen werden (237), um diese mögliche differenziert veränderten Wirkweise des rekombinanten Proteins mit einzupreisen. Die mögliche Einflussnahme der abweichenden Glykosylierung auf kommende Experimente könnte jedoch nicht ausgeschlossen werden. Klotho besitzt eine große Vielzahl an Ansatzpunkten (siehe 2.1.5), die es beeinflusst und die nicht alle vorher evaluiert werden können.

Dem Nachteil der Glykosylierung stehen die Vorteile des Baculovirus/Insektenzellsystems gegenüber wie hohe Expressionsmengen, der häufig erzielten guten Löslichkeit des Proteins im Vergleich zu bakteriellen Systemen, sowie der Sicherheitsaspekt, sowie der größeren Nähe an Säugetier-produzierte Proteine im Vergleich zu bakteriellen Systemen gegenüber (235). Greta Böhme hatte in Anbetracht der potentiellen Probleme durch die Glykosylierung zur Abkehr von dem Insektenzellsystem geraten (37). Denkbar wären, wie bei Zhong et al. demonstriert, HEK-oder CHO-Zellsysteme, jedoch auch hier bliebe die Glykosylierung ein zu beachtender Faktor (47). Würde weiter mit dem Insektenzell-basierten System gearbeitet werden, sollte wie oben erklärt Funktionsnachweise des Proteins, sowie eine Bestimmung des Glykosylierungsmusters erfolgen (236).

6.3 Uptake-Versuch

Es wurde untersucht, ob rekombinantes KL1 durch adhärente HEK 293T-Zellen über 1h aufgenommen wird und im Lysat nachweisbar ist. Außerdem war von Interesse, ob sich KL1 an der Zelloberfläche befindet und ob sich die KL1-Konzentration im Medium analog zur Klotho-Aufnahme verändert.

Ein Nachweis von KL1 im Lysat mittels SDS-PAGE/Western Blot gelang nicht. Der KL1-Nachweis gelang ebenso nicht in der PBS pH2-Fraktion (Proteine der Zelloberfläche).

Jedoch reduzierte sich das KL1-Signal um 58,7% innerhalb einer Stunde im Medium. Diese Reduktion fand durch die Exposition mit den HEK293T-Zellen statt. Ohne Zellkontakt veränderte sich bei sonst identischen Bedingungen die KL1-Konzentration nicht. Diese Ergebnisse deuteten somit nicht auf eine Aufnahme von KL1. Warum kein KL1-Nachweis gelang, könnte viele Gründe haben.

Eine Möglichkeit wäre, dass durch die HEK-Zellen wirklich kein KL1 aufgenommen wurde. Andererseits könnte ein Problem die niedrige KL1-Konzentration im experimentellen Setting gewesen sein. Es wurden zwar 1:1 KL1-haltiges Eluat dem Medium zugesetzt, dieses war aber in seiner Konzentration unbekannt und vermutlich nur niedrig konzentriert. Sodass bei mutmaßlich geringer Aufnahmerate und niedriger KL1-Konzentration nicht detektiert werden konnte. Um diese Faktoren auszuschließen, müsste höher konzentriertes KL1 verwandt werden oder ein sensitiveres Verfahren wie die Messung einer radioaktiven-Markierung oder eine Immunpräzipitation verwendet werden.

Die Reduktion von KL1 in Gegenwart der Zellen könnte durch mehrere Dinge zu erklären sein. Zum einen wäre eine Reduktion durch eine nicht-detektierte Aufnahme möglich. Der intrazelluläre lysosomale Abbau wurde durch Chloroquin blockiert, jedoch erfolgte kein Nachweis des Erfolges der Inhibition. Zum anderen könnte durch Prozessierung durch Proteine an der Zelloberfläche oder im Medium die KL1-Konzentration gesenkt werden. In Frage kommen dafür Proteasen des α - und β - Schnitts, wie die α -Sekretasen - ADAM10 und ADAM17 - und die β -Sekretasen - BACE1 und den durch unser Labor bestimmten Kandidaten Meprin β (37, 44). Die Prozessierung von KL1, die zur Reduktion im Medium führen würde, müsste sich abseits des α - und β - Schnitts bewegen und zu kleineren Protein-Fragmenten führen. Diese müssten in zukünftigen Experimenten bestimmt werden. Der fehlende Nachweis eines Fragments unterstützt diese These nicht, jedoch offenbarte sich das Produkt des Schnitts der γ -Sekretase auch erst nach gezielter Blockade der Sekretase (44). Der Nachweis des Fragments war durch seine vermutet kurze Halbwertszeit erschwert. Auszuschließen, dass weitere Fragmente von KL1 existieren, ist bis dato nicht möglich. Bisher ist nicht vollständig geklärt, wie Klotho oder KL1 aus dem Blut entfernt wird (57). Klotho wird von der Niere aus dem Blut zu großen Teilen in den Urin exkretiert. Jedoch sind auch andere Ausscheidungs- und Eliminationswege denkbar (57).

Nebenbefundlich wurde in einem Experiment der Einfluss des rk-KL1 auf den APP-Spiegel untersucht. Hier fand sich sowohl im Lysat als auch im Medium der KL1-exponierten Zellen ein erhöhter APP-Spiegel. In den Lysaten wurde 57,03 % (\pm 14,10 SEM) mehr APP detektiert als in der Kontrolle. Im Medium fand sich 98,71% (\pm 44,91 SEM) mehr APP-Signal.

Einschränkend ist die geringe Anzahl an Replikaten ($n=2$) und die fehlende Wiederholung des Experiments. Außerdem wurde das Medium TCA-präzipitiert, um APP nachzuweisen. Es handelt sich um eine semiquantitative Methode, sodass es hier Raum für Verfälschungen gibt. Als Kontrolle diente BSA. BSA wurde mit einem Albumin-Antikörper detektiert. Dieses war aber erst vor der TCA-Präzipitation zugesetzt worden, sodass es keine echte Kontrolle der sekretierten Proteine darstellt, sondern insbesondere der TCA-Fällung.

Die in der Literatur genannten Verbindungen von Klotho zu Morbus Alzheimer sind zahlreich (siehe 2.1.9). APP nimmt im Rahmen der Amyloid-Hypothese eine zentrale Rolle ein (25). Die Überschneidungen von Klotho und APP zeigen sich in Prozessierung, da beide durch α -, β - und γ -Sekretasen geschnitten werden können (25, 44) und auch in Bezug auf Regulation des Spiegels, denn sAPP β erhöht Klothospiegel (238). Es finden sich in Alzheimer-Mausmodellen Klotho-assoziierte Verbesserungen des Phänotyps auf Kognition und den Phänotyp (28-31). Zudem ist AD mit niedrigen Klotho-CSF-Spiegeln assoziiert und diese wiederum sind mit schlechterem Abschneiden bei kognitiven Tests korreliert (15, 124).

Trotz der genannten Einschränkung des vorliegenden Experiments ist die Darstellung an dieser Stelle wichtig, da die oben angesprochenen Verbindungen existieren. In weiteren Experimenten sollte erneut geprüft werden, ob KL1 den APP-Spiegel wirklich erhöht. Ferner ist die genauere Eingrenzung wichtig, ob KL1 zur Verschiebung der Prozessierung APPs hin zu dem mit Neuroprotektion-assoziierten sAPP α und weg von von dem amyloidogen-assoziierten sAPP β führt (163). Bei Bestätigung des Effekts sollte das Modell gewechselt werden. HEK293T-Zellen stellen kein gutes Modell für den APP-Stoffwechsel dar, besser wären murine oder humane Neuronen (239). Eine weitere Idee ist die Überprüfung und Abgleichung des Effekts mit dem aufgereinigtem KL Δ TM. Der Frage wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr nachgegangen, da im Zentrum die Aufnahme und der Transport von KL1 stand.

6.4 Transport Klothos über ein Blut-Hirnschranken-Modell

6.4.1 KL1 wird aktiv transportiert

Exogenes, peripher appliziertes Klotho wurde bislang nicht jenseits der BHS im Gehirn nachgewiesen (32, 34), aber dennoch bewirkt es zentralnervöse Effekte und führt u.a. zu besserer Kognition (32, 33). Auch die Applikation von KL1 allein verbessert die Kognition und verändert hippocampale Prozesse rapide nach Gabe und das sogar stärker als das fl-Klotho (33). Unklar bleibt der konkrete Mechanismus.

Denkbar wäre der Transport eines kleineren Fragments Klothos mit anschließender Wirkung im ZNS, aber auch dies ist bislang unklar (33). Die BHS wird durch Endothel, Astrozyten und Perizyten gebildet (240). Die Penetration von Molekülen zur Gehirnseite wird durch dichtes Endothel, die Tight Junctions bilden, kontrolliert. Die Dichte bestimmt dabei den Parazellulären Transport (223). Neben dem parazellulären Transport gibt es die Möglichkeit entweder für lipophile Moleküle passiv zu diffundieren oder für hydrophile Stoffe aktiv rezeptorvermittelt-spezifisch oder unspezifisch transzytotisch auf die andere Seite zu gelangen, sowie Carrier-vermittelt transportiert zu werden (223, 240) Die Fähigkeit des fl-Klothos transzytotisch transportiert zu werden, wurde in einem zellulären Nieren-Modell bereits nachgewiesen (57).

KL1 ist die eine Untereinheit Klothos. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob diese Untereinheit über ein BHS-Modell von der Blutseite (luminal) zur Gehirnseite (abluminal) transportiert werden kann. Als Modell wurden auf Transwells kultivierte b.END3-Zellen genutzt. Diese Art des in vitro Modells reduziert die Komplexität des in vivo-Modells, eignet sich aber gut für die Studien an Barriereigenschaften und mechanistischen Aspekten von Transporten (223).

Für die Evaluation eines Transports wurde der Transzytose-Quotient unter Einbezug der parazellulären Diffusion (TQ) herangezogen, wie schon zuvor in unserer Arbeitsgruppe etabliert (35, 225). Dazu wurde der Marker ¹⁴C-Inulin hinzugegeben. Es sollte außerdem überprüft werden, ob der in dieser Arbeit charakterisierte Antikörper PA-KL1/1 den Transport beeinflussen könnte.

In einem Vorversuch wurde der TQ für ¹²⁵Iod-KL1 nach 1h bestimmt. Hierbei ergab sich, dass KL1 2,5-mal mehr abluminal gefunden wurde, als durch alleinige parazelluläre Diffusion zu erwarten war. Dies sprach für einen aktiven Transport von KL1. In der darauffolgenden Versuchsreihe zur potentiellen Beeinflussung durch den Antikörper zeigte sich ein TQ von im Mittel 3,7 in der Kontrollgruppe, also der Gruppe ohne PA-KL1/1.

Diese Ergebnisse weisen auf einen potentiellen Transport von KL1 in vitro. Schaut man sich die auf parazellulären Transport korrigierte KL1-Anteil nach 1h an, der sich abluminal finden ließ, zeigte sich, dass nur 6,04% des initial applizierten KL1 transportiert worden ist. Diese eher geringe Transportleistung nach 1h ist vor dem Hintergrund des fehlenden Nachweises von peripher gegebenem fl-Klotho nicht verwunderlich (32, 34).

Kunert et al. hatten auf geschätzt, dass 97,74% des KL1 im CSF intrathekal produziert worden war und nur 2,26% aus dem Blut stammte (62). Für soluble-Klotho nahmen sie 98,49% intrathekale Synthese an. Die Autoren dieser Studie legen den Stokes-Einstein-Radius Klothos, sowie das zu erwartende Plasma/CSF-Verhältnis und das beobachtete Plasma/CSF-Verhältnis Klothos zu Grunde. Einschränkend war das Kollektiv in der Studie. Es handelte sich dabei um 39 Kinder, bei denen Infektionen oder autoinflammatorische Prozesse im ZNS ausgeschlossen werden sollten. Kinder, die eine solche Diagnostik erhalten sind nur bedingt repräsentativ für die Normalbevölkerung (62). Dennoch stimmt die Schätzung der Autoren mit den hier dargestellten Daten bezüglich der Größenordnung des einstelligen Prozentbereichs überein.

Neben dem TQ sollte im Rahmen des Vorversuchs bestimmt werden, wie viel KL-assoziertes Signal nach 1h wieder detektierbar war (sog. Wiederfindung). Dabei wurden 85,7% nach 1h wieder detektiert, während 14,3% verloren gingen. Der größte Anteil fand sich luminal, also

auf Seite der Zugabe mit durchschnittlich 73,4%. 4,7% fanden sich nach 1h abluminal. In der PBS-Fraktion fanden sich 4,7% und im Lysat 2,8% (siehe Abbildung 16 A).

Wiederfindungserhebungen sind als Qualitätsmerkmal wichtig, da verschiedene Faktoren wie schlechte Löslichkeit, Bindung an Zell-Assay Material oder Metabolisierung durch Enzyme, nicht-spezifische Bindung an Zellen und Akkumulation an der Zellschicht Einfluss nehmen können. Ein guter Wert für die Wiederfindung liegt zwischen 80 und 120% (223).

Der Präzipitats-Überstands-Quotient könnte als Indikator für solche Prozesse dienen. Das ausgefällte, im Pellet enthaltene ¹²⁵Iod repräsentiert das stabile Protein-assoziierte Signal nach der TCA-Präzipitation. Kommen aktive enzymatische oder zelluläre Prozesse zum Tragen, könnte sich das Verhältnis zum freien Iod im Überstand verändern. Interessanterweise fand sich in den Lysaten (195,3%) als auch in der PBS-Fraktion (253%) signifikant mehr KL1-assoziiertes Signal als im Mastermix, der als Kontrolle für das Ausgangsniveau des Präzipitats-Überstands-Quotient verwendet wurde. Dies könnte auf eine Akkumulation von KL1 im Rahmen spezifischer Bindung hindeuten. Abluminal fand eine zwar eine Reduktion des Präzipitats-Überstands-Quotient, die sich aber im weiteren Verlauf nicht wiederholte. Deswegen wurde ihr keine Bedeutung zugemessen.

Um die Frage nach dem Transport sicherer beantworten zu können, sollten für kommende Experimente Anpassungen am Setting erfolgen.

Die KL1-Konzentration sollte ermittelt werden (siehe Silberfärbung in 6.2.1), um zwischen Experimenten vergleichbarer zu sein und auch physiologische Konzentrationen bzw. therapeutische Konzentrationen gezielt anwenden zu können.

Es sollte eine adäquate Kontrolle geschaffen werden. Eine Möglichkeit wäre die Wiederholung der Prozedur an nicht-infiziertem, konditionierten Insektenmedium analog zum KL1-haltigen Medium. Das dann nicht KL1-haltige radioaktiv behandelten Eluat, wäre bis auf den fehlenden KL1-Zusatz identisch mit dem KL1-haltigen Ansatz. Dies würde eventuelle Unreinheiten des aufgereinigten Mediums ausgleichen.

Eine andere Möglichkeit wäre das aufgereinigte KLΔTM als Kontrolle zu nutzen. Ähnliche Proteinformen wurden bislang nicht nach peripherer Applikation jenseits der BHS detektiert (32, 57) und könnte sich deswegen als Negativ-Kontrolle anbieten. Voraussetzung wäre dabei aber eine Abstimmung der Konzentration beider Eluate.

Die von Hu et al. nachgewiesene Transzytose in der Niere wurde nach 1h ermittelt. In der Veröffentlichung werden jedoch auch Ergebnisse gezeigt, die nahe legen, dass mit zunehmender Zeit auch mehr Klotho transportiert worden ist. Ab ca. 8h stellte sich dort ein Gleichgewicht ein (57). Dies weist darauf hin, dass mit längeren Inkubationszeiten auch klarere Ergebnisse erzielt werden könnten. Dies könnte bei der aktuell hohen Streuung zur Angleichung der Werte beitragen. Auch sollte in Erwägung gezogen werden die Permeabilität zu bestimmen, um einen Eindruck über die Dynamik des Transports zu gewinnen. Permeabilität ist als Rate definiert, wie schnell ein Stoff die BHS überquert (223). Mit diesen Informationen könnte man den apparenten Permeabilitäts- Koeffizienten bestimmen, die häufigste Methode in vitro Permeabilität zu quantifizieren (223).

Eine weitere wichtige Frage wäre die Abklärung eines potentiellen Effluxes des Proteins. Zur Untersuchung der Frage kommt die Blockade von bekannten Efflux-Transporten wie P-gp in Frage.

Weitere Anpassung wären an dem Modell möglich. b.END3 Zellen eignen sich nur bedingt zur Diskrimination von parazellulärem und transzellulärem Transport (225, 241), alternativ könnten zukünftig endotheliale kapilläre Zellen aus Schweine-Gehirnen verwandt werden (PBCEC; (241) oder aus Mäusegehirnen (BMEC) (225). Diese Modelle würden höhere TER-Werte aufweisen, also weniger parazellulären Transport zulassen. Dadurch wären die dort gewonnenen Erkenntnisse verlässlicher.

Auch eine Co-Kultur von Astrozyten, wie bei Park et al. dargestellt (hier waren es C8-D1A-Zellen), könnten zur Verbesserung der Barriereigenschaften beitragen und die Validität der Ergebnisse verbessern (240). Die Autoren hatten so neben der Erhöhung der TEER-Werte, v.a. auch den parazellulären Transport von größeren Molekülen minimiert.

Generell einschränkend an den *in vitro* Modellen der BHS, wie sie hier verwendet wurden und für zukünftige Experimente vorgeschlagen wurden, ist die hohe Variabilität innerhalb verschiedener Studien, aufgrund der Modelldiversität und der fehlenden Standardisierung. Dies erschwert die Reproduzierbarkeit einzelner Experimente und die Vergleichbarkeit von verschiedenen Experimenten (223).

Sollten sich die Ergebnisse bestätigen, könnte ein ähnlicher experimenteller Aufbau wie bei Leon et al. gewählt werden (32), um peripher appliziertes KL1 im ZNS *in vivo* nachzuweisen. Sie nahmen ein rekombinantes α KL-Fragment, das die KL1- und KL2-Domäne enthielt. Dies ähnelte somit dem Produkt des α -Cuts der Sekretasen ADAM 10 and 17 (32, 44). Das Klotho-Fragment wurde dann in hoher Dosis intraperitoneal verabreicht und 4h später erfolgte der Versuch des Nachweises mittels Immunpräzipitation in Niere und Gehirn (32). Alternativ könnte auch ein vergleichbarer Ansatz wie bei Hu et al. verwendet werden. Hier wurde mit 125 Iod-markiertem-Klotho gearbeitet und auch mit einer Infrarot-Markierung. Die jeweils markierten Proteine wurden intravenös appliziert (57).

Es wäre dennoch auch wichtig andere biologische Fragen mit einem solchen Experiment zu verbinden, um beim potentiellen Scheitern des Nachweises, die Tiere nicht umsonst geopfert zu haben.

6.4.2 PA-KL1/1 vermindert den KL1-Transport

Neben der Frage des Transports sollte geklärt werden, ob durch die Anwendung des PA-KL1/1-Antikörpers der Transport gesenkt werden könnte. Es fand sich eine durchschnittliche, statistische-signifikante Reduktion des TQ von - 33,69% (\pm 11,04 SEM, $p=0,0037$) in der PA-KL1/1-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 17).

Die Reduktion des Transports durch den gegen KL1-gerichteten Antikörper unterstreicht nochmal den spezifisch KL1-assoziierten Transportprozess. Eluate des aufgereinigten Mediums, die mit dem Antikörper untersucht worden waren, zeigten hohe Spezifität (vgl. Abbildung 4), sodass anzunehmen war, dass vor allem radioaktiv-markiertes KL1 im Eluat vorhanden und an der Translokation von luminal nach abluminal gehindert worden war. Die Aufreinigung mit dem Strep-Tag verspricht eine hohe Reinheit der Eluate bis jenseits der 99% (222).

Auch die Lysate wurden betrachtet. Hier zeigte sich nach PA-KL1/1-Antikörper Exposition eine im Median leichte Reduktion des KL1-Signals. Dies könnte auf eine verhinderte Aufnahme von KL1 durch den Antikörper deuten. Einschränkend war hier jedoch die geringe Replikatzahl ($n=5$, ein unabhängiges Experiment). Deswegen sollte dieses Experiment erneut durchgeführt werden. In diesem Experiment wurden kleine Transwells genutzt, aufgrund deren 2-3 Wells für die Analyse der Lysate gepoolt wurden. Um die konkrete Frage nach Reduktion der Aufnahme in die b.END3-Zellen zu beantworten, sollte der Umstieg auf Materialien erwogen werden, die höhere Zellzahlen erlauben.

Der Präzipitats-Überstands-Quotient zeigte einen nicht-statistisch-signifikanten Trend zur Reduktion, also zu weniger KL1-assoziiertem Signal im Lysat der KL1-Antikörper-Gruppe, was eventuell auf eine geringere Akkumulation von KL1 in den Zellen hindeuten könnte.

Interessanterweise fand sich luminal 33,0% (\pm 9,1% SEM) weniger KL1 nach 1h in der PA-KL1/1-Gruppe als in der Kontrollgruppe. Wenn der KL1-Antikörper den Transport blockierte, würde man eigentlich erwarten, dass luminal mehr KL1 verbleibt als in der Kontrolle. Warum es dennoch zu dieser statistisch signifikanten Verminderung ($p=0,0006$) kam, bleibt in diesem Aufbau Umstand von Spekulation.

Für zukünftige Experimente eignet sich der Antikörper, um den TQ zu reduzieren. Um noch besser mit dem Antikörper arbeiten zu können, könnte eine Dosis-Wirkungsbeziehung ermittelt werden. Optimalerweise sollte dafür dann auch die Konzentration von KL1 bekannt sein.

Jedoch sind auch andere Applikationen zukünftig denkbar. Bei den oben angesprochenen Funktionstests nach Aufreinigung von KL1, könnte auch eine Gruppe mit KL1 und dem Antikörper inkubiert werden, um dort eine inhibitorischen Wirkung zu testen. Dies könnte die Aussagekraft in verschiedenen kommenden Experimenten durch eine neue mögliche Kontrolle stärken.

Zudem wäre interessant, ob der Antikörper mitsamt des Proteins nach Bindung internalisiert und ebenfalls transportiert wird. Dazu wäre ein Nachweis des Antikörpers abluminal mittels SDS-PAGE/Western Blot möglich.

6.4.3 Reduktion des Transports durch LRP1- und LDL-R.-Blockade

Die reduzierte Clearance spielt in der Akkumulation des A β -Peptids eine entscheidende Rolle für eine vermutete Pathogenese des Morbus Alzheimer (209, 210). Klotho-Überexpression ist in vivo mit einer Alternation der A β -Transporter-Expression an der BHS assoziiert. Dabei kommt es zur Hochregulation der Efflux-Transporter P-gp und LRP1 und zu einer Verminderung der Influx-assoziierten Proteine ABCA1 und RAGE. In vitro zeigen sie die Effekte eines Klotho-Knock-Downs auf primäre menschlichen-Plexus-Choroideus Epithelzellen. Diese sind in ihrer Fähigkeit A β -Clearance zu leisten deutlich eingeschränkt (28).

LRP1 ist in der Lage eine Vielzahl an Liganden zu binden und spielt eine Rolle in verschiedensten biologischen Prozessen. Bei den Liganden handelt es sich um Proteine des Lipoprotein-Metabolismus, Proteasen (oder Protease-/Inhibitor-Komplexe), Matrix-Proteine, intrazelluläre Proteine, Wachstumsfaktoren und weitere (36). Aktuell sind mehr als 100 Liganden bekannt (242).

Exploratorisch sollte durch Blockade von LRP1 (B411E2, (211)) und der Inhibition aller LDL-Rezeptoren (RAP, (36)) getestet werden, ob diese Rezeptoren potentiell an einem Transport von KL1 beteiligt sind.

Der TQ der LRP1-inhibierten Gruppe war im Mittel um 20,11% (\pm 10,9 % SEM) zur Kontrolle reduziert. In der LDL-R.-inhibierten Gruppe war der TQ um 23,24% (\pm 12,3 % SEM) zur Kontrolle vermindert (siehe Abbildung 19 (A)). Beide Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant. Diese Reduktionen deuten einen möglichen Einfluss der beiden Inhibitoren auf den KL1-Transport an.

Es wurden ebenso die Lysate analysiert. In der B411E2-Gruppe wurde durchschnittlich 35,5% (\pm 19,76% SEM) mehr KL1-assoziiertes Signal als in der Kontrolle detektiert (Abbildung 19 (B)). In der RAP-Gruppe war in den Lysaten sogar 107,5% (36,02 % SEM) mehr als in der Kontrollgruppe ($p=0,0342$). Interessanterweise fand sich hier eher mehr KL1 in den Lysaten bei Inhibition als in der Kontrolle. Dies ist ein Unterschied im Vergleich zur Inhibition durch den KL1-Antikörper. Hier war weniger KL1 in den Zellen festgestellt worden. Dies könnte auf Unterschiede der Blockade des Transports andeuten. So könnte der KL1-Antikörper verhindern, dass KL1 in die Zelle eintritt, während die LRP1- und LDL-R.-Blockade das Akkumulieren in der Zelle begünstigen könnte.

In der PBS-Fraktion fand sich ebenfalls statistisch signifikant mehr Signal in beiden Interventionsgruppen als in der Kontrolle (Abbildung 19 (C)). In der B411E2-Gruppe wurde eine Steigerung von im Mittel 72,3% (27,94 % SEM; $p=0,0401$) im Vergleich zur Kontrolle gemessen. In der RAP-Gruppe betrug die Steigerung 114,5 % (15,40% SEM; $p=0,0020$). Dies weist auf den Verbleib von KL1 an der Zelloberfläche hin.

Diese ersten Erkenntnisse über die mögliche Interaktion von KL1 und LRP1, sowie potentiell anderen LDL-R. sind noch kritisch zu hinterfragen. Zunächst muss in zukünftigen Experimenten die Interaktionsfähigkeit von KL1 und LRP1 betrachtet werden. Dazu böte sich

eine Co-Immünpräzipitation an. Diese Methode ist ein Standard für die Identifikation und Bestätigung von Protein-Protein-Interaktionen (243). Bei nicht ausreichender Sensitivität des Nachweises durch SDS-PAGE/Western Blot, könnte eine Massenspektrometrie angeschlossen werden (243). Bei bestätigter Interaktion könnten weiter Co-Immünpräzipitationsversuche angeschlossen werden, bei denen verschiedene LRP1-Abschnitte bzw. Domänen fehlen, um die für die Interaktion wichtige Domäne(n) zu identifizieren. Für diese Experimente böten sich die von André Kachlmeier erstellten CHO-Zellen an, die unterschiedliche LRP1-Domänen-Kombinationen aufweisen (244).

Zudem sollte der oben dargestellte Versuch wiederholt werden. Dabei sollte über eine Vergrößerung der Gruppen nachgedacht werden, um ausreichende statistische Power für das Experiment zu erreichen. Es gelten sonst auch die oben genannten Möglichkeiten das Modell anzupassen (siehe 6.4.1). Mit der Verwendung von BMEC oder PBCEC statt b.END3-Zellen würde eine höhere Diskriminationsfähigkeit des Experiments bezüglich parazellulärem und transzellulärem Transport geschaffen (223). Außerdem muss wie oben besprochen dringend eine Konzentrationsbestimmung des rekombinanten KL1 erfolgen und eine Anpassung der Transportzeit in Erwägung gezogen werden.

7 Zusammenfassung

Inhalt dieser Arbeit war die Charakterisierung eines polyklonalen Antikörperkandidaten gegen eine der zwei Klotho-Untereinheiten, sowie die Evaluation und Optimierung der Expression des rekombinanten KL1 und KL Δ TM. Außerdem sollte die mögliche Aufnahme von KL1 durch HEK293T-Zellen untersucht werden. Im Vordergrund stand der mögliche Transport von KL1 über die BHS. Dies wurde anhand eines in vitro Modells untersucht.

Bisher war Klotho nach peripherer Gabe nicht im ZNS nachgewiesen worden (32, 34). Dennoch zeigte sich nach peripherer Klotho-Gabe eine analoge Verbesserung der kognitiven Befunde wie bei globaler Überexpression (18, 28). Der Mechanismus der Verbesserung im ZNS durch periphere Gabe ist weiterhin unklar. Denkbar ist ein Transport eines kleineren Fragments wie z.B. der Klotho-Untereinheit KL1 (33). Für die zukünftig angestrebte therapeutische Verwendung Klothos oder kleiner Fragmente ist das Verständnis des zugrunde liegenden Mechanismus, wie peripheres Klotho zentral wirkt, wichtig.

Von den vier Antiseren (zwei gegen KL1- und zwei gegen KL2-gerichtet) zeigten die gegen KL1-gerichteten Antiseren erfolgreiche Detektion von Klotho in Lysaten von transient-transfizierten HEK293T-Zellen nach SDS-PAGE/Western Blot. Eins der KL1-Antiseren wurde mittels Affinitätschromatografie aufgereinigt und anschließend wurden die optimalen Anwendungsmodalitäten bestimmt. Aus den Tests kristallisierte sich eine Nutzungsempfehlung für den polyklonalen Antikörper PA-KL1/1 eine Konzentration von 1,5-3 μ g/ml bei 5% Milchpulverzusatz für ein SDS-PAGE/Western Blot-Prozedere. Für den gesicherten Nachweis bei niedrigen Klotho- bzw. KL1-Konzentrationen sollten weitere Tests unter diesen Bedingungen stattfinden. Die gegen KL2-gerichteten Antiseren zeigten sich bislang nicht erfolgreich.

Für die Produktion von rekombinantem KL1 bzw. KL Δ TM wurden High-Five-Insektenzellen und ein Baculovirus-System genutzt. Zur Infektion der High-Five-Insektenzellen standen ein KL1- und ein KL Δ TM-Baculovirus von Greta Böhme zu Verfügung (37). Die Verdünnung des Virusmediums von 1:20 zeigte sich als produktivste, niedrigere Verdünnungen brachten keinen zusätzlichen Vorteil. Die wiederholte Abnahme des Mediums zeigte sich bezüglich der produzierten KL1-Konzentration äquivalent zur akkumulativen Methode. Jedoch war aufgrund der größeren Menge an resultierendem konditioniertem Medium und dem niedrigeren Ausmaß an Degradation erstere Methode vorzuziehen. Die stärkste Expressionsleistung fand sich zwischen 24-72h, wie es gemäß des Viruszyklus auch zu erwarten ist (235).

Vor der Aufreinigung ging zwischen Mediumsabnahme und der Applikation auf die Säule ein erheblicher Anteil an KL1 verloren, was die in der Literatur genannte Instabilität Klothos gegenüber Einfrier-/Auftauzyklen unterstrich (4). Der Versuch den Überbrückungswert mit einer Ammoniumsulfatpräzipitation kombiniert mit einer Ultrafiltration zu steigern, lieferte in dem gezeigten Beispiel kein überzeugendes Ergebnis. Das Steigern der Ausgangskonzentration vor Aufreinigung wird jedoch empfohlen (222), sodass sich ein Optimieren des Verfahrens hier lohnen kann. Das eigentliche Aufreinigungsverfahren erbrachte im besten Fall eine leichte Steigerung der Konzentration, jedoch waren die letztlich entstehenden Eluate nur niedrig konzentriert. In zukünftigen Bemühungen sollte weiter der Versuch unternommen werden, die Konzentration zu steigern. Außerdem sind zukünftig Aktivitätsassays des rekombinanten Proteins unerlässlich, vor allem vor dem Hintergrund der Bedeutung der Glykosylierung (47, 232, 235). Ein Wechsel des Expressionssystems zu Säugetierzellen wie bei Zhong et al. kann in Erwägung gezogen werden (47).

Eine KL1-Aufnahme durch HEK293T-Zellen konnte mit der gewählten Methode nicht nachgewiesen werden, sodass die Notwendigkeit für sensitivere Methoden besteht. Auch die niedrige verwendete Konzentration an KL1 könnte zu dem fehlenden Nachweis geführt haben. Dennoch reduzierte sich das KL1-Signal nach 1h nach Exposition mit den Zellen, möglich wäre der enzymatische Abbau durch z.B. α -Sekretasen ADAM10 und ADAM17 und die β -Sekretasen BACE1 und Mepri β (37, 44). Der Reduktion der KL1-Konzentration sollte in kommenden Experimenten weiter nachgegangen werden.

Innerhalb des gleichen Experiments wurde auch der APP-Spiegel im Medium und den Lysaten erhoben. Dabei fand sich eine Erhöhung der Spiegel nach KL1-Exposition. Trotz der oben aufgeführten Einschränkung, v.a. der fehlenden Wiederholung des Experiments, wurde das Ergebnis hier dargestellt. Grund dafür waren die sich in der Literatur befindlichen Hinweise zwischen Klotho, APP und AD.

Für die Evaluation des Transports von KL1 über ein BHS-Modell wurde der Transzytose-Quotient genutzt. Hierbei zeigten sich erstmals empirische Hinweise, dass KL1 über ein BHS-Modell transportiert werden kann. Es fand sich auf der Gehirn-Seite mehr KL1 als durch parazellulären Transport zu erwarten war, wenn auch nur recht geringe Mengen. Die Ausmaße des potentiellen Transports passen zu den Schätzungen von Kunert et al., die für 2,26% des KL1 im CSF das Blut als Ursprung vermuteten (62). Auch in den Lysaten und an der Zelloberfläche fanden sich kleine Mengen KL1, sowie Hinweise auf eine Akkumulation innerhalb dieser Fraktion (Präzipitats-Überstands-Quotient). Um den Transport von KL1 sicherer nachzuweisen, sollte in zukünftigen Experimenten Optimierungen am Modell stattfinden (wie beispielsweise Wechsel der Modellzellen (225, 241)), sowie weitere oben genannte Anpassungen erfolgen.

Der im Rahmen des Projekts aufgereinigte und charakterisierte polyklonale Antikörper PA-KL1/1 reduziert den Transport von KL1, um ca. 1/3 und zeigt Hinweise der Reduktion der Aufnahme von KL1 in die Zellen. Zur Sicherstellung der reduzierten Aufnahme sollte das Setting umgestellt und das Experiment wiederholt werden. Zudem sollte eine Dosis-Wirkungsbeziehung exploriert werden, um festzustellen, ob sich der Transport noch weiter senken lässt.

Die Inhibition von LRP1 und aller anderen LDL-Rezeptoren führte zu Hinweisen einer Reduktion des KL1-Transports. Gleichzeitig fand sich mehr in KL1 in den Lysaten und an der Zelloberfläche. Diese Ergebnisse müssen aufgrund der oben genannten Einschränkungen dringend validiert werden.

Abschließend erbrachte die Arbeit die Grundlage für weitere Experimente zum potentiellen Transport von KL1. Zum einen wurde der Produktionsprozess der rekombinanten charakterisiert und Probleme näher beschrieben. Es wurde ein polyklonaler Antikörper aufgereinigt und die Detektion von Klotho validiert. Zum anderen zeigt diese Arbeit erste Hinweise auf einen potentiellen Transport über die Blut-Hirnschranke der Klotho-Untereinheit KL1.

8 Literaturverzeichnis

1. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390(6655):45-51.
2. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y. *Klotho*, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol*. 2003;17(12):2393-403.
3. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, et al. Suppression of aging in mice by the hormone *Klotho*. *Science*. 2005;309(5742):1829-33.
4. Cheikhi A, Barchowsky A, Sahu A, Shinde SN, Pius A, Clemens ZJ, et al. *Klotho*: An Elephant in Aging Research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2019;74(7):1031-42.
5. Ligumsky H, Merenbakh-Lamin K, Keren-Khadmy N, Wolf I, Rubinek T. The role of α -*klotho* in human cancer: molecular and clinical aspects. *Oncogene*. 2022;41(40):4487-97.
6. Neyra JA, Hu MC, Moe OW. *Klotho* in Clinical Nephrology: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2020;16(1):162-76.
7. 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.
8. Masuda H, Chikuda H, Suga T, Kawaguchi H, Kuro-o M. Regulation of multiple ageing-like phenotypes by inducible *klotho* gene expression in *klotho* mutant mice. *Mech Ageing Dev*. 2005;126(12):1274-83.
9. Chen G, Liu Y, Goetz R, Fu L, Jayaraman S, Hu MC, et al. α -*Klotho* is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. *Nature*. 2018;553(7689):461-6.
10. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al. *Klotho* converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006;444(7120):770-4.
11. Prud'homme GJ, Kurt M, Wang Q. Pathobiology of the *Klotho* Antiaging Protein and Therapeutic Considerations. *Front Aging*. 2022;3:931331.
12. Xu Y, Sun Z. Molecular basis of *Klotho*: from gene to function in aging. *Endocr Rev*. 2015;36(2):174-93.
13. Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, et al. Establishment of sandwich ELISA for soluble α -*Klotho* measurement: Age-dependent change of soluble α -*Klotho* levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;398(3):513-8.
14. Espuch-Oliver A, Vázquez-Lorente H, Jurado-Fasoli L, de Haro-Muñoz T, Díaz-Alberola I, López-Velez MDS, et al. Reference Values of Soluble α -*Klotho* Serum Levels Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Healthy Adults Aged 18-85 Years. *J Clin Med*. 2022;11(9).
15. 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. *Neurosci Lett*. 2014;558:37-40.
16. Nagai T, Yamada K, Kim HC, Kim YS, Noda Y, Imura A, et al. Cognition impairment in the genetic model of aging *klotho* gene mutant mice: a role of oxidative stress. *FASEB J*. 2003;17(1):50-2.
17. Dubal DB, Yokoyama JS, Zhu L, Broestl L, Worden K, Wang D, et al. Life extension factor *klotho* enhances cognition. *Cell Rep*. 2014;7(4):1065-76.
18. Dubal DB, Zhu L, Sanchez PE, Worden K, Broestl L, Johnson E, et al. Life extension factor *klotho* prevents mortality and enhances cognition in hAPP transgenic mice. *J Neurosci*. 2015;35(6):2358-71.
19. Emami Aleagha MS, Siroos B, Ahmadi M, Balood M, Palangi A, Haghighi AN, Harirchian MH. Decreased concentration of *Klotho* in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2015;281:5-8.
20. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2011;377(9770):1019-31.

21. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health*. 2022;7(2):e105-e25.
22. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2021;397(10284):1577-90.
23. Europe A. Dementia in Europe Yearbook 2019 - Estimating the prevalence of dementia in Europe: Alzheimer Europe; 2019.
24. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2018;25(1):59-70.
25. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016;8(6):595-608.
26. Shi M, Chu F, Zhu F, Zhu J. Impact of Anti-amyloid- β Monoclonal Antibodies on the Pathology and Clinical Profile of Alzheimer's Disease: A Focus on Aducanumab and Lecanemab. *Front Aging Neurosci*. 2022;14:870517.
27. Perneczky R, Dom G, Chan A, Falkai P, Bassetti C. Anti-amyloid antibody treatments for Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2024;31(2):e16049.
28. Zhao Y, Zeng CY, Li XH, Yang TT, Kuang X, Du JR. Klotho overexpression improves amyloid- β clearance and cognition in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Aging Cell*. 2020;19(10):e13239.
29. Zeng CY, Yang TT, Zhou HJ, Zhao Y, Kuang X, Duan W, Du JR. Lentiviral vector-mediated overexpression of Klotho in the brain improves Alzheimer's disease-like pathology and cognitive deficits in mice. *Neurobiol Aging*. 2019;78:18-28.
30. Kuang X, Chen YS, Wang LF, Li YJ, Liu K, Zhang MX, et al. Klotho upregulation contributes to the neuroprotection of ligustilide in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol Aging*. 2014;35(1):169-78.
31. Kuang X, Zhou HJ, Thorne AH, Chen XN, Li LJ, Du JR. Neuroprotective Effect of Ligustilide through Induction of α -Secretase Processing of Both APP and Klotho in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:353.
32. 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 Rep*. 2017;20(6):1360-71.
33. Gupta S, Moreno AJ, Wang D, Leon J, Chen C, Hahn O, et al. KL1 Domain of Longevity Factor Klotho Mimics the Metabolome of Cognitive Stimulation and Enhances Cognition in Young and Aging Mice. *J Neurosci*. 2022;42(19):4016-25.
34. Hu MC, Shi M, Zhang J, Addo T, Cho HJ, Barker SL, et al. Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating α Klotho. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):79-90.
35. Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meißner JN, Schubert N, Di Spiezio A, et al. Endothelial LRP1 transports amyloid- β (1-42) across the blood-brain barrier. *J Clin Invest*. 2016;126(1):123-36.
36. Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev*. 2008;88(3):887-918.
37. Böhme GM. Mepri β ist eine neue Sekretase des Anti-Aging-Proteins Klotho [Dissertation]. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2022.
38. 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. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242(3):626-30.
39. Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y, Sekine S, Iida A, Anazawa H, et al. Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett*. 1998;424(1-2):6-10.
40. Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, et al. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett*. 2004;565(1-3):143-7.
41. Li L, Pastor J, Zhang J, Davidson T, Hu MC, Moe OW. In search of alternatively spliced alpha-Klotho KI1 protein in mouse brain. *FASEB Bioadv*. 2021;3(7):531-40.

42. Mencke R, Harms G, Moser J, van Meurs M, Diepstra A, Leuvenink HG, Hillebrands JL. Human alternative Klotho mRNA is a nonsense-mediated mRNA decay target inefficiently spliced in renal disease. *JCI Insight*. 2017;2(20).
43. Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(50):19796-801.
44. Bloch L, Sineshchekova O, Reichenbach D, Reiss K, Saftig P, Kuro-o M, Kaether C. Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase. *FEBS Lett*. 2009;583(19):3221-4.
45. Maretzky T, Scholz F, Köten B, Proksch E, Saftig P, Reiss K. ADAM10-mediated E-cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2008;128(7):1737-46.
46. Chen CD, Li Y, Chen AK, Rudy MA, Nasse JS, Zeldich E, et al. 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.
47. Zhong X, Jagarlapudi S, Weng Y, Ly M, Rouse JC, McClure K, et al. 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.
48. Ito S, Fujimori T, Hayashizaki Y, Nabeshima Y. Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1576(3):341-5.
49. Hayashi Y, Ito M. Klotho-Related Protein KLRP: Structure and Functions. *Vitam Horm*. 2016;101:1-16.
50. Ito S, Kinoshita S, Shiraishi N, Nakagawa S, Sekine S, Fujimori T, Nabeshima YI. Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein. *Mech Dev*. 2000;98(1-2):115-9.
51. Razaque MS. The role of Klotho in energy metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(10):579-87.
52. Kharitonov A, Dunbar JD, Bina HA, Bright S, Moyers JS, Zhang C, et al. FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *J Cell Physiol*. 2008;215(1):1-7.
53. Olaison H, Mencke R, Hillebrands JL, Larsson TE. Tissue expression and source of circulating α Klotho. *Bone*. 2017;100:19-35.
54. Lim K, Groen A, Molostvov G, Lu T, Lilley KS, Snead D, et al. α -Klotho Expression in Human Tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(10):E1308-18.
55. Martín-Núñez E, Pérez-Castro A, Tagua VG, Hernández-Carballo C, Ferri C, Pérez-Delgado N, et al. Klotho expression in peripheral blood circulating cells is associated with vascular and systemic inflammation in atherosclerotic vascular disease. *Sci Rep*. 2022;12(1):8422.
56. Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, Ohyama Y, Aizawa H, Suga T, et al. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;248(2):324-9.
57. Hu MC, Shi M, Zhang J, Addo T, Cho HJ, Barker SL, et al. Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating α Klotho. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):79-90.
58. Lindberg K, Amin R, Moe OW, Hu MC, Erben RG, Östman Wernerson A, et al. The kidney is the principal organ mediating klotho effects. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(10):2169-75.
59. Akimoto T, Kimura T, Watanabe Y, Ishikawa N, Iwazu Y, Saito O, et al. The impact of nephrectomy and renal transplantation on serum levels of soluble Klotho protein. *Transplant Proc*. 2013;45(1):134-6.
60. Wang HL, Xu Q, Wang Z, Zhang YH, Si LY, Li XJ, et al. A potential regulatory single nucleotide polymorphism in the promoter of the Klotho gene may be associated with essential hypertension in the Chinese Han population. *Clin Chim Acta*. 2010;411(5-6):386-90.
61. Saar-Kovrov V, Donners M, van der Vorst EPC. Shedding of Klotho: Functional Implications in Chronic Kidney Disease and Associated Vascular Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:617842.

62. Kunert SK, Hartmann H, Haffner D, Leifheit-Nestler M. Klotho and fibroblast growth factor 23 in cerebrospinal fluid in children. *J Bone Miner Metab.* 2017;35(2):215-26.
63. Kresovich JK, Bulka CM. Low Serum Klotho Associated With All-cause Mortality Among a Nationally Representative Sample of American Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2022;77(3):452-6.
64. Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, et al. Plasma klotho and mortality risk in older community-dwelling adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2011;66(7):794-800.
65. Lee J, Jeong DJ, Kim J, Lee S, Park JH, Chang B, et al. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer.* 2010;9:109.
66. Pan J, Zhong J, Gan LH, Chen SJ, Jin HC, Wang X, Wang LJ. Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2011;32(4):729-35.
67. Zhang Q, Yin S, Liu L, Liu Z, Cao W. Rhein reversal of DNA hypermethylation-associated Klotho suppression ameliorates renal fibrosis in mice. *Sci Rep.* 2016;6:34597.
68. Young GH, Wu VC. KLOTHO methylation is linked to uremic toxins and chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2012;81(7):611-2.
69. 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.
70. King GD, Rosene DL, Abraham CR. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. *Age (Dordr).* 2012;34(6):1405-19.
71. Sahu A, Mamiya H, Shinde SN, Cheikhi A, Winter LL, Vo NV, et al. Age-related declines in α -Klotho drive progenitor cell mitochondrial dysfunction and impaired muscle regeneration. *Nat Commun.* 2018;9(1):4859.
72. Wu SE, Chen WL. Soluble klotho as an effective biomarker to characterize inflammatory states. *Ann Med.* 2022;54(1):1520-9.
73. Moreno JA, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, Suárez-Alvarez B, Lopez-Larrea C, Jakubowski A, et al. The inflammatory cytokines TWEAK and TNF α reduce renal klotho expression through NF κ B. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(7):1315-25.
74. Zhou Q, Lin S, Tang R, Veeraragoo P, Peng W, Wu R. Role of Fosinopril and Valsartan on Klotho Gene Expression Induced by Angiotensin II in Rat Renal Tubular Epithelial Cells. *Kidney Blood Press Res.* 2010;33(3):186-92.
75. Yoon HE, Ghee JY, Piao S, Song JH, Han DH, Kim S, et al. Angiotensin II blockade upregulates the expression of Klotho, the anti-ageing gene, in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(3):800-13.
76. Narumiya H, Sasaki S, Kuwahara N, Irie H, Kusaba T, Kameyama H, et al. HMG-CoA reductase inhibitors up-regulate anti-aging klotho mRNA via RhoA inactivation in IMCD3 cells. *Cardiovasc Res.* 2004;64(2):331-6.
77. Kuwahara N, Sasaki S, Kobara M, Nakata T, Tatsumi T, Irie H, et al. HMG-CoA reductase inhibition improves anti-aging klotho protein expression and arteriosclerosis in rats with chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Int J Cardiol.* 2008;123(2):84-90.
78. Marsell R, Krajisnik T, Göransson H, Ohlsson C, Ljunggren O, Larsson TE, Jonsson KB. Gene expression analysis of kidneys from transgenic mice expressing fibroblast growth factor-23. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(3):827-33.
79. Kuro OM. The Klotho proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(1):27-44.
80. Forster RE, Jurutka PW, Hsieh JC, Haussler CA, Lowmiller CL, Kaneko I, et al. Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;414(3):557-62.
81. Choi BH, Kim CG, Lim Y, Lee YH, Shin SY. Transcriptional activation of the human Klotho gene by epidermal growth factor in HEK293 cells; role of Egr-1. *Gene.* 2010;450(1-2):121-7.
82. Zhang H, Li Y, Fan Y, Wu J, Zhao B, Guan Y, et al. Klotho is a target gene of PPAR-gamma. *Kidney Int.* 2008;74(6):732-9.

83. Zhang R, Zheng F. PPAR-gamma and aging: one link through klotho? *Kidney Int.* 2008;74(6):702-4.
84. Abolghasemi M, Yousefi T, Maniati M, Qujeq D. The interplay of Klotho with signaling pathway and microRNAs in cancers. *J Cell Biochem.* 2019;120(9):14306-17.
85. Li J, Chen Y, Guo X, Zhou L, Jia Z, Tang Y, et al. Inhibition of miR-15b decreases cell migration and metastasis in colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2016;37(7):8765-73.
86. Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science.* 2005;310(5747):490-3.
87. Cha SK, Ortega B, Kurosu H, Rosenblatt KP, Kuro OM, Huang CL. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(28):9805-10.
88. Cha SK, Hu MC, Kurosu H, Kuro-o M, Moe O, Huang CL. Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K(+) excretion by Klotho. *Mol Pharmacol.* 2009;76(1):38-46.
89. Phan P, Saikia BB, Sonnaila S, Agrawal S, Alraawi Z, Kumar TKS, Iyer S. The Saga of Endocrine FGFs. *Cells.* 2021;10(9).
90. Erben RG. Physiological Actions of Fibroblast Growth Factor-23. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:267.
91. Erben RG. α -Klotho's effects on mineral homeostasis are fibroblast growth factor-23 dependent. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2018;27(4):229-35.
92. Kuro OM. Molecular Mechanisms Underlying Accelerated Aging by Defects in the FGF23-Klotho System. *Int J Nephrol.* 2018;2018:9679841.
93. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest.* 2007;117(12):4003-8.
94. Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S, Van Looveren R, Maes C, Carmeliet P, et al. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J Clin Invest.* 2006;116(12):3150-9.
95. Andrukhova O, Bayer J, Schüler C, Zeitz U, Murali SK, Ada S, et al. Klotho Lacks an FGF23-Independent Role in Mineral Homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2017;32(10):2049-61.
96. Anour R, Andrukhova O, Ritter E, Zeitz U, Erben RG. Klotho lacks a vitamin D independent physiological role in glucose homeostasis, bone turnover, and steady-state PTH secretion in vivo. *PLoS One.* 2012;7(2):e31376.
97. Kuro OM. Klotho and calciprotein particles as therapeutic targets against accelerated ageing. *Clin Sci (Lond).* 2021;135(15):1915-27.
98. Jahnen-Dechent W, Büscher A, Köppert S, Heiss A, Kuro OM, Smith ER. Mud in the blood: the role of protein-mineral complexes and extracellular vesicles in biomineralisation and calcification. *J Struct Biol.* 2020;212(1):107577.
99. Akiyama KI, Miura Y, Hayashi H, Sakata A, Matsumura Y, Kojima M, et al. Calciprotein particles regulate fibroblast growth factor-23 expression in osteoblasts. *Kidney Int.* 2020;97(4):702-12.
100. Ito N, Fukumoto S. Congenital Hyperphosphatemic Conditions Caused by the Deficient Activity of FGF23. *Calcif Tissue Int.* 2021;108(1):104-15.
101. Mencke R, Olauson H, Hillebrands JL. Effects of Klotho on fibrosis and cancer: A renal focus on mechanisms and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;121:85-100.
102. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, et al. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem.* 2011;286(10):8655-65.
103. Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science.* 2007;317(5839):803-6.
104. Buendía P, Carracedo J, Soriano S, Madueño JA, Ortiz A, Martín-Malo A, et al. Klotho Prevents NF κ B Translocation and Protects Endothelial Cell From Senescence Induced by Uremia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015;70(10):1198-209.
105. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J Biol Chem.* 2005;280(45):38029-34.

106. Guo Y, Zhuang X, Huang Z, Zou J, Yang D, Hu X, et al. Klotho protects the heart from hyperglycemia-induced injury by inactivating ROS and NF- κ B-mediated inflammation both in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(1):238-51.
107. Chen TH, Kuro OM, Chen CH, Sue YM, Chen YC, Wu HH, Cheng CY. The secreted Klotho protein restores phosphate retention and suppresses accelerated aging in Klotho mutant mice. *Eur J Pharmacol.* 2013;698(1-3):67-73.
108. Mikula-Pietrasik J, Rutecki S, Książek K. The functional multipotency of transforming growth factor β signaling at the intersection of senescence and cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(4):196.
109. Huang Q, Chen Y, Shen S, Wang Y, Liu L, Wu S, et al. Klotho antagonizes pulmonary fibrosis through suppressing pulmonary fibroblasts activation, migration, and extracellular matrix production: a therapeutic implication for idiopathic pulmonary fibrosis. *Aging (Albany N Y).* 2020;12(7):5812-31.
110. Hayat R, Manzoor M, Hussain A. Wnt signaling pathway: A comprehensive review. *Cell Biol Int.* 2022;46(6):863-77.
111. Bian A, Neyra JA, Zhan M, Hu MC. Klotho, stem cells, and aging. *Clin Interv Aging.* 2015;10:1233-43.
112. Zhou L, Li Y, Zhou D, Tan RJ, Liu Y. Loss of Klotho contributes to kidney injury by derepression of Wnt/ β -catenin signaling. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(5):771-85.
113. Château MT, Araiz C, Descamps S, Galas S. Klotho interferes with a novel FGF-signalling pathway and insulin/Igf-like signalling to improve longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany N Y).* 2010;2(9):567-81.
114. Vitale G, Pellegrino G, Vollery M, Hofland LJ. ROLE of IGF-1 System in the Modulation of Longevity: Controversies and New Insights From a Centenarians' Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:27.
115. Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature.* 2013;493(7432):338-45.
116. Dias GP, Murphy T, Stangl D, Ahmet S, Morisse B, Nix A, et al. Intermittent fasting enhances long-term memory consolidation, adult hippocampal neurogenesis, and expression of longevity gene Klotho. *Mol Psychiatry.* 2021;26(11):6365-79.
117. Gao W, Guo L, Yang Y, Wang Y, Xia S, Gong H, et al. Dissecting the Crosstalk Between Nrf2 and NF- κ B Response Pathways in Drug-Induced Toxicity. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:809952.
118. Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, Ligumsky H, Sredni B, Kanety H, et al. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene.* 2008;27(56):7094-105.
119. Li XX, Huang LY, Peng JJ, Liang L, Shi DB, Zheng HT, Cai SJ. Klotho suppresses growth and invasion of colon cancer cells through inhibition of IGF1R-mediated PI3K/AKT pathway. *Int J Oncol.* 2014;45(2):611-8.
120. Rubinek T, Wolf I. The Role of Alpha-Klotho as a Universal Tumor Suppressor. *Vitam Horm.* 2016;101:197-214.
121. Abramovitz L, Rubinek T, Ligumsky H, Bose S, Barshack I, Avivi C, et al. KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(13):4254-66.
122. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
123. Li Q, Vo HT, Wang J, Fox-Quick S, Dobrunz LE, King GD. Klotho regulates CA1 hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience.* 2017;347:123-33.
124. 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;86(3):1471-81.
125. Massó A, Sánchez A, Gimenez-Llort L, Lizcano JM, Cañete M, García B, et al. 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.

126. 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.
127. Fung TY, Iyaswamy A, Sreenivasmurthy SG, Krishnamoorthi S, Guan XJ, Zhu Z, et al. Klotho an Autophagy Stimulator as a Potential Therapeutic Target for Alzheimer's Disease: A Review. *Biomedicines*. 2022;10(3).
128. 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.
129. Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, Maekawa Y, Yamamoto K, Ohta J, et al. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339(3):827-32.
130. Sedighi M, Baluchnejadmojarad T, Afshin-Majd S, Amiri M, Aminzade M, Roghani M. Anti-aging Klotho Protects SH-SY5Y Cells Against Amyloid β 1-42 Neurotoxicity: Involvement of Wnt1/pCREB/Nrf2/HO-1 Signaling. *J Mol Neurosci*. 2021;71(1):19-27.
131. Zeldich E, Chen CD, Colvin TA, Bove-Fenderson EA, Liang J, Tucker Zhou TB, et al. The neuroprotective effect of Klotho is mediated via regulation of members of the redox system. *J Biol Chem*. 2014;289(35):24700-15.
132. Zhou HJ, Zeng CY, Yang TT, Long FY, Kuang X, Du JR. 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.
133. Zhu L, Stein LR, Kim D, Ho K, Yu GQ, Zhan L, et al. Klotho controls the brain-immune system interface in the choroid plexus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(48):E11388-e96.
134. Vo HT, Laszczyk AM, King GD. Klotho, the Key to Healthy Brain Aging? *Brain Plast*. 2018;3(2):183-94.
135. 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. *Neurobiol Aging*. 2017;59:41-54.
136. Salech F, Varela-Nallar L, Arredondo SB, Bustamante DB, Andaur GA, Cisneros R, et al. Local Klotho Enhances Neuronal Progenitor Proliferation in the Adult Hippocampus. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2019;74(7):1043-51.
137. Xin SH, Tan L, Cao X, Yu JT, Tan L. Clearance of Amyloid Beta and Tau in Alzheimer's Disease: from Mechanisms to Therapy. *Neurotox Res*. 2018;34(3):733-48.
138. Xue M, Yang F, Le Y, Yang Y, Wang B, Jia Y, et al. Klotho protects against diabetic kidney disease via AMPK- and ERK-mediated autophagy. *Acta Diabetol*. 2021;58(10):1413-23.
139. Mytych J, Sołek P, Będzińska A, Rusinek K, Warzybok A, Tabęcka-Łonczyńska A, Kozirowski M. Klotho-mediated changes in the expression of Atg13 alter formation of ULK1 complex and thus initiation of ER- and Golgi-stress response mediated autophagy. *Apoptosis*. 2020;25(1-2):57-72.
140. Fernández Á F, Sebti S, Wei Y, Zou Z, Shi M, McMillan KL, et al. Disruption of the beclin 1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice. *Nature*. 2018;558(7708):136-40.
141. Chen CD, Sloane JA, Li H, Aytan N, Giannaris EL, Zeldich E, et al. The antiaging protein Klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS. *J Neurosci*. 2013;33(5):1927-39.
142. Zeldich E, Chen CD, 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.
143. Mazucanti CH, Kawamoto EM, Mattson MP, Scavone C, Camandola S. Activity-dependent neuronal Klotho enhances astrocytic aerobic glycolysis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019;39(8):1544-56.
144. Massó A, Sánchez A, Bosch A, Giménez-Llort L, Chillón M. Secreted α Klotho isoform protects against age-dependent memory deficits. *Mol Psychiatry*. 2018;23(9):1937-47.

145. Li S, Jin M, Koeglsperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci*. 2011;31(18):6627-38.
146. Ligumsky H, Rubinek T, Merenbakh-Lamin K, Yeheskel A, Sertchook R, Shahmoon S, et al. Tumor Suppressor Activity of Klotho in Breast Cancer Is Revealed by Structure-Function Analysis. *Mol Cancer Res*. 2015;13(10):1398-407.
147. Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector TD, et al. Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2002;17(10):1744-51.
148. Hao Q, Ding X, Gao L, Yang M, Dong B. G-395A polymorphism in the promoter region of the KLOTHO gene associates with reduced cognitive impairment among the oldest old. *Age (Dordr)*. 2016;38(1):7.
149. Kim Y, Kim JH, Nam YJ, Kong M, Kim YJ, Yu KH, et al. Klotho is a genetic risk factor for ischemic stroke caused by cardioembolism in Korean females. *Neurosci Lett*. 2006;407(3):189-94.
150. Zhang F, Zhai G, Kato BS, Hart DJ, Hunter D, Spector TD, Ahmadi KR. Association between KLOTHO gene and hand osteoarthritis in a female Caucasian population. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(6):624-9.
151. Kanbay M, Demiray A, Afsar B, Covic A, Tapoi L, Ureche C, Ortiz A. Role of Klotho in the Development of Essential Hypertension. *Hypertension*. 2021;77(3):740-50.
152. Shimokata H, Ando F, Fukukawa Y, Nishita Y. Klotho gene promoter polymorphism and cognitive impairment. *Geriatrics & Gerontology International*. 2006;6(2):136-41.
153. Arking DE, Krebsova A, Macek M, Sr., Macek M, Jr., Arking A, Mian IS, et al. Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(2):856-61.
154. 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. *Circ Res*. 2005;96(4):412-8.
155. Deary IJ, Harris SE, Fox HC, Hayward C, Wright AF, Starr JM, Whalley LJ. KLOTHO genotype and cognitive ability in childhood and old age in the same individuals. *Neurosci Lett*. 2005;378(1):22-7.
156. Yokoyama JS, Sturm VE, Bonham LW, Klein E, Arfanakis K, Yu L, et al. Variation in longevity gene KLOTHO is associated with greater cortical volumes. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015;2(3):215-30.
157. Belloy ME, Napolioni V, Han SS, Le Guen Y, Greicius MD. Association of Klotho-VS Heterozygosity With Risk of Alzheimer Disease in Individuals Who Carry APOE4. *JAMA Neurol*. 2020;77(7):849-62.
158. Belloy ME, Eger SJ, Le Guen Y, Napolioni V, Deters KD, Yang HS, et al. KL*VS heterozygosity reduces brain amyloid in asymptomatic at-risk APOE*4 carriers. *Neurobiol Aging*. 2021;101:123-9.
159. Driscoll I, Ma Y, Gallagher CL, Johnson SC, Asthana S, Hermann BP, et al. Age-Related Tau Burden and Cognitive Deficits Are Attenuated in KLOTHO KL-VS Heterozygotes. *J Alzheimers Dis*. 2021;79(3):1297-305.
160. Almeida OP, Morar B, Hankey GJ, Yeap BB, Golledge J, Jablensky A, Flicker L. Longevity Klotho gene polymorphism and the risk of dementia in older men. *Maturitas*. 2017;101:1-5.
161. Mengel-From J, Soerensen M, Nygaard M, McGue M, Christensen K, Christiansen L. Genetic Variants in KLOTHO Associate With Cognitive Function in the Oldest Old Group. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016;71(9):1151-9.
162. 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.
163. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:5541-54.
164. Abraham CR, Chen C, Cuny GD, Glicksman MA, Zeldich E. Small-molecule Klotho enhancers as novel treatment of neurodegeneration. *Future Med Chem*. 2012;4(13):1671-9.

165. Lim SC, Liu JJ, Subramaniam T, Sum CF. Elevated circulating alpha-klotho by angiotensin II receptor blocker losartan is associated with reduction of albuminuria in type 2 diabetic patients. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2014;15(4):487-90.
166. Karalliedde J, Maltese G, Hill B, Viberti G, Gnudi L. Effect of renin-angiotensin system blockade on soluble Klotho in patients with type 2 diabetes, systolic hypertension, and albuminuria. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(11):1899-905.
167. Janić M, Lunder M, Novaković S, Škerl P, Šabovič M. Expression of Longevity Genes Induced by a Low-Dose Fluvastatin and Valsartan Combination with the Potential to Prevent/Treat "Aging-Related Disorders". *Int J Mol Sci.* 2019;20(8).
168. Xue J, Wang L, Sun Z, Xing C. Basic Research in Diabetic Nephropathy Health Care: A study of the Renoprotective Mechanism of Metformin. *J Med Syst.* 2019;43(8):266.
169. Amaro-Gahete FJ, de-la OA, Jurado-Fasoli L, Gutiérrez Á, Ruiz JR, Castillo MJ. Association of physical activity and fitness with S-Klotho plasma levels in middle-aged sedentary adults: The FIT-AGEING study. *Maturitas.* 2019;123:25-31.
170. Amaro-Gahete FJ, De-la OA, Jurado-Fasoli L, Espuch-Oliver A, de Haro T, Gutierrez A, et al. Exercise training increases the S-Klotho plasma levels in sedentary middle-aged adults: A randomised controlled trial. The FIT-AGEING study. *J Sports Sci.* 2019;37(19):2175-83.
171. Tan SJ, 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.
172. Gaitán JM, Moon HY, Stremlau M, Dubal DB, Cook DB, Okonkwo OC, van Praag H. Effects of Aerobic Exercise Training on Systemic Biomarkers and Cognition in Late Middle-Aged Adults at Risk for Alzheimer's Disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:660181.
173. Hu Y, Mou L, Yang F, Tu H, Lin W. Curcumin attenuates cyclosporine A-induced renal fibrosis by inhibiting hypermethylation of the klotho promoter. *Mol Med Rep.* 2016;14(4):3229-36.
174. Mochón-Benguigui S, Carneiro-Barrera A, Castillo MJ, Amaro-Gahete FJ. Is Sleep Associated with the S-Klotho Anti-Aging Protein in Sedentary Middle-Aged Adults? The FIT-AGEING Study. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(8).
175. Hu MC, Shi M, Gillings N, Flores B, Takahashi M, Kuro OM, Moe OW. Recombinant α -Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy. *Kidney Int.* 2017;91(5):1104-14.
176. Hocquemiller M, Giersch L, Audrain M, Parker S, Cartier N. Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. *Hum Gene Ther.* 2016;27(7):478-96.
177. Mendell JR, Al-Zaidy SA, Rodino-Klapac LR, Goodspeed K, Gray SJ, Kay CN, et al. Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs. *Mol Ther.* 2021;29(2):464-88.
178. Khan S, Barve KH, Kumar MS. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol.* 2020;18(11):1106-25.
179. Invidia L, Salvioli S, Altília S, Pierini M, Panourgia MP, Monti D, et al. The frequency of Klotho KL-VS polymorphism in a large Italian population, from young subjects to centenarians, suggests the presence of specific time windows for its effect. *Biogerontology.* 2010;11(1):67-73.
180. Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie PuND, Deutsche Gesellschaft für Neurologie e. V. (DGN). S3-Leitlinie Demenzen 2016 [09.01.2023]. Available from: <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/038-013>.
181. I Blotenberg JT. Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen, Informationsblatt 1: Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. ; 2022 [10.01.2023]. Available from: https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/infoblatt1_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalzg.pdf.
182. 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2022;18(4):700-89.
183. Grabher BJ. Effects of Alzheimer Disease on Patients and Their Family. *J Nucl Med Technol.* 2018;46(4):335-40.

184. Jönsson L, Tate A, Frisell O, Wimo A. The Costs of Dementia in Europe: An Updated Review and Meta-analysis. *Pharmacoeconomics*. 2023;41(1):59-75.
185. Storck SE, Hartz AMS, Pietrzik CU. The Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *Handb Exp Pharmacol*. 2022;273:247-66.
186. Bateman RJ, Aisen PS, De Strooper B, Fox NC, Lemere CA, Ringman JM, et al. Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2011;3(1):1.
187. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 2012;488(7409):96-9.
188. Robinson M, Lee BY, Hane FT. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(2):317-30.
189. 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.
190. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement*. 2013;9(1):63-75.e2.
191. Weuve J, Hebert LE, Scherr PA, Evans DA. Deaths in the United States among persons with Alzheimer's disease (2010-2050). *Alzheimers Dement*. 2014;10(2):e40-6.
192. Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I. Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Neurologia*. 2017;32(8):523-32.
193. Nelson PT, Head E, Schmitt FA, Davis PR, Neltner JH, Jicha GA, et al. Alzheimer's disease is not "brain aging": neuropathological, genetic, and epidemiological human studies. *Acta Neuropathol*. 2011;121(5):571-87.
194. Wolters FJ, van der Lee SJ, Koudstaal PJ, van Duijn CM, Hofman A, Ikram MK, et al. Parental family history of dementia in relation to subclinical brain disease and dementia risk. *Neurology*. 2017;88(17):1642-9.
195. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993;261(5123):921-3.
196. Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, et al. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease*. *N Engl J Med*. 1998;338(8):506-11.
197. Ward A, Crean S, Mercaldi CJ, Collins JM, Boyd D, Cook MN, Arrighi HM. Prevalence of apolipoprotein E4 genotype and homozygotes (APOE e4/e4) among patients diagnosed with Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*. 2012;38(1):1-17.
198. Shinohara M, Kanekiyo T, Yang L, Linthicum D, Shinohara M, Fu Y, et al. APOE2 eases cognitive decline during Aging: Clinical and preclinical evaluations. *Ann Neurol*. 2016;79(5):758-74.
199. Barnes DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol*. 2011;10(9):819-28.
200. Serrano-Pozo A, Growdon JH. Is Alzheimer's Disease Risk Modifiable? *J Alzheimers Dis*. 2019;67(3):795-819.
201. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):a006189.
202. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2019;14(1):32.
203. Schneider JA, Arvanitakis Z, Bang W, Bennett DA. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology*. 2007;69(24):2197-204.
204. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297(5580):353-6.
205. Ma C, Hong F, Yang S. Amyloidosis in Alzheimer's Disease: Pathogeny, Etiology, and Related Therapeutic Directions. *Molecules*. 2022;27(4).
206. Forloni G, Artuso V, La Vitola P, Balducci C. Oligomeropathies and pathogenesis of Alzheimer and Parkinson's diseases. *Mov Disord*. 2016;31(6):771-81.

207. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 2008;14(8):837-42.
208. Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(14):5819-24.
209. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science.* 2010;330(6012):1774.
210. Roberts KF, Elbert DL, Kasten TP, Patterson BW, Sigurdson WC, Connors RE, et al. Amyloid- β efflux from the central nervous system into the plasma. *Ann Neurol.* 2014;76(6):837-44.
211. Storck SE, Hartz AMS, Bernard J, Wolf A, Kachlmeier A, Mahringer A, et al. 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.
212. Storck SE, Pietrzik CU. Endothelial LRP1 - A Potential Target for the Treatment of Alzheimer's Disease : Theme: Drug Discovery, Development and Delivery in Alzheimer's Disease Guest Editor: Davide Brambilla. *Pharm Res.* 2017;34(12):2637-51.
213. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell.* 2019;179(2):312-39.
214. Wickham TJ, Nemerow GR. Optimization of growth methods and recombinant protein production in BTI-Tn-5B1-4 insect cells using the baculovirus expression system. *Biotechnol Prog.* 1993;9(1):25-30.
215. Aiello L, Guilfoyle R, Huebner K, Weinmann R. Adenovirus 5 DNA sequences present and RNA sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (HEK-Ad-5 or 293). *Virology.* 1979;94(2):460-9.
216. Montesano R, Pepper MS, Möhle-Steinlein U, Risau W, Wagner EF, Orci L. Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell.* 1990;62(3):435-45.
217. Kato Y, Arakawa E, Kinoshita S, Shirai A, Furuya A, Yamano K, et al. Establishment of the anti-Klotho monoclonal antibodies and detection of Klotho protein in kidneys. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;267(2):597-602.
218. Hilbich C, Mönning U, Grund C, Masters CL, Beyreuther K. Amyloid-like properties of peptides flanking the epitope of amyloid precursor protein-specific monoclonal antibody 22C11. *J Biol Chem.* 1993;268(35):26571-7.
219. Wingfield P. Protein precipitation using ammonium sulfate. *Curr Protoc Protein Sci.* 2001;Appendix 3:Appendix 3F.
220. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
221. Cassidy A, O'Kennedy R. Antibody Purification Using Affinity Chromatography. *Methods Mol Biol.* 2022;2466:3-22.
222. Schmidt TG, Skerra A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc.* 2007;2(6):1528-35.
223. Santa-Maria AR, Heymans M, Walter FR, Culot M, Gosselet F, Deli MA, Neuhaus W. Transport Studies Using Blood-Brain Barrier In Vitro Models: A Critical Review and Guidelines. *Handb Exp Pharmacol.* 2022;273:187-204.
224. Hladky SB, Barrand MA. Elimination of substances from the brain parenchyma: efflux via perivascular pathways and via the blood-brain barrier. *Fluids Barriers CNS.* 2018;15(1):30.
225. Mazura AD, Ohler A, Storck SE, Kurtyka M, Scharfenberg F, Weggen S, et al. PCSK9 acts as a key regulator of A β clearance across the blood-brain barrier. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(4):212.
226. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom.* 2015;20(2):107-26.
227. Bradbury A, Plückthun A. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature.* 2015;518(7537):27-9.

228. Ascoli CA, Aggeler B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *Biotechniques*. 2018;65(3):127-36.
229. Murphy CI, Piwnica-Worms H, Grünwald S, Romanow WG, Francis N, Fan HY, Marr S. Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the Baculovirus System. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018;123(1):e61.
230. Schubert M, Nimitz M, Bertoglio F, Schmelz S, Lukat P, van den Heuvel J. Reproducible and Easy Production of Mammalian Proteins by Transient Gene Expression in High Five Insect Cells. *Methods Mol Biol*. 2021;2305:129-40.
231. Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, Lawrence JJ. Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1994;40(1):57-75.
232. Shi X, Jarvis DL. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system. *Curr Drug Targets*. 2007;8(10):1116-25.
233. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1994;32:9-15.
234. Cao E, Chen Y, Cui Z, Foster PR. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol Bioeng*. 2003;82(6):684-90.
235. Chambers AC, Aksular M, Graves LP, Irons SL, Possee RD, King LA. Overview of the Baculovirus Expression System. *Curr Protoc Protein Sci*. 2018;91:5.4.1-5.4.6.
236. Mariño K, Bones J, Kattla JJ, Rudd PM. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat Chem Biol*. 2010;6(10):713-23.
237. Chen CD, 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.
238. Li H, Wang B, Wang Z, Guo Q, Tabuchi K, Hammer RE, et al. Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and Klotho gene expression without rescuing the essential function of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(40):17362-7.
239. Penney J, Ralvenius WT, Tsai LH. Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Mol Psychiatry*. 2020;25(1):148-67.
240. Park JS, Choe K, Khan A, Jo MH, Park HY, Kang MH, et al. Establishing Co-Culture Blood-Brain Barrier Models for Different Neurodegeneration Conditions to Understand Its Effect on BBB Integrity. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6).
241. Omidi Y, Campbell L, Barar J, Connell D, Akhtar S, Gumbleton M. Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Res*. 2003;990(1-2):95-112.
242. Fernandez-Castaneda A, Arandjelovic S, Stiles TL, Schlobach RK, Mowen KA, Gonias SL, Gaultier A. Identification of the low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein-1 interactome in central nervous system myelin suggests a role in the clearance of necrotic cell debris. *J Biol Chem*. 2013;288(7):4538-48.
243. Lin JS, Lai EM. Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation. *Methods Mol Biol*. 2017;1615:211-9.
244. Kachlmeier A. Eine mechanistische Analyse zur Aufnahme des A η - α -Peptids über das Low density lipoprotein receptor-related protein 1 [Dissertation]. Mainz: Johannes-Gutenberg Universität Mainz; 2022.

9 Danksagung

Danke, an alle Beteiligten Personen, ohne die diese Arbeit nie möglich gewesen wäre.

10 Tabellarischer Lebenslauf – Julian Bastelberger

Nicht verfügbar in der Online-Version.