

**INAUGURAL-Dissertation**

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen-Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

**vorgelegt von**

**Diplom-Biologin Friederike Krop**

**aus**

**Wiesbaden**

Tag der mündlichen Prüfung:

**Funktionelle Studien**  
**zur**  
**Signaltransduktion von Klotho**

**Gutachter: Prof. Dr. Gabriele Petersen**  
**PD Dr. Anne Régnier-Vigouroux**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung „Therapeutic Area Oncology“ der Firma Merck Serono, Merck KGaA in Darmstadt unter Anleitung von Dr. Andree Blaukat durchgeführt.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg,

---

Friederike Krop

## Danksagung

An erster Stelle geht mein herzlicher Dank an Frau Prof. Petersen. Ich möchte ihr dafür danken, dass sie sich bereit erklärt hat als Erstgutachter meine Doktorarbeit mitzubetreuen. Vor allem danke ich ihr aber für ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung, ihr Verständnis bei allen Problemen und ihre vielen guten Hinweise.

Ebenso danke ich Frau Dr. Régnier-Vigouroux für die Bereitschaft als zweiter Gutachter meine Arbeit mitzubewerten sowie für ihre freundliche Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich der Firma Merck KGaA in Darmstadt und insbesondere Dr. Jens Oliver Funk für die großzügige Unterstützung danken und dafür, dass sie es mir ermöglicht haben meine Doktorarbeit in der Abteilung „Therapeutic Area Oncology“ auszuführen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Andree Blaukat. Ich danke ihm für die sehr gute fachliche Betreuung und dafür, dass er sich wenn es darauf ankam immer etwas von seiner knapp bemessenen Zeit für mich abgezockt hat. Vor allem aber danke ich ihm für seine Menschlichkeit und sein Verständnis in schwierigen Zeiten.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinen Laborkolleginnen Elena Kilian, Katharina Bergmann und Tina Faden dafür, dass sie mir so gute Freundinnen geworden sind und dafür gesorgt haben, dass ich immer mit Freude zur Arbeit gegangen bin, selbst wenn die Experimente öfter einmal frustrierend waren. Ich danke ihnen dafür, dass sie alle Höhen und Tiefen mit mir durchgestanden haben und jederzeit bereit waren mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Bessere Kollegen kann man sich nicht wünschen!

Außerdem möchte ich allen anderen vergangenen Mitgliedern des Joint Basic Research Labs, v.a. Vanessa Schadel, Dirk Vocke, Denis Irmer, Jessica Daecke, Katja Wischrop, Ralf Reiners und Jana Precht sowie den vielen anderen, die im Laufe der Jahre kamen und gingen, für eine schöne Zeit und viele lustige Erinnerungen danken. Danke, dass man so viel Spaß mit euch allen haben konnte!

Ebenfalls möchte ich mich für die Unterstützung der anderen Labore unserer Abteilung bedanken, sowohl bei den Laborleiter als auch bei den Laboranten, die immer bereit waren mit Ratschlägen, Reagenzien oder ähnlichem auszuhelfen.

Ein großes Dankeschön gilt Dirk Müller-Pompalla und Jens Hannewald für ihre Hilfe bei der Proteinreinigung. Vor allem Jens möchte ich für seine ausgeprägte Hilfsbereitschaft, seine aufmunternde Art und sehr viele lustige Geschichten danken.

Jörg Bomke, Judith Schmiedel und Norbert Avemarie möchte ich ganz herzlich für die Hilfe und Unterstützung bei den Biacore-Studien danken.

Ebenso danke ich Roland Kellner für die Unterstützung bei der massenspektrometrischen Analyse.

Ein weiteres Dankeschön gilt Dr. Hans-Jürgen Grote und Melanie Kühnl für ihre Hilfe bei der Durchführung der Microarray-Studien. Darüber hinaus danke ich Dr. Anja von Heydebreck und besonders Dr. Eike Staub für ihre Beratung und die aufwendige Auswertung der Studien.

Mein allergrößter Dank gilt meinem Freund und zukünftigem Mann Björn dafür, dass er immer für mich da ist und mir mit viel Liebe und Geduld durch alle schweren Zeiten geholfen hat. Ohne ihn hätte ich das alles nicht geschafft und wäre nicht so glücklich, wie ich es heute bin.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen für ihre Liebe, Herzlichkeit und Großzügigkeit danken und dafür, dass sie mich, wann immer sie konnten, unterstützt haben.

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Summary</b> .....	<b>XIV</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Die Entdeckung von Klotho</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Struktur und Expression von Klotho</b> .....	<b>3</b>
1.2.1 Struktur des Klothogens und seiner Proteinvarianten .....	3
1.2.2 Die KL-Domänen und ihre Funktion.....	5
1.2.3 Expression und Lokalisation von Klotho .....	5
1.2.4 Klotho als humoraler Faktor.....	7
<b>1.3 Klotho – ein Protein mit vielfältigen Funktionen</b> .....	<b>9</b>
1.3.1 Funktionen der Transmembranform von Klotho.....	10
1.3.1.1 Regulation des FGF („fibroblast growth factor“) 23 Signalweges durch Klotho als Co-Rezeptor von FGF23.....	10
1.3.2 Funktionen der sezernierten Form von Klotho .....	12
1.3.2.1 Regulation der Aktivität von Ionenkanälen durch enzymatische Aktivität von Klotho .....	12
1.3.2.2 Regulation der Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion und Schutz vor endothelialer Dysfunktion durch Klotho .....	13
1.3.2.3 Inhibition des Wnt-Signalweges durch Klotho .....	14
1.3.2.4 Inhibition des Insulin-/ IGF1-Rezeptor-Signalweges durch Klotho und die Folgen .....	16
<b>1.4 Die Rolle von Klotho in der Krebsforschung</b> .....	<b>21</b>
<b>1.5 Ziel der Arbeit</b> .....	<b>26</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>27</b>
2.1.1 Geräte .....	27
2.1.2 „Software“.....	27
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien .....	28
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.5 „Kits“.....	31
2.1.6 Puffer, Lösungen und Medien.....	31
2.1.7 Medien und Lösungen für die Zellkultur .....	35
2.1.8 Plasmide .....	36
2.1.9 Primer.....	38
2.1.10 Enzyme und Puffer .....	39
2.1.11 Rekombinante Proteine .....	40

2.1.12	Antikörper .....	41
2.1.13	Bakterienstämme.....	42
2.1.14	Zelllinien .....	42
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>43</b>
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	43
2.2.1.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) mit Plasmid-DNA .....	43
2.2.1.2	Präparation bakterieller Plasmid-DNA .....	43
2.2.1.3	Bestimmung der DNA-Konzentration und der DNA-Reinheit .....	44
2.2.1.4	Einfrieren von Bakterienzellen .....	44
2.2.1.5	Klassische Klonierung .....	44
2.2.1.5.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR = „polymerase chain reaction“) .....	44
2.2.1.5.2	Enzymatische Restriktion von DNA .....	46
2.2.1.5.3	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	47
2.2.1.5.4	Agarosegelelektrophorese.....	47
2.2.1.5.5	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	48
2.2.1.5.6	DNA-Ligation .....	48
2.2.1.6	TOPO® Klonierung (Invitrogen).....	49
2.2.1.7	Gateway® Klonierung (Invitrogen).....	50
2.2.1.8	DNA-Sequenzierung.....	50
2.2.1.9	„Microarray“-Genexpressionsanalyse .....	51
2.2.2	Eukaroytische Zellkultur.....	52
2.2.2.1	Kultivierung von Zelllinien .....	52
2.2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	53
2.2.2.3	Zellzahlbestimmung.....	53
2.2.2.4	Transiente Transfektion von Zellen.....	54
2.2.2.5	Herstellung einer stabilen Zelllinie .....	55
2.2.2.6	Stimulation bzw. Behandlung von Zellen .....	56
2.2.2.7	Sammlung von Zellkulturüberständen.....	57
2.2.3	Proteinanalytische und biochemische Methoden .....	57
2.2.3.1	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen .....	57
2.2.3.2	Chemische Kopplung („Crosslinking“) von Klotho-Fc an Zelloberflächenproteine .....	58
2.2.3.3	Herstellung von Zelllysaten.....	59
2.2.3.4	Subzelluläre Fraktionierung von Zellen.....	59
2.2.3.5	Präparation von Membranproteinen.....	60
2.2.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	61
2.2.3.7	Bestimmung der Klotho-Fc-Proteinkonzentration mittels Fc-Elisa.....	62
2.2.3.8	Chemische Kopplung („Crosslinking“) von Klotho-Fc an Protein A Agarosekügelchen mittels DMP (Dimethylpimelimidat x 2 HCl).....	63
2.2.3.9	(Co-) Immunpräzipitation bzw. „Pull-Down“ .....	64
2.2.3.10	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	65
2.2.3.11	Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	66
2.2.3.12	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen .....	66
2.2.3.13	Transfer von Proteinen auf Membranen und Immundetektion der immobilisierten Proteine (Western Blot-Analyse) .....	67
2.2.3.14	Far-Western .....	68
2.2.4	Proteinreinigung .....	69
2.2.4.1	Affinitätschromatographie .....	69

2.2.4.2	Gelfiltration .....	70
2.2.4.3	SLS (= „static light scattering“).....	71
2.2.5	Methoden zur Untersuchung der Proteinbindung.....	72
2.2.5.1	Methoden zur Untersuchung der Bindung von Proteinen an Zellen .....	72
2.2.5.1.1	Durchflusszytometrie .....	72
2.2.5.1.2	Bindung von <sup>125</sup> Iod-markierten Proteinen an Zellen .....	73
2.2.5.2	Biacore .....	74
2.2.6	Bestimmung der Glucuronidaseaktivität.....	75
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>76</b>
<b>3.1</b>	<b>Klonierung verschiedener Klothovarianten und Generierung einer mit Klotho stabil transfizierten Zelllinie.....</b>	<b>76</b>
3.1.1	Herstellung und Expression von Klothovarianten mit unterschiedlichem „Tag“ ..	76
3.1.2	Generierung eines mit Klotho-Fc stabil transfizierten CHO-Klons .....	77
<b>3.2</b>	<b>Reinigung von Klotho-Fc und Nachweis der Aktivität des aufgereinigten Proteins.....</b>	<b>78</b>
3.2.1	Reinigung von Klotho-Fc mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration.....	78
3.2.2	SLS („static light scattering“)-Analyse und Nachweis der Aktivität des gereinigten Klothoproteins .....	83
3.2.2.1	SLS („static light scattering“)-Analyse .....	83
3.2.2.2	Nachweis der Glucuronidaseaktivität des gereinigten Klothoproteins .....	85
3.2.2.3	Nachweis einer zellulären Funktion von Klotho-Fc – Effekte auf den IGF1-Signalweg.....	87
<b>3.3</b>	<b>Die Bindung von Klotho-Fc an Zellen .....</b>	<b>88</b>
3.3.1	Nachweis der Bindung von RPE-konjugiertem Klotho-Fc an L6-Zellen mittels Durchflusszytometrie .....	88
3.3.2	Bindungseigenschaften von Klotho gezeigt am Beispiel der L6-Zelllinie .....	90
<b>3.4</b>	<b>Bindet Klotho an den IGF1-Rezeptor? .....</b>	<b>94</b>
3.4.1	Co-Immünpräzipitation / Co- „Pull-Down“ des IGF1-Rezeptors mit Klotho-Fc....	94
3.4.2	Versuchter Nachweis einer Bindung von Klotho an den IGF1-Rezeptor mittels Durchflusszytometrie .....	98
3.4.2.1	Kompetitionsstudien von IGF1 und Klotho zur Bindung an den IGF1-Rezeptor.....	99
3.4.2.2	Unveränderte Bindung von Klotho an NCI-H322-Zellen trotz induzierter IGF1R-Internalisierung .....	100
3.4.3	Biacore-Analyse („surface plasmon resonance“) .....	101
3.4.4	Vergleich verschiedener Zelllinien in Bezug auf IGF1R-Expression, Klotho-Bindung und Inhibierung des IGF1-Signalweges durch Klotho .....	103
<b>3.5</b>	<b>Versuch der Identifizierung eines Klothorezeptors durch „Pull-Down“ und Far-Western mit gereinigtem Klotho-Fc.....</b>	<b>105</b>
3.5.1	„Pull-Down“-Experimente zur Identifizierung eines Klothorezeptors.....	105
3.5.2	Far-Western Analyse zur Identifizierung eines Klothorezeptors .....	112
<b>3.6</b>	<b>Screening von 106 „Orphan“ GPCRs auf Bindung von Klotho-Fc .....</b>	<b>115</b>
<b>3.7</b>	<b>„Microarray“-Studien zur Ermittlung von Änderungen im Genexpressionsprofil verschiedener Zelllinien nach Behandlung mit Klotho</b>	<b>118</b>
3.7.1	Auswahl von Zelllinien für die „Microarray“-Studien .....	118

---

3.7.1.1	Bindung von Klotho an die Zelloberfläche.....	119
3.7.1.2	Inhibition des IGF1-Signalweges durch Klotho .....	120
3.7.2	„Microarray“-Studien.....	121
3.7.3	Verifizierung von Ergebnissen der „Microarray“-Studien.....	128
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>131</b>
4.1	Die Reinigung von Klotho-Fc und das Problem der Aggregatbildung .....	131
4.2	Bindungseigenschaften – Klotho-Fc und Klotho-His <sub>6</sub> im Vergleich .....	135
4.3	Bindet Klotho an den IGF1R? .....	137
4.4	Identifizierung eines Klothorezeptors .....	142
4.5	Ergebnisse der Genexpressionsstudien und mögliche Schlussfolgerungen.	145
4.6	Ausblick .....	151
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>153</b>
	<b>Datenbankverzeichnis.....</b>	<b>163</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Struktur des Klothogens und der durch alternatives Spleißen entstehenden Klothoproteinvarianten: (1) sezernierte Form und (2) Transmembranform.....	4
Abb. 2:	Klotho wird gespalten und kann als humoraler Faktor fungieren.....	9
Abb. 3:	Schematische Darstellung des IGF1-Signalwegs und der angenommenen Rolle von Klotho bei seiner Inhibition.....	17
Abb. 4:	Klotho und seine unterschiedlichen Wirkmechanismen.....	20
Abb. 5:	Vergleich der Klothoexpression zwischen Tumor- und Normalgewebe in verschiedenen Tumorarten.....	25
Abb. 6:	Nachweis der Expression von verschiedenen Klothovarianten.....	77
Abb. 7:	Nachweis von Klotho-Fc im Überstand stabil transfizierter CHO-Klone.....	78
Abb. 8:	Chromatogramm der Reinigung von Klotho-Fc mittels Affinitätschromatographie über eine Protein A Säule.....	79
Abb. 9:	Kontrolle der Reinigung von Klotho-Fc mittels Affinitätschromatographie..	80
Abb. 10:	Chromatogramm der Reinigung von Klotho-Fc mittels Gelfiltration.....	81
Abb. 11:	Kontrolle der Reinigung von Klotho-Fc mittels Gelfiltration.....	82
Abb. 12:	Kontrolle der Reinigung nach Affinitätschromatographie, Gelfiltration und Konzentrierung der Proteine.....	83
Abb. 13:	SLS („static light scattering“)-Analyse des gereinigten Klotho-Fc.....	85
Abb. 14:	Nachweis einer <i>in vitro</i> Glucuronidaseaktivität von Klotho-Fc.....	86
Abb. 15:	Inhibition des IGF1-Signalweges durch Klotho.....	88
Abb. 16:	Bindung von Klotho an L6 Rattenmyoblasten.....	89
Abb. 17:	Nachweis der Spezifität der Bindung von Klotho an L6 Rattenmyoblasten.....	90
Abb. 18:	Vergleich der Bindungseigenschaften von Klotho-Fc und Klotho-His <sub>6</sub> .....	91
Abb. 19:	Oligomerisierungszustand von Klotho-His <sub>6</sub> .....	92
Abb. 20:	<i>In vitro</i> Glucuronidaseaktivität von Klotho-His <sub>6</sub> .....	93
Abb. 21:	Co-Immunpräzipitation von Klotho-V5 und IGF1R.....	95
Abb. 22:	Co-Immunpräzipitation von Klotho-V5 und IGF1R bzw. EGFR.....	96
Abb. 23:	Co-Immunpräzipitation von Klotho-V5 und endogenem IGF1R.....	97
Abb. 24:	„Pull-Down“ von endogenem bzw. stabil überexprimiertem IGF1R durch Klotho-Fc.....	98

---

Abb. 25:	Bindung von Klotho an L6 Rattenmyoblasten und Kompetition durch IGF1.....	99
Abb. 26:	Bindung von Klotho an L6 Rattenmyoblasten nach Internalisierung des IGF1R.....	100
Abb. 27:	Biacore-Analyse der Bindung von Klotho an eine IGF1R-Oberfläche.....	102
Abb. 28:	Untersuchung der IGF1R-Expression verschiedener Zelllinien mittels Western Blot-Analyse.....	104
Abb. 29:	„Pull-Down“ von Klotho-bindenden Proteinen aus L6-Zelllysaten.....	106
Abb. 30:	„Pull-Down“ von Klotho-bindenden Proteinen aus einer Rattenlebermembranpräparation.....	108
Abb. 31:	„Pull-Down“ von Klotho-bindenden Proteinen aus L6-Zelllysaten nach Biotinylierung der Oberflächenproteine.....	109
Abb. 32:	„Pull-Down“ von Klotho-bindenden Proteinen aus L6-Zelllysaten nach Kopplung von Klotho-Fc an gebundene Oberflächenproteine.....	111
Abb. 33:	Far-Western mit proteinhaltigen Fraktionen eines Rattenleberextraktes und gereinigtem Klotho-Fc.....	113
Abb. 34:	Far-Western mit ausgewählten Fraktionen eines Rattenleberextraktes und gereinigtem Klotho-Fc.....	114
Abb. 35:	Untersuchung der Bindung von Klotho-Fc an mit „Orphan“-GPCRs transfizierte HeLa-Zellen.....	116
Abb. 36:	Bindung von Klotho an verschiedene Zelllinien.....	119
Abb. 37:	Inhibition des IGF1-Signalweges durch Klotho.....	120
Abb. 38:	Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsprofile von Klotho-behandelten und unbehandelten Zelllinien.....	122
Abb. 39:	Abschätzung der globalen Signifikanz der Expressionsunterschiede zwischen Klotho-behandelten und unbehandelten Zellen.....	123
Abb. 40:	Überschneidung zwischen in L6- und HepG2-Zellen differentiell exprimierten Genen.....	124
Abb. 41:	Analyse der durch Klotho hochregulierten Gene bezüglich ihrer Funktion.	125
Abb. 42:	Funktionelles Netzwerk aus 81 Klotho-induzierten Genen.....	126
Abb. 43:	„Box-Whisker-Plots“ ausgewählter Zellzyklus-assoziiierter Gene, die eine erhöhte Expression 24 h nach Behandlung mit Klotho zeigen.....	127
Abb. 44:	Nachweis einer erhöhten Expression ausgewählter Zellzyklus-assoziiierter Proteine 10, 24 und 48 h nach Behandlung mit Klotho.....	129
Abb. 45:	Prognostische Signifikanz einer Signatur aus den 81 Genen des Klotho-induzierten Zellzyklusnetzwerks.....	150

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Gen- und Proteinlänge von humanem, Maus- und Rattenklotho, sowie Homologievergleich zwischen den Spezies.....	3
Tab. 2:	IGF1R-Expression und Klothobindung verschiedener Zelllinien.....	104
Tab. 3:	Liste der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine aus den mittels Far-Western und Comassiefärbung ausgewählten Proteinbanden.	115
Tab. 4:	Liste ausgewählter durch Klotho regulierter Gene und ihrer Funktion.....	130

## Abkürzungsverzeichnis

% (m/V)	Gewichtsprozent
% (V/V)	Volumenprozent
A	Adenin
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym („Angiotensin-converting enzyme“)
ADAM	„a disintegrin and metalloproteinase“
Akt	„v-akt murine thymoma viral oncogene homolog“
AP	alkalische Phosphatase
APC	Adenomatous-polyposis-coli Protein
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ATM	„Ataxia telangiectasia mutated“
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	„Ataxia telangiectasia and Rad3-related“
bp	Basenpaare
BRCA1	„breast cancer type 1 susceptibility protein“
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
BS(PEG)	Bis-succinimidester-aktiviertes Polyethylenglykol
Bub1	„budding uninhibited by benzimidazoles 1“
bzw.	beziehungsweise
CD	cytosolische Domäne
Cdk1	Cyclin-abhängige Kinase 1 („Cyclin dependent kinase 1“)
C/EBP $\beta$	„CCAAT/enhancer-binding protein $\beta$ “
Chaps	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Chk1	„Checkpoint“ Kinase 1
CHO	„Chinese Hamster Ovary“
CIS	„surrounding carcinoma <i>in situ</i> “
c	centi
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	„complementary DNA“
cRNA	„complementary RNA“
Cys	Cystein
d.h.	das heißt
D-MEM	„Dulbecco´s minimal essential medium“
DMP	Dimethylpimelimidat x 2 HCl

---

DMR	„dynamic mass redistribution“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
dNTP	Desoxy-Nucleotidtriphosphat
D-PBS	„Dulbecco`s phosphate buffered saline“
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor („epidermal growth factor“)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor („epidermal growth factor receptor“)
EGS	Ethylenglykol-bis-sulfosuccinimidylsuccinat
EGTA	Ethylenglykolbis-(2-aminoethylether-)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	„Enzyme-linkend Immunosorbent Assay“
ER	Estrogenrezeptor
Erk	„extracellular signal regulated kinase“
<i>et al.</i>	und andere
FCS	fötale Kälberserum („fetal calf serum“)
Fen1	Flap Endonuklease-1
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor („fibroblast growth factor“)
FGFR	Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor („fibroblast growth factor receptor“)
FOXO	„Forkhead box O“
FRS	FGFR Substrat
g	Gramm
x g	x Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GLUT-4	Glucosetransporter Typ 4
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor („G-Protein coupled receptor“)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde („hour“)
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“)
HSA	humanes Serumalbumin

---

HUVEC	„Human umbilical vein endothelial cell“
IGF1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor („Insulin-like growth factor“)
IGF1R	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktorrezeptor („Insulin-like growth factor receptor“)
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IR	Insulin Rezeptor
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
kb	Kilobase
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Lys	Lysin
m	milli
m	Meter
M	molar
μ	micro
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase („mitogen-activated protein kinase“)
MEK	MAPK Kinase
MEM	„minimal essential medium“
MilliQ-H <sub>2</sub> O	MilliQ gefiltertes deionisiertes Wasser
min	Minute
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
MOPS	„3-(N-morpholino)propanesulfonic acid“
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
MU	Methylumbelliferon
4Mu-β-D-GlcU	4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronidhydrat
N	normal
n	nano
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen („open reading frame“)
p	pico
p21	CDK („Cyclin dependent kinase“)-Inhibitor 1
p53	Tumorsupressor p53
pS	phospho-Serin
pT	phospho-Threonin

---

pY	phospho-Tyrosin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PDK1	Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PLK1	Polo-ähnliche Kinase 1 („Polo-like kinase 1“)
PPAR- $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- $\gamma$
PTEN	„phosphatase and tensin homolog“
PTH	Parathormon („parathyroid hormone“)
Ras	„rat sarcoma viral oncogene“ (Homolog zu v-ras)
RIPA	„Radioimmunoprecipitation Assay“
ROMK1	„Renal Outer Medullary Potassium Channel 1“
ROS	reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“)
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
RNAi	RNA-Interferenz
RPE	R-Phycoerythrin
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
siRNA	„small-interfering“ RNA
SLS	„static light scattering“
SOC	„super optimal broth with catabolite repression“
SOX	„sex determining region Y (SRY)- box“
SP	Signalpeptid
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung („tris buffered saline“)
TCC	„transitional cell carcinoma“
TMD	Transmembrandomäne
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPC6	„Transient Receptor Potential Cation Channel 6“
TRPV5/6	„Transient Receptor Potential Vanilloid 5/6“
T	Thymin

---

U	Einheit („unit“)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel

## Zusammenfassung

Klotho ist ein Typ I Transmembranprotein, das als solches oder nach Abspaltung seiner extrazellulären Domäne als sezernierter löslicher Faktor eine Rolle in einer Vielzahl an Signaltransduktionswegen spielt. So kann Klotho z.B. die Wirkung von Wachstumsfaktoren, wie FGF23, Insulin, IGF1 und Wnt modulieren. Über einen bisher ungeklärten Mechanismus hemmt Klotho die Phosphorylierung des IGF1R und damit den nachgeschalteten PI3-Kinase/Akt-Signalweg. Da der IGF1R ein validiertes Target für die Krebstherapie ist und es Hinweise auf eine Funktion von Klotho als Tumorsuppressor gibt, könnte Klotho selbst oder ein synthetischer Klothorezeptor-Agonist ein vielversprechendes Therapeutikum für die zukünftige Behandlung maligner Tumore darstellen. Grundvoraussetzung für derartige Ansätze ist jedoch ein besseres Verständnis der Klotho-vermittelten Signaltransduktion und die Identifizierung aller Klothorezeptoren.

In dieser Arbeit wurde daher die Inhibition des IGF1-Signalweges durch Klotho näher untersucht. Als erstes wurden hierzu adäquate Modellsysteme identifiziert und eine Reihe von Werkzeugen, u.a. verschiedene Klothovarianten, hergestellt. Mit Hilfe einer Liganden-Affinitätschromatographie sowie eines gezielten „Screenings“ einer „Orphan“ GPCR Rezeptorbibliothek sollte dann ein Rezeptor für Klotho identifiziert werden, der nach Bindung von Klotho die Inhibition der IGF1-Signaltransduktion vermittelt. Für diese Zwecke und weitere pharmakologische Studien wurde die extrazelluläre Domäne von Klotho mit einem Fc-„Tag“ kloniert, in CHO-Zellen stabil exprimiert und Klotho-Fc aus dem Überstand dieser Klone gereinigt. Trotz der nachgewiesenen biologischen Aktivität und einer robusten, salz-stabilen zellulären Bindung von Klotho-Fc an ausgewählte Zellen konnte weder in affinitätschromatographischen „Pull-Down“-Experimenten noch im „Orphan-Screen“ ein spezifischer Interaktionspartner bzw. Rezeptor von Klotho identifiziert werden.

In einem parallelen Ansatz wurde eine im Laufe dieser Arbeit von Wolf *et al.* (2007) neu beschriebene Bindung der Transmembranform von Klotho an den IGF1R untersucht und geklärt, ob eine solche Bindung auch für die lösliche extrazelluläre Domäne von Klotho besteht, da diese Domäne allein die Inhibition der IGF1-Signaltransduktion vermittelt. Es konnte jedoch weder mittels Co-Immünpräzipitation bzw. „Pull-Down“ die Bindung der Transmembranform an den IGF1R uneingeschränkt verifiziert noch mit Hilfe von Co-Immünpräzipitation, Analysen mittels Durchflusszytometrie und Biacore-Experimenten Hinweise auf eine Bindung der extrazellulären Domäne gefunden werden. Daher besteht weiterhin die Annahme, dass die Inhibition des IGF1-Signalweges nicht über den IGF1R sondern einen bisher unbekanntes Klothorezeptor vermittelt wird.

Zusätzlich durchgeführte Microarray-Studien mit Klotho-sensitiven Zellen konnten zwar keine unmittelbaren Hinweise auf den gesuchten putativen Klothorezeptor geben, zeigten jedoch eine signifikante Induktion einer Vielzahl Zellzyklus-assoziiierter Gene durch Klotho, die in dieser Weise und diesem Umfang bisher nicht bekannt war. Mit 81 dieser Gene konnte mit Hilfe der MetaCore Software ein fundiertes Netzwerk erstellt werden, das funktionelle Interaktionen zwischen den einzelnen Genen bzw. Proteinen aufzeigt. Diese Ergebnisse bieten neue Einblicke in die Funktion von Klotho in der Tumorentstehung und -progression und eine interessante Grundlage für weitere Studien.

## Summary

Klotho is a type I single-pass transmembrane protein that is implicated in multiple signal transduction pathways. For example it modulates the signaling of multiple growth factors, including FGF23, insulin, IGF1 and Wnt signaling. It can either act as transmembrane form or after shedding and secretion of its extracellular domain as humoral factor. By a not yet fully elucidated mechanism Klotho inhibits phosphorylation of the IGF1R and thereby downstream PI3-Kinase/Akt signaling. Since the IGF1R is a validated target in cancer therapy and there is evidence for a function of Klotho as tumor suppressor, Klotho itself or synthetic Klotho receptor agonists may be promising therapeutics for future treatment of malignant tumors. A basic requirement for these approaches is a better understanding of Klotho mediated signal transduction and the identification of all Klotho receptors.

Therefore, in this work the inhibition of the IGF1 signaling pathway was analyzed in detail. First of all adequate model systems were identified and a set of tools, e.g. different Klotho variants, were established. By ligand affinity chromatography and selective screening of an orphan GPCR receptor library a receptor for Klotho that mediates the inhibition of the IGF1 signal transduction should be identified. For this purpose and further pharmacological studies an Fc-tagged extracellular domain of Klotho was cloned, stably expressed in CHO cells and purified from supernatant of stably transfected cells. Despite of an evident activity and a robust salt-insensitive cellular binding of Klotho-Fc to selected cell lines, it was not possible to identify a specific interaction partner by affinity chromatography or orphan screening.

In a parallel approach binding of the transmembrane form of Klotho to the IGF1R, which was described in the course of this work by Wolf *et al.* (2007), was analyzed. Furthermore, binding of the extracellular domain of Klotho to the IGF1R was studied, because this domain alone is able to mediate the inhibition of the IGF1R signal transduction. Co-immunoprecipitation, pull-down and flow cytometry analysis as well as Biacore experiments clearly demonstrated that secreted Klotho does not bind to IGF1R and suggest that corresponding published data may be artefacts. These findings further substantiate the hypothesis that another Klotho receptor exists that mediates the inhibition of the IGF1 signaling pathway.

Microarray studies with Klotho sensitive cells did not provide any clear link to the nature of this putative Klotho receptor, but revealed a link between Klotho signal transduction and cell cycle regulation. Using the MetaCore software it was possible to construct a well-founded network including 81 upregulated genes that discloses functional interactions. These results provide new insights into the function of Klotho in tumor development and progression and offer an interesting basis for further studies.

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Entdeckung von Klotho

In der griechischen Mythologie wird die Lebensdauer eines Menschen durch die drei Töchter des Zeus und der Themis bestimmt. Zu diesen sogenannten Schicksalsgöttinnen gehört (1) Klotho, die den Faden des Lebens spinnt, (2) Lachesis, die ihn misst und damit die Länge der Lebensdauer bestimmt und (3) Atropos, die ihn durchtrennt und damit das Leben beendet. Das Klothogen, welches nach der ersten der drei Göttinnen benannt ist, wurde 1997 in einem Mäusestamm entdeckt, bei dem ein Defekt in diesem Gen zu vielfältigen Funktionsstörungen führte, die an ein frühzeitiges Altern beim Menschen erinnerten (Kuro-o, *et al.*, 1997). Die Klothomäus entstand ursprünglich als Zufallsprodukt bei der Generierung von transgenen Mäusen durch konventionelle Mikroinjektion eines Transgens in den Vorkern einer befruchteten Zygote (Kuro-o, *et al.*, 1995). Dieses Transgen wurde bei der späteren Klothomäus zufällig in ca. 10-facher Kopie an einem einzigen Genlocus in der Promotorregion des später als Klotho identifizierten Gens inseriert, was zu einer stark unterdrückten Expression des Gens und zu dem angesprochenen Alterungsphänotyp bei homozygoten Mutanten führte (Kuro-o, *et al.*, 1997). Im Folgenden wurde dann eine Klotho Null-Mutante generiert, die einen zur ursprünglichen Klothomäus identischen Alterungsphänotyp aufwies (Tsujikawa *et al.*, 2003).

Klotho-defiziente Mäuse sterben frühzeitig im Alter von nur acht bis neun Wochen, wobei die genaue Todesursache bisher ungeklärt ist. Sie zeigen viele Alterungssymptome, von denen jedoch keins für sich genommen tödlich ist (Kuro-o, *et al.*, 1997). Sie sind unfruchtbar auf Grund atrophischer äußerer und innerer Genitalorgane (Hypogonadismus), was durch einen Defekt in der Hypophyse und/oder des Hypothalamus verursacht wird (Kuro-o, *et al.*, 1997; Toyama *et al.*, 2006). Klothomäuse weisen eine gestörte Knochenmineralisierung auf, die zu einer Abnahme der Knochendichte (Osteopenie) kortikaler Knochen, paradoxer Weise aber zu einer Erhöhung der Knochendichte in trabekulären Knochen führt (Kuro-o, *et al.*, 1997; Kawaguchi *et al.*, 1999 und 2000; Yamashita *et al.*, 1998 und 2000). Weitere auffällige Symptome sind die beträchtliche ektopische Verkalkung in verschiedenen weichen Geweben sowie Gefäßverkalkungen, die vermutlich eine sekundäre Folge des erhöhten Calcium-, Phosphat- und Vitamin D-Spiegels im Blut sind (Kuro-o, *et*

*al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2002; Tsujikawa *et al.*, 2003). Des Weiteren gehören zu den typischen Alterungssymptomen dieser Mäuse eine gestörte Bewegungskoordination (Ataxie), Haut- und Muskelatrophie, verminderte Hörfähigkeit und eine frühzeitige Rückbildung des Thymus (Kuro-o, *et al.*, 1997; Kamemori *et al.*, 2002). Darüber hinaus treten Lungenemphyse in Verbindung mit einer erhöhten Dehnbarkeit der Lunge und erhöhter expiratorischer Zeit sowie eine Neurodegeneration im Rückenmark und im Hippocampus auf, wobei letzteres mit einer Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten verbunden ist (Kuro-o, *et al.*, 1997; Suga *et al.*, 2000; Nagai *et al.*, 2003; Anamizu *et al.*, 2005). Der Blutglucosespiegel ist bei Klothomäusen niedriger als normal (Utsugi *et al.*, 2000). Bis heute gelten Klotho-defiziente Mäuse als eines der am besten charakterisierten Säugetiermodelle zur Untersuchung von Alterungsprozessen.

Um die Ursachen des Alterungsphänotyps genauer zu erforschen und herauszufinden, ob Klotho in der Lage ist den natürlichen Alterungsprozess aufzuhalten oder zumindest zu verlangsamen, wurden zusätzlich transgene Mäuse generiert, die Klotho zum einen unter Kontrolle eines ubiquitären und zum anderen unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors überexprimieren (Kuro-o, *et al.*, 1997; Masuda *et al.*, 2005). Klotho-überexprimierende Mäuse weisen keine der oben genannten Alterungserscheinungen auf, sondern leben 20-30 % länger als Wildtypmäuse und zeichnen sich durch eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress und einer leichten Insulin- und IGF1-Resistenz aus (Kuro-o, *et al.*, 1997; Kurosu *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2005).

Klotho war das zuerst entdeckte Mitglied einer neuen Proteinfamilie. 2002 wurde von Ito *et al.* ein zweites Mitglied, das sogenannte  $\beta$ -Klotho, entdeckt, welches trotz gleicher Domänenstruktur nur eine Sequenzhomologie von 41 % zu Klotho aufweist. Infolge dieser Neuentdeckung wurde dem ursprünglichen Klotho der Name  $\alpha$ -Klotho gegeben. Jedoch wird häufig der Einfachheit halber (auch im Rahmen dieser Arbeit) weiterhin der Name Klotho anstelle von  $\alpha$ -Klotho verwendet.

## 1.2 Struktur und Expression von Klotho

### 1.2.1 Struktur des Klothogens und seiner Proteinvarianten

Das humane Klothogen mit einer Größe von ~ 50 kb besteht aus fünf Exons und vier Introns und liegt auf Chromosom 13q12. Durch alternatives Spleißen können zwei Transkriptvarianten entstehen: (1) ein Transkript mit einem ORF („open reading frame“) von 3036 bp, der für ein Transmembranprotein mit 1012 Aminosäuren codiert und (2) ein Transkript, das bis auf eine 50 bp lange Insertion am Ende von Exon 3 identisch ist mit der ersten Transkriptvariante, jedoch innerhalb der zusätzlichen 50 bp ein Stopcodon im Leseraster besitzt. Dies hat einen ORF von nur 1647 bp zur Folge, der für ein verkürztes 549 Aminosäuren langes, sezerniertes Protein codiert (Matsumura *et al.*, 1998). Ein Vergleich der Gen- bzw. Proteinlängen zwischen Mensch, Maus und Ratte sowie ein Homologievergleich ist in Tabelle 1 gezeigt.

**Tab. 1: Gen- und Proteinlänge von humanem, Maus- und Rattenklotho, sowie Homologievergleich zwischen den Spezies** (basierend auf Matsumura *et al.*, 1998; Shiraki-lida *et al.*, 1998; Ohyama *et al.*, 1998).

	<b>Mensch</b>	<b>Maus</b>	<b>Ratte</b>
Genlocus	13q12	13q12	12q12
ORF Membranform	3036 bp	3042 bp	3042 bp
Länge des Membranprotein	1012 AS	1014 AS	1014 AS
ORF sezernierte Form	1647 bp	1650 bp	
Länge des sezernierten Proteins	549 AS	550 AS	
	<b>Mensch mit Maus</b>	<b>Maus mit Ratte</b>	<b>Ratte mit Mensch</b>
cDNA Homologie	80 %	93 %	83 %
Membranproteinhomologie	86 %	94 %	85 %

Die Transmembranform des Klothoproteins ist ein Typ I Transmembranprotein. Es besteht aus (1) einer N-terminalen Signalsequenz, (2) einer extrazellulären Domäne, die zwei sogenannte KL-Domänen (KL1 und KL2) enthält, (3) einer einfachen Transmembranhelixdomäne und (4) einer kurzen, nur 10 Aminosäuren langen, C-terminalen intrazellulären Domäne. Die sezernierte Form des Klothoproteins enthält lediglich die N-terminale Signalsequenz und einen Teil der extrazellulären Domäne inklusive der KL1-Domäne. KL2-, Transmembran- und intrazelluläre Domäne fehlen, was zu einer stark verkürzten Variante des Proteins führt (Matsumura *et al.*, 1998). (siehe Abb. 1)

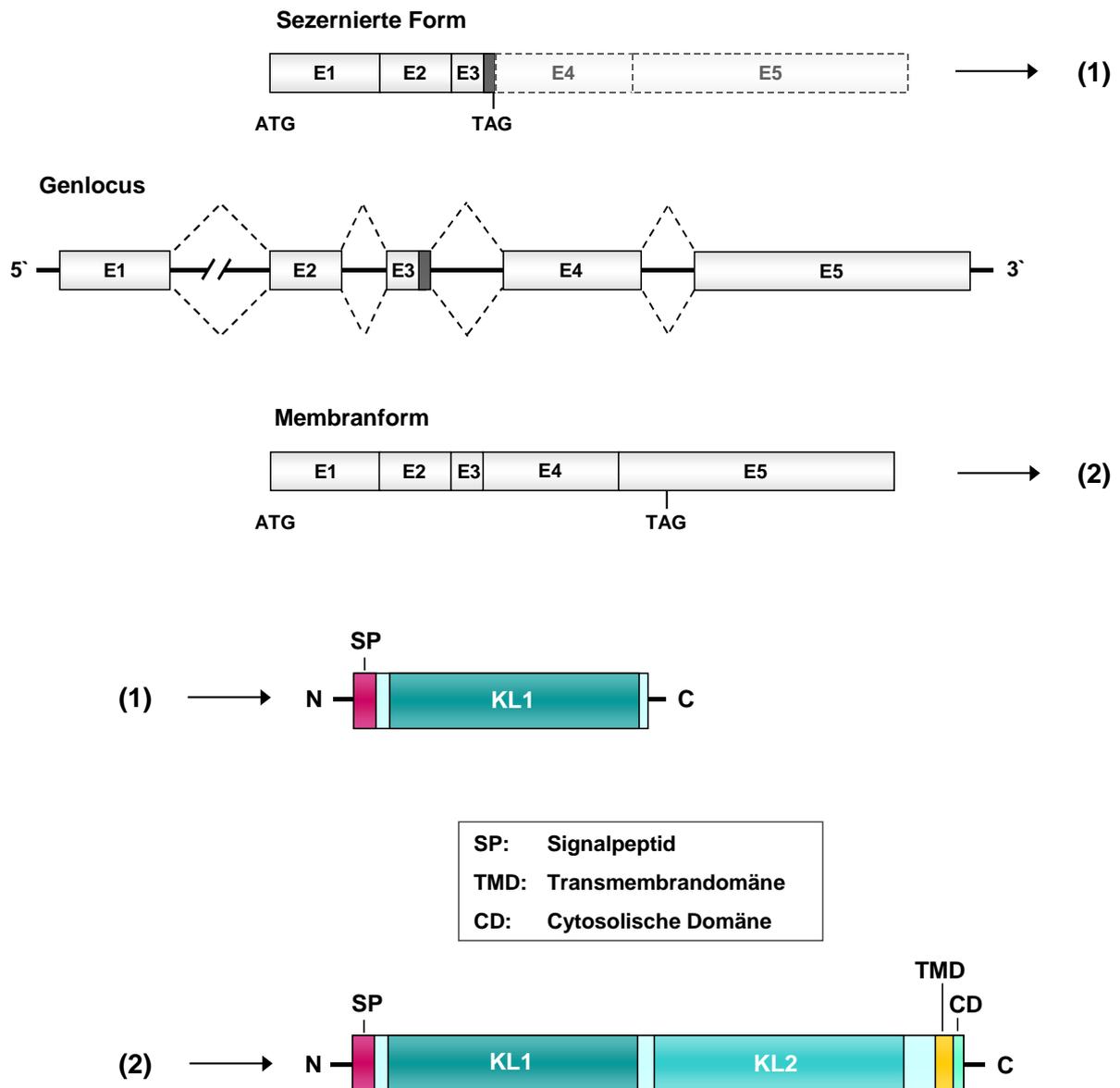


Abb. 1: Struktur des Klothogens und der durch alternatives Spleißen entstehenden Klothoproteinvarianten: (1) sezernierte Form und (2) Transmembranform.

Klotho wird posttranslational modifiziert. Zum einen findet eine Glykosylierung des Proteins statt, die durch Zugabe von N-Glykosidase rückgängig bzw. durch Behandlung mit Tunicamycin, einem Inhibitor der N-Glykosylierung, verhindert werden kann und zum anderen konnte mittels Gelfiltration und Immunpräzipitation eine Oligomerisierung von Klotho festgestellt werden (Imura *et al.*, 2004).

### **1.2.2 Die KL-Domänen und ihre Funktion**

Die KL-Domänen des Klothoproteins haben eine Länge von ~ 450 Aminosäuren und eine Sequenzähnlichkeit von ~ 20 % zueinander (Kuro-o, *et al.*, 1997). Ihre Sequenz ist zu 20-40 % identisch zu der Sequenz verschiedener Enzyme, die  $\beta$ -glykosidische Bindungen in Zuckern, Glykoproteinen und Glykolipiden spalten: erstens der humanen Lactase-Phlorizin-Hydrolase und zweitens der  $\beta$ -Glucosidase aus Pflanzen und Bakterien (Mian, 1998). Letzteres ist der Grund, warum die Klotho-Proteinfamilie zur Glykosidase-Familie 1 Superfamilie gezählt wird. Eine  $\beta$ -Glucosidase-ähnliche Aktivität von rekombinantem Klotho konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Tohyama *et al.*, 2004). Der Grund hierfür liegt möglicherweise darin, dass im aktiven Zentrum der Glucosidase-ähnlichen Domänen bei Klotho (und ebenso bei  $\beta$ -Klotho) ein Austausch jeweils eines für die enzymatische Aktivität der Glucosidase entscheidenden Glutaminsäurerestes stattgefunden hat (Glutaminsäure  $\rightarrow$  Asparagin in KL1 und Glutaminsäure  $\rightarrow$  Alanin in KL2) (Kuro-o *et al.*, 1997; Mian, 1998; Ito *et al.*, 2000; Rye and Withers, 2000).

Es konnte jedoch eine schwache Glucuronidaseaktivität von Klotho *in vitro* nachgewiesen werden. Rekombinantes Klothoprotein ist in der Lage neben dem künstlichen Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronidhydrat auch einige natürlich vorkommende  $\beta$ -Glucuronide, wie  $\beta$ -Estradiol, 3- $\beta$ -D-Glucuronid und 3- $\beta$ -D-Glucuronid zu spalten. Die Glucuronidaseaktivität ist im Vergleich mit anderen Glykosidasen relativ schwach, kann jedoch durch einen spezifischen Inhibitor der  $\beta$ -Glucuronidase gehemmt werden (Tohyama *et al.*, 2004). Inzwischen wird auch eine Sialidaseaktivität von Klotho diskutiert, da gezeigt werden konnte, dass Klotho die Konzentration von Ionenkanälen in der Membran durch Abspaltung endständiger Sialinsäurereste von N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden reguliert (Cha *et al.*, 2008).

### **1.2.3 Expression und Lokalisation von Klotho**

Obwohl die Auswirkungen einer Mutation im Klothogen vielfältig sind und eine Vielzahl von Organen und Geweben betreffen, wird Klotho nur in einer begrenzten Anzahl von Geweben exprimiert. Dies gilt sowohl für den Menschen als auch für Maus und Ratte, obgleich sich gesamt gesehen kleine Unterschiede im Expres-

sionsmuster zwischen den Spezies ergeben und die Expression von humanem Klotho bisher nur in Teilen erforscht ist. In der Maus wird Klotho vor allem stark in der Niere und im Epithel des Choroid plexus im Gehirn exprimiert. Eine schwache Expression ist in der Hypophyse, den Gonaden, der Harnblase, den Skelettmuskeln, dem Darm, der Plazenta, der Schilddrüse und dem Innenohr zu finden (Kuro-o *et al.*, 1997; Kamemori *et al.*, 2002; Ben-Dov *et al.*, 2007). In der Ratte und im Menschen ist der Hauptort der Klothoexpression ausschließlich die Niere. Eine schwächere Expression zeigt sich im Vergleich mit der Maus nur in einer geringeren Anzahl von Geweben, nämlich erstens bei der Ratte in Gehirn, Lunge, Darm und Ovar und zweitens beim Menschen in Plazenta, Prostata, Dünndarm und Schilddrüse, wobei eine Expression in weiteren Geweben beim Menschen nicht ausgeschlossen werden kann, da nicht alle Gewebe gut untersucht sind (Matsumura *et al.*, 1998; Ohyama *et al.*, 1998).

Die subzelluläre Lokalisation von Klotho wurde darüber hinaus in Mäusen weitergehend untersucht. Während Klotho in den Zellen des Choroid plexus im Gehirn wie erwartet als Transmembranprotein hauptsächlich in der Plasmamembran zu finden ist, zeigt es in der Niere zum Großteil eine diffuse Verteilung im Cytoplasma (Li *et al.*, 2004). Diese eher unerwartete cytoplasmatische Verteilung wurde später auch in der Schilddrüse des Menschen bestätigt (Imura *et al.*, 2007). Eine mögliche Erklärung ist, dass Klotho in diesen Geweben eine Rolle bei der Rekrutierung der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase zur Plasmamembran spielt. Es konnte gezeigt werden, dass Klotho im endoplasmatischen Reticulum (ER) und im Golgi Apparat an die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase bindet. Im Komplex mit dieser wandert es zur Plasmamembran bzw. reichert es sich in frühen Endosomen an, um bei Bedarf an Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase als Antwort auf eine niedrige Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen eine schnelle Rekrutierung des Komplexes zur Plasmamembran zu ermöglichen (Imura *et al.*, 2007).

Vergleicht man die Expression des Membranproteins und der durch alternatives Spleißen entstehenden sezernierten Variante, zeigen RT-PCR Analysen mit Mausgewebe, dass das Transkript der Membranform in allen untersuchten Geweben mindestens zehnmals stärker exprimiert ist als das Transkript der sezernierten Variante (Shiraki-Iida *et al.*, 1998). Northern Blot-Analysen menschlicher Gewebe dagegen lassen ein Vorherrschen der sezernierten Variante erkennen (Matsumura *et al.*, 1998). Jedoch konnte das sezernierte Protein nicht in extrazellulären Flüssigkeiten nachgewiesen werden (Imura *et al.*, 2004). Eine mögliche Erklärung wäre,

dass die sezernierte Form zwar in größeren Mengen produziert und sezerniert, dann aber im Serum sehr schnell zu nicht detektierbaren Mengen abgebaut wird.

Es sind bisher zwei Transkriptionsfaktoren beschrieben, die die Transkription von Klotho aktivieren: (1) der nukleäre Hormon-Rezeptor PPAR- $\gamma$  (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor), der hauptsächlich in Fettgewebe und in geringeren Mengen z.B. in der Niere vorkommt und nach Bindung eines Liganden u.a. die Expression von Glucosetransportern erhöht sowie die Expression von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  senkt und eine wichtige Rolle bei der Lipogenese und der Insulinsensitivität spielt (Zhang, *et al.*, 2008; Guan *et al.*, 2005; Farmer *et al.* 2005; Nehlin *et al.*, 2006) und (2) Egr-1, ein Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der durch EGF-vermittelte Aktivierung des Ras/MEK/Erk-Signalweges rasch induziert wird (Choi *et al.*, 2010). Für beide Transkriptionsfaktoren konnte eine Bindungsstelle in der Promoterregion des Klothogens identifiziert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Transkriptionsfaktoren die Klothoexpression erhöht und dass ein „Knockdown“ durch siRNA („small-interfering“ RNA) die Induktion der Klothoexpression unterdrückt (Zhang, *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2010). Weitere Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Klotho regulieren, sind bisher nicht bekannt.

#### **1.2.4 Klotho als humoraler Faktor**

Trotz der Tatsache, dass die durch alternatives Spleißen entstehende kurze Klotho-variante nicht in extrazellulären Flüssigkeiten nachgewiesen werden konnte, verdichteten sich mit der Zeit Daten, die vermuten ließen, dass Klotho neben einer Funktion als Transmembranprotein auch als humoraler Faktor wirken kann. Der erste Hinweis darauf war die bereits beschriebene Tatsache, dass eine Mutation im Klothogen Störungen in einer Vielzahl an Organen auslöst, die selbst keine Expression von Klotho zeigen, wie z.B. dem Knochen oder der Haut (Kuro-o *et al.*, 1997). Zusätzlich führte eine Parabiose (= operative Verbindung zweier Tiere, durch die humorale Faktoren zwischen den Tieren ausgetauscht werden können) zwischen einer heterozygoten Klotho-Mausmutante und einer Wildtypmaus zu einer vollständigen Regeneration der zuvor bestehenden endothelialen Funktionsstörung in der Klotho-Mutante (Saito *et al.*, 2000). Letztendlich jedoch spricht die Tatsache, dass eine weitere sezernierte Form von Klotho, die jedoch nicht der alternativ

gespleißten Variante entspricht, im Blut, Urin und in der Cerebrospinalflüssigkeit von Mäusen und Menschen detektiert werden konnte für eine Funktion von Klotho als zirkulierender humoraler Faktor (Imura *et al.*, 2004).

Es war nun wichtig zu klären, auf welchem Weg diese neue Klothovariante aus der Zelle ins Blut oder die Cerebrospinalflüssigkeit gelangt. Die inzwischen allgemein anerkannte Theorie ist, dass viele der bisher bekannten Funktionen von Klotho durch die extrazelluläre Domäne der Transmembranvariante vermittelt werden, die zuvor abgespalten und freigesetzt wird, nachdem Klotho entweder allein auf konventionellem Weg oder im Komplex mit der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase zur Plasmamembran rekrutiert wurde. Im zweiten Fall konnte eine Abspaltung von Klotho zusammen mit einer Zunahme der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase-Konzentration in der Plasmamembran durch die Messung einer erhöhten Konzentration an sezerniertem Klotho im Blut nachgewiesen werden (Imura *et al.*, 2007).

Inzwischen ist bekannt, dass die Abspaltung der extrazellulären Domäne dabei durch zwei Metalloproteasen der ADAM („A Disintegrin and Metalloproteinase“) Familie, ADAM10 und ADAM17, an zwei Stellen innerhalb der extrazellulären Domäne erfolgen kann. Dabei wird durch einen Schnitt relativ nahe der Transmembrandomäne (=  $\alpha$ -Schnittstelle) ein Fragment mit einem Molekulargewicht von 130 kDa (= „ $\alpha$ -cut“) oder durch einen Schnitt zwischen der KL1- und KL2-Domäne (=  $\beta$ -Schnittstelle) ein 68 kDa Fragment (= „ $\beta$ -cut“) generiert (Chen *et al.*, 2007). Die exakten Schnittstellen wurden bisher nicht identifiziert. Möglicherweise handelt es sich bei der  $\beta$ -Schnittstelle jedoch um eine zuvor bereits beschriebene potentielle Spaltstelle aus vier basischen Aminosäuren (Lys-Lys-Arg-Lys) zwischen den zwei KL-Domänen (Matsumura *et al.*, 1998). Die Spaltung von Klotho durch Metalloproteasen der ADAM-Familie wird durch Insulin stimuliert (Chen *et al.*, 2007). Zusätzlich konnte inzwischen gezeigt werden, dass membranständiges Klotho auch durch die  $\beta$ -Sekretase 1 gespalten werden kann und der in der Membran verbleibende Klothorest ein Substrat der  $\gamma$ -Sekretase ist (Bloch *et al.*, 2009).

Natürlich ist es durchaus möglich, dass noch weitere bisher unbekannte Spaltstellen innerhalb der extrazellulären Domäne von Klotho bestehen. Der genaue Mechanismus sowie die Antwort auf die Fragen, welche Ereignisse im Detail zu einer Abspaltung von Klotho führen und wann und warum welches Fragment abgespalten wird, bleibt weiterhin unklar. Insofern ist es nicht möglich mit Sicherheit zu sagen,

welche der sezernierten Klothovarianten letztendlich für die im Folgenden beschriebenen Funktionen zuständig ist.

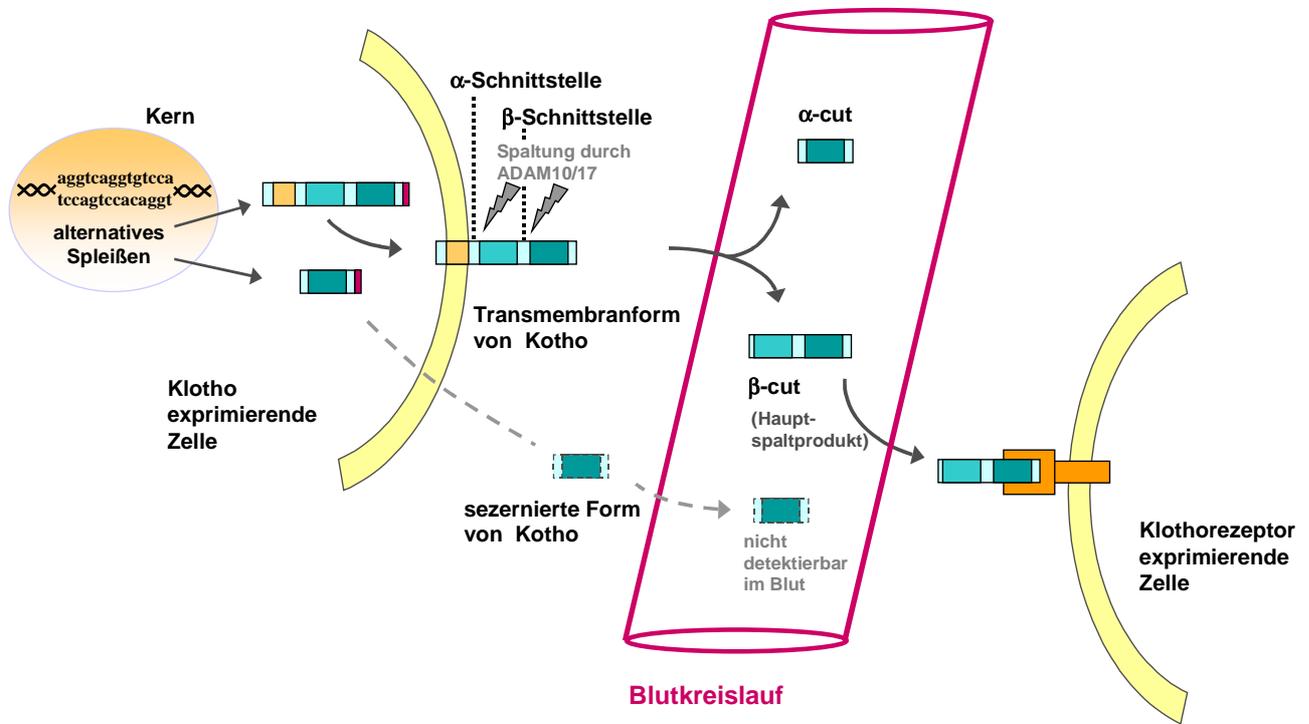


Abb. 2: Klotho wird gespalten und kann als humoraler Faktor fungieren.

### 1.3 Klotho – ein Protein mit vielfältigen Funktionen

Zu den bemerkenswerten Eigenschaften von Klotho zählt neben der Tatsache, dass es eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Alterungsprozesses spielt, auch, dass es ein Protein mit vielfältigen Funktionen ist. Und obwohl in den dreizehn Jahren seit seiner Entdeckung eine Vielzahl an Erkenntnissen bezüglich seiner Funktion gewonnen wurde, bleiben viele Fragen in Bezug auf genaue Mechanismen und tiefer gehende Zusammenhänge weiterhin offen. Im Folgenden werden einige der bekannten Funktionen von Klotho kurz beschrieben, um einen Überblick über die Bedeutung von Klotho für den Organismus, sei es Maus oder Mensch, zu bekommen.

### **1.3.1 Funktionen der Transmembranform von Klotho**

#### **1.3.1.1 Regulation des FGF („fibroblast growth factor“) 23 Signalweges durch Klotho als Co-Rezeptor von FGF23**

Die einzige bisher beschriebene Funktion von Klotho als plasmamembranständiges Protein ist seine Funktion als Co-Rezeptor für den Fibroblasten Wachstumsfaktor 23 (FGF23) (Kurosu *et al.*, 2006, Urakawa *et al.*, 2006). FGF23-defiziente Mäuse weisen im Vergleich zu Klotho-defizienten Mäusen einen nahezu identischen Alterungsphänotyp auf (Shimada *et al.*, 2004; Sitara *et al.*, 2004; Kuro-o *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2002). Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass Klotho und FGF23 in einem gemeinsamen Signalweg interagieren. Tatsächlich konnte inzwischen gezeigt werden, dass die Transmembranform von Klotho an verschiedene FGF-Rezeptor (FGFR)-Isoformen bindet und die Affinität von FGF23 zu diesen FGF-Rezeptoren erheblich erhöht, wodurch die Aktivierung des FGF23-Signalweges induziert wird (Kurosu *et al.*, 2006, Urakawa *et al.*, 2006). FGF23 allein besitzt nur eine sehr geringe Affinität zu seinen Rezeptoren und ist in der Regel auf Cofaktoren, wie z.B. Heparin oder Glykosaminoglykan angewiesen (Yamashita *et al.*, 2002 ; Yu *et al.*, 2005).

FGF23 ist ein Hormon, das die Phosphathomöostase reguliert und als eine Art Gegenspieler des Vitamin D interagiert. Es wird im Knochen gebildet und wirkt auf die Niere, wo es die Reabsorption von Phosphat und die Biosynthese von Vitamin D inhibiert, was zu einem verminderten Phosphat- und 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>- (= aktive Form des Vitamin D<sub>3</sub>) Spiegel im Blut führt (Quarles, 2003; Saito *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Zusätzlich wirkt es auf die Schilddrüse und unterdrückt dort die Expression von PTH („parathyroid hormone“), einem Hormon, das wiederum die Vitamin D Biosynthese in der Niere fördert (Ben-Dov *et al.*, 2007; Krajisnik *et al.*, 2007). Somit wird auf zwei Wegen durch FGF23 mit Hilfe von Klotho die Vitamin D Biosynthese inhibiert. Ein hoher Vitamin D Gehalt im Blut fördert die Absorption von Phosphat und Calcium aus dem Dünndarm sowie ihre Mobilisierung aus den Reservoirs im Knochen. Dies führt zu einer erheblichen Erhöhung des Ca x P Produktes, was die ektopische Verkalkung von Blutgefäßen und weichen Geweben ansteigen lässt (Nabeshima, 2006). Dies könnte den entsprechenden Phänotyp bei Klotho- bzw. FGF23-defizienten Mäusen erklären, die Verkalkungen in

größeren Ausmaß aufweisen. Ein hoher Vitamin D Spiegel kann zusätzlich Apoptose induzieren und möglicherweise Gewebeatrophien verursachen, was wiederum durch eine gemeinsame Wirkung von Klotho und FGF23 verhindert werden kann (Medici *et al.*, 2008). Interessant ist auch, dass Vitamin D selbst durch Aktivierung eines Vitamin D Rezeptors die Bildung von FGF23 im Knochen induziert. Das heißt, die Vitamin D Konzentration im Blut wird durch einen negativen „feedback loop“, an dem FGF23 und Klotho beteiligt sind, reguliert (Shimada *et al.*, 2004; Tsujikawa *et al.*, 2003). Obwohl Vitamin D beim Auslösen des Alterungsphänotyps die Hauptrolle zu spielen scheint, wurde jedoch gezeigt, dass letztendlich die durch Vitamin D ausgelöste hohe Phosphatkonzentration im Blut (Hyperphosphatämie) der entscheidende Faktor ist. In FGF23-defizienten Mäusen konnten die Alterungserscheinungen durch eine Niedrig-Phosphat-Diät, trotz anhaltender hoher Vitamin D und Calcium-Konzentrationen im Blut, verhindert bzw. rückgängig gemacht werden (Stubbs *et al.*, 2007).

Beide Orte, an denen bisher eine Funktion von FGF23 nachgewiesen wurde, die Niere und die Schilddrüse, sind Organe, die Klotho endogen exprimieren, wodurch eine Funktion als Transmembranprotein von Klotho erst möglich wird. Daher ist durchaus möglich, dass weitere Organe, die Klotho endogen exprimieren, Zielorgane für den endokrin wirkenden FGF23 sind.

Es konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -Klotho, das zweite bekannte Mitglied der Familie, die Rolle des Co-Rezeptors für die zwei anderen Mitglieder der FGF19 Subfamilie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren, zu denen FGF19 (in Maus: FGF15), FGF21 und FGF23 gehören, übernimmt (Kurosu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007).  $\beta$ -Klotho wird vor allem in der Leber und dem weißem Fettgewebe exprimiert (Ito *et al.*, 2000). FGF19, das vom Dünndarm freigesetzt wird, inhibiert die Gallensäuresynthese und -freisetzung (Inagaki *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006), wohingegen FGF21, das in der Leber gebildet wird, die Lipolyse in den Adipocytten fördert (Kharitonov *et al.*, 2005; Inagaki *et al.*, 2007). Somit scheint die Funktion von Klotho als Co-Rezeptor für endokrine Fibroblasten Wachstumsfaktoren ein allgemeines Prinzip für die Funktion der Proteine der Klotho-Familie zu sein (Kurosu und Kuro-o, 2008 und 2009; Kuro-o, 2008).

### **1.3.2 Funktionen der sezernierten Form von Klotho**

Wie bereits zuvor erwähnt, kann Klotho auch als humoraler Faktor nach Abspaltung und Freisetzung der extrazelluläre Domäne eine Reihe von Funktionen erfüllen, die unterschiedlich gut aufgeklärt sind.

#### **1.3.2.1 Regulation der Aktivität von Ionenkanälen durch enzymatische Aktivität von Klotho**

Die KL-Domänen von Klotho weisen eine schwache *in vitro* Glucuronidaseaktivität auf (Tohyama *et al.*, 2004). Eine physiologische Funktion dieser enzymatischen Aktivität beider Domänen konnte als Erstes in Bezug auf die Regulation des Ionenkanals TRPV5 („Transient Receptor Potential Vanilloid 5“) gezeigt werden. TRPV5 ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal der in den Epithelzellen der Niere exprimiert wird und für die transzelluläre Rückresorption von  $\text{Ca}^{2+}$  im distalen Tubulus und damit für die Erhaltung der Calciumhomöostase zuständig ist (Hoenderop *et al.*, 2005; Nijenhuis *et al.*, 2005). Klotho verhindert die Internalisierung des Ionenkanals in die Zelle, was zu einer vermehrten Anzahl an TRPV5-Kanälen in der Plasmamembran und damit zu einer anhaltenden Ionenkanalaktivität und einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Durchlässigkeit der Membran führt (Chang *et al.*, 2005). Der gleiche Effekt konnte auch für den zu TRPV5 stark homologen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal TRPV6 gezeigt werden (Lu *et al.*, 2008). Da dieser Effekt durch die Behandlung mit einem spezifischen  $\beta$ -Glucuronidaseinhibitor gehemmt werden konnte und ebenso durch gereinigte  $\beta$ -Glucuronidase ausgelöst wurde, kam man zu der Annahme, dass dieser Effekt durch eine Glucuronidaseaktivität von Klotho vermittelt wird (Chang *et al.*, 2005).

Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass vielmehr eine Sialidaseaktivität von Klotho für den Effekt verantwortlich ist. Durch Abspaltung endständiger  $\alpha$ 2,6-Sialinsäurereste N-glycosidisch gebundener Oligosaccharide der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanäle werden darunter liegende Galactose-Reste freigelegt, an die das Galactosebindende Lectin Galectin-1 binden kann. Dieses ist in der Lage extrazellulär Plasmamembran-Glykoproteine miteinander zu vernetzen. Die Vernetzung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanäle verhindert ihre Endocytose und hält sie in der Plasmamembran fest (Cha *et al.*, 2008). Bei dem durch die  $\beta$ -Glucuronidase vermittelten Effekt scheint es

sich dagegen um einen „off-target“ Effekt gegenüber den Sialinsäureresten zu handeln.

Inzwischen wurde mit ROMK1, einem K<sup>+</sup>-Kanal in der Apikalmembran des distalen Tubulus der Niere, ein weiterer Ionenkanal identifiziert, der durch den oben beschriebenen Mechanismus reguliert wird (Cha *et al.*, 2009). Eine allgemeine, weiterreichendere Funktion von Klotho in der Regulation des Ionentransports in der Niere ist daher nicht ausgeschlossen.

Zusätzlich deckten neuere Untersuchungen eine entgegengesetzte Funktion von Klotho in der Regulation des Ca<sup>2+</sup>-Ionenkanals TRPC6 auf (Cha *et al.*, 2009; Huang, 2010). Dieser Kanal wird im Gehirn, in Zellen der glatten Muskulatur und der Niere sowie in Blut- und Immunzellen exprimiert. Studien mit TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen lassen eine Rolle dieses Kanals in der Regulation der Kontraktion glatter Muskelzellen der Gefäße und der Lunge sowie bei der glomerulären Nierenfunktion vermuten (Dietrich und Gudermann, 2007). Sezerniertes Klotho scheint im Fall von TRPC6 die Zelloberflächenexpression des Kanals durch Störung der durch Wachstumsfaktoren im Serum ausgelösten Exocytose zu senken (Cha *et al.*, 2009). Der genaue Mechanismus muss jedoch noch geklärt werden.

Die hier genannten Beispiele zeigen, dass Klotho sowohl auf parakrinem als auch auf endokrinem Weg wirken kann. Parakrin ist die Wirkung, wenn Klotho von den Zellen des renalen Tubulus der Niere in den Urin abgegeben wird und von dort die Membranhäufigkeit von TRPV5 oder ROMK1 der Nachbarzellen reguliert. Endokrin dagegen ist die Wirkung, wenn Klotho in den Blutkreislauf sezerniert wird und die Membranexpression von TRPC6 im Herz oder den Glomeruli beeinflusst.

### **1.3.2.2 Regulation der Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion und Schutz vor endothelialer Dysfunktion durch Klotho**

Klotho-defiziente Mäuse zeigen eine verminderte Vasodilatation in der Aorta und den Ateriolen als Antwort auf Acetylcholin (Saito *et al.*, 1998) sowie eine beeinträchtigte Angiogenese (Shimada *et al.*, 2004; Fukino *et al.*, 2002). Sowohl die Vasodilatation und damit der Gefäßtonus als auch die Angiogenese sind von Stickstoffmonoxid (NO) abhängig, das in den vaskulären Endothelzellen gebildet und ins Blut abgegeben wird. Daher lag die Vermutung nahe, dass Klotho-defiziente Mäuse eine gestörte bzw. verminderte NO-Synthese aufweisen. Diese Vermutung wurde bestärkt

durch die Tatsache, dass bei Klotho-defizienten Mäusen die Konzentration der Stickstoffoxidmetabolite  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NO}_3^-$  im Urin deutlich erniedrigt ist (Saito *et al.*, 1998). Zusätzlich zeigte eine Studie mit Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Ratten, die eine Vielzahl von Risikofaktoren für Arteriosklerose (z.B. Bluthochdruck, Fettleibigkeit und Hyperglykämie) aufweisen, dass eine Adenovirus-vermittelte Einführung des Klothogens die Dysfunktion des Gefäßendothels verbessert, den erhöhten Blutdruck erniedrigt und die NO-Synthese erhöht (Saito *et al.*, 2000).

Der genaue Mechanismus, durch den Klotho die NO-Synthese induziert, ist jedoch noch ungeklärt. Allerdings gibt es mehrere Studien, die durch Klotho ausgelöste Signalkaskaden in kultivierten Endothelzellen beschreiben und bei denen eine Erhöhung der cAMP-Konzentration eine ausschlaggebende Rolle spielt. Den ersten Hinweis lieferte eine Studie, die eine zeit- und dosisabhängig Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Klotho in kultivierten Endothelzellen zeigte, welche eine PKA-vermittelte Erhöhung der ACE („Angiotensin I-converting enzyme“)-Aktivität zur Folge hatte (Yang *et al.*, 2003). Zudem wurde eine Erhöhung der NO-Synthese in Verbindung mit einer Expressionszunahme der MnSOD (Mangan-Superoxid-Dismutase) als Folge einer Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Klotho beschrieben. Dies, zusammen mit einer Inhibition der Produktion von durch Angiotensin II induzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS = „reactive oxygen species“) durch Klotho, lieferte einen weiteren Hinweis auf einen Schutzeffekt von Klotho gegenüber endothelialer Dysfunktion (Rakugi *et al.*, 2007). Diese Rolle von Klotho wird zusätzlich durch Ergebnisse weiterer Untersuchung gestützt, die zeigen, dass Klotho die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Apoptose und zelluläre Seneszenz in kultivierten Endothelzellen reduziert (Ikushima *et al.*, 2006) und die Bildung von endothelialen Adhäsionsmolekülen, deren Expression bei einer Gefäßentzündung stark durch  $\text{TNF}\alpha$  induziert wird, unterdrückt (Maekawa *et al.*, 2009).

### 1.3.2.3 Inhibition des Wnt-Signalweges durch Klotho

Klotho reguliert mehrere Wachstumsfaktorsignalwege, u.a. den Wnt-Signalweg. Untersuchungen zeigten, dass sezerniertes Klotho verschiedene Mitglieder der Wnt-Familie bindet und dadurch die Aktivierung der Wnt-Sinaltransduktion hemmt. Klotho kann daher als eine Art sezernierter Wnt-Antagonist bezeichnet werden (Liu *et al.*,

2007). Ob die Bindung von Klotho an die Wnt-Liganden die Interaktion mit ihrem Rezeptor verhindert oder die Inhibition des Signalweges über einen anderen, bisher ungeklärten Mechanismus abläuft, ist jedoch noch unklar.

Der Wnt-Signalweg ist essentiell für die Proliferation und das Überleben von Stammzellen. Eine kontinuierliche Aktivierung der Stammzellen kann jedoch zu ihrer schnellen Ermüdung bzw. Erschöpfung und damit zu einer vorzeitigen Seneszenz der Stammzellen führen (Scheller *et al.*, 2006; Kirstetter *et al.*, 2006). Solche Störungen begrenzen die Geweberegeneration und beeinflussen bzw. beschleunigen möglicherweise den Alterungsprozess. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Inhibition der Wnt-Signaltransduktion durch Klotho zum Alterungsphänotyp Klotho-defizienter Mäuse durchaus beitragen kann. Z.B. weisen Klotho-defiziente Mäuse eine reduzierte Menge an epidermalen Stammzellen in den Haarfollikeln auf (Kuro-o *et al.*, 1997). Die vorhandenen Stammzellen wiederum zeichnen sich durch eine starke Aktivierung der Wnt-Signalkaskade im Vergleich zu Wildtypmäusen aus. Daher wird angenommen, dass es sich hierbei um eine kontinuierliche Aktivierung des Wnt-Signalweges handelt, die zu einer frühen Seneszenz der Stammzellen führt (Kuro-o *et al.*, 2009). Ebenfalls ist es möglich, den paradoxen Knochen-Phänotyp Klotho-defizienter Mäuse (reduzierte Knochendichte in kortikalen Knochen ↔ erhöhte Knochendichte in trabekulären Knochen) zumindest teilweise mit der fehlenden Inhibition der Wnt-Signaltransduktion zu erklären (Kawaguchi *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 1998). Es wurde gezeigt, dass die Wnt-Signalkaskade selektiv in trabekulären Knochen erhöht ist. Dadurch wird die Proliferation und das Überleben von Osteoblasten gefördert, wodurch die erhöhte Knochendichte erklärbar wäre (Kuro-o *et al.*, 2009). Der Grund für die selektive Aktivierung des Wnt-Signalweges bleibt jedoch ungeklärt.

Die genannten Ergebnisse zeigen eine bisher unbekannt Verbindung zwischen dem Wnt-Signalweg und Alterungsprozessen auf und öffnen die Tür für die Idee lösliche Stammzell-Mediatoren wie Wnt als mögliches Ziel für neue therapeutische Strategien zur Bekämpfung bzw. Linderung der Erkrankungen des Alters in Betracht zu ziehen.

#### 1.3.2.4 Inhibition des Insulin-/ IGF1-Rezeptor-Signalweges durch Klotho und die Folgen

Eine verlängerte Lebensspanne als Folge einer moderaten negativen Regulation der Insulin- und IGF1-Signaltransduktion ist ein in der Evolution konservierter Mechanismus zur Unterdrückung der Alterung (Tatar *et al.*, 2003). Diese These wird durch viele Studien in verschiedensten Modellorganismen unterstützt. In *C. elegans* und *Drosophila* führen „Loss-of-function“ bzw. „Reduction-of-function“ Mutationen in Genen, die für Orthologe des Insulinrezeptors, des Insulin Rezeptor Substrats (IRS) oder der PI3-Kinase codieren, zu einer verlängerten Lebensspanne (Kenyon *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 1996; Tatar *et al.*, 2001; Clancy *et al.*, 2001). Gleiches gilt für verschiedene Insulin- oder IGF1-Rezeptor „knockout“-Mäuse sowie für Mäuse mit Mutationen im IRS-Gen (Blüher *et al.*, 2003; Holzenberger *et al.*, 2003; Taguchi *et al.*, 2007; Selman *et al.*, 2008).

Mit diesem Hintergrundwissen ist es nicht überraschend, dass für Klotho, welches auch häufig als „anti-ageing“ Hormon bezeichnet wird, eine Inhibition der intrazellulären Insulin- und IGF1-Signaltransduktion nachgewiesen wurde (Kurosu *et al.*, 2005). Einen ersten Hinweis auf eine solche Funktion von Klotho gab die Tatsache, dass Klotho-defiziente Mäuse hypoglykämisch sind und eine erhöhte Sensitivität gegenüber Insulin aufweisen (Utsugi *et al.*, 2000), wohingegen Klotho-überexprimierende Mäuse resistent gegenüber Insulin (Männchen) oder IGF1 (Weibchen) sind (Kurosu *et al.*, 2005).

Der genaue Mechanismus der Inhibition des Insulin- und IGF1-Signalweges ist bisher nicht bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die abgespaltene extrazelluläre Domäne von Klotho die Liganden-stimulierte Autophosphorylierung des Insulin- und IGF1-Rezeptors unterdrückt, was zu einer reduzierten Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen führt (Abb. 3). Eine verminderte Bindung von Insulin oder IGF1 an ihre Rezeptoren konnte durch Klotho jedoch nicht nachgewiesen werden (Kuroso *et al.*, 2005). Dementsprechend wurde ursprünglich davon ausgegangen, dass Klotho selbst nicht an den Insulin- bzw. IGF1-Rezeptor bindet. Inzwischen ist jedoch zumindest eine Bindung von Klotho an den IGF1-Rezeptor beschrieben (Wolf *et al.*, 2008). Genaue Details zu dieser Bindung und ihrer Folgen stehen jedoch noch aus.

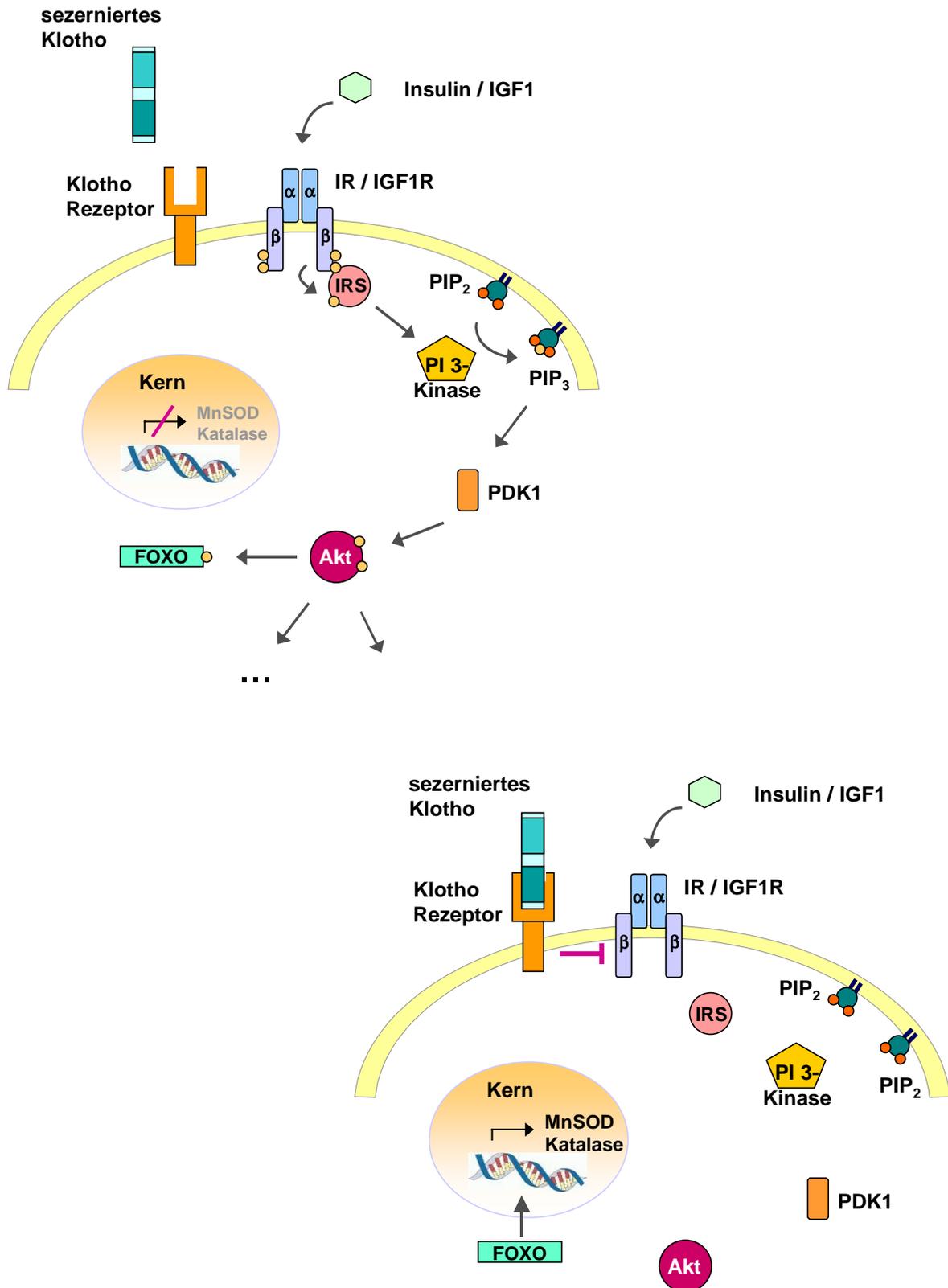


Abb. 3: Schematische Darstellung des IGF1-Signalweges und der angenommenen Rolle von Klotho bei seiner Inhibition.

Es stellt sich die Frage, wie eine moderate negative Regulation der Insulin- und IGF1-Signaltransduktion durch Klotho zu einer verlängerten Lebensspanne führen kann. Eine Theorie, wie das Leben von Zellen verlängert wird, ist, dass durch die Inhibition des Insulin- bzw. IGF1-Signalweges eine Überladung der Zellen mit Lipiden verhindert wird, wodurch der Schwellenwert für eine Lipid-induzierte Apoptose erhöht wird. Untersuchungen zeigten bei Klotho-defizienten Mäusen im Vergleich zu heterozygoten bzw. zu Wildtypmäusen eine vermehrte Expression des Glucosetransporters Typ 4 (GLUT-4) im Skelettmuskel (Utsugi *et al.*, 2000). Die Bindung von Insulin bzw. IGF1 an den jeweiligen Rezeptor löst normalerweise eine Phosphorylierungskaskade aus, die zur Translokation von GLUT-4 zur Plasmamembran führt. Wird diese Kaskade jedoch unterdrückt, nimmt die Anzahl an GLUT-4 in der Plasmamembran ab. Dies hat einen verminderten Import von Glucose in die Zelle und damit eine verminderte Bildung von Malonyl-Coenzym A, einem entscheidenden Ausgangsprodukt der Fettsäuresynthese (Lipogenese), zur Folge. D.h., die Lipogenese der Zelle wird reduziert und gleichzeitig steigt die Fettsäureoxidation, da diese ansonsten von Malonyl Coenzym A inhibiert wird. Als Ergebnis wird die Zelle nicht mit Lipiden überladen und eine Lipid-induzierte Apoptose bleibt aus (Unger, 2006).

Eine weitaus wichtigere und besser untersuchte Folge der Inhibition der Insulin-/IGF1-Signaltransduktion ist eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress. Die durch die Aktivierung des Insulin- bzw. IGF1-Rezeptors ausgelöste Phosphorylierungskaskade (Abb. 3) führt neben der Translokation von GLUT-4 zur Plasmamembran auch zu einer negativen Regulation der „Forkhead box O“ (FOXO) Transkriptionsfaktoren. Diese werden durch eine phosphorylierte und damit aktive Akt Kinase phosphoryliert, was einen Ausschluss dieser Faktoren aus dem Zellkern zur Folge hat (Brunet *et al.*, 1999). Eine Inhibition der Insulin- bzw. IGF1-Signaltransduktion, z.B. durch Klotho, führt zu einer reduzierten Phosphorylierung von Akt und damit auch der FOXO-Transkriptionsfaktoren, wodurch diese in den Kern translozieren können und dort die Expression ihrer Zielgene induzieren, zu denen u.a. Superoxid-Dismutasen und Katalase gehören (Kops *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2005). Diese Enzyme sorgen für den Abbau von für den Organismus schädlichen reaktiven Sauerstoffspezies, die bei oxidativem Stress entstehen, zu Wasserstoffperoxid und weiter zu Sauerstoff und Wasser. Eine Überexpression von Klotho in Mäusen führte zu einer geringeren Menge an detektierbaren phosphorylierten FOXO und einer erhöhten Expression der Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD). Die

Mäuse waren dadurch resistenter gegenüber oxidativem Stress, was anhand eines im Vergleich zu Wildtypmäusen niedrigerem Gehalts an 8-Hydroxy-2-deoxyguanosin (8-OhdG = Marker für oxidative Schäden der DNA) im Urin nachgewiesen werden konnte (Yamamoto *et al.*, 2005). Mit sublethalen Dosen an Paraquat (= Herbizid, das Hydroperoxide generiert) behandelte Klotho-überexprimierende Mäuse überleben länger als Wildtypmäuse, und kultivierte Zellen, die mit Klotho und Paraquat behandelt wurden, weisen weniger Lipidoxidation und Apoptose auf als Zellen, die nur mit Paraquat behandelt wurden (Yamamoto *et al.*, 2005).

Zusammengefasst kann man daher sagen, dass Klotho die Resistenz gegenüber oxidativem Stress sowohl auf zellulärer als auch auf Organismenebene erhöht. Dementsprechend ist es nicht überraschend, dass Klotho auch eine Rolle bei Erkrankungen spielt, zu deren Ursachen oxidativer Stress gezählt wird, wie Ischämie oder Entzündungskrankheiten. Eine verminderte Expression von Klotho findet man z.B. in Ratten bei akutem inflammatorischem Stress (Ohyama *et al.*, 1998) und in Colitis-Mausmodellen (Thurston *et al.*, 2010). Eine Überexpression von Klotho dagegen kann durch Ischämie oder Glomerulonephritis verursachte Nierenschäden verhindern (Sugiura *et al.*, 2005, Haruna *et al.*, 2007).

Eine weitere Folge der Inhibition des Insulin-/IGF1-Signalweges durch Klotho ist die Fähigkeit von Klotho die über den p53/21 Signalweg vermittelte Seneszenz von humanen Endothelzellen (HUVEC) und primären humanen Fibroblasten (MRC5) nach DNA-Schäden zu reduzieren (de Oliveira, 2006, Ikushima *et al.*, 2006). p53 ist ein Protein, das die Transkription von Genen reguliert, die am Zellzyklusarrest und der Apoptose beteiligt sind (Wahl und Carr, 2001). Zu ihnen gehört auch der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p21, der zusammen mit anderen Proteinen für den p53-vermittelten Zellzyklusarrest in der G1-Phase verantwortlich ist (Bartek und Lukas, 2001). Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung von MRC5-Zellen mit Klotho RNAi zur Aktivierung des Insulin-/IGF1-Signalweges bis hin zu einer Inaktivierung von FOXO3 sowie zu einer erhöhten Expression von p21 und einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase führt. p53 ist dabei essentiell für den Arrest (de Oliveira, 2006). Bereits vorher wurde berichtet, dass über die Aktivierung des Insulin-/IGF1-Signalweges mit folgender Phosphorylierung von FOXO3 durch Akt die *in vitro* Lebensspanne von kultivierten Zellen über den p53/21-Signalweg negativ reguliert wird (Miyachi *et al.*, 2004, Kyoung Kim *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse führten zu folgender Theorie: Über die Insulin-/IGF1-Signaltransduktion wird die Serin-/Threonin-

Kinase Akt aktiviert. Diese phosphoryliert den FOXO3-Transkriptionsfaktor, wodurch dieser im Cytoplasma zurückgehalten wird. Dadurch nimmt die Konzentration an MnSOD ab und daraus folgend die Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies in der Zellen zu, wodurch der p53/21-Signalweg aktiviert und der Zellzyklus arretiert wird. Klotho wiederum inhibiert diesen Weg und verhindert so eine vorzeitige Seneszenz der Zelle.

Auch wenn die Signalkaskade, die durch die Aktivierung des Insulin- bzw. IGF1-Rezeptors ausgelöst wird und die Folgen der Inhibition durch Klotho relativ gut untersucht sind, ist der Mechanismus, der zur Inhibition selbst führt, einer der am wenigsten verstandenen Klotho-Wirkmechanismen. Trotz der Tatsache, dass eine Bindung von Klotho an den IGF1-Rezeptor gezeigt werden konnte, hält sich immer noch die Theorie, dass es einen bisher unbekanntem Klothorezeptor gibt, der durch Bindung von Klotho eine Signalkaskade aktiviert, die mit dem Insulin-/IGF1- Signalweg interagiert.

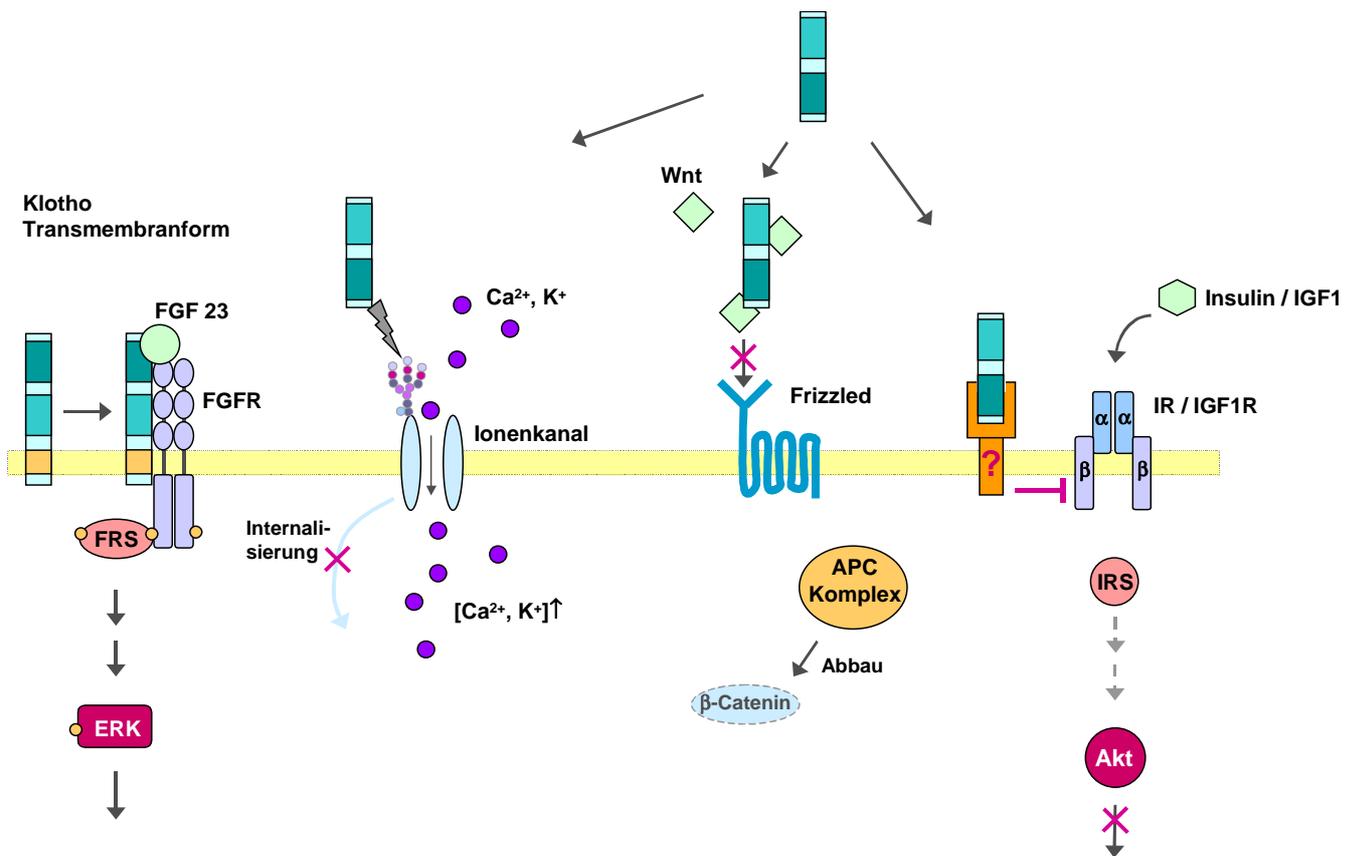


Abb. 4: Klotho und seine unterschiedlichen Wirkmechanismen.

## 1.4 Die Rolle von Klotho in der Krebsforschung

Das Älterwerden wird mit einer vermehrten Entstehung einer Vielzahl an Krebsarten in Verbindung gebracht. Wenn man die molekularen Mechanismen versteht, die diesem Alterskrebs zugrunde liegen, ist man vielleicht in der Lage ihn zu verhindern oder zu behandeln. Da Klotho eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung bzw. der Verlangsamung des Alterungsprozesses von Zellen und Organismen zu spielen scheint und Signalwege reguliert, die nachgewiesener Weise eine wichtige Rolle bei der Entstehung unterschiedlichster Krebsarten spielen, liegt die Theorie nahe, dass auch Klotho eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung spielt und ein mögliches Zielprotein für neue Therapien gegen Krebs darstellen könnte.

Um die Rolle von Klotho bei der Krebsentstehung zu verstehen, muss man sich die Bedeutung der Proteine nachgeschalteter Signalkaskaden anschauen. Der wichtigste genetisch konservierte Signalweg, der das Altern und Krebs miteinander verbindet, ist der IGF1-Signalweg, der zur Aktivierung der FOXO-Transkriptionsfaktoren führt. Diese sind ein Hauptziel des PI3-Kinase/Akt-Weges bei der zellulären Stimulation durch Wachstumsfaktoren wie IGF1 oder Insulin. Mutationen in diesem Weg sowie in PTEN, der Phosphatase, die der PI3-Kinase entgegenwirkt, sind in den meisten Tumoren zu finden (Luo *et al.*, 2003; Parsons, 2004; Altomare und Testa, 2005), wie z.B. in Glioblastomen sowie in Mamma- und Prostatakarzinomen (Greer und Brunet, 2008).

Die Gruppe der FOXO-Transkriptionsfaktoren, die bei Säugetieren vier Mitglieder beinhaltet (FOXO1, 3, 4 und 6), fördert eine Vielzahl an zellulären Antworten, zu denen v.a. Resistenz gegenüber oxidativem Stress, Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose gehören (Greer und Brunet, 2008). Die Fähigkeit diese Zellantworten zu induzieren macht sie zu Tumorsuppressorkandidaten, da fehlender Arrest an Kontrollpunkten die Tumorentwicklung fördert und eine gestörte Fähigkeit der DNA-Reparatur zu genomischer Instabilität und dem Überleben mutierter Zellen führen kann. Den ersten Hinweis für eine wichtige Rolle von FOXO-Transkriptionsfaktoren in Tumoren lieferte die Entdeckung, dass FOXO-Gene in humanen Tumoren an chromosomalen Translokationen in Rhabdomyosarkomen und akuter myeloischer Leukämie beteiligt sind (Galili *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1994; Parry *et al.*, 1994; Borkhardt *et al.*, 1997). Weitere Anzeichen für eine Bedeutung als Tumorsuppressor lieferten Brustkrebsstudien, bei denen in humanen Brustkrebsgewebeschnitten das

Vorkommen von cytoplasmatischem FOXO3 stark mit einer schlechten Überlebensrate der Brustkrebspatienten korrelierte (Hu *et al.*, 2004).

Vermutlich bedeutender für eine Wirkung von Klotho als Tumorsuppressor ist jedoch die Funktion von IGF1 bzw. des IGF1-Rezeptors. IGF1 fördert das Zellwachstum und die Differenzierung sowohl durch autokrine als auch durch parakrine Mechanismen (Jones and Clemmons, 1995) und ist ein potenter Inhibitor der Apoptose (Baserga *et al.*, 2003). Seine Wirkung wird hauptsächlich über den IGF1-Rezeptor vermittelt. Die wichtige Rolle des IGF1-Signalweges bei der Tumorentstehung ist bereits durch viele Untersuchungen und Studien belegt. Viele Tumorzelllinien und die meisten Primärtumore (z.B. Mamma-, Prostata-, Ovarial-, Nieren- und Colonkarzinome sowie Rhabdomyosarkome) überexprimieren IGF1 oder den IGF1-Rezeptor und zeigen eine verstärkte Bindung des Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor (Werner und LeRoith, 1996; Baserga, 1995; Cardillo *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2002; Ouban *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 1999; Bruchim *et al.*, 2009). Verschiedene Studien konnten eine Verbindung zwischen einer hohen Serumkonzentration an IGF1 und einem erhöhtem Risiko der Entstehung von Brust- und Prostatakrebs, Lungenkrebs, endometrialen und colorektalen Tumoren sowie Blasenkrebs nachweisen (Hankinson *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999; Probst-Hensch *et al.*, 2001; Petridou *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003). Der IGF1-Rezeptor spielt nachweislich eine entscheidende Rolle bei der malignen Transformation von Zellen und ihrer Erhaltung (Valentinis und Baserga, 2001; DeAngelis *et al.*, 1995; Kaleko *et al.*, 1990). Darüber hinaus zeigten Untersuchungen, dass IGF1 die Tumorangiogenese und -invasion sowie die Metastasenbildung fördert (Fukuda *et al.*, 2002; Treins *et al.*, 2005; Zhang und Brodt, 2003, Samani *et al.*, 2001). Vermutlich ist diese wachstumsfördernde und transformierende Wirkung von IGF1 bzw. des IGF1-Rezeptors zu einem großen Teil das Resultat ihrer potenten anti-apoptotischen Aktivität (Resnicoff *et al.*, 1995).

Aufgrund des Wissens um die wichtige Rolle von IGF1 und dem IGF1-Rezeptor in der Tumorentstehung und dem Fortschreiten der Krankheit wird v.a. der IGF1-Rezeptor häufig als Ansatzpunkt für die Entwicklung von Medikamenten zur Krebsbehandlung gewählt, immer mit dem Ziel, die IGF1-Signaltransduktion zu inhibieren. Dabei kommen verschiedenen Strategien zum Einsatz. Man versucht zum einen durch monoklonale Antikörper gegen den IGF1-Rezeptor die Bindung von IGF1 an seinen Rezeptor verhindern und zum anderen mit Hilfe von Tyrosinkinaseinhibitoren die enzymatische Aktivität des IGF1-Rezeptors zu inhibieren. Ein weiterer Ansatz ist

der Einsatz von siRNA gegen den IGF1-Rezeptor, um die Anzahl der Rezeptoren zu reduzieren. Die Inhibition der IGF1 Wirkung soll dabei entweder direkt das Tumorstadium hemmen oder den Effekt von bereits existierenden Krebstherapien potenzieren. Da Klotho den IGF1-Signalweg inhibiert, liegt die Idee nahe Klotho selbst bzw. in abgewandelter Form als Medikament in der Krebstherapie einzusetzen oder den IGF1-Signalweg über den Mechanismus zu inhibieren, welcher der Klotho-Wirkung zu Grunde liegt. Dieser Mechanismus ist jedoch bisher leider ungeklärt.

Ein weiterer Signalweg, der durch Klotho inhibiert wird und der eine bereits gut untersuchte Rolle bei der Krebsentstehung spielt, ist der Wnt-Signalweg. Viele Komponenten dieses Weges sind als Onkogene (z.B.  $\beta$ -Catenin, SOX und Wnt 1) oder Tumorsuppressorgene (z.B. APC, Anxin und E-Cadherin) beschrieben. Die Assoziation einer deregulierten Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalkaskade mit Krebs ist besonders gut im Zusammenhang mit colorektalen Tumoren dokumentiert (Polakis, 2007; Fuchs *et al.*, 2005). Ein durch Mutation konstitutiv aktivierter Wnt-Signalweg führt zur übermäßigen Stammzellerneuerung und Proliferation und damit zu einem erheblich erhöhten Risiko der Tumorentstehung. Tatsächlich ist eine Deletion im APC-Gen oder eine konstitutive  $\beta$ -Catenin Aktivierung in Stammzellen essentiell für intestinale Neoplasien (Fodde und Brabletz, 2007).

Selbst Krebsarten, die keine Mutationen in Proteinen der Wnt-Signalkaskade tragen, fallen durch einen stark aktivierten Wnt-Signalweg auf. Diese Aktivierung ist entweder Folge einer erhöhten Expression verschiedener Komponenten der Wnt-Signaltransduktion oder einer epigenetischen Stilllegung von negativ regulierenden Genen des Signalweges (Barker and Clevers, 2006). So wurde z.B. gezeigt, dass Colonkarzinomzellen die Expression von sezernierten Wnt-Antagonisten epigenetisch stilllegen (He *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2004).

Die Inhibition der Wnt-Signalkaskade ist in der Krebstherapie daher von besonderem Interesse. Auch hier ist eine wichtige therapeutische Option den Wnt-Signalweg direkt zu Beginn zu inhibieren. Dies ist entweder durch Antikörper gegen Wnt-Proteine (He *et al.*, 2005) oder durch eine sezernierte extrazelluläre Domäne ihres Rezeptors Frizzled möglich (DeAlmeida *et al.*, 2007). In beiden Fällen werden die Wnt-Proteine abgefangen bevor sie an ihren Rezeptor in der Membran binden können, wodurch eine Aktivierung der Signaltransduktion verhindert wird. Eine ähnliche Funktion könnte auch Klotho ausüben, da es, wie bereits beschrieben, an Wnt-

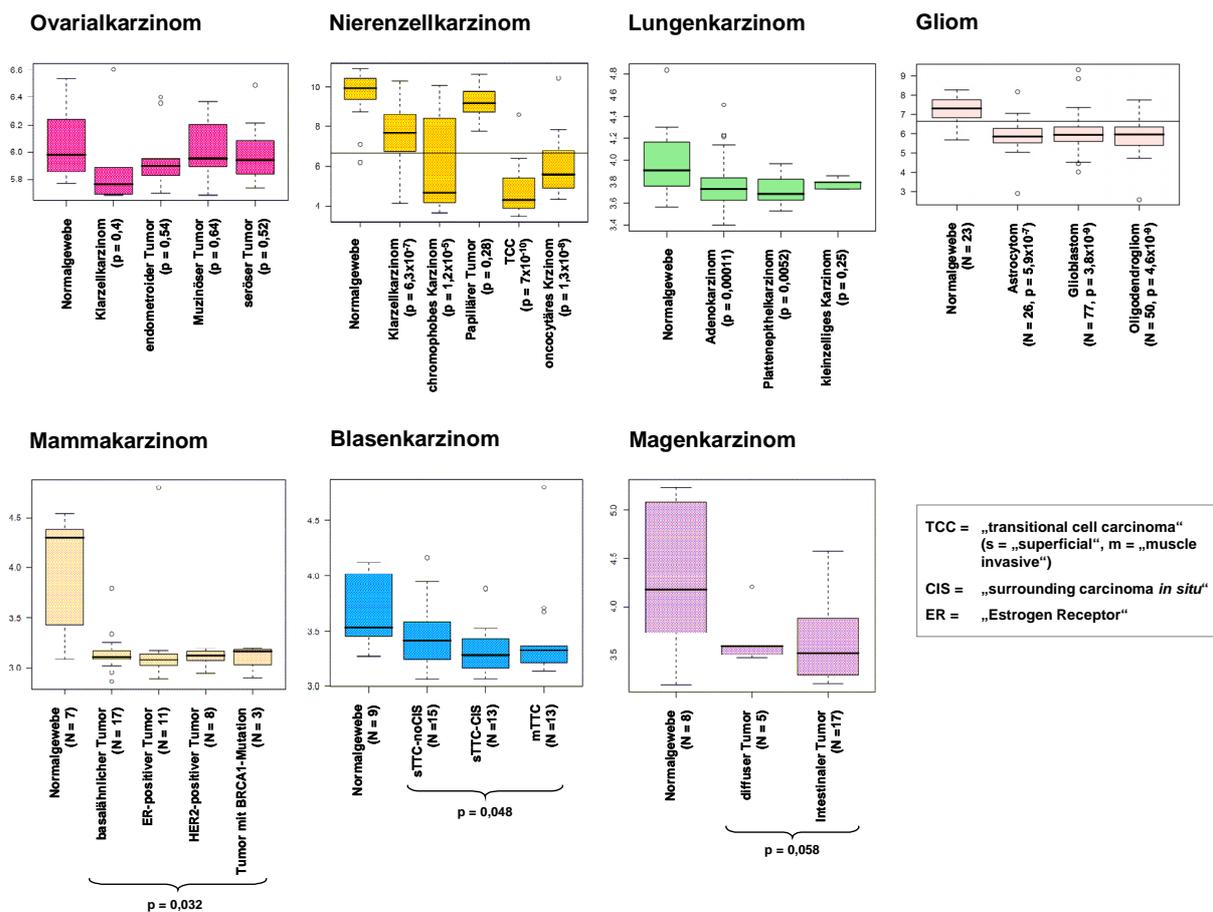
Proteine bindet und so möglicherweise die Interaktion dieser an ihren Rezeptoren verhindert.

Tatsächlich wird Klotho selbst inzwischen als Tumorsuppressor diskutiert, vor allem in Verbindung mit Brustkrebs. Immunhistochemische Analysen von humanem Brustkrebsgewebe stellten eine deutlich niedrigere Expression von Klotho in Mammakarzinomen im Vergleich zu gesundem Brustgewebe fest (Wolf *et al.*, 2008). Darüber hinaus ergaben Untersuchungen, dass eine Überexpression von Klotho zu einem verminderten Wachstum von kultivierten Brustkrebszellen führt, wohingegen ein „knockdown“ der Klothoexpression mittels siRNA das Wachstum fördert. Nähere Untersuchungen der Signalwege zeigten eine Inhibition des IGF1-Signalweges sowie eine vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  („CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$ “) durch Klotho als möglichen Grund für die anti-proliferative Wirkung (Wolf *et al.*, 2008). Der Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$  wurde bereits zuvor als möglicher Inhibitor des Tumorwachstums bei Brustkrebs benannt (Gomis *et al.*, 2006, Wolf *et al.*, 2006).

Inzwischen wurde eine funktionelle Variante von Klotho (KL-VS) beschrieben, die zwei Aminosäuresubstitutionen aufweist (F352V und C370S), eine reduzierte Aktivität zeigt (Arking *et al.*, 2002) und als Risikofaktor für frühe koronare Arterienkrankungen gilt (Arking *et al.*, 2003). Diese Variante wurde auch mit einem erhöhten Risiko für Brust- und Ovarialkrebs in Verbindung gebracht, sofern sie zusammen mit einer Mutation im BRCA1 Gen auftritt (Wolf *et al.*, 2010). Die Tatsache, dass Keimbahn-Mutationen in BRCA1 das Risiko für Brust- und Ovarialkrebs wesentlich erhöhen, war bereits länger bekannt. Es wurde jedoch davon ausgegangen, dass weitere genetische Faktoren sowie Umweltfaktoren dieses Risiko modifizieren können (Antoniou und Easton, 2006). Eine Mutation im Klothogen könnte demnach zu diesen Faktoren zählen.

Eine weitere Studie mit Ovarialkarzinomen brachte dagegen ein eher unerwartetes Ergebnis. In dieser Studie war bei den untersuchten Proben eine hohe Konzentration an sezerniertem Klotho mit einem erhöhtem Risiko für das Fortschreiten der Krankheit und einer erhöhten Sterberate assoziiert, wobei eine hohe Expression von Klotho trotz antagonistischer Wirkung zu IGF1 mit einer hohen Konzentration dieses Wachstumsfaktors korrelierte (Lu *et al.*, 2008). Warum Klotho in diesem Fall die Tumorprogression fördert statt sie zu unterdrücken und ob vielleicht weitere Faktoren eine Rolle spielen, muss weiter untersucht werden.

Eine in unserer Abteilung durchgeführte Analyse von Genexpressionsdaten einer Vielzahl an Tumorarten bzw. Normalgeweben, stützen wiederum die These von Klotho als Tumorsuppressor, da Klotho in vielen Tumorarten geringer exprimiert war als im untersuchten gesunden Gewebe. Beispiele hierfür sind Lungen-, Magen- und Nierentumore, bei denen die Tumorproben eine deutlich niedrigere Expression von Klotho zeigten als das vergleichbare gesunde Gewebe (siehe Abb. 5).



**Abb. 5: Vergleich der Klothoexpression zwischen Tumor- und Normalgewebe in verschiedenen Tumorarten.** Die Klothoexpression wurde mittels „Microarray“ ermittelt und mit Hilfe von „Box-Whisker-Plots“ dargestellt. Die P-Werte beziehen sich jeweils auf die Signifikanz des Expressionsunterschieds zwischen Tumor- und Normalgewebe.

Um die Rolle von Klotho in der Krebsentstehung zu verstehen, ist die genaue Kenntnis der Wirkmechanismen, wie z.B. der Inhibition der IGF1-Signalkaskade durch Klotho, ein entscheidender Punkt. Daher ist die Aufklärung dieser Mechanismen Gegenstand intensiver Untersuchungen.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Unter den vielen Signaltransduktionswegen, bei denen Klotho eine Rolle spielt, ist der IGF1-Signalweg einer der interessantesten in Bezug auf die onkologische Forschung. Eine entscheidende Rolle von Komponenten dieses Weges in der Tumorentstehung und -progression wurde bereits durch eine Vielzahl an Studien belegt. Der genaue Mechanismus, der zu der von Kurosu *et al.* (2005) beschriebenen Inhibition der IGF1-Signaltransduktion durch Klotho führt, ist bisher ungeklärt. Es wird angenommen, dass die extrazelluläre Domäne der Transmembranform abgespalten und ins Blut abgegeben wird. Dort kann diese als humoraler Faktor auf Zellen mit einem bisher unbekanntem Klothorezeptor wirken. Die Bindung von Klotho an diesen Rezeptor verhindert die Phosphorylierung des IGF1R und hemmt somit den weiteren PI3-Kinase/Akt-Signalweg.

Ursprüngliches Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und nähere Charakterisierung dieses putativen Klothorezeptors sowie die Aufklärung der durch Bindung von Klotho ausgelösten Vorgänge. Als Rezeptoridentifizierungsmethode wurde die Liganden-Affinitätschromatographie sowie das gezielte „Screening“ einer Rezeptorbibliothek gewählt. Um für diese Zwecke und weitere pharmakologische Studien einen molekular definierten und in größeren Mengen verfügbaren Liganden zu haben, sollte zuvor die extrazelluläre Domäne von Klotho mit einem Fc-„Tag“ kloniert, in CHO-Zellen stabil exprimiert, Klotho-Fc aus dem Überstand dieser Klone gereinigt und die Aktivität und Bindungsfähigkeit des gereinigten Proteins nachgewiesen werden.

Da Klotho die Bindung von IGF1 an seinen Rezeptor nicht kompetiert (Kurosu *et al.*, 2005), wurde bisher angenommen, dass die Inhibition des IGF1-Signalweges nicht über eine Bindung an den IGF1R vermittelt wird. Da im Laufe dieser Arbeit jedoch von Wolf *et al.* (2007) eine Bindung der Transmembranform von Klotho an den IGF1R beschrieben wurde, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit eine solche Bindung zu verifizieren und sie näher zu untersuchen bzw. zu klären, ob eine solche Bindung auch an die lösliche extrazelluläre Domäne von Klotho beobachtet werden kann, da diese Domäne allein die Inhibition der IGF1-Signaltransduktion vermittelt.

Darüber hinaus sollten in „Microarray“-Studien mit Klotho-sensitiven Zellen Informationen über Gene und damit über Signalwege gewonnen werden, die durch Klotho beeinflusst werden, um Hinweise auf den gesuchten Klothorezeptor zu erhalten und/oder unter Umständen neue Mechanismen der Klotho-Wirkweise aufzudecken.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Biacore 3000	Biacore
Chromatograph: Äkta Explorer 100	GE Healthcare
Criterion™ Blotter Transferkammer	BioRad
Criterion™ Gelelektrophoresekammer für Proteingele	BioRad
DAWN HELEOS II Streulichtdetektor	Wyatt Technology
FACScan Durchflusszytometer	Becton-Dickinson
γ-Strahlen Detektor (γ-Master)	LKB Wallac
HPLC Agilent 1200 Serie	Agilent
Mini-Sub Cell GT Agarosegelkammer	BioRad
Mithras LB 940 „Multilabel-Reader“	Berthold Technologies
NanoDrop ND-1000	peQLab
Optilab rEX Brechungsindexdetektor	Wyatt Technology
Sonifizierer SONOPLUS	Bandelin
Infinite M200 Plattenlesegerät	Tecan
UV-Detektor	Syngene
UV-Tisch (UV-Transilluminator 2000)	BioRad
VersaDoc™ „Imaging System“	BioRad Western Blot

#### 2.1.2 „Software“

CellQuest™	Becton Dickinson
Lasergene : EditSeq™, MegAlign™, SeqMan™ (DNA und Protein Sequenzanalyse)	DNASTAR
GeneSnap™	Syngene
GraphPad Prism 5	GraphPad
MetaCore™	GeneGo
MicroWin 2000™	Berthold Technologies
Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft
NanoDrop ND-1000 3.1.2	peQLab

---

Quantity One	BioRad
i-control 1.5	Tecan
Astra V Software	Wyatt Technologies

### **2.1.3 Chemikalien und Reagenzien**

Agarose	Invitrogen
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem
Agar-Agar	BD
AgNO <sub>3</sub>	Merck
Bovines Serum Albumin (BSA), Albumin Fraktion V	AppliChem
BS(PEG) <sub>9</sub>	Thermo Scientific
Chaps	Merck
Zitronensäure-Monohydrat	Merck
Coomassie Brilliantblau R-250	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Dinatriumtetraborat	Merck
DMP (Dimethylpimelimidat x 2 HCl)	Thermo Scientific
EDTA	Merck
EGTA	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethanolamin	Merck
Ethidiumbromid	AppliChem
EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin	Thermo Scientific
Formaldehydlösung (37 %)	Merck
Glycerol	Merck
Glycin	Merck
Guanidin	Merck
HEPES	Sigma-Aldrich
Humanes Serum Albumin (HSA)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck
Kanamycinsulfat	AppliChem

---

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck
Magermilchpulver	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck
4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronidhydrat	Sigma-Aldrich
Natriumcitrat	Merck
NaCl	Merck
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Merck
$\text{NaHCO}_3$	Merck
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
NaOH	Merck
$\text{NaN}_3$	Merck
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (wasserfrei)	Merck
Nonidet P-40	Roche
Phenolrot	Merck
Phosphatase Inhibitor Set II	Calbiochem
Ponceau S	Merck
Protease Inhibitor Set III	Calbiochem
Protein A/G PLUS Agarose	Santa Cruz Biotechnology
Salzsäure	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Sucrose	Merck
Sulfo-EGS	Thermo Scientific
Sytox Green	Invitrogen
Tris	Merck
Tris-HCl	Merck
Triton X-100	Merck
Tween 20	Merck
Zeocin	Invitrogen

DNA-Standards und Probenpuffer:

6x „Loading Dye Solution“	Fermentas
„GeneRuler 1kb DNA Ladder“	Fermentas
„1 kb Plus DNA Ladder“	Invitrogen

Protein-Standards und Probenpuffer:

20x „Reducing agent“ (reduzierendes Agenz)	BioRad
4x „SDS Sample Buffer“	BioRad
„Magic Mark XP Western Standard“	Invitrogen
„Precision Plus Protein <sup>TM</sup> Standard, unstained“	BioRad
„SeeBlue Plus2 Prestained Proteinstandard“	Invitrogen

Detektionsreagenzien:

Coomassie Plus Proteinreagenz	Pierce
FAST <sup>TM</sup> BCIP/NBT	Sigma-Aldrich
„Lumi Light Western Blotting Substrate“	Roche
„Lumi Light PLUS Western Blotting Substrate“	Roche
„Precision StrepTactin-AP Conjugate“	BioRad
„SureBlue <sup>TM</sup> TMB Microwell Peroxidase Substrate“	KPL

**2.1.4 Verbrauchsmaterialien**

„Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array“	Affymetrix
„Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Array“	Affymetrix
Amicon Ultra-15 Zentrifugen Filtereinheit (Ultra Cell 50k, regenerierte Cellulose 50000 MWCO)	Millipore
Criterion <sup>TM</sup> XT „Precast“ Gele:	BioRad
- 4-12 % BisTris, 18 oder 26 Kammern	
- 3-8 % Tris-Acetat, 12 + 2 Kammern	
Criterion <sup>TM</sup> „Blotting Sandwiches“ (0,2 µm Nitrocellulose mit Filterpapieren)	BioRad
HighTrap rProtein A HP Säule	GE Healthcare
HiLoad Superdex Säule (16/60 cm, 200 µg)	GE Healthcare
96-Kavitätenplatten aus Polyethylen	Greiner
96-Kavitätenplatte für ELISA	Costar
24-Kavitätenplatten Nunclon <sup>TM</sup> „Surface“	NUNC
6-Kavitäten-Zellkulturplatten Nunclon <sup>TM</sup> „Surface“	NUNC
1 ml Kryoröhrchen	NUNC
0,22 µM Millipore-GV Spritzenfilter	Millipore

Petrischalen für die Mikrobiologie	VWR
QIAshredder	Qiagen
5 ml Rundboden-Röhrchen aus Polypropylen (für die Durchflusszytometrie)	BD Falcon
4 ml Röhrchen für $\gamma$ -Zähler (75 x 11,5 mm, Polypropylen)	Sarstedt
„Sensor Chip“ CM5	Biacore
Superdex 200 GL Säule	GE Healthcare
TripleFlasks	NUNC
VacuCap 60 Bottle-top Filtereinheit (0,2 $\mu$ m Supor Membran)	Pall
VacuCap 90 PF Filtereinheit (w / 0,8 / 0,2 $\mu$ m Supor Membran)	Pall
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen (T-75) „Nunclon™ Surface“	NUNC
6 cm-Zellkulturschalen „Nunclon™ Surface“	NUNC
10 cm-Zellkulturschalen „Nunclon™ Surface“	NUNC
40 $\mu$ m Nylon Zellsieb	BD Falcon

### 2.1.5 „Kits“

„Amine Coupling Kit“	Biacore
„JETquick Gel Extraction Spin Kit“	Genomed
„Lynx Rapid RPE Antibody conjugation Kit“	AbD seroTec
„Plasmid HiSpeed Purification Kit“	Qiagen
„ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kits“	Calbiochem
„RNeasy Mini Kit“	Qiagen
„Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System“	Promega

### 2.1.6 Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit MilliQ-Wasser aus der hauseigenen Anlage von Merck angesetzt und später weiter verdünnt. Die Lagerung erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur.

---

<u>10 mM Acetatpuffer (pH 5,5):</u>	von Biacore
<u>Blockierlösung (Western Blot):</u>	5 % (m/V) BSA 0,01 % (m/V) NaN <sub>3</sub> in 1x TBS + Spatelspitze Phenolrot pH 7,5 (Lagerung bei 4 °C)
<u>Chaps-Lysepuffer:</u>	10 mM Tris 1mM MgCl <sub>2</sub> 1mM EGTA 0,5 % Chaps 10 % Glycerin → pH auf 7,5 mit HCl einstellen (Lagerung bei 4 °C)
<u>Citratpuffer:</u>	0,1 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, pH 5,5 0,2 M NaCl 0,01 % Tween 20
<u>Coomassie Färbelösung:</u>	0,25 % (m/V) Coomassie Brilliant Blue R-250 10 % (V/V) Essigsäure 12,5 % (V/V) Isopropanol
<u>Coomassie Entfärbelösung:</u>	10 % (V/V) Essigsäure 12,5 % (V/V) Isopropanol
<u>Coomassie „Instant“ Färbelösung:</u>	Instant Blue von Expedeon Protein Solutions (Lagerung bei 4 °C)
<u>Fc-ELISA 0,1 M Carbonat-Puffer:</u>	3,39 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> und 5,7 g NaHCO <sub>3</sub> → ad 1 l MilliQ-Wasser pH 9,5 -9,7
<u>Fc-ELISA Blockierpuffer:</u>	1x D-PBS mit 2 % (V/V) BSA und 0,05 % (V/V) Tween 20 als 10x Stammlösung aliquotiert (Lagerung bei -20 °C)
<u>Fc-ELISA Waschpuffer (PBS-T):</u>	1x D-PBS mit 0,05 % (V/V) Tween 20

---

<u>Fc-ELISA Probenpuffer:</u>	1x D-PBS mit 1 % Milchpulver (frisch ansetzen)
<u>10 x HBS-N Puffer:</u>	von Biacore
<u>10 x HBS-EP+ Puffer:</u>	von Biacore
<u>HGNT-Lysepuffer:</u>	20 mM HEPES, pH 7,4 150 mM NaCl 10 % (V/V) Glycerol 1 % (V/V) Triton X-100 2 mM EDTA (Lagerung bei 4 °C)
<u>Homogenisierungspuffer:</u>	5 mM Tris-HCl, pH 7,4 300 mM Sucrose Proteaseinhibitor Cocktail (1:100 eingesetzt)
<u>20x Laufpuffer für SDS-PAGE:</u>	20x MOPS-Puffer von BioRad 20x Tricine Puffer von BioRad
<u>LB-Agar:</u>	LB-Medium mit 1,5 % (m/V) Agar-Agar autoklaviert (Lagerung bei 4°C)
<u>LB-Medium:</u>	20 g LB-Medium von Sigma-Aldrich in ein 1 l MilliQ-H <sub>2</sub> O autoklaviert
<u>10x PBS:</u>	84 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 16 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 M NaCl (pH nicht einstellen!) sterilfiltriert durch VacuCap 60 PF Filtereinheit
<u>Ponceau S Färbelösung:</u>	0,25 % (m/V) Ponceau S 10 % (V/V) Essigsäure

---

<u>Puffer A für Proteinreinigung:</u>	6,5 mM Zitronensäure-Monohydrat 43,5 mM Di-Natriumhydrogenphosphat 0,1 M Ammoniumsulfat pH 7,0 sterilfiltriert durch VacuCap 60 PF Filtereinheit
<u>Puffer B für Proteinreinigung:</u>	45 mM Zitronensäure-Monohydrat 43,5 mM Di-Natriumhydrogenphosphat 0,1 M Ammoniumsulfat pH 3,0 sterilfiltriert durch VacuCap 60 PF Filtereinheit
<u>Puffer für Gelfiltration:</u>	1x PBS mit 20 % (V/V) Glycerol sterilfiltriert durch VacuCap 60 PF Filtereinheit
<u>Reaktionspuffer für Glucuronidaseaktivitätsmessung:</u>	0,5 mM 4-Methylumbelliferyl $\beta$ -D-glucuronid- hydrat 0,1 M Natriumcitrat (pH 5,5) 0,05 M NaCl 0,01 % (V/V) Tween 20
<u>RIPA-Lysepuffer (4x) :</u>	200 mM Tris, pH 7,4 600 mM NaCl 4 % (V/V) Nonidet P-40 2 % (m/V) SDS 4 mM EGTA (Lagerung bei RT) vor Gebrauch 1:4 mit MilliQ-Wasser verdünnt
<u>SDS-Probenpuffer:</u>	4/5 4x „SDS Sample Buffer“ von BioRad 1/5 20x „Reducing agent“ von BioRad (immer frisch ansetzen)
<u>Silberfärbungslösungen:</u>	
Fixierlösung:	30 % (V/V) Ethanol 10 % (V/V) Essigsäure (frisch angesetzt)
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Stammlösung: (Sensibilisierungslösung)	1 % (m/V) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> vor Gebrauch 1:50 mit MilliQ-Wasser verdünnt

---

Silbernitratlösung:	10 mM AgNO <sub>3</sub>
Entwickler:	566 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,0185 % (V/V) Formaldehyd 0,001 % (m/V) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (frisch angesetzt)
5x Stopplösung:	516 mM Tris 3,2 % (V/V) Eisessig vor Gebrauch 1:5 mit MilliQ-Wasser verdünnt
<u>SOC-Medium:</u>	von Invitrogen
<u>Solubilisierungspuffer:</u>	20 mM Tris, pH 7,4 0,4 M NaCl 1 mM EDTA 10 % Glycerol 0,5 % Chaps Proteaseinhibitor Cocktail (1:100 eingesetzt)
<u>50x TAE-Puffer:</u>	von Invitrogen
<u>20x TBS:</u>	1 M Tris 3 M NaCl pH 7,5 eingestellt mit HCl
<u>TBS-T:</u>	1x TBS mit 0,05 % (V/V) Tween 20
<u>10x Transferpuffer (Western Blot):</u>	184 mM Tris 1,6 M Glycin pH 8,0 (pH nicht einstellen!)

### **2.1.7 Medien und Lösungen für die Zellkultur**

DMSO	AppliChem
D-PBS „Dulbecco`s phosphate buffered saline“ (CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> )	Invitrogen
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH
FuGENE 6 Transfektionsreagenz	Roche

G418 Sulfat	Merck
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen
Lipofectamin 2000 Transfektionreagenz	Invitrogen
MTX	Sigma
Natriumpyruvat MEM (100 mM)	Invitrogen
OptiMEM I-Medium	Invitrogen
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen
PolyFect Transfektionsreagenz	Qiagen
Trypsin-EDTA (1x)	Invitrogen

Zellkulturmedien (Invitrogen):

Medium	Zusätze	Zelllinie
CHO-S-SFM II-Medium	-	CHO
D-MEM (+ 4500mg/l Glucose, + L-Glutamine, - Pyruvat)	-	A431, AR42J, H4IIE, HEK 293T, HeLa, HepG2, HT29, L6, McA-Rh7777, MCF7, PC3, Rat1, SKNSH,
D-MEM (+ 4500mg/l Glucose, + L-Glutamine, - Pyruvat)	2 mM L-Glutamin	ARL6
D-MEM (+ 4500mg/l Glucose, + L-Glutamine, - Pyruvat)	1 mg/ml G418, 200 nM MTX	NIH-3T3-IGF1R
MEM alpha (+ Ribonukleinsäuren, + Desoxyribonukleinsäuren)	-	CHO
RPMI 1640 (- L-Glutamin)	2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat	NCI-H322

Allen Medien wurde 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt (Ausnahmen: CHO-S-SFM II-Medium zur Gewinnung von Zellkulturüberständen für die Proteinreinigung und Hungermedium bei Stimulationen bzw. Behandlungen von Zellen).

### 2.1.8 Plasmide

<b>pCMV6-XL4-Klotho</b>	Expressionsplasmid für Säugetierzellen, codiert für die Transmembranform von humanem Klotho (OriGene)
<b>pCR-Blunt II-TOPO</b>	Plasmid für die TOPO <sup>®</sup> -Klonierung (Invitrogen)

---

<b>pIg plus</b>	Expressionsplasmid für Säugetierzellen für die Expression von Fusionsproteinen mit C-terminalem Fc-„Tag“ (Merck Serono)
<b>pIg plus-Klotho</b>	Expressionsplasmid für Säugetierzellen, codiert für die extrazelluläre Domäne (AS 1-982) von humanem Klotho mit C-terminalem Fc-„Tag“ (Friederike Krop)
<b>pDONR 221</b>	„Entry“-Vektor für die Gateway <sup>®</sup> -Klonierung (Invitrogen)
<b>pcDNA DEST40</b>	Expressionsplasmid für Säugetierzellen, „Destination“-Vektor für die Gateway <sup>®</sup> -Klonierung von Fusionsproteinen mit C-terminalem V5- und His- „Tag“ (Invitrogen)
<b>pcDNA DEST40-Klotho</b>	Expressionsplasmid für Säugetierzellen, codiert für die Transmembranform von humanem Klotho mit C-terminalem V5- und His- „Tag“ (Friederike Krop)
<b>pDEST27</b>	Expressionsplasmid für Säugetierzellen, „Destination“-Vektor für die Gateway <sup>®</sup> -Klonierung von Fusionsproteinen mit C-terminalem GST-„Tag“ (Invitrogen)
<b>pDEST27- hKL1/-hKL2</b>	Expressionsplasmid für Säugetierzellen, codiert für die hKL1 (AS 57-506) bzw. die hKL2 (AS 515-953) Domäne von humanem Klotho mit C-terminalem GST-„Tag“ (Friederike Krop)
<b>pDEST15</b>	Expressionsplasmid für <i>E. coli</i> , „Destination“-Vektor für die Gateway <sup>®</sup> -Klonierung von Fusionsproteinen mit C-terminalem GST-„Tag“ (Invitrogen)
<b>pDEST15- hKL1/-hKL2</b>	Expressionsplasmid für <i>E. coli</i> , codiert für die hKL1 (AS 57-506) bzw. die hKL2 (AS 515-953) Domäne von humanem Klotho mit C-terminalem GST-„Tag“ (Friederike Krop)
<b>pGFP<sup>2</sup>-N1 / pGFP<sup>2</sup>-N3</b>	Expressionsplasmid für Säugetierzellen für die Expression von Fusionsproteinen mit C-terminalem GFP-„Tag“ (BioSignal Packard)
<b>pGFP<sup>2</sup>-N3-Klotho</b>	Expressionsplasmid für Säugetierzellen, codiert für die Transmembranform von humanem Klotho mit C-terminalem GFP-„Tag“ (Friederike Krop)
<b>pCIneoDest-IGF1R</b>	Expressionsplasmid für Säugetierzellen, codiert für den IGF1-Rezeptor (Merck)
<b>pGFP<sup>2</sup>-N1-EGFR</b>	Expressionsplasmid für Säugetierzellen, codiert für den humanen EGF-Rezeptor mit C-terminalem GFP-„Tag“ (Denis Irmer)

### 2.1.9 Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	Anmerkungen
Klotho-GFP Klonierung		
Klotho-GFP forward-Primer	GGGG AGA TCT ACC ATG CCC GCC AGC GCC CC	Bgl II Schnittstelle Kozak-Sequenz
Klotho-GFP reverse-Primer	GGGG GAT ATC TTT GTA ACT TCT TCT GCC	EcoR V Schnittstelle
Klotho-Fc Klonierung		
Klotho-Fc forward-Primer	G CTC GAG AAA ATA ACC ATG CCC GCC AGC GCC CCG CCG	XhoI Schnittstelle Kozak-Sequenz Füllnucleotide
Klotho-Fc reverse-Primer	GG GG ATC CTC TAA AGA CTT TCG GGT GTG	BamHI Schnittstelle Füllnucleotide
Klotho-V5 Klonierung		
Klotho-V5 forward-Primer	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG CCC GCC AGC GCC CCG CCG CG	attB1 Sequenz Shine-Dalgarno und Kozak Sequenz Klotho Sequenz
Klotho-V5 reverse-Primer	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTT GTA ACT TCT TCT GCC	attB1 Sequenz Klotho Sequenz
hKL1-GST Klonierung		
hKL1 forward-Primer	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GCC CCC GAG GCC GCG GGC CTC	attB1 Sequenz Klotho Sequenz (bp 148 - 168)
hKL1 reverse-Primer	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTA AGG TAA AGG AGG GAA GCC	attB1 Sequenz Klotho Sequenz (bp 1513 - 1530) STOP-Codon
hKL2-GST Klonierung		
hKL2 forward-Primer	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC CCT GAA AAT CAG CCC CTA GAA G	attB1 Sequenz Klotho Sequenz (bp 1528 - 1549)
hKL2 reverse-Primer	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTA TTC CAG AGT TTC TGG GCC CGG	attB1 Sequenz Klotho Sequenz (bp 2860 - 2880) STOP-Codon
Primer für Colony-PCR		
Klotho 433 forward-Primer	ACTCACTACCGCTTCTCCA (Start bei bp 433)	für Klonierung von Klotho-V5 in pcDNA DEST40, Klotho- GFP in pGFP <sup>2</sup> -N3 und hKL1- GST in pDEST27
Klotho 1178 reverse-Primer	GAAAGCAGTTGCCTCAGGT (Start bei bp 1178)	
Klotho 1347 forward-Primer	GGTGGATGTCATCGGGTAT (Start bei 1347)	für Klonierung von Klotho-Fc in pIlg plus
Klotho 2222 reverse-Primer	TCTTTGTCCTTTTGGGAGA (Start bei 2222)	
Klotho 1740 forward-Primer	CCAGATCGCTTTACTCCAG (Start bei 1740)	für Klonierung von hKL2 in pDEST27
Klotho 2726 reverse-Primer	TAAGCAAAGTATCCGCAA (Start bei 2726)	

Primer	Sequenz (5' → 3')	Anmerkungen
Primer für Sequenzierung		
Klotho 683 forward-Primer	GCGGTCAGGTCAAGTACTG (Start bei 683)	für Klonierung von Klotho-Fc in plg plus
Klotho 988 forward-Primer	CCCGTATTTATTGATGGTG (Start bei 988)	
Klotho 2611 forward-Primer	ATATCCAACGGAATCGATG (Start bei 2611)	
Klotho 269 reverse-Primer	GTGGTGGGTGAACGTATCCC (Start bei 269)	
Klotho 2907 forward-Primer	GTCCAGAAGAATTCACCGTG (Start bei bp 2907)	für Klonierung von Klotho-GFP in pGFP <sup>2</sup> -N3 / Klotho-V5 in pcDNA DEST40
Klotho 269 reverse-Primer	GTGGTGGGTGAACGTATCCC (Start bei bp 269)	
Klotho 1347 forward-Primer	GGTGGATGTCATCGGGTAT (Start bei 1347)	für Klonierung von hKL1 in pDEST27 / pDEST15
Klotho 230 reverse-Primer	TCGGTCTGGTAGGCGG (Start bei 230)	
Klotho 2611 forward-Primer	ATATCCAACGGAATCGATG (Start bei 2611)	für Klonierung von hKL2 in pDEST27 / pDEST15
Klotho 1884 reverse-Primer	CACTGGGGTGATGTTGACA (Start bei 1884)	
Sonstige Primer (Gateway Klonierung)		
attB 1-3 Primer attB 2-3 Primer	siehe Invitrogen	für BP Reaktion
M13 forward Primer M13 reverse Primer	siehe Invitrogen	für Sequenzierung nach BP-Reaktion

### 2.1.10 Enzyme und Puffer

Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
10x Antarctic Phosphatase Reaktionpuffer	New England Biolabs
β-Glucuronidase (aus Rinderleber)	Sigma-Aldrich
BP-Clonase Enzym Mix	Invitrogen
5x BP-Clonase Reaktionspuffer	Invitrogen
dNTP Mix	Invitrogen
LR-Clonase Enzym Mix	Invitrogen
5x LR-Clonase Reaktionspuffer	Invitrogen
Proteinase K	Invitrogen
10 x Pwo-DNA-Polymerase Reaktionspuffer	peQLab

Pwo-DNA-Polymerase	peQLab
„Salt Solution“ für TOPO-Klonierung	Invitrogen
Sequenzier-„Premix“ (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100)	Amersham Bioscience
5x Sequenzierpuffer (BigDye Terminator v1.1, v3.1)	Amersham Bioscience
T4-Ligase	Invitrogen
10x T4-Ligase Puffer	Invitrogen
Taq-DNA-Polymerase	peQLab
10 x Taq-DNA-Polymerase Reaktionspuffer	peQLab

### Restriktionsenzyme und verwendete Reaktionspuffer:

BSA für die Restriktion New England Biolabs

Restriktionsenzym	verwendeter Reaktionspuffer	Geschnittene DNA (Klonierung)
BamHI	Puffer 2	pCR-Blunt II-TOPO-Klotho / plg plus (Klotho-Fc Klonierung)
XhoI	Puffer 2	pCR-Blunt II-TOPO-Klotho / plg plus (Klotho-Fc Klonierung)
Bgl II	Puffer 3	pGFP <sup>2</sup> -N3 / Klotho-PCR-Produkt (Klotho-GFP Klonierung)
EcoRV	Puffer 3	pGFP <sup>2</sup> -N3 / Klotho-PCR-Produkt (Klotho-GFP Klonierung)
HindIII	Puffer 2	Kontrollverdau bei Klotho-Fc und Klotho-GFP Klonierung

Alle Restriktionsenzyme und Puffer wurden bei New England Biolabs bestellt.

### **2.1.11 Rekombinante Proteine**

humaner EGF	R&D Systems
humanes Fc	Merck Serono (Boston)
<sup>125</sup> Iod-markiertes humanes Fc	Biotrend
humaner IGF1	R&D Systems
humaner IGF1R (extrazelluläre Domäne)	R&D Systems
humanes Klotho-His <sub>6</sub>	R&D Systems
humanes Klotho-Fc (extrazelluläre Domäne)	selbst aufgereinigt
<sup>125</sup> Iod-markiertes Klotho-Fc (extrazelluläre Domäne)	Biotrend

### 2.1.12 Antikörper

#### Primärantikörper:

Antigen	Verdünnung	Quelle	Kopplung	Katalog-Nr.	Anbieter
pAkt (Ser473)	1:1000	Kaninchen	HRP	9271	Cell Signaling
Bub1	1:1000	Kaninchen	HRP	S1756	Epitomics
Chk1	1:200	Kaninchen	HRP	sc-7898	Santa Cruz
EGFR	1:250 (WB) 5 µg/ml (IP)	Kaninchen	HRP	sc-03	Santa Cruz
Fen1	1:1000	Kaninchen	HRP	2746	Cell Signaling
IGF1Rβ	1:1000	Kaninchen	HRP	3027	Cell Signaling
IGF1Rβ	5 µg/ml (IP)	Kaninchen	HRP	MAB391	R&D Systems
pIGF1Rβ (Tyr1131)/pIRβ (Tyr1146)	1:1000	Kaninchen	HRP	3021	Cell Signaling
pIGF1Rβ (Tyr1131)/pIRβ (Tyr1146)	1:1000	Kaninchen	HRP	I7661-21B	US Biological
pIGF1Rβ (Tyr1135/1136)/ pIRβ (Tyr1150/1151)	1:1000	Kaninchen	HRP	3024	Cell Signaling
IGF1R	33 ng/µl	Maus	RPE	MCA2344PET	AbDseroTec
IGF1R	10 µg/ml	Maus	-	-	Merck Serono
Human IgG (Fc- spezifisch)	1:3000- 1:4000	Ziege	HRP	A0170	Sigma-Aldrich
Human IgG (Fc <sub>γ</sub> -spezifisch)	1:1000	Ziege	AP	109-055-098	Jackson ImmunoResearch
Human IgG (H+L-Ketten)	1:893 (2 µg/ml)	Ziege	-	109-005-088	Jackson ImmunoResearch
Human IgG (Fc <sub>γ</sub> -spezifisch)	1:50000	Ziege	HRP	109-036-098	Jackson ImmunoResearch
p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	1:1000	Kaninchen	HRP	9101	Cell Signaling
Rad1	1:1000	Kaninchen	HRP	S0771	Epitomics
Spc25	1:1000	Kaninchen	HRP	S1215	Epitomics
V5	1:1000 (WB) 3 µg/ml (IP)	Maus	HRP	R960-25	Invitrogen

(HRP = „horseradish peroxidase“, AP = alkalische Phosphatase)

#### Sekundärantikörper:

Antigen	Verdünnung	Quelle	Kopplung	Katalog-Nr.	Anbieter
Maus IgG	1:2000	Schaf	HRP	RPN4201	GE Healthcare
Kaninchen IgG	1:2000	Ziege	HRP	7074	Cell Signaling Technologies
Biotin	1:10000	Maus	HRP	A0185	Sigma-Aldrich

**2.1.13 Bakterienstämme**chemisch kompetente *E. coli*, One Shot TOP10

Invitrogen

chemisch kompetente *E. coli* DH10B

Invitrogen

**2.1.14 Zelllinien**

Zelllinie	Herkunft
Humane Tumorzelllinien	
A431	Vulva
HEK 293T	Niere
HeLa	Uterus
HepG2	Leber
HT29	Colon
MCF7	Brust
NCI-H322	Lunge
PC3	Proatata
SK-N-SH	Nervensystem
Rattentumorzelllinien	
AR42J	Pankreas
ARL6	Leber
H4IIE	Leber
L6	Skelettmuskel
McA-Rh7777	Leber
Rat1	Bindegewebe (Fibroblasten)
Maustumorzelllinie	
NIH-3T3-IGF1R	Bindegewebe (Fibroblasten)
Hamstertumorzelllinie	
CHO	Ovar

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Transformation von *Escherichia coli* (*E. coli*) mit Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mittels Hitzeschock-Methode in kompetente *E. coli* Zellen eingebracht. Dazu wurden chemisch kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und 15-60 µl Zellsuspension (60 µl bei Transformationen im Rahmen von Klonierungen, ansonsten 15-30 µl) vorsichtig mit ca. 50-250 ng Plasmid-DNA gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis folgte der Hitzeschock für 60 s bei 42 °C. Die Zellen wurden dann 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Zellen 30-40 min bei 37 °C und 300 Upm geschüttelt und anschließend 50-100 µl des Ansatzes auf LB-Platten, die das geeignete Antibiotikum enthielten, ausplattiert. Die hier verwendeten Plasmide enthielten alle eine Ampicillin-, Kanamycin- oder Zeocin-Resistenz. Die eingesetzten Antibiotikakonzentrationen betragen 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin bzw. 25 µg/ml Zeocin. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.1.2 Präparation bakterieller Plasmid-DNA

Als Ausgangsmaterial für die Präparation bakterieller Plasmid-DNA diente eine Übernachtskultur, die am Abend zuvor mit einer isolierten Bakterienkolonie von einer LB-Agarplatte oder mit 10 µl aus einer Glycerolkultur angeimpft wurde und über Nacht (16-18 h) bei 37 °C und 250 Upm in LB-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum gewachsen war.

Die Präparation großer Plasmidmengen wurde mit Hilfe des „Plasmid Purification HiSpeed Maxi Kits“ der Firma Qiagen gemäß dem Protokoll des Herstellers mit 250 ml Übernachtskultur durchgeführt.

Für kleinere Mengen Plasmid-DNA wurde das „Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System“ der Firma Promega verwendet. Auch hier erfolgte die Durchführung nach Protokoll des Herstellers, wobei 5 ml Übernachtskultur als Ausgangsmaterial dienten.

Die DNA wurde am Ende jeweils in einem geeigneten Volumen MilliQ-Wasser aufgenommen (in 50 µl bei Plasmid-Minipräparationen und in 500-1000 µl bei Plasmid-Maxipräparationen).

### **2.2.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration und der DNA-Reinheit**

Die Konzentration präparierter Plasmid-DNA wurde mit dem Spectrophotometer „NanoDrop ND-1000“ und der zugehörigen Software von peQLab durch Messung der Optischen Dichte (= Extinktion) der DNA-Lösung bei 260 nm bestimmt. Zusätzlich wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen, einer Wellenlänge, bei der Proteinverunreinigungen sichtbar werden. Der Quotient der Extinktionswerte bei 260 nm und 280 nm ( $OD_{260nm} / OD_{280nm}$ ) wird als Maß für den Reinheitsgrad einer DNA-Lösung verwendet. Liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0 kann die Lösung als rein bezeichnet werden.

### **2.2.1.4 Einfrieren von Bakterienzellen**

Um Bakterienklone über einen längeren Zeitraum (Monate bis Jahre) zu lagern, wurden diese in Kryoröhrchen eingefroren. Dazu wurden 200 µl einer am Abend zuvor angeimpften Übernachtskultur mit 200 µl 80 %igem Glycerol versetzt und bei -80 °C eingefroren und gelagert (= Glycerolkultur).

Bei Bedarf wurde eine kleine Menge (~ 10 µl), wenn möglich gefrorene Glycerolkultur abgenommen, eine Übernachtskultur damit angeimpft und das Kryoröhrchen möglichst schnell wieder auf -80 °C gestellt.

### **2.2.1.5 Klassische Klonierung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Klotho-GFP, ein Protein, das aus der vollständigen Sequenz des humanen Klothoproteins und einem C-terminalen GFP-„Tag“ besteht, mittels klassischer Klonierung hergestellt.

#### **2.2.1.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR = „polymerase chain reaction“)**

Die Polymerasekettenreaktion dient der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Durch einen Denaturierungsschritt wird die doppelsträngige Ausgangs-DNA

(= „Template“-DNA) in zwei Einzelstränge gespalten. Diese dienen dann als Matrize für spezifische Oligonukleotidprimer. Durch Absenken der Reaktionstemperatur wird eine Anlagerung der Primer an die Einzelstränge ermöglicht. Mit Hilfe der hitzebeständigen Taq-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* wird dann der zum vorliegenden Einzelstrang komplementäre Gegenstrang gebildet, wodurch ein neuer Doppelstrang entsteht. Durch sich wiederholende Zyklen der DNA-Denaturierung, Hybridisierung der Primer und DNA-Synthese (Elongation) wird der gewünschte Genbereich amplifiziert, wobei die DNA-Menge im Laufe der Zyklen exponentiell ansteigt.

PCR-Ansatz:

1 µl	DNA (~ 400 ng)
5 µl	10 x Reaktionspuffer für Pwo-DNA-Polymerase
1 µl	10 µM „reverse“-Primer
1 µl	10 µM „forward“-Primer
1 µl	10 mM dNTP Mix
5 µl	DMSO
33,5 µl	MilliQ-H <sub>2</sub> O
2,5 µl	Pwo Polymerase

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter 2.1.9 aufgelistet.

Temperatur- und Zeitschema für die PCR:

Temperatur	Zeit	Zyklen	
94 °C	2 min	1	Initiale Denaturierung
94 °C	30 s	5	Denaturierung
54 °C	30 s		Hybridisierung der Primer
72 °C	2 min		Elongation
94 °C	30 s	25	Denaturierung
60 °C	30 s		Hybridisierung der Primer
72 °C	3 min		Elongation
72 °C	7-15 min	1	Finale Elongation
4 °C	∞		

Eine Variante der PCR ist die „Colony“-PCR. Mit dieser kann ohne vorherige Präparation der Plasmid-DNA nach einer Ligation (siehe 2.2.1.5.6) und folgender Transformation (siehe 2.2.1.1) überprüft werden, ob ein Insert bei der Ligation in den Vektor eingebaut wurde oder nicht. Hierbei wird ein PCR-Ansatz mit Primern gemacht, die eine ausgewählte Sequenz des Inserts amplifizieren und bei dem statt präparierter

DNA direkt ein Teil der Bakterienkolonie eingesetzt wird. Ist das amplifizierte Genfragment in der folgenden Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.5.4) zu sehen, fand bei der Ligation eine Insertion des gewünschten Genfragments statt.

PCR-Ansatz für die „Colony“-PCR:

5 µl 10 x Reaktionspuffer für Taq-DNA-Polymerase  
 1 µl 10 µM „reverse“-Primer  
 1 µl 10 µM „forward“-Primer  
 1 µl 10 mM dNTP Mix  
 41 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O  
 1 µl Taq-Polymerase  
 + ein Teil einer gepickten Bakterienkolonie

Temperatur- und Zeitschema für die „Colony“-PCR:

Temperatur	Zeit	Zyklen	
95 °C	5 min	1	Initiale Denaturierung
94 °C	1 min	30	Denaturierung
55 °C	1 min		Hybridisierung der Primer
72 °C	1 min		Elongation
72 °C	7 min		1
4 °C	∞		

### 2.2.1.5.2 Enzymatische Restriktion von DNA

Die enzymatische Restriktion (= Verdau) von DNA wurde zum einen verwendet, um bei Vektor und Insert passende Enden für eine spätere Ligation zu erzeugen (präparativer Verdau) und zum anderen, um die gewünschte Insertion eines DNA-Fragments nachzuweisen (Kontrollverdau). Letzteres ist möglich, da durch das Einfügen eines Inserts in einen Vektor beim Verdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym ein spezifisches Schnittmuster entsteht, dass sich von dem des Vektors ohne Insert unterscheidet.

Restriktionsendonukleasen erkennen und schneiden spezifische Basenabfolgen innerhalb der DNA. Die für sie optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen variieren dabei zwischen den verschiedenen Restriktionsenzymen. Für den Verdau wurde jeweils der vom Hersteller (NEB) empfohlene Puffer verwendet und bei einem Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen der für eine gemeinsame Reaktion am besten geeignete Puffer ausgewählt (siehe 2.1.10). Die Restriktion erfolgte bei 37 °C.

Die Ansätze für einen präparativen - bzw. einen Kontrollverdau sahen wie folgt aus:

Präparativer Verdau	Kontrollverdau
x µl Vektor- (3-4 µg) oder Insert-DNA (0,5-1 µg)	3 µl DNA (300-600 ng)
5 µl Reaktionspuffer	1 µl Reaktionspuffer
Optional: 0,5 µl BSA (wenn für entsprechendes Restriktionsenzym vom Hersteller empfohlen)	-
3 µl Restriktionsenzym I	0,5 µl Restriktionsenzym
3 µl Restriktionsenzym II	-
→ ad 50 µl H <sub>2</sub> O	5,5 µl H <sub>2</sub> O
Inkubation für 2 h bei 37 °C	Inkubation für 1-2 h bei 37 °C

### 2.2.1.5.3 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Durch Restriktionsenzyme geschnittene Plasmid-DNA (Vektor) wurde enzymatisch am 5`-Ende dephosphoryliert, um bei der späteren Ligation mit einem Insert (siehe 2.2.1.5.6) eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. Die Dephosphorylierung erfolgte durch die Antarctic Phosphatase, die Phosphatgruppen am 5`-Ende von Nukleinsäuresträngen entfernt und dadurch ein 5`-Hydroxyende an beiden Enden des Vektors erzeugt, wodurch eine Selbstligation unmöglich wird.

In der Reaktion wurde der komplette 50 µl Ansatz aus dem Restriktionverdau (3-4 µg geschnittene Vektor-DNA) eingesetzt und mit 6 µl 10x Antarctic Phosphatase Reaktionspuffer, 3 µl MilliQ-Wasser und 1 µl (= 5 U) Antarctic Phosphatase versetzt. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 15 min. Die Phosphatase wurde danach direkt durch 5-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

### 2.2.1.5.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung verschiedener Nukleinsäure-Moleküle im elektrischen Feld nach ihrer Größe. Die Wanderung erfolgt auf Grund der negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren von der Kathode zur Anode, wobei kleine DNA-Moleküle schneller durch die Agarosematrix wandern können als große Moleküle.

Mit Hilfe dieser Methode wurden PCR-Produkte auf ihre Reinheit und korrekte Länge hin überprüft und Proben aus dem Restriktionsverdau aufgetrennt, um den Erfolg des

Verdau zu kontrollieren oder darüber hinaus die DNA aus dem Gel zu reinigen (siehe 2.2.1.5.5). Zur Trennung wurden 0,8 oder 1,0 %ige Agarosegele verwendet. Die Herstellung des Gels erfolgte, indem die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE Puffer in der Mikrowelle durch Aufkochen gelöst und die Agaroselösung in eine Gelkammer gegossen wurde. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,01 %), eines in die DNA interkalierenden Farbstoffs, zu 50 ml Agaroselösung konnte die DNA im Gel später durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Laufkammer überführt und die Geltaschen mit Größenmarker bzw. den Proben, die zuvor mit 6x Ladepuffer versetzt wurden, beladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 20-40 min. Durch Anregung mit UV-Licht wurde das Ethidiumbromid in der DNA zur Fluoreszenz angeregt und die DNA sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte durch Aufnahme der Gele mit Hilfe eines UV-Dokumentationsgeräts von Syngene und des Programms GeneSnap<sup>TM</sup>.

#### **2.2.1.5.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Elution der zuvor mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des „JETquick Gel Extraction Spin Kit“ von Genomed. Dazu wurde die DNA auf einem UV-Tisch durch UV-Licht sichtbar gemacht, vorsichtig mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte dann gemäß Protokoll des Herstellers. Das Prinzip der Reinigung besteht darin, dass der Elutionspuffer ein chaotropes Salz ( $\text{NaClO}_4$ ) enthält, durch welches die Agarose solubilisiert wird. Die DNA kann dann an die Silicapartikel der Extraktionssäule binden und Agarose, Salze, Proteine und Ethidiumbromid durch Waschen entfernt werden. Die DNA wurde zum Schluss mit 30  $\mu\text{l}$  MilliQ-Wasser von der Säule eluiert.

#### **2.2.1.5.6 DNA-Ligation**

Ziel der Ligation ist die Integration eines DNA-Fragments (Insert) in ein Plasmid (Vektor). T4-Ligase ist ein Enzym, das die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5`-Phosphat- und 3`-Hydroxyenden in doppelsträngiger DNA katalysiert. Sie ist in der Lage sowohl glatte als auch kohäsive Enden der DNA miteinander zu

verbinden. Vektor und Insert wurden bei der Ligation etwa in einem Molekülverhältnis von 1:3 eingesetzt. Die einzusetzende Vektor- und Insert-Menge wurde nach folgender Formel berechnet:  $(\text{ng Insert} / \text{Länge Insert}) \times 1 = (\text{ng Vektor} / \text{Länge Vektor}) \times 3$ . Die Ligation wurde in einem Volumen von 15  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Davon waren 1,5  $\mu\text{l}$  T4-Ligase Puffer und 1  $\mu\text{l}$  (= 400 U) T4-Ligase. Die restlichen 12,5  $\mu\text{l}$  enthielten Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 (~ 40-60 ng Vektor, ~ 100-150 ng Insert). Um den Anteil der mit sich selbst ligierten Vektoren zu ermitteln, wurde eine Reaktion mit MilliQ-Wasser statt Insert-DNA angesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C. Der komplette Ligationsansatz wurde im Folgenden für die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen verwendet (siehe 2.2.1.1).

### 2.2.1.6 TOPO® Klonierung (Invitrogen)

Die Klonierung von Klotho-Fc, d.h. die Generierung eines Proteins, das aus dem extrazellulären Teil des humanen Klothoproteins (AS 1-982) und einem C-terminalen Fc-„Tag“ besteht, wurde mit einer Kombination aus TOPO-Klonierung (Invitrogen) und klassischer Klonierung durchgeführt.

Dazu wurde wie bei der klassischen Klonierung eine Amplifikation des gewünschten Genfragments mittels spezifischer Primer (siehe 2.1.9) und PCR-Reaktion (siehe 2.2.1.5.1) durchgeführt und das Produkt über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (siehe 2.2.1.5.4 und 2.2.1.5.5). Anschließend wurde das PCR-Produkt in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) nach Protokoll des Herstellers eingeführt. Der TOPO-Vektor liegt dafür linearisiert mit am 3'-Phosphatende kovalent gebundener Topoisomerase I vor, die die Ligation der Vektorenden mit den glatten Enden des PCR-Produkts vermittelt und danach freigesetzt wird.

Ansatz für die TOPO-Klonierungsreaktion:

4  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt  
1  $\mu\text{l}$  „Salt Solution“  
1  $\mu\text{l}$  pCR II-Blunt-TOPO

Die Inkubation erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der so gewonnene Vektor mit Insert durch Transformation (siehe 2.2.1.1) in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 eingeführt, die Plasmid-DNA mittels Plasmid-Minipräparation (siehe 2.2.1.2) gewonnen und die korrekte Insertion des gewünschten

Genfragments mit Hilfe eines Kontrollverdaus und Agarosegelelektrophorese kontrolliert (siehe 2.2.1.5.2 und 2.2.1.5.4). Das Klothogenfragment wurde dann durch Restriktionsenzyme (siehe 2.1.10) ausgeschnitten und in den Vektor plg plus mittels klassischer Klonierung (siehe 2.2.1.5) eingeführt.

### 2.2.1.7 Gateway® Klonierung (Invitrogen)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Varianten des humanen Klothoproteins mit „Tag“ mittels Gateway-Klonierung (Invitrogen) hergestellt: Klotho-V5, ein Protein, das aus der vollständigen Sequenz des humanen Klothoproteins und einem C-terminalen V5-„Tag“ besteht und die Klotho-Domänen hKL1 (AS 57-506) und hKL2 (AS 515-953) mit C-terminalem GST-„Tag“.

Das Gateway-System nutzt das natürlich vorkommende Rekombinationssystem des Bakteriophagen  $\lambda$ . Die für die homologe Rekombination durch den Phagen notwendigen „attachment“ (*att*)-Bereiche wurden modifiziert und in verschiedene Vektoren integriert. Das gewünschte Gen wird zuerst in einen Eingangsvektor („Entry“-Vektor) eingeführt, der die für eine Rekombination notwendigen homologen Bereiche *attL1* und *attL2* enthält. Danach findet die Integration in den Zielvektor („Destination“-Vektor) mit den Rekombinationssequenzen *attR1*- und *attR2* statt. Die beiden Rekombinationsreaktionen werden durch zwei verschiedene  $\lambda$ -Enzyme durchgeführt, die spezifisch bestimmte *att*-Sequenzen erkennen und an dieser Stelle die Rekombinationsreaktion ausführen. Durch ein im Zielvektor zwischen den *attR*-Sequenzen integriertes Gen (*ccdB*), dessen Expression in *E. coli* DH10B zur Inhibierung der Gyrase und damit zur Wachstumshemmung führt, wird nach Rekombination und erfolgter Transformation des Reaktionsansatzes in *E. coli* DH10B eine Selektion positiver Klone ermöglicht, da nur Klone wachsen können, die ein Plasmid enthalten, in dem das *ccdB* Gen gegen das gewünschte Genfragment ausgetauscht wurde.

Die Klonierung wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter 2.1.9 aufgelistet.

### 2.2.1.8 DNA-Sequenzierung

Um zu überprüfen, dass während der Klonierung keine fehlerhafte Amplifikation der eingebauten DNA mit daraus folgender Mutation stattgefunden hat oder das Gen in

einem falschen Leseraster eingebaut wurde, wurden die Übergänge von Vektor zu Insert sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode (Sanger *et al.*, 1992), auch Kettenabbruchmethode genannt, mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden (ddNTP's).

Standardansatz für die Sequenzier-PCR-Reaktion:

x µl DNA (400-500 ng)  
 1 µl „reverse“- oder „forward“-Primer  
 4 µl Sequenzier-„Premix“ (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100, Amersham Bioscience)  
 2 µl 5x Sequenzierpuffer (BigDye Terminator v1.1, v3.1, Amersham Bioscience)  
 → ad 20 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O

Die PCR wurde nach folgendem Temperatur- und Zeitschema durchgeführt:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	4 min	1
95 °C	20 sec	35
55 °C	20 sec	
60 °C	3-4 min	
4 °C	∞	

Die bei der PCR-Reaktion entstehenden Kettenabbruchprodukte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, die eingebauten ddNTP's mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt und die Abfolge der vier unterschiedlichen Farbsignale der vier verschiedenen ddNTP's und damit die Sequenz des amplifizierten DNA-Fragments mit Hilfe eines Detektors bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme SeqMan, EditSeq und MegAlign.

### 2.2.1.9 „Microarray“-Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse mit Hilfe eines „Rat Genome Arrays“ bzw. eines „Human Genome Arrays“ der Firma Affymetrix, bei der die Expression einer Vielzahl von Genen untersucht werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um eine Veränderung der Genexpression, d.h. eine vermehrte oder verringerte Expression

einzelner Gene, durch die Stimulation verschiedener Zellen mit Klotho nachzuweisen. Es wurden sowohl Ratten- als auch humane Zellen untersucht. Die Stimulation der Zellen mit 50 nM Klotho-Fc bzw.- Klotho-His<sub>6</sub> oder PBS (= Negativkontrolle) erfolgte wie in 2.2.2.6 beschrieben in 6 cm-Zellkulturschalen (jeweils Triplikate), wobei 16 h vor Stimulation ein Mediumwechsel zu serumfreien Medium stattfand. 24 h nach Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Lyse der Zellen sowie die RNA-Synthese mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ von Qiagen nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Synthese doppelsträngiger cDNA, die daran anschließende Herstellung mit Biotin-markierter cRNA aus dieser sowie die Hybridisierung der zuvor fragmentierten cRNA auf dem „Genexpressions-Chip“ der Firma Affymetrix und die folgende Messung mit Datenanalyse des „Microarrays“ wurden in der Abteilung Histopathologie II (TA Oncology - Target Research) der Firma Merck nach Protokoll des Herstellers Affymetrix durchgeführt. Die Auswertung der Genexpressionsanalyse erfolgte durch die Bioinformatikabteilung der Firma Merck.

## **2.2.2 Eukaroytische Zellkultur**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **2.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in der Regel in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem für die jeweilige Zelllinie geeigneten Medium kultiviert (siehe 2.1.7).

Zum Passagieren der Zellen wurden diese nach Absaugen des Mediums mit 10-15 ml D-PBS gewaschen, mit 500 µl Trypsin-EDTA (1x) versetzt und für 2-3 min bei 37 °C inkubiert. Wenn sich die Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden lösten, wurden sie in der gewünschten Menge frischem Kulturmedium aufgenommen, resuspendiert und wie gewünscht verdünnt in insgesamt ca. 15 ml Kulturmedium neu ausgesät. Die Zellen wurden ein- bis zweimal die Woche bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % passagiert.

Für die Durchflusszytometrie bzw. Stimulationsexperimente wurden die Zellen in 10 cm- bzw. 6 cm-Zellkulturschalen oder in 6-Kavitätenplatten ausgesät. Dazu

wurden die Zellen wie oben beschrieben vom Flaschenboden abgelöst und in einer der gewünschten Verdünnung entsprechenden Menge Kulturmedium aufgenommen und ausgesät, wobei pro 10 cm-Schalen 7-8 ml, pro 6 cm-Schalen 3 ml und pro Kavität einer 6-Kavitätenplatte 2 ml Zellsuspension verteilt wurden.

#### **2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Um Zellen über einen längeren Zeitraum (Monate bis Jahre) ohne Kultivierung zu lagern, wurden diese in Kryoröhrchen eingefroren. Dazu wurden die Zellen einer zu 70-90 % konfluenten 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche oder 10 cm-Zellkulturschale, wie bei der Kultivierung von Zelllinien beschrieben, mit Trypsin-EDTA abgelöst und in 10 ml D-PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation der Zellen bei 1200 Upm und 4 °C wurden diese in 3-5 ml Kulturmedium, das mit 20 % FCS (statt 10 %) und 20 % DMSO versetzt war, aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und in 1 ml Aliquots auf drei bis fünf Kryoröhrchen aufgeteilt. Die Zellen wurden dann sofort bei -80 °C eingefroren und nach einigen Tagen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Die Zellen wurden nach dem Auftauen sofort in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit 20 ml vorgewärmten Kulturmedium überführt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde am folgenden Tag abgenommen und 15 ml frisches Medium zugegeben.

#### **2.2.2.3 Zellzahlbestimmung**

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen mit D-PBS (5-8 ml pro 10 cm-Schale, 3-5 ml pro 6 cm-Schale und 2 ml pro Kavität einer 6-Kavitätenplatte) gewaschen, mit Trypsin-EDTA (500 µl pro 10 cm-Schale, 200 µl pro 6 cm-Schale und 100 µl pro Kavität einer 6-Kavitätenplatte) abgelöst und in einer geeigneten Menge D-PBS aufgenommen. 10-20 µl der Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop die Zahl der Zellen in vier großen Quadraten (jeweils unterteilt in neun kleine Quadrate) gezählt. Um die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu bestimmen, wurde der Mittelwert der vier erhaltenen Werte mit 10<sup>4</sup> multipliziert.

#### 2.2.2.4 Transiente Transfektion von Zellen

Für die transiente Transfektion wurden HEK 293T- oder HeLa-Zellen verwendet.

HEK 293T-Zellen wurden durch Liposomen-vermittelte Transfektion mit Hilfe des Transfektionsreagenzes FuGENE 6 der Firma Roche transfiziert. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 10 cm-Zellkulturschalen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu etwa 50-60 % konfluent waren. Zur Transfektion von Zellen einer 10 cm-Schale wurden 21 µl FuGENE-Transfektionsreagenz direkt in 300 µl serum- und antibiotikafreies D-MEM-Medium pipettiert und der Ansatz sofort gut gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 7 µg Gesamt-DNA bzw. bei Doppeltransfektionen 3,5 µg der jeweiligen DNA zugegeben. Der Ansatz wurde direkt nach Zugabe der DNA gut gemischt und dann für ca. 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurde bei den zu transfizierenden Zellen das Medium gewechselt. Das alte Medium wurde abgesaugt und pro 10 cm-Schale 8 ml frisches D-MEM-Medium (mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin) zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Transfektionsansätze vorsichtig auf die Zellen getropft und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Transfizierte HEK 293T-Zellen wurden in der Regel ca. 42 h nach Transfektion lysiert (siehe 2.2.3.3)

Die Transfektion von HeLa-Zellen erfolgte durch Liposomen-vermittelte Transfektion mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Lipofectamin 2000 der Firma Invitrogen. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 6-Kavitätenplatten so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu etwa 80-90 % konfluent waren. Zur Transfektion von Zellen einer Kavität wurden 7,5 µl Lipofectamin 2000 in 242,5 µl OptiMEM I-Medium gegeben, vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig wurde in einem zweiten Ansatz 2,5 µg DNA in 250 µl OptiMEM I-Medium pipettiert und gemischt. Beide Ansätze wurden dann unter vorsichtigem Mischen vereinigt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden der gesamte Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde nach drei bis fünf Stunden oder am nächsten Tag gewechselt. Transfizierte HeLa-Zellen wurden 48 h nach Transfektion in der Durchflusszytometrie eingesetzt (siehe 2.2.5.1.1).

### 2.2.2.5 Herstellung einer stabilen Zelllinie

Zur Herstellung einer Zelllinie, die stabil humanes Klotho-Fc (extrazellulärer Teil des humanen Klothoproteins mit Fc-„Tag“) exprimiert, wurden CHO („Chinese Hamster Ovary“)-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit Klotho-Fc transfiziert und anschließend Klone, die Klotho stabil exprimieren, selektiert. Da es sich bei der hier verwendeten Klotho-Variante um den extrazellulären Teil des humanen Klothoproteins handelt, sollte das Protein kontinuierlich in den Überstand der CHO-Zellen abgegeben werden und dort nachweisbar sein.

Für die Transfektion wurde PolyFect Transfektionsreagenz von Qiagen verwendet. Die Transfektion mit PolyFect beruht auf dem Prinzip des verzweigten aktivierten Dendrimers, an dessen Armen sich positiv geladene Aminosäuregruppen befinden, an die kompakte DNA binden kann, wobei der PolyFect-DNA Komplex eine positive Nettoladung besitzt. Nach Bindung an negativ geladene Rezeptoren der Zelloberfläche von eukaryotischen Zellen und Endozytose des Komplexes in die Zelle bewirkt PolyFect eine Abpufferung des lysosomalen pH-Werts, wodurch die lysosomalen Nukleasen inaktiviert werden. Auf diese Weise wird eine Lyse der DNA verhindert und der PolyFect- DNA Komplex kann in den Kern aufgenommen werden. Für die Transfektion wurden CHO-Zellen in 10 cm-Schalen in zwei unterschiedlichen Dichten ausgesät, so dass sie zwei Tage später zum Zeitpunkt der Transfektion zu ca. 35 % bzw. 70 % konfluent waren. Von jeder Dichte wurden zwei Schalen transfiziert. Für die Transfektion einer 10 cm-Schale wurden 4 µg DNA (pIg plus-Klotho-Fc) in 300 µl serum- und antibiotikafreies MEM alpha Medium pipettiert und anschließend 25 µl PolyFect Transfektionsreagenz zugegeben. Der Ansatz wurde 10 s intensiv gemischt und dann für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurde bei den zu transfizierenden Zellen das Medium gewechselt. Das alte Medium wurde abgesaugt und pro 10 cm-Schale 7 ml frisches Kulturmedium (= MEM alpha Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin) zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit und Zugabe von 1 ml Kulturmedium zum Transfektionsansatz wurde dieser durch 2 bis 3-maliges auf- und abpipettieren gemischt und anschließend vorsichtig auf die Zellen getropft. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Da die Zellen beider Verdünnungen nach zwei Tagen zu 80-100 % konfluent waren, wurde je eine Schale jeder Verdünnung so gesplittet, dass die Zellen wieder einzeln vorlagen und eine Selektion vereinzelter Klone möglich war.

Die Selektion erfolgte mit Hilfe des Antibiotikums G418, für welches der in die Zellen eingeführte Vektor plg plus-Klotho-Fc ein Resistenzgen besitzt. Somit können sich nach Zugabe des Antibiotikums zum Kulturmedium nur die Zellen vermehren, die den Vektor bei der Transfektion aufgenommen und nicht wieder abgegeben oder abgebaut haben. Zur Selektion wurden die Zellen in Selektionsmedium (= MEM alpha Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und G418) mit einer Anfangskonzentration von 0,25 mg/ml G418 kultiviert. Diese Konzentration wurde nach einem Tag auf 0,5 mg/ml und nach acht Tagen auf 1 mg/ml G418 gesteigert. Das Selektionsmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Vier Tage nach der letzten Erhöhung der Antibiotikakonzentration wurden 48 Zellklone unter dem Mikroskop mit einer sterilen Pipettenspitze aufgesogen und jeder Klon einzeln in eine Kavität einer 24-Kavitätenplatten überführt, die 500 µl Selektionsmedium mit 1 mg/ml G418 enthielt. Die einzelnen Klone wurden nach und nach in 6-Kavitätenplatten und anschließend in 10 cm-Zellkulturschalen bzw. 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen expandiert. Die Expression von Klotho-Fc im Überstand der Klone wurde mittels Western Blot-Analyse mit einem Fc-Antikörper nachgewiesen. Die zehn Klone mit der stärksten Expression von Klotho-Fc wurden weiterkultiviert und Zellen dieser Klone eingefroren. Der Klon mit der stärksten Expression (Klon 45) wurde dann für alle weiteren Versuche verwendet. Die stabile Expression wurde in regelmäßigen Abständen mittels Western Blot-Analyse kontrolliert. Zur Kontrolle der Stabilität wurde nach einigen Wochen das Selektionsantibiotikum versuchsweise weggelassen. Da die Expression stabil blieb, wurden die Zellen im weiteren Verlauf zur Produktion von Klotho-Fc in Kulturmedium ohne G418 kultiviert.

#### **2.2.2.6 Stimulation bzw. Behandlung von Zellen**

Für die Stimulation bzw. Behandlung von Zellen mit gereinigtem Klotho, IGF1 und anderen Proteinen oder Substanzen wie Inhibitoren wurden Zellen in 6-Kavitätenplatten, 6 cm- oder 10 cm-Zellkulturschalen so ausgesät, dass sie einen oder zwei Tage später zu 60-100 % konfluent waren. Die ausgesäte Zelldichte richtete sich dabei nach der Länge der Inkubationszeit nach Stimulation (60-70 % Konfluenz bei Inkubationen von 24-48 h und 80-100 % Konfluenz bei Inkubationen für wenige Minuten bis Stunden). Die Zellen wurden dann in der Regel abends durch Zugabe von serumfreien Kulturmedium (= Hungermedium) gehungert (1 ml pro

Kavität einer 6-Kavitätenplatte, 2 ml pro 6 cm-Schale und 7 ml pro 10 cm-Schale). Je nach Versuch wurde das Medium nach 1-2 h noch einmal gewechselt. 16-18 h nach dem Wechsel zu Hungermedium wurden die Zellen mit dem jeweiligen Protein oder Inhibitor stimuliert bzw. behandelt. Dazu wurde das Protein oder der Inhibitor der gewünschten Konzentration entsprechend in Medium vorverdünnt und in einem Mediumvolumen, das mindestens einem Zehntel des Gesamtvolumens in der Zellkulturschale entsprach, vorsichtig über den Zellen verteilt. Die Zellen wurden dann je nach Versuch für mehrere Minuten, Stunden oder Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Anschließend wurde je nach Versuch der Überstand abgenommen und gesammelt (siehe 2.2.2.7) oder lediglich abgesaugt und verworfen sowie die Zellen entweder direkt auf Eis lysiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt lysiert (siehe 2.2.3.3) oder verworfen.

### **2.2.2.7 Sammlung von Zellkulturüberständen**

Abgenommene Zellkulturüberstände, deren Proteine mittels Western Blot-Analyse, Immunpräzipitation oder ELISA untersucht werden sollten, wurden zuvor zweimal zentrifugiert. Der erste Zentrifugationsschritt für 5 min bei 3000 Upm und 4 °C diente dem Abtrennen von toten Zellen und großen Zelltrümmern, wohingegen der zweite Zentrifugationsschritt für 5 min bei maximaler Umdrehung (14000 Upm) und 4 °C dem Abtrennen kleinerer Zellfragmente diente. Beide Male wurde nach der Zentrifugation der Überstand abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Überstände wurden dann direkt für den weiteren Versuch verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

## **2.2.3 Proteinanalytische und biochemische Methoden**

### **2.2.3.1 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen**

Um Oberflächenproteine mit Biotin zu markieren, wurden in 10 cm-Zellkulturschalen konfluent gewachsene Zellen mit 5-10 ml D-PBS gewaschen und mit 500 µl Trypsin-EDTA (1x) abgelöst. Nach erneutem, zweimaligem Waschen mit je 5 ml D-PBS und Zentrifugation für jeweils 4 min bei 1200 Upm und 4 °C wurden die Zellen in 2-5 ml

D-PBS aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 2.2.2.3) und auf  $7 \times 10^6$  Zellen/ml mit D-PBS eingestellt. Pro 1 ml Zellsuspension wurde in einem 50 ml Polypropylenröhrchen 10  $\mu$ l zuvor frisch ange-setzte Sulfo-NHS-Biotin-Stammlösung (10 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin von Pierce, Endkonzentration 0,1 mg/ml) zugegeben und die Suspension für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Pro Röhrchen wurden in der Regel 4 ml Zellsuspension biotinyliert. Pro ml biotinylierte Zellen wurden dann 10 ml D-PBS zugegeben, die Zellen erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen.  $7 \times 10^6$  Zellen wurden mit 500  $\mu$ l Chaps-Puffer lysiert (siehe 2.2.3.3) und in „Pull-Down“-Experimenten eingesetzt (siehe 2.2.3.9).

### **2.2.3.2 Chemische Kopplung („Crosslinking“) von Klotho-Fc an Zelloberflächenproteine**

Für die Kopplung von Klotho-Fc an Zelloberflächenproteine wurden die Zellen zuerst wie für die Durchflusszytometrie beschrieben behandelt und mit Klotho-Fc bzw. Fc (Negativkontrolle) inkubiert (siehe 2.2.5.1.1). Die einzigen Unterschiede bei der Durchführung waren, dass die Bindungsreaktion in einem größeren Volumen (600  $\mu$ l) mit mehr Zellen stattfand und unmarkiertes Klotho-Fc bzw. Fc verwendet wurde. 100  $\mu$ l Zellsuspension (=  $1 \times 10^7$  Zellen) wurden mit 240  $\mu$ l 10 %iger HSA-Lösung (angesetzt in  $H_2O$ , Endkonzentration 4 %) und 240  $\mu$ l D-PBS gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 20  $\mu$ l 5,3  $\mu$ M Klotho-Fc bzw. Fc (Endkonzentration 177 nM) fand die Bindungsreaktion für 30 min auf Eis statt, wobei der Ansatz alle 10 min gemischt wurde. Die folgenden Waschschriffe entsprachen wieder dem Protokoll für die Durchflusszytometrie. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit gebundenem Klotho-Fc bzw. Fc in 800  $\mu$ l PBS (pH 7,2) für die folgende Kopplung mittels Sulfo-EGS oder in 990  $\mu$ l PBS (pH 8,0) für die Kopplung mittels BS(PEG)<sub>9</sub> aufgenommen. Als Kontrolle wurden Ansätze mit der gleichen Konzentration (177 nM) an Klotho-Fc bzw. Fc ohne Zellen gemacht. Zu den Ansätzen wurde dann 200  $\mu$ l Sulfo-EGS (Stammkonzentration: 10 mM in trockenem DMSO, Endkonzentration: 2 mM) bzw. 10  $\mu$ l BS(PEG)<sub>9</sub> (Stammkonzentration: 250 mM in trockenem DMSO, Endkonzentration: 2,5 mM) gegeben. Die Ansätze wurden für 2 h auf Eis inkubiert und die Proben alle 15 min gemischt. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 10  $\mu$ l 1 M Tris, pH 7,5 (beim Ansatz mit Sulfo-EGS) bzw. Tris-HCl, pH 8,0

(beim Ansatz mit BS(PEG)<sub>9</sub>) zu einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben und die Ansätze für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen mit gekoppeltem Klotho-Fc wurden anschließend mit 1 ml Chaps-Puffer lysiert (siehe 2.2.3.3) und in „Pull-Down“-Experimenten eingesetzt (siehe 2.2.3.9).

### **2.2.3.3 Herstellung von Zelllysaten**

Zur Isolierung von Proteinen aus Zellen wurde das Kulturmedium sorgfältig abgesaugt und die Lyse entweder direkt durch Zugabe des Lysepuffers gestartet oder die Zellen zuerst durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren. In letzterem Fall wurden die Zellen für mehrere Stunden bis Tage bei -20 °C gelagert und vor der Lyse auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurde entweder mit RIPA- (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40 (V/V), 0,5 % SDS (m/V), 1 mM EGTA) oder HGNT-Lysepuffer (20 mM HEPES pH 7,4, 10 % Glycerol, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA) lysiert, wobei dem Lysepuffer, um Abbau und Dephosphorylierungen der Proteine zu verhindern, ein kommerzieller Protease- und Phosphataseinhibitor-Cocktail im Verhältnis 1:100 zugesetzt wurde. Aus dem selben Grund wurde während der Lyse durchgängig auf Eis oder bei 4 °C gearbeitet. Nach Zugabe eines passenden Volumens an Lysepuffer (300-500 µl pro Kavität einer 6-Kavitätenplatte bzw. 1 ml pro 10 cm-Zellkulturschale) wurden die Zellen mit einem Zellschaber sorgfältig vom Boden der Schale abgeschabt und das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. HGNT-Lysate wurden für 40 min bei 4 °C über Kopf rotierend inkubiert, während RIPA-Lysate nur 20 min inkubiert und anschließend für 10 s mit dem SONOPLUS Sonifizierstab von Bandelin bei 40 % Leistung sonifiziert wurden. Alle Lysate wurden danach 30 min bei 14000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und direkt für Western Blot-Analysen, Immunpräzipitation oder ELISA verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

### **2.2.3.4 Subzelluläre Fraktionierung von Zellen**

Die subzelluläre Fraktionierung von Zellen zur Auftrennung des Proteoms in eine cytosolische, eine Membran-, eine Kern- und eine Cytoskelett-Fraktion erfolgte mit Hilfe des „ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kits“ von Calbiochem.

Als Ausgangsmaterial dienten in 10 cm-Zellkulturschalen konfluent gewachsene L6-Zellen. Alle Schritte der Fraktionierung wurden gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Fraktionierung erfolgte bis zur Gewinnung der Kernfraktion durch Zugabe von Puffer III und folgender Inkubation nach dem Protokoll für adhärente Zellen. Da sich die Zellen bei diesem Schritt jedoch fast vollständig ablösten, wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Polypropylenröhrchen überführt und ab dann das Protokoll für Suspensionszellen befolgt. Die gewonnenen vier Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrem Einsatz im „Pull-Down“ (siehe 2.2.3.9) bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3.5 Präparation von Membranproteinen

Für „Pull-Down“-Experimente wurden Membranproteine mit Hilfe von differentieller Zentrifugation präpariert. In der Regel erfolgte die Membranpräparation aus Rattenlebern, die zuvor bei -80 °C tiefgefroren waren. 300-800 mg Rattenleber wurden zuerst in eiskaltem Homogenisierungspuffer (5 mM Tris-HCl, pH 7,4, 300 mM Sucrose, 1:100 Proteaseinhibitor Cocktail) suspendiert, wobei 1 ml Homogenisierungspuffer pro 100 mg Gewebe eingesetzt wurde. Mit Hilfe eines „Dounce“ Homogenisators wurde das Gewebe auf Eis homogenisiert. Es folgten drei Zentrifugationsschritte: Schritt 1 bei 4 °C und 1000 x g (= 3000 Upm) für 15 min zum Erhalt von Pellet 1 (enthält Zelltrümmer und Zellkerne), Schritt 2 bei 4 °C und 10000 x g (= 9700 Upm) für 30 min zum Erhalt von Pellet 2 (enthält Mitochondrien, Zellmembranen und Lysosomen) und Schritt 3 bei 4 °C und 112000 x g (= 50000 Upm) für 1 h zum Erhalt von Pellet 3 (enthält u.a. ER, Zellmembranen, Lysosomen und Golgimembranen). Zentrifugationsschritt 3 wurde in einer Ultrazentrifuge durchgeführt. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurden die Überstände abgenommen und im nächsten Schritt eingesetzt. Pellet 2 und 3 wurden je nach Größe der Pellets in 500-1000 µl Solubilisierungspuffer (20 mM Tris, pH 7,4, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerol, 0,5 % Chaps, 1:100 Proteaseinhibitor Cocktail) resuspendiert und für 1 h bei 4 °C über Kopf rotiert. Bei der folgenden Zentrifugation bei 112000 x g (= 50000 Upm) für 1 h in der Ultrazentrifuge wurden unlösliche Proteine abzentrifugiert. Die Überstände mit den solubilisierten Proteinen wurden abgenommen und in „Pull-Down“-Experimenten eingesetzt. Zur Analyse der einzelnen Präparationsschritte mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse wurden nach jedem Zentrifugationsschritt kleine Aliquots abge-

nommen, SDS-Ladepuffer (versetzt mit reduzierendem Agens) zugegeben und diese für 6 min bei 99 °C denaturiert.

### 2.2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford beruht auf dem Prinzip einer Farbverschiebung des Triarylmethanfarbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 von rotbraun nach blau bei Bindung des Farbstoffs an Proteine. Die Folge dieses Farbwechsels ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm. Daher ist die Absorption einer Lösung, der Coomassie Brilliant Blue G-250 zugegeben wurde, bei 595 nm desto größer je mehr Protein enthalten ist.

Zur genauen Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde eine Standardkurve mit Bovinem Serum Albumin (BSA) erstellt. Die Standardkurve wurde mit 1x PBS aus einer BSA-Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml für einen Konzentrationsbereich von 0,1-1,0 mg/ml angesetzt (siehe Tabelle).

Standard (S)	Konzentration [mg/ml]	1x PBS	BSA-Stocklösung
S1	1,0	50 µl	50 µl
S2	0,8	60 µl	40 µl
S3	0,6	70 µl	30 µl
S4	0,4	80 µl	20 µl
S5	0,2	90 µl	10 µl
S6	0,1	95 µl	5 µl

Je Probe wurden zwei bis drei Verdünnungen in 1x PBS angefertigt, die möglichst im Messbereich der Standardkurve lagen. Die für die Bestimmung benötigte Menge Coomassie Plus Proteinreagenz (Pierce) wurde auf Raumtemperatur erwärmt. In eine 96-Kavitätenplatte wurden jeweils 5 µl der Proben bzw. Standards als Doppelwerte vorgelegt. Als Leerwerte dienten zweimal 5 µl 1x PBS. Mit einer Multipette wurden dann je 150 µl Reagenzlösung zu den Proben und Standards in die Platte pipettiert, diese 5 s geschüttelt und anschließend 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des SOFTmax PRO 4.8 Programms und linearer Regression. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand der Standardkurve ermittelt, wobei die Ergebnisse der Verdünnungen mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und anschließend gemittelt wurden.

### 2.2.3.7 Bestimmung der Klotho-Fc-Proteinkonzentration mittels Fc-Elisa

Mittels eines selbst etablierten Fc-ELISA („Enzyme-linkend Immunosorbent Assay“) können Proteine mit Fc-„Tag“ wie Klotho-Fc sowohl im Zellkulturüberstand als auch in Lysaten nachgewiesen und ihre Konzentration bestimmt werden. Der hier etablierte ELISA wurde nach dem Prinzip des „Sandwich“-ELISA aufgebaut.

Am ersten Tag der Durchführung wurden 96-Kavitäten-ELISA-Platten abends mit einem anti-human IgG (H+L) Antikörper aus der Ziege beschichtet. Dazu wurde der Antikörper in einem 0,1 M Carbonat-Puffer (pH 9,6) mit einer Konzentration von 2 µg/ml angesetzt. In jede Kavität wurden 100 µl Antikörperlösung pipettiert, die Platte mit Parafilm abgedeckt und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Platten mit einer Mehrkanalpipette viermal mit je 300 µl Waschpuffer (0,05 % Tween-20 (V/V) in D-PBS) pro Kavität gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Nach jedem Waschschrift wurden die Platten auf einem Papiertuch trocken geklopft. Pro Kavität wurden dann 200 µl 1x Blockierpuffer (2 % BSA (m/V), 0,05 % Tween-20 (V/V) in D-PBS) zugegeben, um spätere unspezifische Bindungen von Proteinen an die Platte zu verhindern. Die Platte wurde mit Parafilm abgedeckt, für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und dann erneut viermal wie zuvor beschrieben gewaschen, um ungebundenes BSA zu entfernen. Um die Klotho-Fc-Konzentration in einer Lösung bestimmen zu können, wurde eine Standardkurve mit gereinigtem Fc-Protein erstellt. Die Standardkurve wurde mit Probenpuffer (1 % Milchpulver in D-PBS) aus einer Fc-Stammlösung mit einer Konzentration von 2,63 mg/ml für einen Konzentrationsbereich von 0,16-100 ng/ml angesetzt (siehe Tabelle). Dazu wurde zuerst eine 1:100 Vorverdünnung der Fc-Stammlösung in Probenpuffer erstellt.

Standard (S)	Konzentration [ng/ml]	Proteinlösung	Probenpuffer
S1	100	7,6 µl Fc-Vorverdünnung	1992,4 µl
S2	25	500 µl S1	1500 µl
S3	10	200 µl S1	1800 µl
S4	5	1000 µl S3	1000 µl
S5	2,5	1000 µl S4	1000 µl
S6	1,25	1000 µl S5	1000 µl
S7	0,625	1000 µl S6	1000 µl
S8	0,31	1000 µl S6	1000 µl
S9	0,16	1000 µl S6	1000 µl

Je Probe wurden zwei bis drei Verdünnungen in Probenpuffer angefertigt, die möglichst im Messbereich der Standardkurve lagen. Von den Standards (als Doppelwerte bestimmt) und den Proben wurden je 100 µl in die Platte pipettiert, die Platte mit Parafilm abgedeckt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Platte erneut viermal wie zuvor beschrieben gewaschen. Pro Kavität wurden dann je 100 µl zuvor 1:50000 verdünnter HRP-konjugierter (Fab')<sub>2</sub> Ziegen anti-human IgG Fc-Antikörper (Fc<sub>γ</sub>-spezifisch) zugegeben. Nach 1 ½ h Inkubation bei 37 °C mit Parafilm abgedeckt wurden die Platten diesmal fünfmal gewaschen. Zur Detektion der Antikörper-Protein-Antikörper-Komplexe wurden pro Kavität 100 µl „SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate“ (KPL) zugegeben und die Platte für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 100 µl 1 N HCl gestoppt und die Konzentration der gebundenen Proteine bei 450 nm am „Mithras“ ELISA-Plattenlesegerät gemessen. Die Auswertung erfolgte in Excel. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand der Standardkurve ermittelt.

#### **2.2.3.8 Chemische Kopplung („Crosslinking“) von Klotho-Fc an Protein A Agarosekügelchen mittels DMP (Dimethylpimelimidat x 2 HCl)**

Bei einigen „Pull-Down“-Experimenten wurde Klotho-Fc zuvor mit Hilfe des homobifunktionalen Imidoesters DMP (Dimethylpimelimidat x 2 HCl) fest an Protein A Agarosekügelchen gekoppelt. Dazu wurden 50 µl Protein A Agarosekügelchen mit 500 µl D-PBS gemischt und 5 µl 16 µM Klotho-Fc bzw. Fc als Negativkontrolle (Endkonzentration: 144 nM) zugegeben. Die Bindung von Klotho-Fc bzw. Fc an die Protein A Agarosekügelchen erfolgte für 3 h bei 4 °C über Kopf rotierend. Es folgten drei Waschschriffe mit je 1 ml D-PBS sowie zwei Waschschriffe mit je 1 ml 0,1 M Dinatriumtetraborat (pH 9,0). Nach jedem Waschschriff wurden die Kügelchen bei 5000 Upm und 4 °C für 2 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Kügelchen wurden dann in 1 ml 0,1 M Dinatriumtetraborat (pH 9,0), in dem direkt zuvor 2 mg DMP gelöst wurden (Endkonzentration DMP: 7,7 mM), aufgenommen. Die Kopplung erfolgte für 45 min bei Raumtemperatur über Kopf rotierend. Die Kügelchen wurden anschließend einmal mit 1 ml 1 M Ethanolamin (pH 8,0) gewaschen und nach Zentrifugation und Absaugen des Überstandes in 1 ml 1 M Ethanolamin (pH 8,0) aufgenommen. Durch Inkubation über Nacht bei 4 °C über Kopf rotierend wurde restliches ungebundenes DMP blockiert. Am nächsten Tag

folgten vier Waschschr tte mit je 1 ml 0,1 M Glycin (pH 2,5) und zwei Waschschr tte mit je 1 ml PBS bei 4 °C bzw. auf Eis. Die Protein A Agarosekügelchen mit daran gekoppeltem Klotho-Fc bzw. Fc wurden danach direkt in „Pull-Down“-Experimenten (siehe 2.2.3.9) eingesetzt.

### **2.2.3.9 (Co-) Immunpräzipitation bzw. „Pull-Down“**

Eine Möglichkeit, um Interaktionen zwischen zwei Proteinen zu untersuchen, ist die (Co-)Immunpräzipitation oder der „Pull-Down“. Bei der Immunpräzipitation wird ein bestimmtes Protein aus einem Proteingemisch mit Hilfe eines gegen dieses Protein gerichteten Antikörpers, der mit seinem Fc-Teil an Protein A/G Agarose- oder Sepharosek gelchen gebunden wird, durch Zentrifugation dieser Kügelchen isoliert und damit angereichert. Von einer Co-Immunpräzipitation spricht man dann, wenn zusätzlich Interaktionspartner des untersuchten Proteins aufgrund einer Bindung an dieses Protein copr zipitieren. Ein „Pull-Down“ beruht auf dem selben Prinzip wie eine Immunpräzipitation mit dem Unterschied, dass das zu untersuchende Proteine nicht mit Hilfe eines Antikörpers, sondern durch Bindung an ein anderes Protein oder ein kurzes Peptid, welches ebenfalls an eine Matrix (z.B. Agarosekügelchen) gebunden vorliegt, präzipitiert wird. In dieser Arbeit wurde für den „Pull-Down“ gereinigtes Klotho-Fc, das über seinen Fc-Teil an Protein A oder Protein A/G-Agarosekügelchen gebunden wurde, verwendet. Beide Methoden wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl mit Lysaten von transient und stabil transfizierten Zellen als auch mit untransfizierten Zellen und dementsprechend mit endogen exprimierten Proteinen durchgeführt. Zusätzlich wurden in manchen „Pull-Down“-Experimenten Präparationen von Membranproteinen aus Rattenlebern eingesetzt.

Sowohl für die Immunpräzipitation als auch für den „Pull-Down“ wurden 800-1200 µl Lysat oder Membranpräparation bzw. PBS (= Negativkontrolle) eingesetzt. Um später unspezifische Bindungen an die Protein A- oder Protein A/G-Agarosekügelchen zu reduzieren, wurde das Lysat in manchen Fällen optional mit 40 µl Protein A oder Protein A/G Agarosekügelchen für 1 h über Kopf rotierend bei 4 °C vorinkubiert. Diese wurden dann bei 5000 Upm für 2 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von einem gegen das zu untersuchende Protein gerichteten Antikörper (je nach Antikörper 3-5 µg) im Fall der Immunpräzipitation oder Zugabe von gereinigtem Klotho-Fc bzw. Fc

(= Negativkontrolle) beim „Pull-Down“ (Endkonzentration von Klotho-Fc bzw. Fc: 100-200 nM) erfolgte eine 3-stündige Inkubation über Kopf rotierend bei 4 °C. Die Isolierung der Immunkomplexe bzw. der Komplexe aus Klotho-Fc und Interaktionspartner erfolgte durch Zugabe von 40 µl Protein A oder Protein A/G Agarosekügelchen (= Matrix) und Inkubation über Kopf rotierend bei 4 °C für 30 min oder über Nacht. Ein Ausnahmefall bildeten „Pull-Down“-Experimente, bei denen Klotho-Fc bzw. Fc zuvor fest an Protein A Agarosekügelchen gekoppelt wurde (siehe 2.2.3.8). In diesen Fällen wurde das Lysat oder die präparierten Membranproteine direkt mit den mit Klotho-Fc-gekoppelten Kügelchen inkubiert. Durch Zentrifugation für 2 min bei 5000 Upm wurden die an die Matrix gebundenen Proteine bzw. Proteinkomplexe vom restlichen Lysat getrennt und dieses abgesaugt. Die Matrix-Proteinkomplexe wurden dann 3-5 x mit 1 ml eiskaltem Lysepuffer oder PBS gewaschen und jedes Mal erneut für 2 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Im letzten Schritt wurden die Kügelchen dann mit einer sehr dünnen langen Pipettenspitze oder eine engen Kanüle vollständig trockengesaugt, in 15-30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und die Proteine durch Inkubation bei 99 °C für 6 min denaturiert und von der Matrix getrennt. Die Proben wurden dann mittels Western Blot-Analyse untersucht.

#### **2.2.3.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Trennung von Proteingemischen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese wurde in der Regel unter Bedingungen durchgeführt, die sicherstellten, dass Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten zerfielen, Proteine entfaltet und inter- bzw. intramolekulare Disulfidbrücken reduziert wurden. Dazu wurden die Proben vor Beladen des Gels mit SDS-Probenpuffer, der das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) und das reduzierende Agens Dithiothreitol (DTT) enthielt, 2:1 versetzt und danach zur Denaturierung für 6 min bei 99°C inkubiert. Durch SDS werden die entfalteten Proteine negativ beladen und dadurch ihre Eigenladung überlagert, so dass sie anschließend bei der elektrophoretischen Trennung im Gel, bestehend aus einer Polyacrylamid-Matrix mit spezifischer Vernetzung, ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht bzw. ihrer Größe getrennt werden. Das Gel wirkt dabei wie ein Sieb aus Poren, durch das kleinere Proteine schneller und größere Proteine langsamer hindurch zum Pluspol wandern. Zum Einsatz kamen Gele mit einem Vernetzungsgradienten von 4-12 %,

Bis-Tris gepuffert, in Verbindung mit MOPS-Puffer als Laufpuffer sowie Gele mit einem Vernetzungsgradienten von 3-8 %, Tris-Acetat gepuffert, zusammen mit Tricine-Puffer.

In Ausnahmefällen (bei der Proteinreinigung) wurde die Trennung ohne Zugabe des reduzierenden Agenzes DDT durchgeführt, um zu verhindern, dass vorhandene Proteinaggregate in ihre Untereinheiten zerfallen, damit diese später mittels Coomassiefärbung oder Western Blot-Analyse nachgewiesen werden konnten.

Die Elektrophorese wurde bei konstanter Voltzahl von 100 bis 200 Volt durchgeführt. Sie wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblau-Farbstofffront des Ladepuffers begann aus dem Gel herauszulaufen.

### **2.2.3.11 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen**

SDS-Polyacrylamidgele wurden in Coomassie-Färbelösung bei leichtem Schütteln und Raumtemperatur für ca. 2 h gefärbt. Die Entfärbung erfolgte ebenfalls bei leichtem Schütteln und Raumtemperatur für ca. 2 h in Entfärbelösung, wobei diese nach 30 min einmal gewechselt wurde. Wenn eine schnelle Färbung des Gels erwünscht war, wurde das Gel direkt für 15-30 min in Coomassie Instant Blue Färbelösung von Expedeon gefärbt und danach lediglich zwei- bis dreimal für 5 min in MilliQ-Wasser gewaschen.

### **2.2.3.12 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen**

Die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen wurde nach dem Silberfärbungsprotokoll von Blum (Blum *et al.*, 1987) mit hochreinen Chemikalien durchgeführt. Die Durchführung erfolgte bei Raumtemperatur unter stetigem Schütteln. Die Gele wurden für eine Stunde in Fixierlösung (30 % (V/V) Ethanol, 10 % (V/V) Essigsäure) fixiert und danach 20 min in 30 % Ethanol und 10 min in MilliQ-Wasser gewaschen. Nach einer Minute Sensibilisierung in 0,02 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung wurden die Gele dreimal 20 s in MilliQ-Wasser gewaschen und anschließend 45 min in Silbernitratlösung (10 mM  $\text{AgNO}_3$ ) inkubiert. Die Entwicklung der Silberbanden erfolgte durch Zugabe von frisch angesetzttem Entwickler (566 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,0185 % (V/V) Formaldehyd, 0,001 % (m/V)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). In diesem wurde das Gel solange inkubiert (1-10 min), bis die Proteinbanden in der gewünschten Stärke sichtbar waren. Die

Reaktion wurde mit Stopplösung (103 mM Tris, 0,64 % (V/V) Eisessig) abgestoppt und das Gel zum Schluss 15 Minuten in MilliQ-Wasser gewaschen. Die weitere Lagerung des Gels erfolgte bei 4 °C in MilliQ-Wasser.

### **2.2.3.13 Transfer von Proteinen auf Membranen und Immundetektion der immobilisierten Proteine (Western Blot-Analyse)**

Durch SDS-PAGE getrennte Proteine wurden unter Nutzung eines BioRad Nass-Transfer-Blotsystems auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Aufbau des Blots erfolgte nach der Sandwich-Methode gemäß Herstelleranweisung.

Minuspol: Schwamm  
1x Filterpapier  
Gel  
Nitrocellulosemembran  
1x Filterpapier  
Pluspol: Schwamm

Die Schwämme, die Membran und die Filterpapiere wurden vor dem Zusammenbau in Transferpuffer (18,4 mM Tris, 160 mM Glycin, 20 % Methanol (V/V), pH 7,4) equilibriert. Das Sandwich wurde in die Blot-Apparatur eingesetzt und sofort mit Transferpuffer überschichtet. Um eine Überhitzung beim Transfer zu verhindern, wurde ein gefrorenes Kühlelement in die Blot-Apparatur eingesetzt und ein Rührfisch zur homogenen Pufferverteilung zugegeben. Der Transfer erfolgte für 50 min bei 100 Volt unter Mischung des Transferpuffers auf einem Magnetrührer.

Durch reversible Färbung der Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Färbelösung wurde der Transfer überprüft. Nach Entfärben der Membran durch kurzes mehrmaliges Spülen mit MilliQ-Wasser wurde diese für 1-4 h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur in Blockierlösung (5 % BSA (m/V) und 0,1 %  $\text{NaN}_3$  (m/V) in TBS, pH 7,5) inkubiert. Die nachfolgende Inkubation mit Primär-Antikörper (Verdünnung je nach Antikörper (siehe 2.1.12), angesetzt in Blockierlösung; mehrfach verwendet) erfolgte bei leichtem Schütteln über Nacht bei 4 °C. Durch dreimaliges Waschen in TBST für je 10 min wurden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Danach folgte bei leichtem Schütteln und Raumtemperatur für 2-4 h die Inkubation mit

Peroxidase-gekoppeltem, gegen den Primär-Antikörper gerichteten Sekundär-Antikörper (Verdünnung 1:2000, angesetzt in TBS mit 5 % Milchpulver; nur einmal verwendet). Die Membran wurden erneut dreimal 10 min in TBST und anschließend zweimal 5 min in TBS gewaschen.

Eine Ausnahme unter den Primärantikörpern stellte der Human-Fc-spezifische Antikörper von Sigma-Aldrich dar, der direkt Peroxidase-gekoppelt ist und daher wie die Sekundärantikörper direkt in TBS mit 5 % Milchpulver (Verdünnung 1:3000 - 1:4000) angesetzt und nur einmal verwendet wurde. Der erste Waschschrift zwischen Primär- und Sekundärantikörperinkubation entfiel daher. Die Inkubation erfolgte hier für 3-4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C.

Die Detektion der an die Proteine gebundenen Antikörper erfolgte mittels Peroxidase-katalysierter Chemilumineszenz-erzeugender Reaktion durch Zugabe von „Lumi Light (PLUS) Western Blotting Substrate“ (= ECL-Reagenz) von Roche auf die Membran und Visualisierung sowie digitale Aufnahme des Chemilumineszenz-signalen im „VersaDoc“ Gerät von BioRad mit Hilfe des Programms „Quantity One“.

Bei Verwendung von Antikörpern, an die das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war, erfolgte die Detektion mit Hilfe von BCIP/NBT (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitro-tetrazolium Blue chloride), einem artifiziellen, chromogenen Substrat der Alkalischen Phosphatase, das durch diese in einen unlöslichen schwarz-violetten Niederschlag auf der Membran verwandelt wird, wodurch zu detektierende Proteine sichtbar gemacht werden.

#### **2.2.3.14 Far-Western**

Der Far-Western ist eine Abwandlung der zuvor beschriebenen Western Blot-Analyse und bietet die Möglichkeit, Interaktionspartner eines Proteins zu identifizieren. Dabei werden die Proteine eines Proteingemischs nach vorangegangener SDS-PAGE (siehe 2.2.3.10) wie bei der Western Blot-Analyse auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit Ponceau S-Färbelösung gefärbt (siehe 2.2.3.13). Die Membran wurde dann über Nacht bei 4 °C in 1x TBS mit 5 % BSA blockiert. Statt der üblichen Inkubation mit Primärantikörper wurde die Membran mit gereinigtem Klotho-Fc inkubiert, um eine Bindung von Klotho an Interaktionspartner auf der Membran zu erreichen. Nach dem Waschen wurde statt des Sekundärantikörpers dann ein Human-Fc-spezifischer Antikörper eingesetzt, der direkt Peroxi-

dase-gekoppelt ist (Verdünnung 1:3000-1:4000, angesetzt in TBS mit 5 % Milchpulver; nur einfach verwendet) und durch den Klotho-Fc, das an Proteine auf der Membran gebunden hat, detektiert werden kann. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur. Die weiteren Waschschriffe sowie die Detektion erfolgte erneut wie in 2.2.3.13 beschrieben.

## **2.2.4 Proteinreinigung**

Humanes Klotho-Fc wurde aus dem Überstand von mit Klotho-Fc stabil transfizierten CHO-Zellen gereinigt (siehe 2.2.2.5). Um Überstände in großem Maßstab zu gewinnen, wurden die Zellen in großen Zellkulturflaschen mit drei Böden („TripleFlasks“) bei 37 ° C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Aussaat der Zellen erfolgte in serumhaltigem MEM alpha Medium. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen mit D-PBS gewaschen und ab dann in CHO-S-SFM II-Medium, einem serumfreien Medium mit geringem Proteingehalt (<100 µg/ml), kultiviert. Ca. zwei Wochen lang wurde alle drei bis vier Tage der Überstand (~ 60 ml) abgenommen und frisches CHO-S-SFM II-Medium zugegeben. Die Überstände wurde direkt in 50 ml-Röhrchen überführt und tote Zellen durch Zentrifugation für 4 min bei 4 °C und 1200 Upm separiert. Der klare Restüberstand wurde in eine sterile Flasche überführt und mit einem kommerziellen Proteaseinhibitor Cocktail versetzt, um Proteinabbau zu verhindern. Die Lagerung bis zur Reinigung erfolgte bei 4 °C. Der Klotho-Fc-Gehalt im Überstand wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse kontrolliert. Die Reinigung erfolgte dann aus 5-12 Litern Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration.

### **2.2.4.1 Affinitätschromatographie**

Die Reinigung von Klotho-Fc aus dem Zellkulturüberstand erfolgte mittels Affinitätschromatographie über eine HighTrap<sup>TM</sup> rProtein A HP Säule mit einem Säulenvolumen von 5 ml von GE Healthcare im Äkta Explorer 100 Chromatographen von GE Healthcare. Die Säule wurde vor dem Probenauftrag mit 3-fachem Säulenvolumen 1x PBS equilibriert und die Überstände durch eine VacuCap 90 PF Filtereinheit filtriert. Der Probenauftrag erfolgte über Nacht mit einer Flussrate von 3,5 ml/min. Nach erfolgreichem Probenauftrag wurde die Säule mit 5-fachen Säulen-

volumen 1x PBS gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden im Anschluss mit einem konstanten pH-Gradienten von pH 7 nach pH 3 über 15 Säulenvolumen eluiert und in Fraktionen von 2,5 ml aufgefangen. Dabei wurde der pH-Gradient durch zwei Citratpuffer mit unterschiedlichem pH-Wert erstellt (6,5 mM [Puffer A, pH 7] bzw. 45 mM [Puffer B, pH 3] Zitronensäure-Monohydrat, 43,5 mM Di-Natriumhydrogenphosphat, 0,1 M Ammoniumsulfat). Die gemäß Elutionsprofil proteinhaltigen Fraktionen (eluiert bei pH 3,75-5) wurden vereinigt und der pH-Wert schnellstmöglich mit 3 M Tris auf pH 7,5 eingestellt. Die Regeneration der Säule erfolgte mit 6 M Guanidin.

Die Proteinkonzentration der vereinigten Fraktionen wurde nach Bradford bestimmt (siehe 2.2.3.6) und die erzielte Reinheit mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung bzw. Western Blot-Analyse (siehe 2.2.3.10, 2.2.3.11, 2.2.3.13) überprüft. Das so gereinigte Klotho-Fc (Molekulargewicht: ~140 kDa) wurde dann mit Hilfe einer „Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Device“, einer Filtereinheit, die bei Zentrifugation (bei 3000 x g und 4 °C) nur Proteine mit einem Molekulargewicht unter 50 kDa durchlässt, konzentriert. Dazu wurde das Konzentrierungsmodul zuerst mit Citratpuffer A equilibriert und anschließend die Proteinfraktion nach und nach aufgeladen. Hierbei wurde immer darauf geachtet, dass nach Zentrifugation mindestens 5 ml Proteinlösung im Konzentrierungsmodul über der Filtermembran übrig blieben, damit die Proteinkonzentration in der Lösung nicht zu starken Schwankungen unterliegt. Dies kann dazu führen, dass Proteine ausfallen. Auf diese Weise wurde die Proteinlösung auf knapp 1/10 des Ausgangsvolumens (auf 3 ml) konzentriert, um eine Konzentration der Proteine im 2-3 mg/ml Bereich zu erreichen. Die komplette Proteinfraktion wurde dann in der folgenden Gelfiltration eingesetzt.

#### **2.2.4.2 Gelfiltration**

Um noch vorhandene Verunreinigungen zu entfernen und die Proteine in 1x PBS umzupuffern, wurde ein weiterer Reinigungsschritt mittels Gelfiltration über eine HiLoad Superdex Säule (200 µg, 1,6/60 cm) am Äkta Explorer 100 durchgeführt. Dazu wurde die Säule mit zweifachem Säulenvolumen (ca. 2 x 120 ml) 1x PBS equilibriert und die Proteinfraktion aus der Affinitätschromatographie geladen. Die Elution erfolgte mit 1,2-fachem Säulenvolumen 1x PBS mit 20 % Glycerol und einer Flussrate von 1 ml/min, wobei das Eluat in 1 ml-Fraktionen aufgefangen wurde. Die

gemäß Elutionsprofil proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung (siehe 2.2.3.10 und 2.2.3.11) analysiert und anschließend in zwei Pools vereinigt (Fraktion A = Fraktionen mit früher eluiertem, stärker aggregiertem Klotho-Fc; Fraktion B = Fraktionen mit später eluiertem, weniger stark aggregiertem Klotho-Fc). Die Proteinkonzentration der beiden Pools wurde nach Bradford bestimmt (siehe 2.2.3.6) und die Proteine erneut mit Hilfe einer „Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Device“ auf 1/7-1/10 des Ausgangsvolumens (auf 1-2 ml) konzentriert, um eine Konzentration der Proteine im 2-3 mg/ml Bereich zu erreichen. Die Filtereinheit wurde zuvor mit 1x PBS equilibriert und die Proben direkt auf einmal geladen. Die konzentrierten Fraktionen wurden durch einen 0,22 µm Millipore-GV Spritzenfilter sterilfiltriert. Nach abschließender Bestimmung der Proteinkonzentration und Analyse mittels SDS-PAGE, Coomassiefärbung und Western Blot-Analyse wurden die Fraktionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### **2.2.4.3 SLS (= „static light scattering“)**

Das „static light scattering“ ist eine physikalische Methode, mit der durch Messung der Intensität der Lichtstreuung eines Makromoleküls das durchschnittliche Molekulargewicht des Moleküls bestimmt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SLS-Analyse verwendet, um das Ausmaß der Aggregatbildung der gereinigten Proteine zu ermitteln. Die Analyse wurde in der Abteilung „Protein and Cell Science“ der Firma Merck durchgeführt. Die Proteinprobe (~10 µl konzentriertes, gereinigtes Protein) wurde unter Benutzung eines HPLC-Geräts der Agilent 1200 Serie über eine Superdex 200 GL Säule (GE Healthcare) getrennt. Die Messung wurde mit Hilfe eines DAWN HELEOS II Streulichtdetektor und einem Optilab rEX Brechungsindexdetektors durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Astra V Software von Wyatt Technologies.

## **2.2.5 Methoden zur Untersuchung der Proteinbindung**

### **2.2.5.1 Methoden zur Untersuchung der Bindung von Proteinen an Zellen**

#### **2.2.5.1.1 Durchflusszytometrie**

Bei der Durchflusszytometrie werden in einer Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Dabei streuen die Zellen einen Teil des Lichts, welches mittels Detektoren („Photomultiplier“) nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und ihrer Komplexität. Zugleich können in einem Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben gemessen werden. Wenn Zellen auf eine spezifische Weise mit Fluoreszenzfarbstoffen, z.B. mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern, die gegen bestimmte Oberflächenproteine gerichtet sind, markiert werden, kann man diese im Durchflusszytometer von nicht markierten Zellen unterscheiden. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser und Filter wird die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe innerhalb einer Messung erhöht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der Durchflusszytometrie verwendet, um die Bindung von Klotho an Zellen zu untersuchen. Dazu wurde gereinigtes humanes Klotho-Fc oder kommerziell erhältliches humanes Klotho-His<sub>6</sub> (R&D Systems) mit Hilfe des „Lynx Rapid RPE Antibody Conjugation Kits“ von AbD seroTec mit dem rot-fluoreszierenden Farbstoff R-Phycoerythrin (RPE) gemäß Protokoll des Herstellers markiert. Die Zellen wurden für die Durchflusszytometrie wie bei der Kultivierung von Zellen beschrieben (siehe 2.2.2.1) in 10 cm-Schalen, 6 cm-Schalen oder 6-Kavitätenplatten kultiviert und in der Regel 1-2 Tage vor dem Versuch ausgesät, so dass sie am Tag der Messung zu 90-100 % konfluent waren. Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit kaltem D-PBS gewaschen, mit einer geeigneten Menge Trypsin-EDTA (1x) von der Zellkulturschale abgelöst und in kaltem D-PBS mit 2 % BSA aufgenommen. Die Zellen wurden dann durch ein 40 µm-Zellsieb filtriert und ihre Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 2.2.2.3). Nach Zentrifugation der Zellsuspension für 5 min bei 1200 Upm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit kaltem D-PBS mit 0,1 % BSA auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml gebracht. Alle weiteren Schritte fanden auf Eis statt. Die Bindungsreaktion wurde in einem Endvolumen von 120 µl in einem 5 ml Polypropylen FACS-Röhrchen durchgeführt. Dazu wurden zuerst 10-20 µl Zell-

suspension (= 1-2 x10<sup>6</sup> Zellen) mit 48 µl 10 %iger HSA-Lösung (angesetzt in H<sub>2</sub>O, Endkonzentration 4 %) und x µl D-PBS (x = 120 µl - restlicher Reaktionsansatz - Klotho-RPE) gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe einer definierten Menge an RPE-gekoppeltem Klotho (je nach Versuch 0,01-13 µg), RPE-gekoppeltem Fc bzw. PBS als Negativkontrolle oder eines anderen kommerziell erhältlichen Fluoreszenz-markierten Antikörpers fand die Bindungsreaktion für 30-60 min auf Eis statt, wobei der Ansatz alle 10-15 min gemischt wurde. Die Zellen wurden bei 1200 Upm und 4 °C zentrifugiert und anschließend dreimal in 3 ml kaltem D-PBS mit 0,1 % BSA gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 700 µl D-PBS mit 0,1 % BSA aufgenommen, 7 µl 1 µM Sytox Green (= Todzellmarker, Enkonzentration 10 nM) zugegeben und die Zellen im Durchflusszytometer FACScan von Becton-Dickinson gemessen. Die Messung und Auswertung erfolgten mit Hilfe des Programms CellQuest.

#### **2.2.5.1.2 Bindung von <sup>125</sup>Iod-markierten Proteinen an Zellen**

Durch die Markierung von Proteinen mit <sup>125</sup>Iod ist es möglich, ihre Bindung an Zellen mit Hilfe eines  $\gamma$ -Zählers nachzuweisen. Diese Methode bietet dementsprechend bei der Analyse der Bindungen von Proteinen an Zellen eine Alternative zur beschriebenen Durchflusszytometrie, jedoch mit dem Nachteil des notwendigen Umgangs mit Radioaktivität.

Um die Bindung von Klotho an Zellen zu untersuchen, wurde gereinigtes Klotho-Fc bzw. Fc als Negativkontrolle durch die Firma Biotrend mit <sup>125</sup>Iod markiert. Die Zellen wurden in 96-Kavitätenplatten in serumhaltigem Kulturmedium so ausgesät, dass sie 2-3 Tage später zu 80-100 % konfluent waren. Vor der Bindungsreaktion wurden die Zellen viermal auf Eis mit je 200 µl eiskaltem D-PBS gewaschen. Die Zugabe der mit <sup>125</sup>Iod-markierten Liganden (1-600 nM) bzw. markiertem Ligand mit 100- bis 1000-fachem Überschuss an unmarkiertem Ligand erfolgte in 50 µl eiskaltem D-PBS, gefolgt von einer 4-stündigen Inkubation auf einem Wippschüttler bei 4 °C. Die folgende Lyse der Zellen fand auf Eis statt. Die Ligandenlösung wurde abgenommen, die Zellen dreimal sehr schnell mit je 100 µl eiskaltem D-PBS gewaschen und die Lyse der Zellen durch Zugabe von 100 µl 1 M NaOH ausgelöst. Das Lysat wurde abgenommen und in für den  $\gamma$ -Zähler geeignete Röhrchen überführt. In den Kavitäten verbliebene Zellreste wurden in 100 µl D-PBS aufgenommen und mit dem NaOH-

Lysat vereinigt. Die Menge an gebundener Radioaktivität wurde im  $\gamma$ -Zähler gemessen.

### 2.2.5.2 Biacore

Die Biacore-Technologie basiert auf der „Surface Plasmon Resonance“ und ermöglicht die Analyse von Bindungsspezifitäten und -affinitäten von Proteinen sowie die Untersuchung des kinetischen Verlaufs molekularer Wechselwirkungen (Schindler, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Biacore-Studien mit dem Biacore 3000 Gerät durchgeführt, um eine beschriebene mögliche Bindung von Klotho-Fc an den IGF1R nachzuweisen. Dazu wurde kommerziell erhältlicher IGF1R (R&D Systems) auf der Oberfläche eines Sensor Chip CM5 wie folgt immobilisiert: die CM-Dextran-Matrix wurde mit *N*-ethyl-*N*'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (EDC) und *N*-hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. Als Laufpuffer diente HBS-N Puffer (aus 10x HBS-N mit MilliQ-H<sub>2</sub>O angesetzt, durch einen 0,22  $\mu$ M Filter filtriert und entgast). Der IGF1R (50  $\mu$ g/ml) wurde in 10 mM Acetatpuffer pH 5,5 (optimaler Puffer wurde durch vorherige Testungen verschiedener pH-Werte ermittelt) mit Hilfe des „aiming“-Programms bis zu einem finalen Immobilisierungslevel von 2000 bzw. 3000 RU („response units“) immobilisiert. Nach der Immobilisierung des IGF1R wurden die restlichen reaktiven Stellen mit 1 M Ethanolamin-HCl (pH 8,5) geblockt. Als Laufpuffer für die folgenden Bindungsversuche diente HBS-EP+ (aus 10x HBS-EP+ mit MilliQ-H<sub>2</sub>O angesetzt, durch einen 0,22  $\mu$ M Filter filtriert und entgast). Die Qualität der IGF1R-Oberfläche wurde durch Bindung von IGF1 an diese getestet. Dazu wurde in HBS-EP+ eine 1:2 Verdünnungsreihe angesetzt, die einen Konzentrationsbereich von 6,5-1666,7 nM IGF1 abdeckte. Als Negativkontrolle für die Spezifität der Bindung diente die Bindung von EGF (eingesetzte Konzentration 12,5  $\mu$ g/ml), das nicht zu den Liganden des IGF1R gehört. Die Bindung von Klotho an den auf der Oberfläche immobilisierten IGF1R wurde sowohl mit Klotho-Fc als auch mit Klotho-His<sub>6</sub> getestet. Beide Klothovarianten wurden in einer Konzentration von 83,3 nM eingesetzt. Die Daten wurden mit Hilfe der Programme BiaEvaluation und GrapPad Prism ausgewertet.

### **2.2.6 Bestimmung der Glucuronidaseaktivität**

Die Messung der Glucuronidaseaktivität von Klotho wurde in einem Reaktionspuffer (0,5 mM 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronidhydrat, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,5, 0,05 M NaCl, 0,01 % Tween 20 (V/V)) durchgeführt, der das Glucuronidasesubstrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronidhydrat (4Mu- $\beta$ -D-GlcU) enthält. Dieses Substrat wird durch Glucuronidasen zum fluoreszierenden Methylumbelliferon (MU) und dem korrespondierenden Glucuronid hydrolysiert. Die Fluoreszenzintensität des Methylumbelliferon kann bei 355 nm gemessen und als Maß für die Glucuronidaseaktivität des eingesetzten Proteins verwendet werden. Als Positivkontrolle wurde kommerziell erhältliche  $\beta$ -Glucuronidase (aus Rinderleber) eingesetzt, von der bekannt ist, dass sie 4Mu- $\beta$ -D-GlcU spaltet. Für die Messung wurde eine 2-fach konzentrierte Lösung des Reaktionspuffers angesetzt. Es wurden 10 bzw. 20  $\mu$ g Klotho bzw. 10  $\mu$ g (= 10 U)  $\beta$ -Glucuronidase als Positivkontrolle pro 100  $\mu$ l Gesamtansatz eingesetzt. Klotho- bzw.  $\beta$ -Glucuronidaseverdünnungen wurden in D-PBS angesetzt. In eine 96-Kavitätenplatte wurden jeweils 50  $\mu$ l der Proben bzw. der Positivkontrolle vorgelegt. Als Leerwert diente 50  $\mu$ l D-PBS. Durch Zugabe von je 50  $\mu$ l 2-fach Reaktionspuffer wurde die Reaktion gestartet. Die Platte wurde für mehrere Stunden bei 37 °C inkubiert und zwischendurch in regelmäßigen Abständen die Fluoreszenzintensität am Mithras Plattenlesegerät bei 355 nm (= Anregungswellenlänge, Emissionswellenlänge: 460 nm) gemessen. Die Erstellung einer Aktivitätskinetik erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism.

### 3. Ergebnisse

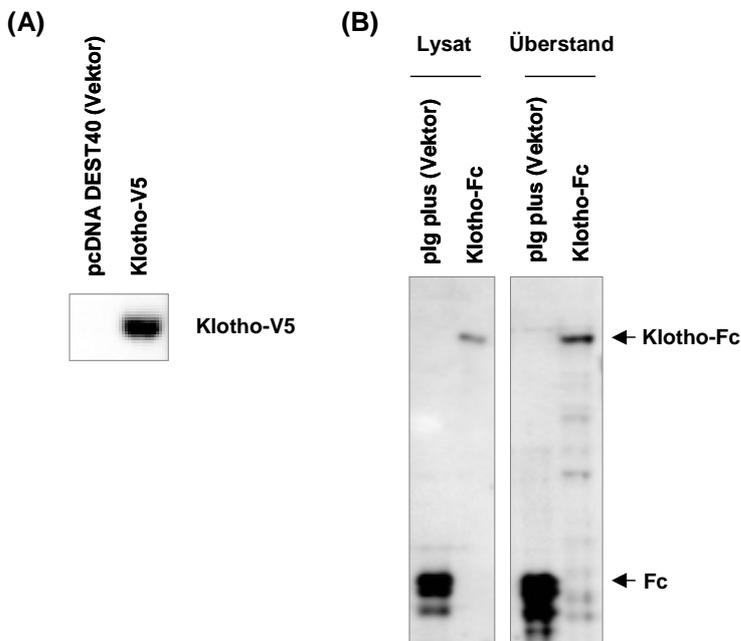
#### 3.1 Klonierung verschiedener Klothovarianten und Generierung einer mit Klotho stabil transfizierten Zelllinie

##### 3.1.1 Herstellung und Expression von Klothovarianten mit unterschiedlichem „Tag“

Um funktionelle Studien zur Signaltransduktion von Klotho durchführen zu können, wurden als Erstes mit Hilfe eines vorhandenen Expressionsplasmids für Säugetierzellen, das für die Transmembranform von Klotho codiert (pCMV6-XL4-Klotho), verschiedene Klothovarianten mit unterschiedlichem „Tag“ kloniert. Für die transiente Transfektion von Zellen und folgende Immunpräzipitationen sowie „Pull-Down“-Experimente wurde mittels Gateway Klonierung Klotho-V5, ein Protein, das aus der vollständigen Sequenz des humanen Klothoproteins und einem C-terminalen V5-„Tag“ besteht, hergestellt. Zusätzlich wurde Klotho-Fc generiert, das sich aus dem extrazellulären Teil des humanen Klothoproteins (AS 1-982) und einem C-terminalen Fc-„Tag“ zusammensetzt. Die Klonierung erfolgte durch eine Kombination aus TOPO-Klonierung und klassischer Klonierung. Diese verkürzte Klothovariante diente vor allem der Reinigung einer löslichen extrazellulären Form des Klothoproteins (siehe 3.2) aus dem Überstand von zuvor mit dieser Variante stabil transfizierten CHO-Zellen.

Die Expression der beiden Varianten wurde durch transiente Transfektion von HEK293T-Zellen und Western Blot-Analyse überprüft. Sowohl für Klotho-V5 als auch für Klotho-Fc konnte eine Expression 48 h nach Transfektion nachgewiesen werden (Abb. 6). Dabei wurde die Expression von Klotho-V5 lediglich im Lysat gezeigt, da es sich hierbei um die Transmembranform von Klotho handelt, die im Lysat zu finden sein sollte. Klotho-Fc dagegen wurde sowohl im Lysat als auch im Überstand nachgewiesen, da es sich um die extrazelluläre Domäne von Klotho handelt, die erwarteter Weise in den Überstand abgegeben wird. Bei dem im Lysat nachweisbaren Anteil an Klotho-Fc, handelte es sich wahrscheinlich um neu gebildetes Protein sowie Protein auf dem Weg zur Zellmembran, durch die es aus der Zelle ausgeschleust wird. Bei der Transfektion mit dem Leervektor pIg plus (= Negativkontrolle)

war wie zu erwarten lediglich eine deutliche Expression des Fc-Proteins allein erkennbar.



**Abb. 6: Nachweis der Expression von verschiedenen Klotho-varianten.** (A) HEK 293T-Zellen wurden mit Leervektor (pcDNA DEST40) oder Klotho-V5 transfiziert und 48 h nach Transfektion lysiert. Die Expression von Klotho-V5 wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit einem V5-Antikörper nachgewiesen. (B) HEK 293T-Zellen wurden mit Leervektor (plg plus) oder Klotho-Fc transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Überstände abgenommen und die Zellen lysiert. Die Expression von Klotho-Fc im Überstand und Lysat wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit einem Fc-Antikörper nachgewiesen.

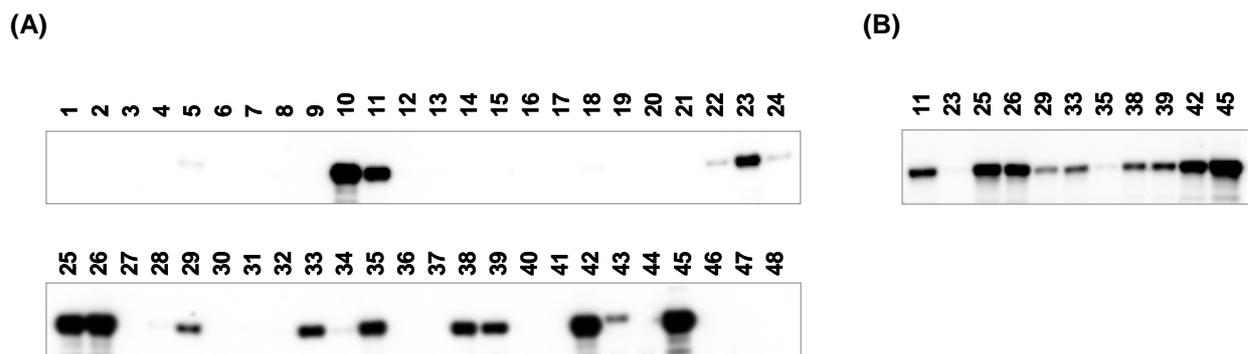
Für weitere Studien, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten, wurde zusätzlich Klotho-GFP, ein Protein, das aus der vollständigen Sequenz des humanen Klothoproteins und einem C-terminalem GFP-„Tag“ besteht, mittels klassischer Klonierung und die Klotho-Domänen hKL1 (AS 57-506) und hKL2 (AS 515-953) mit C-terminalem GST-„Tag“ mittels Gateway Klonierung hergestellt.

### 3.1.2 Generierung eines mit Klotho-Fc stabil transfizierten CHO-Klons

Um im Folgenden eine lösliche extrazelluläre Form des Klothoproteins gewinnen zu können, wurde eine Zelllinie generiert, die stabil die extrazelluläre Variante des humanen Klothoproteins mit Fc-„Tag“ exprimiert.

Aufgrund der guten Transfizierbarkeit, der bekannten vorteilhaften Eigenschaften als Produktionszelllinie für rekombinante Proteine und um spätere Kreuzreaktionen durch endogenes humanes Klothoprotein zu verhindern, wurde die Hamsterzelllinie CHO gewählt. Die Zellen wurden mit dem Vektor plg plus-Klotho-Fc, der ein Resistenzgen für das Antibiotikum G418 besitzt, transfiziert und anschließend Klone, die Klotho stabil exprimieren, mit G418-haltigem Kulturmedium selektiert. 48 Klone wurden ausgewählt, vereinzelt und weiter kultiviert. Da es sich bei der eingeführten Klotho-

Variante um den extrazellulären Teil des humanen Klothoproteins handelt, sollte das Protein kontinuierlich in den Überstand der CHO-Zellen abgegeben werden und dort nachweisbar sein. Klotho-Fc im Überstand konnte sowohl mit Hilfe eines selbst etabliertem quantitativen Fc-ELISAs (Daten nicht gezeigt) als auch mittels Western Blot-Analyse mit einem Fc-Antikörper (Abb. 7) bzw. mit selbst generierten polyklonalen Klotho-Antikörpern (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden. Zwei bis drei Wochen nach der Transfektion zeigten zwölf der 48 Klone (Klon 10, 11, 23, 25, 26, 29, 33, 35, 38, 39, 42 und 45) eine starke und sieben Klone (Klon 5, 22, 24, 28, 34 und 43) eine schwächere Expression von Klotho-Fc (Abb. 7A). Elf der Klone, die größere Mengen an Klotho im Überstand aufwiesen, wurden weiter kultiviert und die Expression zehn bis elf Wochen nach Transfektion erneut kontrolliert (Abb. 7B). Von diesen zeigte Klon 45 die stärkste und stabilste Expression und wurde daher für die folgende Herstellung von Klotho-Fc ausgewählt.



**Abb. 7: Nachweis von Klotho-Fc im Überstand stabil transfizierter CHO-Klone.** Mit Klotho-Fc transfizierte CHO-Zellen wurden zur Selektion stabiler Klone in G418-haltigem Kulturmedium kultiviert. Im Überstand vereinzelter Klone wurde Klotho-Fc **(A)** 2-3 Wochen bzw. **(B)** 10-11 Wochen nach Transfektion mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit einem Fc-Antikörper nachgewiesen, um Klone zu identifizieren, die Klotho-Fc stabil exprimieren und in den Überstand abgeben.

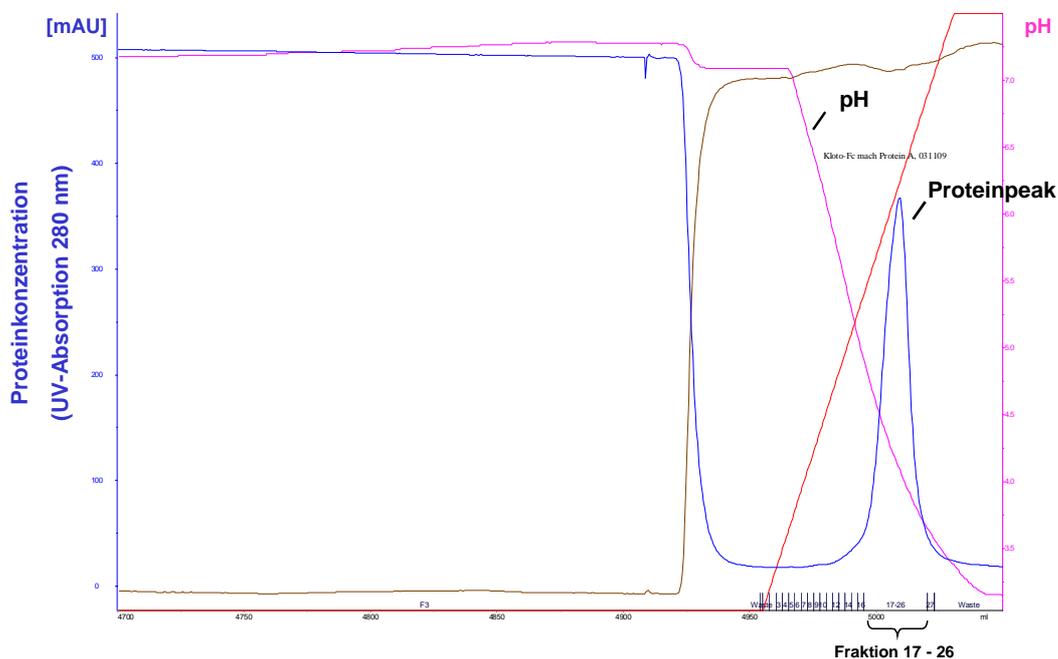
## 3.2 Reinigung von Klotho-Fc und Nachweis der Aktivität des aufgereinigten Proteins

### 3.2.1 Reinigung von Klotho-Fc mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration

Die folgende Reinigung von Klotho-Fc erfolgte aus mehreren Gründen. Zum einen sollte das gereinigte Protein für die Stimulation und Behandlung von Zellen

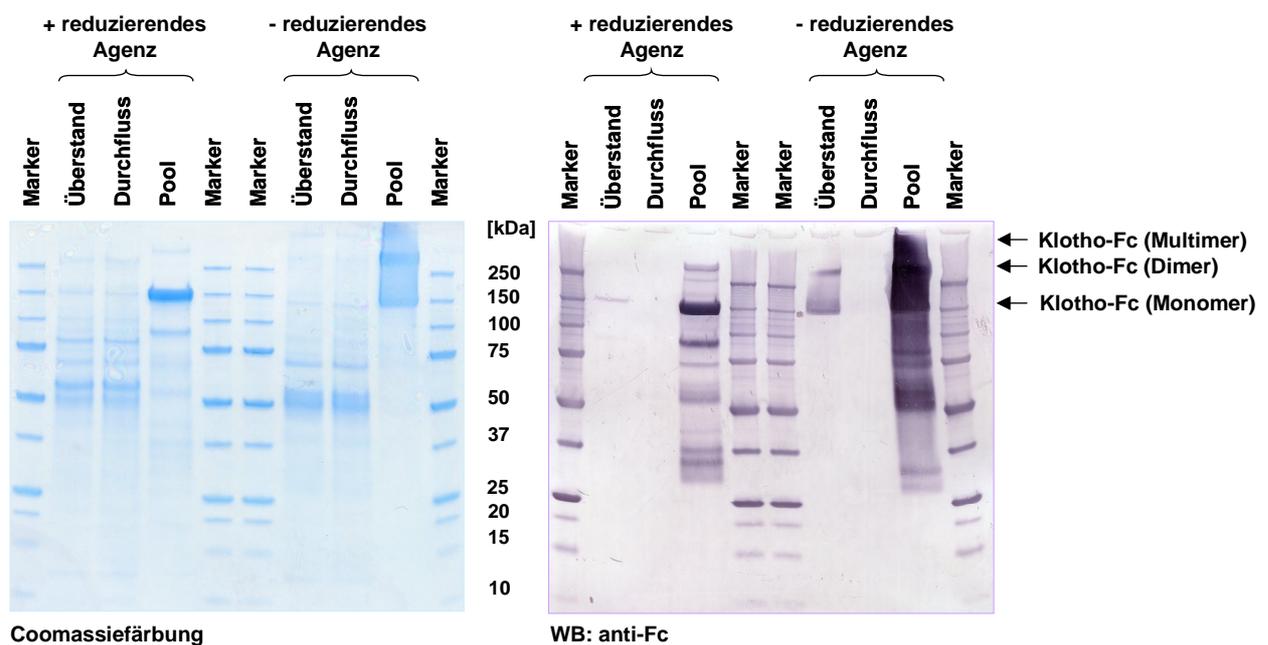
eingesetzt werden, um durch Klotho beeinflusste Signalwege zu untersuchen. Zum anderen sollte die Bindung des Proteins an Zellen charakterisiert werden, mit dem finalen Ziel, einen Rezeptor zu identifizieren, an den Klotho bindet und durch dessen Bindung die Inhibition des IGF1-Signalweges durch Klotho (beschrieben von Kurosu *et al.*, 2005) vermittelt wird. Dazu gehörte u.a. der Einsatz von Klotho-Fc in „Pull-Down“-Experimenten zur Identifizierung eines Klotho-Interaktionspartners (= potentieller Rezeptor). Für diese Experimente wurde die extrazelluläre Domäne von Klotho gewählt, da die meisten bereits beschriebenen Funktionen von Klotho (siehe Abb. 4), wie z.B. die Inhibition des IGF1-Signalweges, durch die extrazelluläre Domäne vermittelt werden. Von mehreren Proteinproduktionen, die während dieser Arbeit durchgeführt wurden, wird im Folgenden eine unter optimierten Bedingungen durchgeführte Reinigung exemplarisch beschrieben.

Die Isolierung des Proteins erfolgte im ersten Schritt aus dem Überstand des stabil transfizierten CHO-Klons 45 mittels Affinitätschromatographie über eine Protein A Säule. Die Elution fand über einen konstanten pH-Gradienten statt, der mit Hilfe von zwei Citratpuffern mit unterschiedlichem pH (pH 7 und pH 3) erstellt wurde.



**Abb. 8: Chromatogramm der Reinigung von Klotho-Fc mittels Affinitätschromatographie über eine Protein A Säule.** Die Reinigung von Klotho-Fc erfolgte aus dem Überstand mit Klotho-Fc stabil transfizierter CHO-Zellen über eine HiTrap rProtein A 4 FF-Säule (Säulenvolumen: 5 ml) von GE Healthcare. Gebundenes Klotho-Fc wurde über einen konstanten pH-Gradienten von pH 7 nach pH 3, erstellt mit Hilfe von zwei Citratpuffern (6,5 mM [Puffer A, pH 7] bzw. 45 mM [Puffer B, pH 3] Zitronensäure-Monohydrat, 43,5 mM Di-Natriumhydrogenphosphat, 0,1 M Ammoniumsulfat), eluiert und in Fraktionen von 2,5 ml aufgefangen. Die proteinhaltigen Fraktionen 17-26 wurden zu einem Pool vereinigt. Blaue Kurve: UV-Absorption des Eluats in mAU (milli Absorbance Units)  $\Rightarrow$  Proteinkonzentration des Eluats, magenta Kurve: pH-Wert, rote Linie: Konzentration des pH-Gradienten in Prozent, braune Kurve: elektrische Leitfähigkeit in mS/cm, schwarze Striche: Unterteilung in Fraktionen.

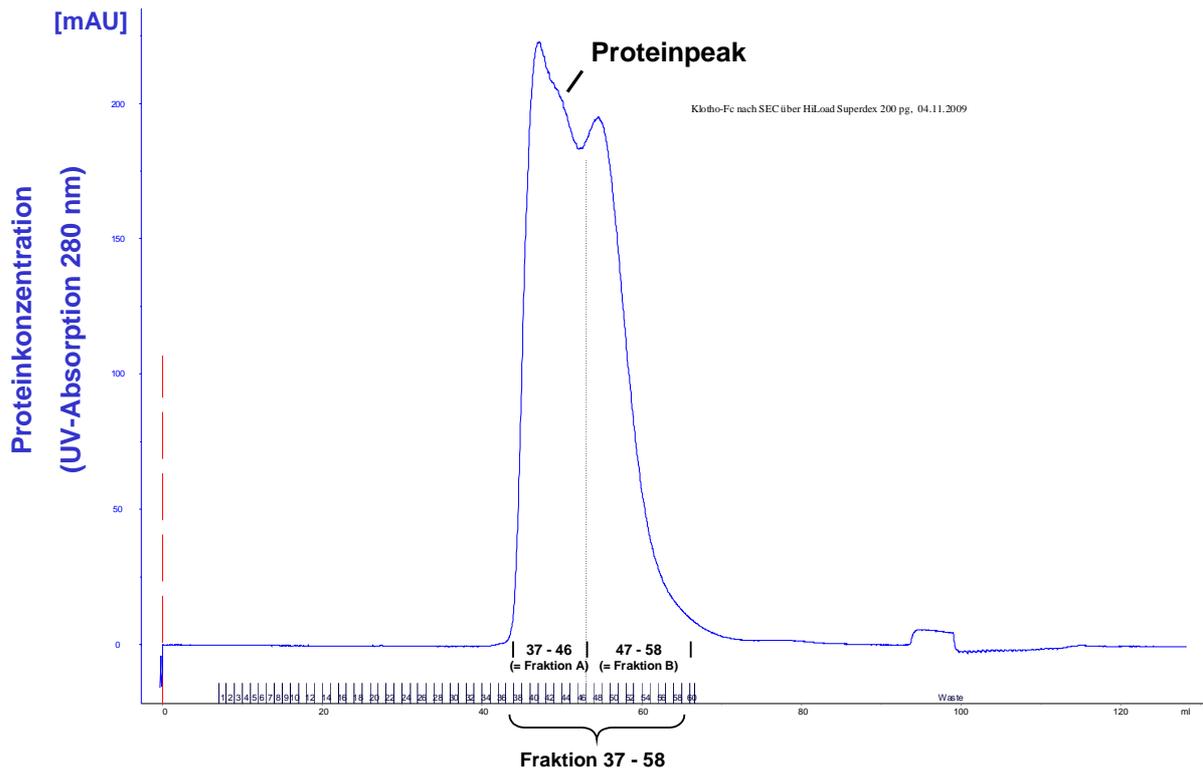
Anhand des Chromatogramms (Abb. 8) war erkennbar, dass an die Säule gebundene Proteine bei einem pH zwischen 5,5 und 3,75 eluiert wurden, wobei der pH-Wert als magentafarbene Linie dargestellt ist und eluiertes Protein anhand des spitzen, blauen „Peaks“ erkennbar ist. Dieser „Peak“ beginnt bei Fraktion 12 und endet etwa mit Fraktion 27. Die Fraktionen 17 bis 26, die den Großteil des Proteins enthielten, wurden zu einem „Pool“ vereinigt. Die Analyse der bisherigen Reinigung erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung bzw. Western Blot-Analyse (Abb. 9).



**Abb. 9: Kontrolle der Reinigung von Klotho-Fc mittels Affinitätschromatographie.** Aliquots des Überstandes, des Durchflusses und der vereinten Fraktionen 17-26 (= „Pool“) der chromatographischen Reinigung von Klotho-Fc wurden unter Zugabe eines reduzierenden Agenzes bzw. ohne dieses mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Reinigung des Proteins mit Hilfe von Coomassiefärbung bzw. Western Blot-Analyse mit einem Fc-Antikörper überprüft. Als Größenmarker diente der „Precision Plus Protein™ Standard“ von BioRad.

Diese zeigte, dass Klotho-Fc gut an die Säule gebunden hatte, da sich nur eine geringe Menge des Proteins, das in Höhe der 150 kDa Markerbande erkennbar war, im Durchfluss befand. Ebenso ist eine gute Anreicherung der Proteine aus dem Überstand erkennbar, da die Klotho-Fc Bande des „Pools“ deutlich stärker war als die des Überstandes. Darüber hinaus sind viele im Überstand und Durchfluss enthaltene weitere Banden unter- und oberhalb von Klotho-Fc, die andere Proteine enthielten, im „Pool“ nicht mehr erkennbar (siehe Coomassiefärbung). Bei Banden die unterhalb der Klotho-Fc Bande im Western Blot zu sehen waren, handelte es sich

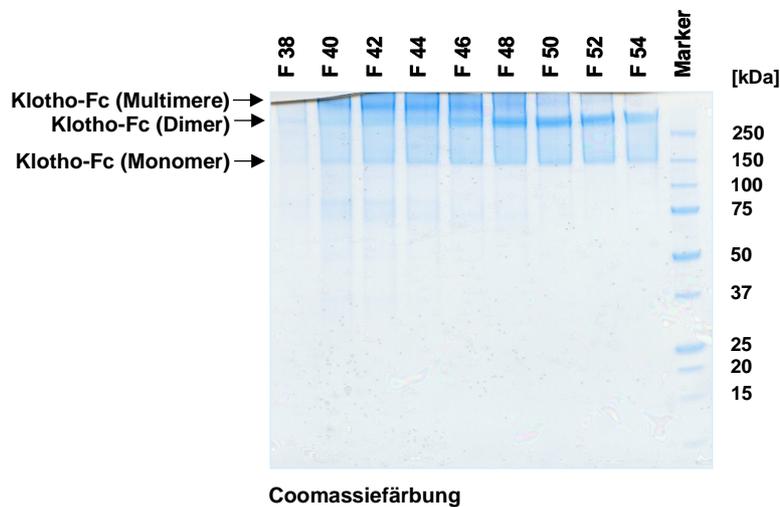
wahrscheinlich um Abbauprodukte des Klothoproteins. Anhand der Proben, die nicht mit reduzierendem Agens versetzt wurden, konnte man sowohl in der Coomassiefärbung als auch im Western Blot sehen, dass Klotho nach diesem ersten Reinigungsschritt zum Großteil als Mono- und Dimer vorlag und nur ein geringer Teil Multimere gebildet hatte.



**Abb. 10: Chromatogramm der Reinigung von Klotho-Fc mittels Gelfiltration.** Die weitere Reinigung von Klotho-Fc erfolgte mittels Gelfiltration über eine HiLoad Superdex Säule (200 µg, 1,6/60cm) von GE Healthcare. Als Puffer diente 1 x PBS mit 20 % Glycerol. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1 ml aufgefangen. Blaue Kurve: UV-Absorption des Eluats in mAU (milli Absorbance Units) ⇒ Proteinkonzentration des Eluats, schwarze Striche: Unterteilung in Fraktionen.

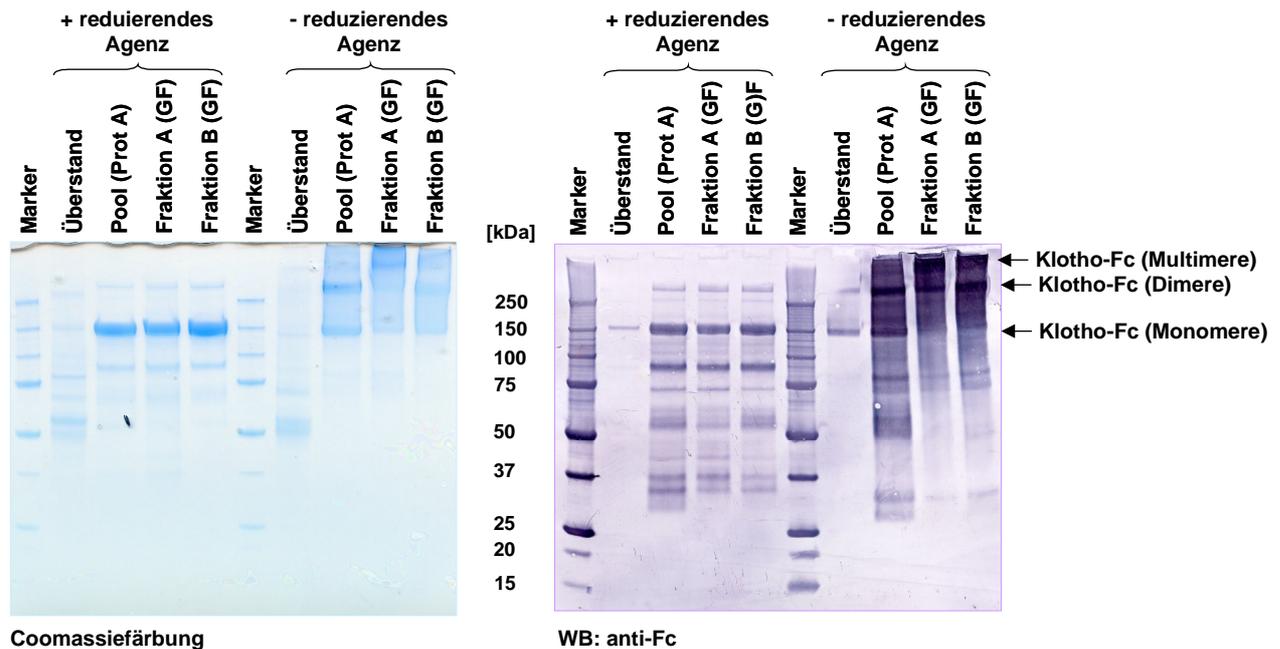
Um noch vorhandene Verunreinigungen durch andere Proteine abzutrennen, wurde ein zweiter Reinigungsschritt mittels Gelfiltration angeschlossen. Das zugehörige Chromatogramm (Abb. 10) zeigte eine hohe Proteinkonzentration in Fraktion 37 bis 58, erkennbar anhand des deutlichen „Peaks“. Jede zweite dieser proteinhaltigen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert (Abb. 11). Da die zuerst eluierten Fraktionen sehr viele Multimere und nur wenig Dimere oder Monomere enthielten und der Anteil an Multimeren in den späteren Fraktionen deutlich abnahm, wurde beschlossen die Fraktionen in zwei getrennten „Pools“ zu vereinigen. Dabei wurden die Fraktionen 37 bis 46 in Fraktion A und die Fraktion 47 bis

58 in Fraktion B zusammengefasst, damit im Fall eines negativen Einflusses der Multimerbildung auf die Aktivität des Proteins die Möglichkeit bestand, mit dem weniger aggregierten Protein aus Fraktion B zu arbeiten.



**Abb. 11: Kontrolle der Reinigung von Klotho-Fc mittels Gelfiltration.** Aliquots jeder zweiten proteinhaltigen Fraktion der Reinigung von Klotho-Fc mittels Gelfiltration wurden ohne vorherige Zugabe eines reduzierenden Agens mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Reinigung des Proteins durch Coomassiefärbung überprüft. Als Größenmarker diente der „Precision Plus Protein™ Standard“ von BioRad.

Bei der abschließenden Analytik mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung sowie Western Blot-Analyse (Abb. 12) war keine deutliche weitere Reinigung durch die Gelfiltration im Vergleich zur Probe direkt nach der Affinitätschromatographie über die Protein A Säule erkennbar. Das Bandenmuster der Coomassiefärbung vor und nach der Gelfiltration stimmte überein. Vergleicht man die Banden ober- und unterhalb der ~ 150 kDa Klotho-Fc Bande jedoch mit den Banden aus dem Western Blot, handelte es sich bei diesen wahrscheinlich nicht um Verunreinigungen sondern lediglich um Abbau (Banden unter 150 kDa) bzw. Multimere (Banden über 150 kDa) des Klothoproteins. Zur Detektion noch vorhandener Verunreinigungen war die angewandte Analytik demnach nicht sensitiv genug oder es waren keine anderen Proteine als Klotho-Fc mehr vorhanden. Jedoch wurde ein negativer Effekt der Gelfiltration sichtbar. Die Proteine lagen nach dieser stärker aggregiert vor als vorher. Der Anteil an Multimeren war deutlich gestiegen, wohingegen der Anteil an Monomeren deutlich abgenommen hatte. Die Menge an Dimeren war jedoch ungefähr gleich geblieben (siehe Western Blot).



**Abb. 12: Kontrolle der Reinigung nach Affinitätschromatographie, Gelfiltration und Konzentrierung der Proteine.** Aliquots der einzelnen Reinigungsschritte der gesamten Reinigung von Klotho-Fc wurden unter Zugabe eines reduzierenden Agens bzw. ohne dieses mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Reinigung des Proteins mittels Coomassiefärbung bzw. Western Blot-Analyse mit einem Fc-Antikörper überprüft. Als Größenmarker diente der „Precision Plus Protein™ Standard“ von BioRad. Pool nach Prot A = vereinte Fraktionen 16-27 der Affinitätschromatographie über eine Protein A-Säule, Fraktion A nach GF = vereinte Fraktionen 37-46 der Gelfiltration, Fraktion B nach GF = vereinte Fraktionen 47-58 der Gelfiltration.

### 3.2.2 SLS („static light scattering“)-Analyse und Nachweis der Aktivität des gereinigten Klothoproteins

#### 3.2.2.1 SLS („static light scattering“)-Analyse

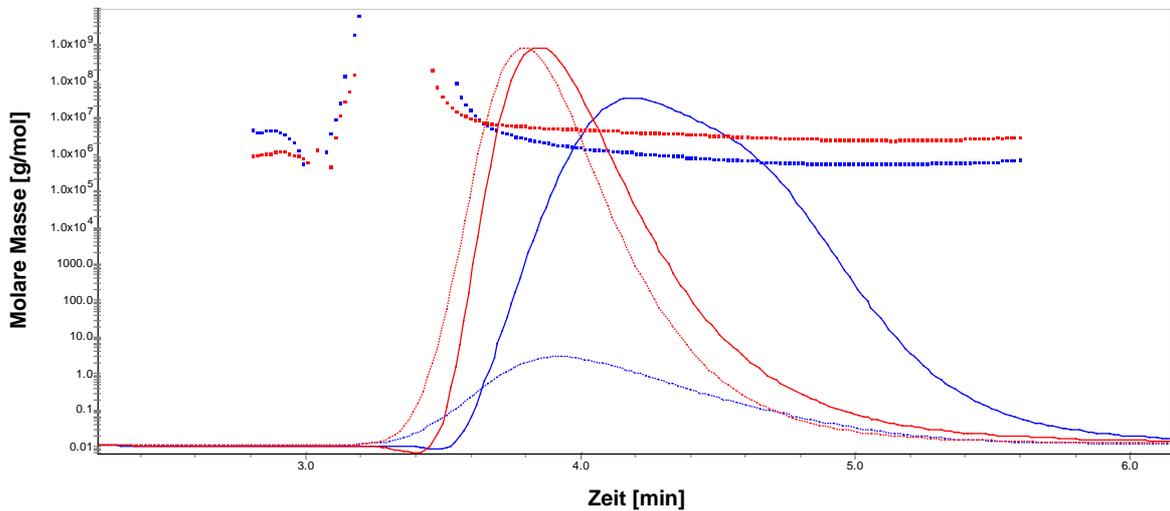
Da bei der abschließenden Analyse der Reinigung mittels SDS-PAGE keine native Gelelektrophorese durchgeführt wurde, sondern den Proteinen lediglich kein reduzierendes Agens zugesetzt, sie jedoch aufgeköcht und mit SDS beladen wurden, kann man davon ausgehen, dass die Proteine nicht mehr im nativen Zustand vorlagen. Daher ist es sowohl möglich, dass im Gel weniger oder aber mehr Aggregatbildung erkennbar war, als in der Lösung tatsächlich vorlag. Deshalb wurde zusätzlich eine SLS-Analyse des gereinigten Klotho-Fc durchgeführt, um einen Eindruck vom Ausmaß der Aggregation des gereinigten Proteins zu erhalten.

Proteine beider Fraktionen befanden sich bei der SLS-Analyse im Ausschlussvolumen der Säule, d.h. es handelte sich um Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 200 kDa, was bedeutet, dass keine Monomere von Klotho-Fc vorlagen. Dies ist jedoch aufgrund der zu erwartenden Dimerisierung durch den Fc-„Tag“ nachvollziehbar. Die Ergebnisse der SLS-Analyse beider Proteinfractionen sind in Abb. 13 graphisch dargestellt.

Da das Lichtstreuungssignal (gestrichelte Linie) proportional zum Molekulargewicht und der Konzentration der untersuchten Proteine ist und bei beiden Fraktionen die gleiche Menge an Proteinlösung mit ungefähr der gleichen Konzentration auf die Säule aufgetragen wurde, kann man schlussfolgern, dass Proteine in Fraktion A im Durchschnitt ein höheres Molekulargewicht als Proteine in Fraktion B aufwiesen. Dies ist anhand des deutlich höheren „Peaks“ erkennbar. Damit übereinstimmend ergab die genaue Analyse der Messung (Daten nicht gezeigt), dass Fraktion A größere Multimere mit entsprechend hohem Molekulargewicht und Fraktion B kleinere Multimere (Oligomere) bis hin zu Dimeren enthielt. Im Durchschnitt gesehen handelte es sich bei Fraktion B um Tetramere. Die stärkere Aggregation der Proteine in Fraktion A war wahrscheinlich auch der Grund dafür, warum diese schneller durch die Säule liefen als Proteine der Fraktion B, erkennbar anhand der Proteinkonzentrations-„Peaks“ (durchgezogene Linien). Proteine der Fraktion A wurden zeitlich eher detektiert als Proteine der Fraktion B. Je größer die Proteine desto schlechter werden sie von den Poren der Säule festgehalten und desto schneller laufen sie durch. Anhand der Molekulargewichtsverteilung (gepunktete Linie) ist wiederum erkennbar, dass beide Fraktionen wie erwartet polydispers waren, d.h. Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht enthielten. Monodisperse Proteinproben würden in der graphischen Darstellung eine exakt waagrechte Linie ergeben. Dies war bei beiden Fraktionen nicht der Fall.

Sowohl die Polydispersität als auch die vorhandene Oligomerisierung der Proteine stimmt mit den Ergebnissen der vorhergegangenen Analyse mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung bzw. Western Blot überein. Die teilweise starke Oligomerisierung der Proteine sollte für spätere Versuche nicht unbedingt ein Problem darstellen, da zum einen Klotho zur Familie der  $\beta$ -Glucosidasen gehört und diese von Natur aus die Tendenz haben, zu dimerisieren (Mian, 1998) und zum anderen bereits durch Imura *et al.* (2004) nachgewiesen wurde, dass Klotho in der Zelle mit sich selbst assoziiert und in der extrazellulären Flüssigkeit Oligomere bildet. Daher spiegelt eine Oligo-

merisierung der Proteine, genauer gesagt der extrazellulären Domäne, möglicherweise den natürlichen Zustand des Proteins wider. Um jedoch sicher zu sein, dass die Oligomerisierung des gereinigten Proteins keine negativen Auswirkungen auf seine Aktivität hat, wurde diese in den folgenden Versuchen überprüft.

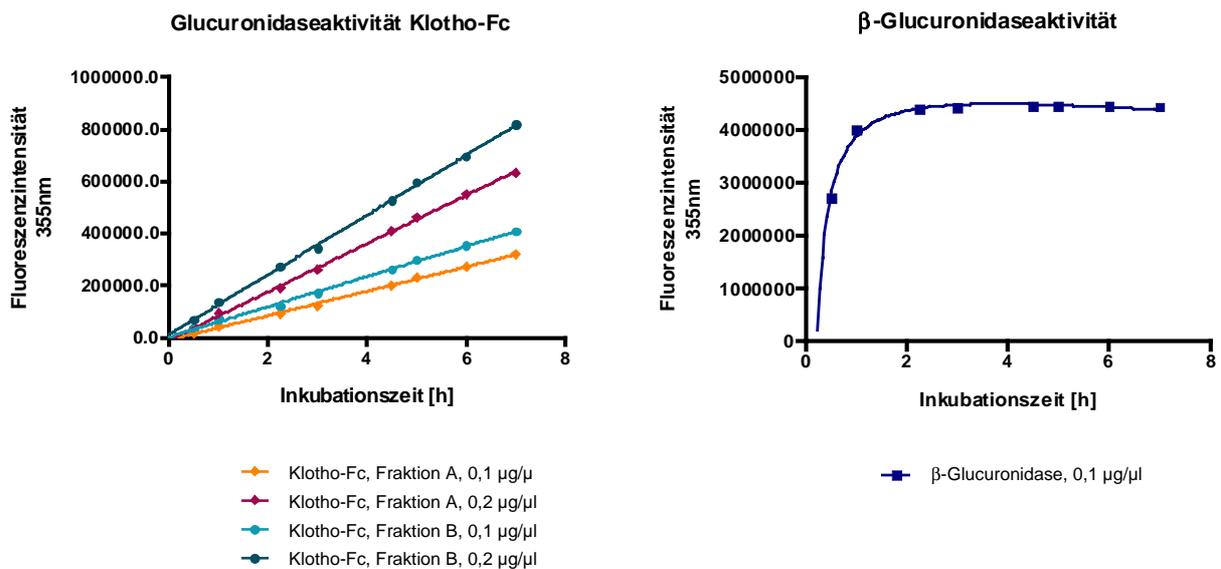


Fraktion A: — dRI Signal (Proteinkonzentration) - - MALS Signal (Lichtstreusignal) ····· Molare Masse (Molekulargewichtsverteilung)  
 Fraktion B: — dRI Signal (Proteinkonzentration) - - MALS Signal (Lichtstreusignal) ····· Molare Masse (Molekulargewichtsverteilung)

**Abb. 13: SLS („static light scattering“)-Analyse des gereinigten Klotho-Fc.** Gereinigtes Klotho-Fc wurde unter Benutzung eines Agilent 1200 HPLC Systems über eine Superdex 200 GL Säule von GE Healthcare getrennt und das Lichtstreusignal mit Hilfe eines DAWN HELEOS II Streulichtdetektors und eines Optilab rEX Brechungsindexdetektors gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Astra V Software von Wyatt Technologies. Durchgezogene Linie: dRI („differential reflective index“)-Signal  $\Rightarrow$  Proteinkonzentration, gestrichelte Linie: MALS-Signal = Lichtstreusignal, gepunktete Linie: Molare Masse [g/mol]  $\Rightarrow$  Molekulargewichtsverteilung, rot = Fraktion A, blau = Fraktion B.

### 3.2.2.2 Nachweis der Glucuronidaseaktivität des gereinigten Klothoproteins

Um nachzuweisen, dass es sich bei dem gereinigten Klotho-Fc um ein natives aktives Protein handelt, wurde als Erstes die enzymatische Aktivität des Proteins untersucht. Bereits 2004 wurde von Tohyama *et al.* eine *in vitro* Glucuronidaseaktivität von Klotho beschrieben. Es wurde gezeigt, dass Klotho in der Lage ist, das Glucuronidasesubstrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronidhydrat (4Mu- $\beta$ -D-GlcU) in das fluoreszierende Methylumbelliferon (MU) und das korrespondierende Glucuronid zu spalten.



**Abb. 14: Nachweis einer *in vitro* Glucuronidaseaktivität von Klotho-Fc.** 0,1 bzw. 0,2 µg/µl Klotho-Fc wurden für mehrere Stunden in einem Reaktionspuffer (0,1 M Natriumcitrat pH 5,5, 0,05 M NaCl, 0,01 % Tween 20 (V/V)) inkubiert, der 0,5 mM des Glucuronidasubstrates 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronidhydrat (4Mu-β-D-GlcU) enthielt, das durch Glucuronidasen zum fluoreszierenden Methylumbelliferon (MU) und dem korrespondierenden Glucuronid hydrolysiert wird. Die Glucuronidaseaktivität des eingesetzten Proteins wurde durch Messung der Fluoreszenzintensität des gebildeten MUs bei 355 nm über die Zeit bestimmt. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit 0,1 µg/µl (= 0,1 U/µl) β-Glucuronidase aus Rinderleber (Sigma).

Die Messung der Fluoreszenzintensität bei 355 nm und damit der Glucuronidaseaktivität des gereinigten Proteins über mehrere Stunden (Abb. 14) zeigte eine deutliche enzymatische Aktivität von Klotho-Fc. Dabei war die Aktivität wie erwartet größer, je mehr Klotho-Fc eingesetzt wurde, da mehr Protein auch mehr Substrat umsetzen kann. Darüber hinaus zeigten die Proteine der Fraktion B eine stärkere Aktivität als die vermehrt aggregierten Proteine der Fraktion A. Daher wurde in weiteren Versuchen, wenn möglich, mit Fraktion B gearbeitet. Als Positivkontrolle für die *in vitro* Reaktion diente die Messung der Glucuronidaseaktivität einer gereinigten β-Glucuronidase aus Rinderleber. Diese zeigte eine um ein Vielfaches stärkere Aktivität als Klotho, was den Erwartungen entsprach, da für Klotho nur eine schwache Aktivität beschrieben war (Tohyama *et al.*, 2004). Bereits nach 2 h war das vorhandene Substrat durch die β-Glucuronidase komplett umgesetzt, wohingegen bei Klotho-Fc auch nach 48 h bei 30 °C noch eine Steigerung der Fluoreszenzaktivität erkennbar war (Daten nicht gezeigt). Daher ist anzunehmen, dass das gereinigte Protein eine hohe Stabilität aufwies.

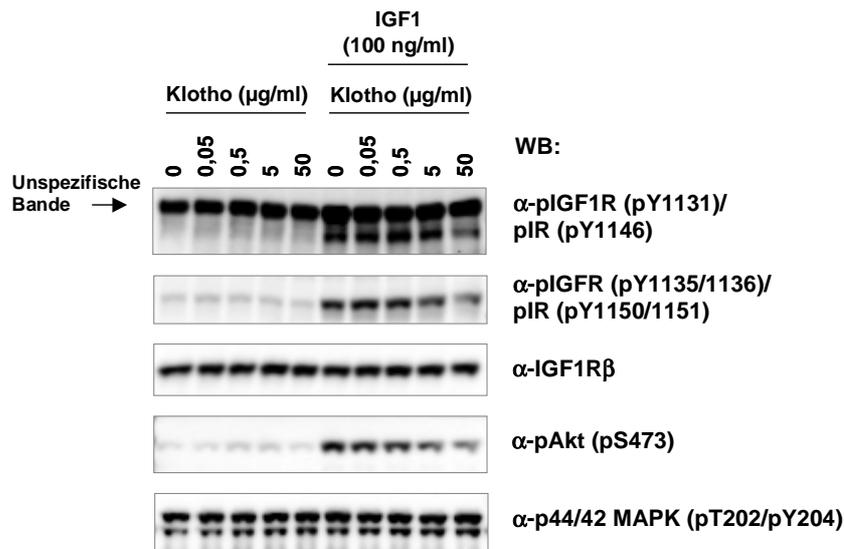
### 3.2.2.3 Nachweis einer zellulären Funktion von Klotho-Fc – Effekte auf den IGF1-Signalweg

Des Weiteren wurde getestet, ob gereinigtes Klotho-Fc neben der enzymatischen Aktivität eine Aktivität bzw. Funktion auf Ebene der zellulären Signaltransduktion ausüben kann. Dazu wurde die Fähigkeit des aufgereinigten Proteins untersucht, den IGF1-Signalweg zu inhibieren. Eine Inhibition des Insulin- und IGF1-Signalweges in L6-Rattenmyoblasten durch Klotho wurde 2005 von Kurosu *et al.* beschrieben, wobei der genaue Mechanismus bisher nicht bekannt ist.

Für die Untersuchung des gereinigten Klotho-Fc wurden ebenfalls L6-Zellen verwendet. Die Western Blot-Analyse (Abb. 15) zeigte eine eindeutige Inhibition der IGF1-induzierten Signaltransduktion mit steigender Konzentration an Klotho-Fc. Dies war erkennbar in der abnehmenden Phosphorylierung und damit auch der abnehmenden Aktivität des IGF1R und der im IGF1-Signalweg „downstream“ gelegenen Kinase Akt. Tyrosin 1131, 1135 und 1136 des IGF1R sind die wichtigsten Autophosphorylierungsstellen innerhalb der IGF1R-Kinasedomäne. Ihre Phosphorylierung folgt auf die Bindung von IGF1 an seinen Rezeptor und ist ein Indiz für die Kinaseaktivität des Rezeptors. Die Phosphorylierung von Akt an Serin 473 innerhalb des Carboxyterminus ist ebenso entscheidend für die Aktivierung dieser Kinase. Die Reduktion der Phosphorylierung dieser beiden Proteine, des Rezeptors am Anfang des IGF1-Signalweges und Akt im Zentrum des PI3K-Signalweges, macht die Inhibition dieses Weges durch Klotho deutlich.

Die Kontrolle der Gesamtexpression des IGF1R zeigte zum einen, dass in allen Lysaten gleich viel Protein enthalten war und zum anderen, dass Klotho keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression bzw. Internalisierung des IGF1R ausübte. Im Gegensatz zur IGF1-vermittelten IGF1R- und Akt-Aktivierung hatte Klotho-Fc keine Wirkung auf die konstitutive Phosphorylierung der p44/42 MAPK in L6-Zellen, was die spezifische Wirkung von Klotho auf den IGF1R-Akt-Signalweg deutlich machte.

Somit konnte für das gereinigte Klotho-Fc neben der enzymatischen auch eine zelluläre Aktivität nachgewiesen werden, wodurch gezeigt wurde, dass das gereinigte Protein für die folgenden Analysen zur Klotho-Signaltransduktion geeignet war.



**Abb. 15: Inhibition des IGF1-Signalweges durch Klotho.** L6 Rattenmyoblasten wurden mit den angegebenen Klotho-Fc Konzentrationen für 30 min behandelt, 5 min mit IGF1 stimuliert und anschließend lysiert. Die Expression des IGF1R bzw. der Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivität des IGF1R sowie die Akt und p44/42 MAPK Phosphorylierung wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert.

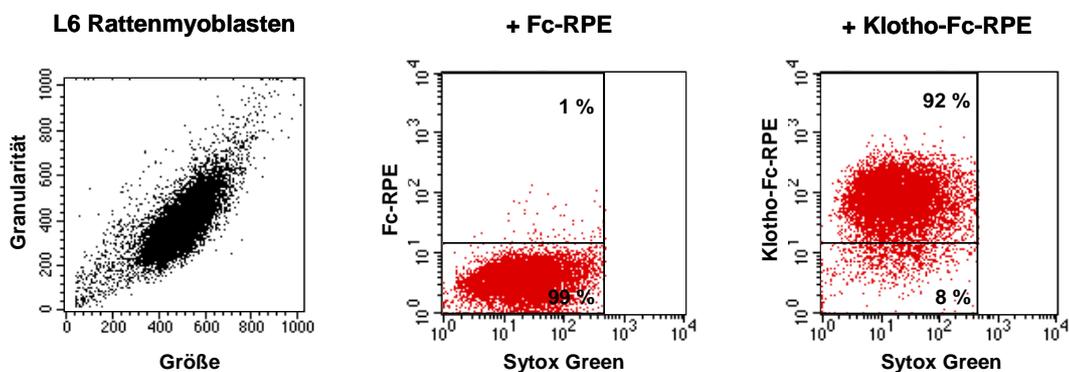
### 3.3 Die Bindung von Klotho-Fc an Zellen

#### 3.3.1 Nachweis der Bindung von RPE-konjugiertem Klotho-Fc an L6-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Ein wichtiges Modellsystem zur Identifizierung eines Rezeptors für Klotho stellen Zellen dar, die Klotho stabil binden können. Als erste Zelllinie wurden daher L6 Rattenmyoblasten gewählt, da eine Bindung an diese bereits 2005 von Kurosu *et al.*, allerdings mit der gereinigten extrazellulären Domäne von Klotho mit V5- und 6xHis-„Tag“ beschrieben wurde. Die Interaktion von Klotho mit diesen Zellen wurde getestet, um zu zeigen, dass auch das gereinigte Klotho-Fc an einen putativen Rezeptor bindet und der Fc-„Tag“ keine negative Auswirkungen auf diese Bindung hat.

Erste Versuche wurden, wie auch bei Kurosu *et al.*, mit  $^{125}\text{I}$ -markiertem Protein durchgeführt. Im Gegensatz zu [ $^{125}\text{I}$ ] Klotho-Fc zeigte [ $^{125}\text{I}$ ] Fc keine Bindung an L6-Zellen (Daten nicht gezeigt), wodurch eine Bindung durch den Fc-„Tag“, z.B. über Fc-Rezeptoren auf den Zellen, ausgeschlossen werden konnte. Die Spezifität einer Bindung ist daran erkennbar, dass bei höheren Konzentrationen eine Sättigung der Bindung zu erkennen ist und die Bindung durch einen Überschuss an unmarkiertem

Liganden verdrängt werden kann. In diesem Fall konnte zwar [ $^{125}$ I] Klotho-Fc durch einen 500- bis 1000-fachen Überschuss an unmarkiertem Klotho-Fc verdrängt werden, eine Sättigung der Bindung wurde jedoch selbst beim Einsatz sehr hoher Konzentrationen an [ $^{125}$ I] Klotho-Fc (bis 600 nM) nicht erreicht (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde ein neues System zum Nachweis einer Bindung von Klotho an Zellen etabliert, das gleichzeitig den Vorteil besaß, ohne Radioaktivität arbeiten zu können. Dazu wurde Klotho mit dem rot-fluoreszierenden Farbstoff R-Phycoerythrin (RPE) markiert, die Zellen mit Klotho-RPE inkubiert und die Bindung an die Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Mit Hilfe dieses Systems konnte eindeutig eine Bindung von Klotho-Fc an L6-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 16). 92 % der lebenden Zellen zeigten eine Bindung von Klotho-Fc-RPE (rechter Graph). Eine Interaktion vermittelt durch den Fc-„Tag“ konnte dabei ausgeschlossen werden, da mit RPE konjugiertes Fc keine Bindung zeigte (mittlerer Graph). Tote Zellen wurden mit Sytox Green (= Todzellmarker) gefärbt und wären rechts in den Graphen zu finden gewesen. Durch setzen von Schranken wurden die toten Zellen jedoch von der Analyse ausgeschlossen. Der linke Graph zeigt die gesamte Zellpopulation, wobei die Größe gegen die Granularität der Zellen aufgetragen wurde.

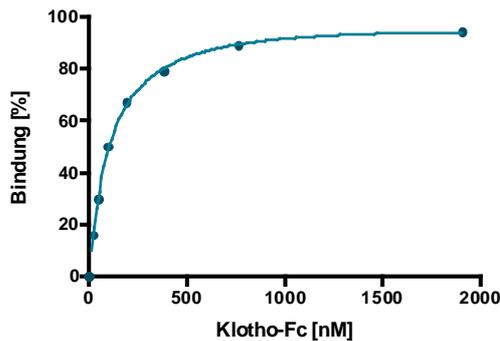


**Abb. 16: Bindung von Klotho an L6 Rattenmyoblasten.** Gereinigtes Klotho-Fc oder Fc allein (Negativkontrolle) wurde mit R-Phycoerythrin (RPE) konjugiert und mit L6 Rattenmyoblasten ( $2 \times 10^6$  Zellen) für 30 min inkubiert. Die eingesetzte Konzentration an Klotho-Fc bzw. Fc betrug 240 nM. Die Bindung von Klotho-Fc bzw. Fc an die Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Tote Zellen wurden mit Sytox Green (= Todzellmarker) gefärbt und von der Analyse ausgeschlossen.

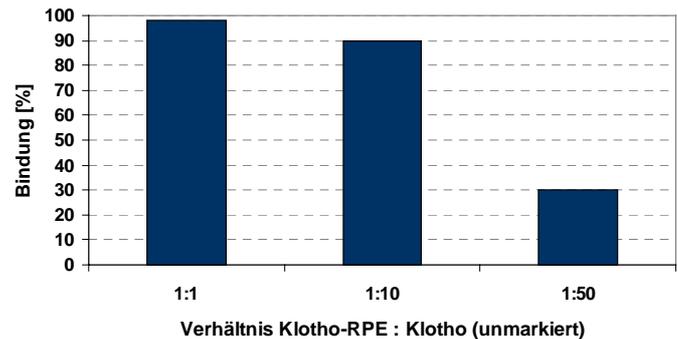
### 3.3.2 Bindungseigenschaften von Klotho gezeigt am Beispiel der L6-Zelllinie

Um die Spezifität der gemessenen Bindung von Klotho an L6-Zellen zu zeigen, wurde als Erstes durch den Einsatz steigender Konzentrationen an Klotho-Fc-RPE ein Sättigung der Bindung herbeigeführt.

(A) Sättigung der Bindung von Klotho-Fc an L6 Zellen



(B) Verdrängung von an L6-Zellen gebundenem Klotho-RPE durch unmarkiertes Klotho.

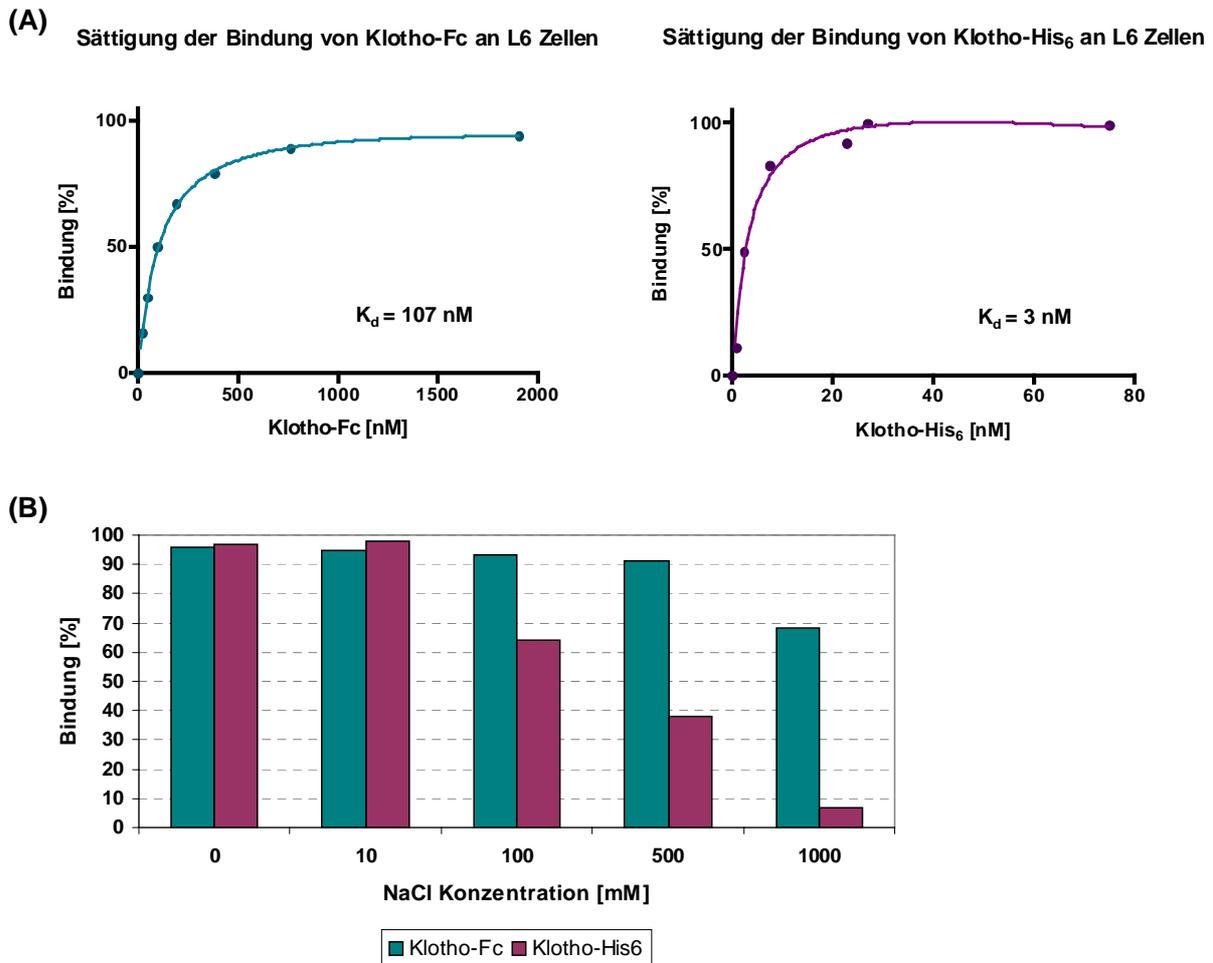


**Abb. 17: Nachweis der Spezifität der Bindung von Klotho an L6 Rattenmyoblasten.** L6 Rattenmyoblasten ( $1 \times 10^6$  Zellen) wurden für 30 min (A) mit steigenden Konzentrationen an Klotho-Fc-RPE inkubiert, um eine Sättigung der Bindung zu erreichen oder (B) mit Klotho-His<sub>6</sub>-RPE (Endkonzentration: 7,7 nM) und steigenden Konzentrationen an unmarkiertem Klotho-His<sub>6</sub> inkubiert, um eine Verdrängung von gebundenem Klotho-His<sub>6</sub>-RPE durch unmarkiertes Klotho-His<sub>6</sub> nachzuweisen. Die Bindung von markiertem Klotho an die Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Tote Zellen wurden mit Sytox Green (= Todzellmarker) angefärbt und von der Analyse ausgeschlossen.

Die mit Hilfe der gewonnenen Daten ermittelte Bindungskurve (Abb. 17A) zeigte eine eindeutige Sättigung der Bindung bei einer ungefähren Konzentration von ca. 1000-1500 nM. Die Bindung stieg trotz des Einsatzes höherer Konzentrationen an Klotho-Fc nicht weiter an. Der mit Hilfe von GraphPad Prism ermittelte  $K_d$ -Wert (= Dissoziationskonstante) betrug 107 nM. In einem zweiten Schritt wurde dann nachgewiesen, dass gebundenes markiertes Klotho durch einen Überschuss an unmarkiertem Klotho verdrängt werden kann (Abb. 17B). Bereits bei einem 10-fachen Überschuss an unmarkiertem Klotho war ein Rückgang der Bindung auf 90 % erkennbar. Bei einem 50-fachen Überschuss war dann eine deutliche Abnahme der Bindung auf nur 30 % zu sehen. Aus diesen Daten kann man schließen, dass die Bindung von Klotho an L6-Zellen spezifisch war.

Der Nachweis der Verdrängbarkeit der Bindung wurde aufgrund der Tatsache, dass zum Zeitpunkt des Versuches nicht genügend gereinigtes Klotho-Fc zur Verfügung stand, mit kommerziell erhältlichem Klotho, genau gesagt mit der extrazellulären Domäne mit 6xHis-„Tag“ von R&D Systems, durchgeführt. Dieses Klotho, im Wei-

teren als Klotho-His<sub>6</sub> bezeichnet, wurde auch in der am Ende durchgeführten „Microarray“-Studie eingesetzt. Daher war es sinnvoll, die Bindungseigenschaften dieser beiden Klothovarianten zu vergleichen. Dabei wurde zum einen die Sättigung der Bindung und zum anderen die Salzresistenz bei steigenden NaCl-Konzentrationen nebeneinander gestellt.

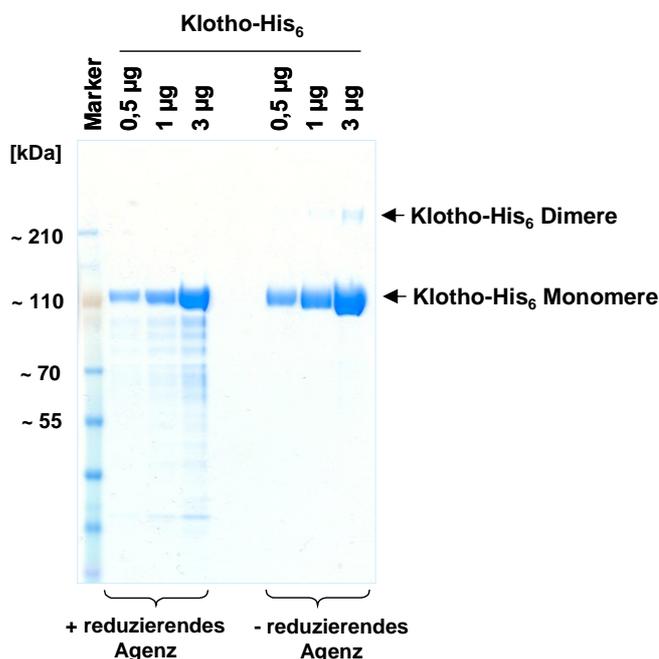


**Abb. 18: Vergleich der Bindungseigenschaften von Klotho-Fc und Klotho-His<sub>6</sub>.** L6 Rattenmyoblasten ( $1 \times 10^6$  Zellen) wurden für 30 min (A) mit steigenden Konzentrationen an Klotho-Fc-RPE bzw. Klotho-His<sub>6</sub>-RPE inkubiert oder (B) mit Klotho-Fc-RPE (Endkonzentration: 240 nM) bzw. Klotho-His<sub>6</sub>-RPE (Endkonzentration: 7,7 nM) und steigenden Konzentrationen an NaCl inkubiert. Die Bindung von markiertem Klotho-Fc bzw. Klotho-His<sub>6</sub> an die Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Tote Zellen wurden mit Sytox Green (= Todzellmarker) angefärbt und von der Analyse ausgeschlossen. Die  $K_d$ -Werte (= Dissoziationskonstanten) der Sättigungskurven wurden mit Hilfe von GraphPad Prism ermittelt.

Wie man anhand der erstellten Bindungskurven (Abb. 18A) erkennen konnte, war bei steigenden Klotho-Konzentrationen bei Klotho-His<sub>6</sub> bereits bei etwa 25-30 nM eine Sättigung der Bindung erreicht, d.h. keine weitere Steigerung der Bindung erkennbar, bei Klotho-Fc dagegen erst bei ca. 1000-1500 nM. Dieser Unterschied wurde auch

anhand des  $K_d$ -Wertes deutlich, der bei Klotho-His<sub>6</sub> bei 3 nM und bei Klotho-Fc bei 107 nM lag. Ein Vergleich der Salzresistenz der Bindung dagegen zeigte (Abb. 18B), dass bei steigender Salzkonzentration die Bindung von Klotho-Fc bis zu einer NaCl-Konzentration von 500 mM relativ stabil blieb (> 90 % Bindung) und erst bei 1000 mM NaCl die Bindung auf knapp unter 70 % sank, was bei Klotho-His<sub>6</sub> bereits bei 100 mM NaCl der Fall war. Bei 1000 mM NaCl war dann kaum noch eine Bindung von Klotho-His<sub>6</sub> an die Zellen detektierbar (< 10 % Bindung). D.h. die Bindung von Klotho-Fc an L6-Zellen wies eine sehr hohe Salzresistenz auf, die deutlich über der von Klotho-His<sub>6</sub> lag.

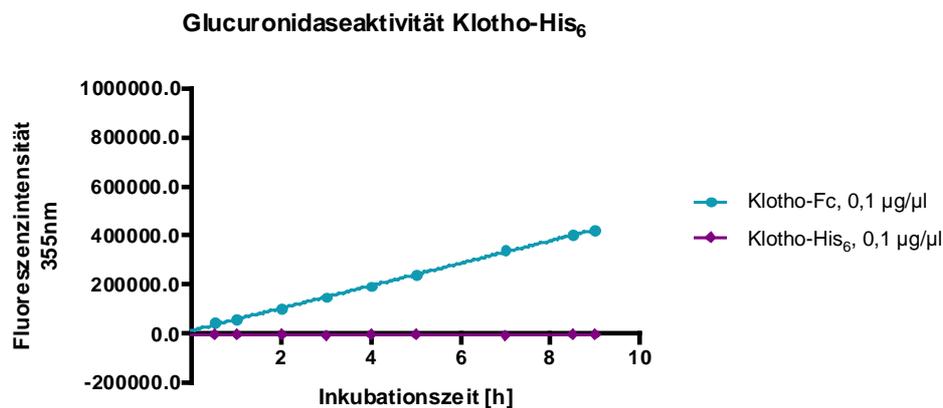
Um den Verdacht zu prüfen, dass das Vorliegen des aufgereinigten Klotho-Fc in einer polydisperse Lösung mit teilweise großen Oligomeren ein Grund dafür sein könnte, dass größere Mengen Protein zum Erreichen einer Sättigung der Bindung eingesetzt werden müssen, wurden steigende Mengen an Klotho-His<sub>6</sub> mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung bezüglich des Vorliegens von Oligomeren untersucht. Ein Vergleich der beiden Proteinvarianten nach Trennung im Gel unter und ohne Zugabe eines reduzierenden Agenzes (Abb. 19, Vergleich mit Abb. 12) zeigte, bei Betrachtung der Proben ohne reduzierendes Agenz, dass Klotho-His<sub>6</sub> im Gegensatz zu Klotho-Fc hauptsächlich als Monomer (Bande bei ~ 110 kDa) und nur ein sehr geringer Teil als Dimer (Bande bei knapp über 210 kDa) vorlag. Die Bande mit Monomeren war um ein Vielfaches intensiver als die Dimerbande. Dies war besonders gut in der Spur mit 3 µg Protein erkennbar. Größere Oligomere waren nicht vorhanden.



**Abb. 19: Oligomerisierungszustand von Klotho-His<sub>6</sub>.** 0,5 µg, 1 µg und 3 µg Klotho-His<sub>6</sub> wurden unter Zugabe eines reduzierenden Agenzes bzw. ohne dieses mit Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung bezüglich des Molekulargewichtes analysiert.

Es ist daher möglich, dass die schlechtere Bindung von Klotho-Fc an die Zellen eine Folge der teilweise stärkeren Oligomerbildung und einer damit einhergehenden teilweisen Inaktivierung war.

Die gezeigte stärkere Salzresistenz der Bindung von Klotho-Fc an die Zellen könnte jedoch einen Vorteil bei der Identifizierung von Interaktionspartnern darstellen, da es schwieriger ist, eine Bindung zwischen zwei Proteinen nachzuweisen, wenn diese instabil oder nur transient ist. Darüber hinaus hemmte Klotho-His<sub>6</sub> zwar ebenfalls den IGF1-Signalweg (Daten nicht gezeigt), wies aber interessanterweise keine *in vitro* Glucuronidaseaktivität auf (Abb. 20). Die Messung der Fluoreszenzintensität bei 355 nm über mehrere Stunden zeigte keinen Umsatz des eingesetzten Glucuronidasesubstrates in ein fluoreszierendes Spaltprodukt durch Klotho-His<sub>6</sub>. Klotho-Fc, das als Positivkontrolle diente, zeigte dagegen eine deutliche enzymatische Aktivität. Diese unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Klothovarianten (mit Fc- oder His<sub>6</sub>-„Tag“) wurden bei der Auswahl für die Folgeexperimente berücksichtigt.



**Abb. 20: *In vitro* Glucuronidaseaktivität von Klotho-His<sub>6</sub>.** 0,1 µg/µl Klotho-His<sub>6</sub> wurde für mehrere Stunden in Reaktionspuffer (0,1 M Natriumcitrat pH 5,5, 0,05 M NaCl, 0,01 % Tween 20 (V/V)) inkubiert, der 0,5 mM des Glucuronidasesubstrates 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronidhydrat (4MU-β-D-GlcU) enthielt, das durch Glucuronidasen zum fluoreszierenden Methylumbelliferon (MU) und dem korrespondierenden Glucuronid hydrolysiert wird. Die Glucuronidaseaktivität des eingesetzten Proteins wurde durch Messung der Fluoreszenzintensität des gebildeten MUs bei 355 nm über die Zeit bestimmt. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit 0,1 µg/µl Klotho-Fc.

Im Folgenden wurde dann die Bindung von Klotho an weitere Zelllinien getestet, um neben dem etablierten System mit L6 Rattenmyoblasten auch ein humanes Zellsystem zu finden, das eine gute Bindung von Klotho an die Zellen und eine Wirkung von Klotho auf die zelluläre Signaltransduktion, sprich eine Inhibierung des IGF1-Signalweges durch Klotho, aufweist. Ein humanes Zellsystem ist in diesem Fall von

Bedeutung, da es sich bei dem gereinigten Protein um humanes Klotho handelt und dieses lediglich eine 85 %ige Sequenzhomologie zu Rattenklotho aufweist. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 2 (siehe 3.4.4) zusammengefasst.

### **3.4 Bindet Klotho an den IGF1-Rezeptor?**

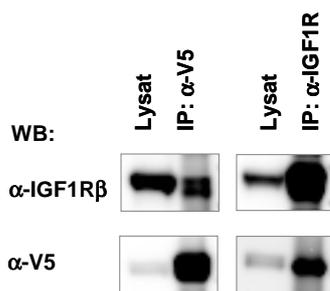
Da 2005 von Kurosu *et al.* gezeigt wurde, dass Klotho die Bindung von IGF1 an seinen Rezeptor nicht hemmt, wurde angenommen, dass die Inhibierung des IGF1-Signalweges durch Klotho nicht über eine direkte Bindung von Klotho an den IGF1R vermittelt wird. Eine These war, dass Klotho an einen weiteren Rezeptor bindet, wodurch, über einen bisher unbekanntem Mechanismus, die Inhibierung der IGF1-Signaltransduktion ausgelöst wird. 2007 wurde dann jedoch von Wolf *et al.* in mit Klotho-HA (Transmembranform von Klotho mit HA-„Tag“) stabil oder transient transfizierten MCF7-Zellen eine Bindung von Klotho an den IGF1R mittels Co-Immunpräzipitation nachgewiesen. Dabei konnte Klotho-HA nach Immunpräzipitation mit IGF1R-Antikörper bzw. IGF1R nach Immunpräzipitation mit HA-Antikörper mittels Western Blot-Analyse detektiert werden. Um sicherzustellen, dass diese Interaktion kein Artefakt ist, sollte die Bindung in einem ersten Schritt verifiziert werden, um dann im zweiten Schritt die Bindung näher zu charakterisieren und den genauen Mechanismus der Inhibierung zu entschlüsseln.

#### **3.4.1 Co-Immunpräzipitation / Co- „Pull-Down“ des IGF1-Rezeptors mit Klotho-Fc**

Um eine Interaktion zwischen Klotho und dem IGF1R nachzuweisen, wurden initial Immunpräzipitations- bzw. „Pull-Down“-Experimente durchgeführt.

In einem ersten Experiment wurden HEK 293T-Zellen mit Klotho-V5 und IGF1R transient transfiziert und anschließend eine Immunpräzipitation mit V5- bzw. IGF1R-Antikörpern durchgeführt. In der folgenden Western Blot-Analyse (Abb. 21) konnte die erfolgreiche Immunpräzipitation von Klotho-V5 und des IGF1R nachgewiesen werden. Bei einem Vergleich der Stärke der Banden im Lysat mit denen nach Immunpräzipitation mit den entsprechenden Antikörpern war eine deutliche Anreicherung von Klotho-V5 bzw. des IGF1R durch die Immunpräzipitation erkennbar.

Darüber hinaus konnte eine Co-Immunpräzipitation sowohl des IGF1R als auch von Klotho-V5 nach Immunpräzipitation mit dem jeweils anderen Antikörper gezeigt werden. In beiden Fällen war eine deutliche Bande erkennbar, wobei die Co-Immunpräzipitation von Klotho-V5 eindeutiger war, da im Vergleich mit der Expression im Lysat eine deutliche Anreicherung stattfand, was beim IGF1R nicht der Fall war.

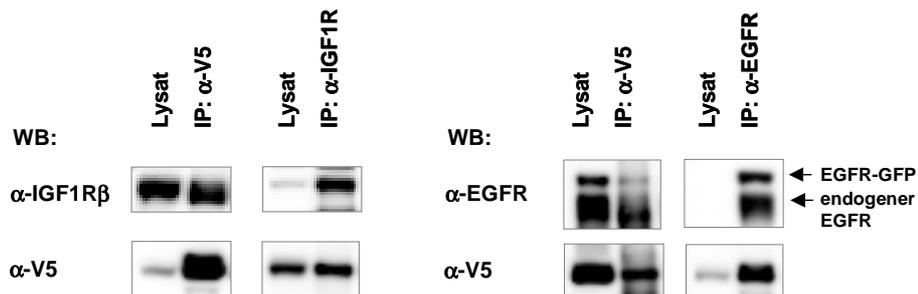


**Abb. 21: Co-Immunpräzipitation von Klotho-V5 und IGF1R.** HEK 293T-Zellen wurden mit Klotho-V5 und IGF1R transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit HGNT-Puffer lysiert und das Lysat in einer Immunpräzipitation mit V5- bzw. IGF1R-Antikörpern eingesetzt. Die Kontrolle der Expression sowie der Nachweis einer Co-Immunpräzipitation erfolgte durch Analyse des Lysats bzw. der präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit den entsprechenden Antikörpern.

Um sicherzustellen, dass es sich nicht um eine unspezifische Bindung handelt, wurde im nächsten Versuch getestet, ob auch eine Co-Immunpräzipitation von Klotho mit dem EGFR detektiert werden kann. Dazu wurde zusätzlich eine Transfektion mit Klotho-V5 und EGFR-GFP durchgeführt. Der EGFR wurde hier als Negativkontrolle eingesetzt, da Kurosu *et al.* (2005) und Wolf *et al.* (2007) gezeigt haben, dass Klotho keinen Einfluss auf die EGF-Signaltransduktion ausübt und dementsprechend auch nicht an den Rezeptor binden sollte. EGFR-GFP wurde gewählt, da es als Expressionsplasmid zur Verfügung stand und da bei Verwendung von GFP-Fusionsproteinen die Möglichkeit besteht, die Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie zu kontrollieren.

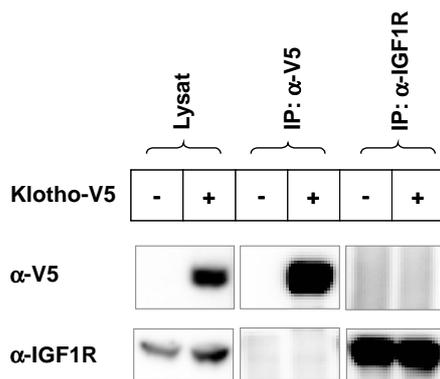
Die Western Blot-Analyse (Abb. 22) zeigte erneut eine erfolgreiche Immunpräzipitation von Klotho-V5 und des IGF1R, erkennbar an der zunehmenden Bandenstärke nach Immunpräzipitation mit dem entsprechenden Antikörpern im Vergleich mit der Expression im Lysat. Ebenso konnte eine gegenseitige Co-Immunpräzipitation von Klotho-V5 und des IGF1R reproduziert werden. Erneut war eine IGF1R Bande nach Immunpräzipitation mit V5-Antikörpern bzw. eine Klotho-V5 Bande nach Immunpräzipitation mit IGF1R-Antikörpern sichtbar. Darüber hinaus war jedoch auch bei der Negativkontrolle eine deutliche Klotho-V5 Bande nach Immunpräzipitation mit EGFR-Antikörpern erkennbar. Bei der Detektion des EGFR musste man hier sowohl nach EGFR-GFP als auch nach endogenem EGFR schauen, da mit dem EGFR-

Antikörper beide Varianten detektiert werden können. Hier war in Höhe beider Varianten nach Immunpräzipitation mit V5-Antikörpern ebenfalls eine Bande erkennbar. Möglicherweise handelte es sich also bei beiden detektierten Interaktionen, sowohl zwischen Klotho und dem EGFR als auch zwischen Klotho und dem IGF1R, nur um eine unspezifische Bindung, die durch die starke Überexpression der Proteine nach Transfektion verursacht wurde.



**Abb. 22: Co-Immunpräzipitation von Klotho-V5 und IGF1R bzw. EGFR.** HEK 293T-Zellen wurden mit Klotho-V5 und IGF1R oder EGFR-GFP (Negativkontrolle) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit HGNT-Puffer lysiert und das Lysat in einer Immunpräzipitation mit V5-Antikörpern bzw. IGF1R- oder EGFR-Antikörpern eingesetzt. Die Kontrolle der Expression sowie der Nachweis einer Co-Immunpräzipitation erfolgte durch Analyse des Lysats bzw. der präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit den entsprechenden Antikörpern.

Um solch unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurden im nächsten Schritt HEK 293T-Zellen lediglich mit Klotho-V5 transfiziert und der Versuch einer Co-Immunpräzipitation von Klotho mit endogenem IGF1R gemacht. Die Western Blot-Analyse (Abb. 23) zeigte in diesem Fall keine Interaktion zwischen Klotho-V5 und endogenem IGF1R, da weder eine Klotho-V5 noch eine IGF1R Bande nach Immunpräzipitation mit dem jeweils anderen Antikörper zu sehen war. Die Grundvoraussetzung für dieses Experiment, eine erfolgreiche Immunpräzipitation beider Proteine mit den entsprechenden Antikörpern, konnte dagegen nachgewiesen werden. Sowohl bei Klotho-V5 als auch beim IGF1R war eine deutliche Anreicherung an Proteinen aus dem Lysat durch die Immunpräzipitation mit V5- bzw. IGF1R-Antikörper erkennbar. Bei Klotho-V5 war diese wie erwartet nur im Transfektionsansatz mit Klotho-V5 zu sehen, beim IGF1R dagegen aufgrund der Tatsache, dass hier endogener IGF1R nachgewiesen wurde, in beiden Transfektionsansätzen (ohne und mit Klotho-V5).

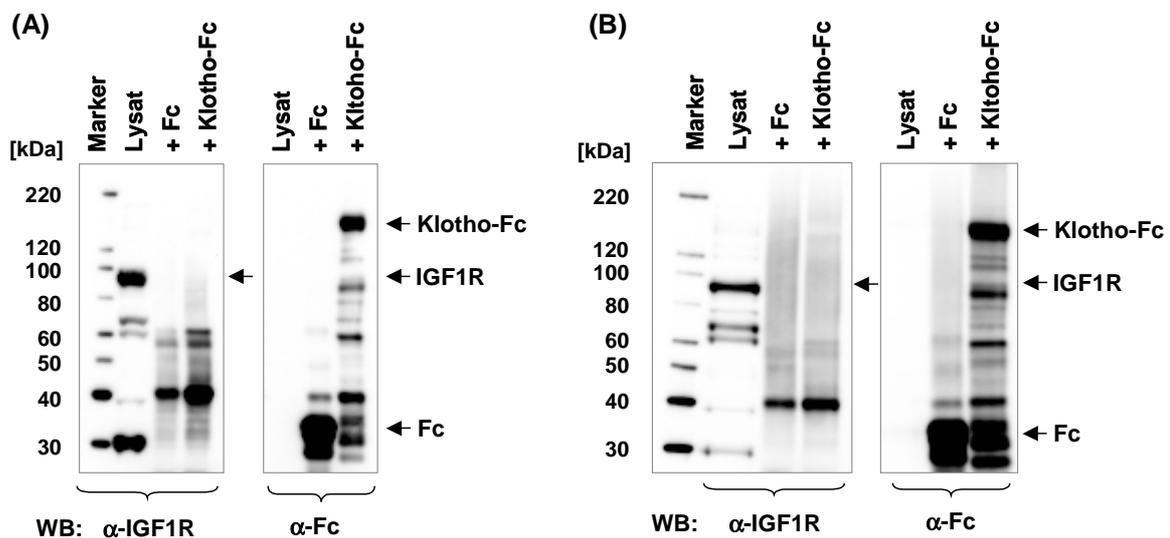


**Abb. 23: Co-Immünpräzipitation von Klotho-V5 und endogenem IGF1R.** HEK 293T-Zellen wurden mit Klotho-V5 oder Leervektor transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit HGNT-Puffer lysiert und das Lysat in einer Immunpräzipitation mit V5- bzw. IGF1R-Antikörpern eingesetzt. Die Kontrolle der Expression sowie der versuchte Nachweis einer Co-Immünpräzipitation erfolgte durch Analyse des Lysats bzw. der präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit den entsprechenden Antikörpern.

Da es sich bei Wolf *et al.* (2007) um eine Interaktion zwischen der Transmembranform von Klotho mit HA-„Tag“ und dem IGF1R handelt, stellt sich die Frage, ob auch die lösliche extrazelluläre Domäne von Klotho an den IGF1R binden kann. Diese Frage ist von entscheidender Bedeutung, da die Inhibierung des IGF1-Signalweges durch die lösliche extrazelluläre Domäne vermittelt wird. Eine gängige Theorie ist, dass bei Klotho-exprimierenden Zellen die extrazelluläre Domäne von der Transmembranform abgespalten und ins Blut sezerniert wird. Durch dieses wird sie zu Zellen transportiert, die einen bisher unbekanntem Klothorezeptor exprimieren, an den die lösliche Klothoform bindet und einen bisher unbekanntem Mechanismus auslöst.

Um eine Interaktion zwischen der extrazellulären Domäne von Klotho und dem IGF1R zu untersuchen, wurden „Pull-Down“-Experimente mit gereinigtem Klotho-Fc durchgeführt. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen an den Fc-„Tag“ diente ein zusätzlicher „Pull-Down“ mit gereinigtem Fc als Negativkontrolle. Als Erstes wurde ein „Pull-Down“ des IGF1R aus Lysaten von NCI-H322-Zellen, die eine starke Expression des IGF1R aufweisen (siehe Tabelle 2), mit an Protein A/G Agarosekügelchen gebundenem Klotho-Fc bzw. Fc versucht. In der folgenden Western Blot-Analyse wurde zwar die erfolgreiche Bindung von Fc bzw. Klotho-Fc an die Protein A/G Agarosekügelchen nachgewiesen (Abb. 24A, rechts), IGF1R konnte jedoch lediglich im Lysat nicht aber nach Pull-Down mit Klotho-Fc detektiert werden (Abb. 24A, links). Somit schlug der Nachweis einer Bindung von Klotho-Fc an den IGF1R fehl. Wie erwartet war auch keine IGF1R Bande nach „Pull-Down“ mit Fc allein, was eine unspezifische Bindung an den Fc-„Tag“ oder die Agarosematrix angezeigt hätte, vorhanden. Es waren lediglich einige unspezifische Banden in beiden „Pull-Down“-Ansätzen unterhalb des IGF1R zu sehen.

Um die Konzentration an IGF1R zu erhöhen und so eine mögliche schwache Interaktion zu verstärken, wurde der gleiche Versuch mit transfizierten NIH-3T3-Zellen durchgeführt, die stabil ein große Menge an IGF1R exprimieren (siehe Abb. 28). Auch hier konnte, trotz erfolgreicher Bindung von Klotho-Fc bzw. Fc an die Protein A/G Agarosekügelchen (Abb. 24B, rechts), im Western Blot mit IGF1R-Antikörper (Abb. 24B, links) zwar eine IGF1R Bande im Lysat jedoch keine im „Pull-Down“ mit Klotho-Fc und damit keine Bindung des IGF1R an Klotho-Fc nachgewiesen werden. Eine unspezifische Bindung an den Fc-„Tag“ allein oder die Agarosematrix wurde ebenso wenig detektiert. Somit konnte durch „Pull-Down“-Experimente eine Interaktion zwischen der löslichen extrazellulären Domäne von Klotho und dem IGF1R nicht nachgewiesen werden.



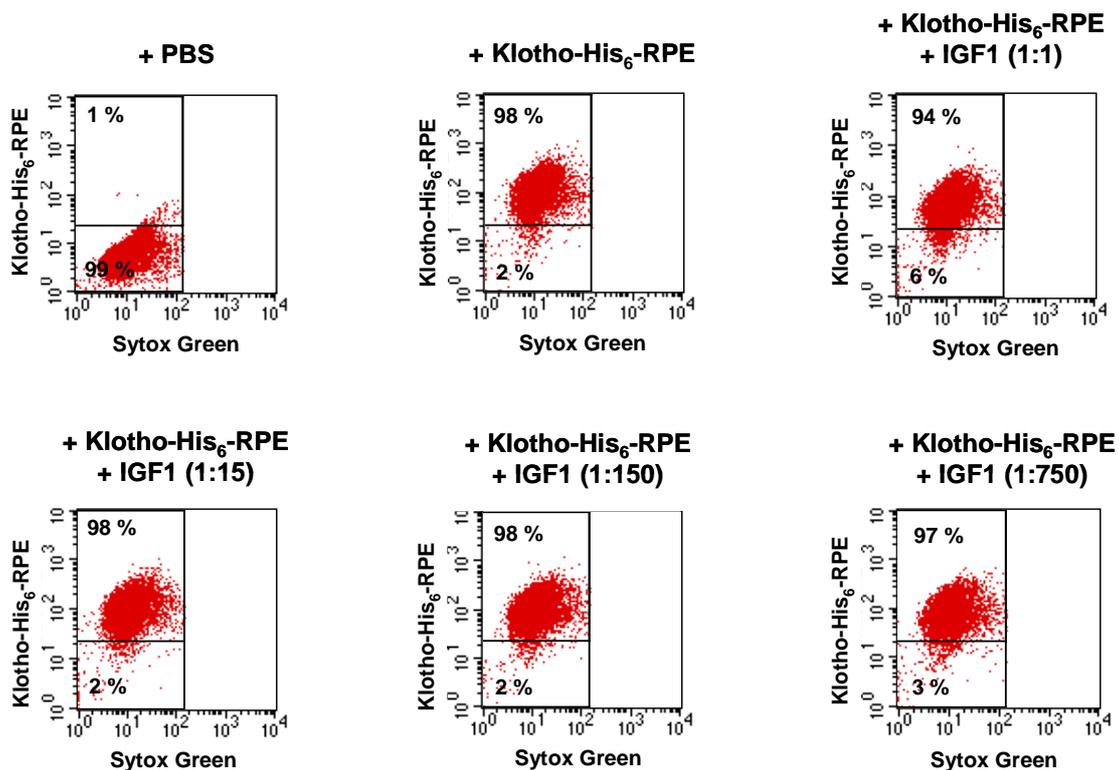
**Abb. 24:** „Pull-Down“ von endogenem bzw. stabil überexprimiertem IGF1R durch Klotho-Fc. IGF1R endogen exprimierende NCI-H322-Zellen **(A)** bzw. IGF1R stabil exprimierende NIH-3T3-Zellen **(B)** wurden mit HGNT-Puffer lysiert und das Lysat für einen „Pull-Down“ von endogenem bzw. stabil exprimiertem IGF1R mit an Protein A/G Agarosekügelchen gebundenem Klotho-Fc bzw. Fc (Negativkontrolle) verwendet. Die Kontrolle der Expression sowie der versuchte Nachweis eines „Pull-Downs“ des IGF1R erfolgte durch Analyse des Lysats bzw. der präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit den entsprechenden Antikörpern.

### 3.4.2 Versuchter Nachweis einer Bindung von Klotho an den IGF1-Rezeptor mittels Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurde nun versucht, Hinweise auf eine Interaktion zwischen der löslichen extrazellulären Domäne und dem IGF1R zu erhalten.

### 3.4.2.1 Kompetitionsstudien von IGF1 und Klotho zur Bindung an den IGF1-Rezeptor

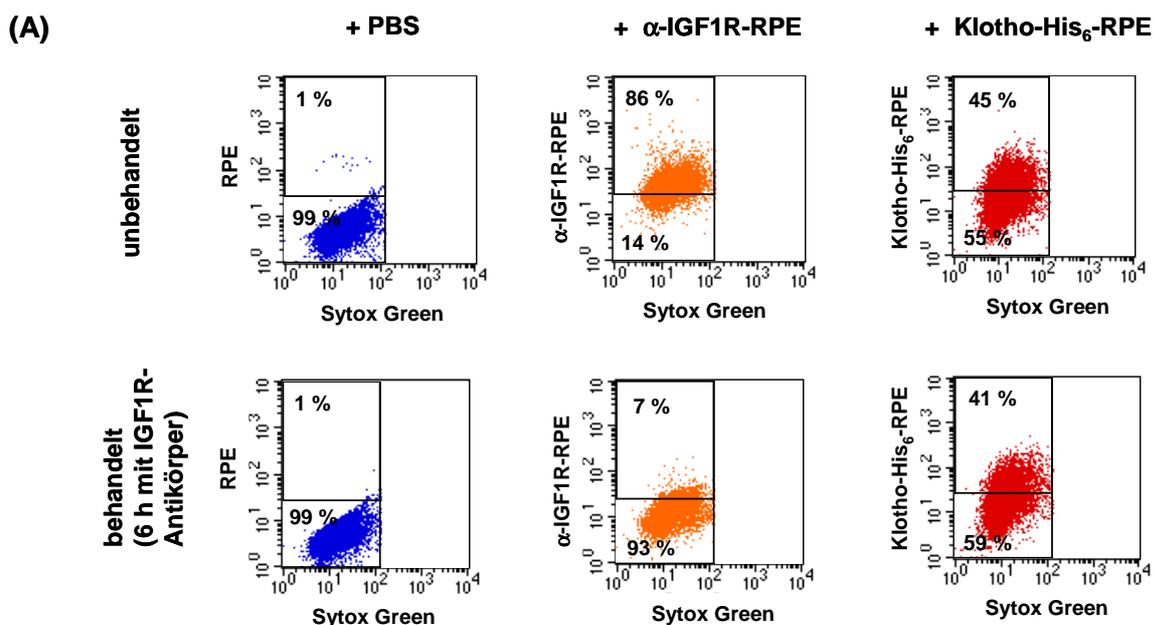
2005 wurde von Kurosu *et al.* in Bindungsversuchen mit L6-Zellen und  $^{125}$ I-markiertem löslichem Klotho gezeigt, dass Klotho die Bindung von IGF1 an seinen Rezeptor nicht kompetiert. Dieses Ergebnis wurde nun in einem ersten Schritt auf anderem Weg mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Dazu wurde die Bindung von Klotho-Fc an L6-Zellen mit einem bis zu 750-fachen molaren Überschuss an IGF1 mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb. 25). Wie auch bei Kurosu *et al.* konnte bei Zugabe steigender Mengen an IGF1 keine Abnahme der Klotho-Bindung, lediglich minimale Schwankungen zwischen 94 und 98 %, festgestellt werden. Auch bei einem 750-fachen Überschuss an IGF1 zeigten immer noch 97 % der Zellen eine Klotho-Bindung, 98 % waren es im Ansatz ohne IGF1. Sollte lösliches Klotho trotzdem an den IGF1R binden, kann die Bindungsstelle nicht mit der von IGF1 überlappen.



**Abb. 25: Bindung von Klotho an L6 Rattenmyoblasten und Konkurrenz durch IGF1.** Klotho-His<sub>6</sub> wurde mit R-Phycoerythrin (RPE) konjugiert und in einer Endkonzentration von 7,7 nM mit  $1 \times 10^6$  L6 Rattenmyoblasten und steigenden Konzentrationen an IGF1 (in Klammern angegebenen Verhältnissen = molare Verhältnisse) für 30 min inkubiert. Die Bindung von Klotho-His<sub>6</sub>-RPE an die Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Tote Zellen wurden mit Sytox Green (= Todzellmarker) angefärbt und von der Analyse ausgeschlossen. Ein Ansatz mit PBS diente als Negativkontrolle für die Bindung.

### 3.4.2.2 Unveränderte Bindung von Klotho an NCI-H322-Zellen trotz induzierter IGF1R-Internalisierung

Wenn es eine Bindung von löslichem Klotho an den IGF1R gibt, sollte diese Bindung durch eine Internalisierung des IGF1R mit folgender geringerer Rezeptordichte auf der Zelloberfläche abnehmen. Um dies zu testen, wurden NCI-H322-Zellen, die sowohl IGF1R auf ihrer Oberfläche exprimieren als auch Klotho binden (siehe Tab. 2), für sechs Stunden mit einem therapeutischen IGF1R-Antikörper von Merck Serono behandelt, der nachgewiesener Weise bei mehrstündiger Behandlung zu einer Internalisierung des IGF1R führt. Behandelte und unbehandelte Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bezüglich ihrer Klotho-Bindung und IGF1R-Oberflächenexpression sowie ein Teil der Zellen mittels Lyse und folgender Western Blot-Analyse bezüglich der Gesamt-IGF1R-Expression untersucht.



(B)

IGF1R-Antikörper  
behandelt:



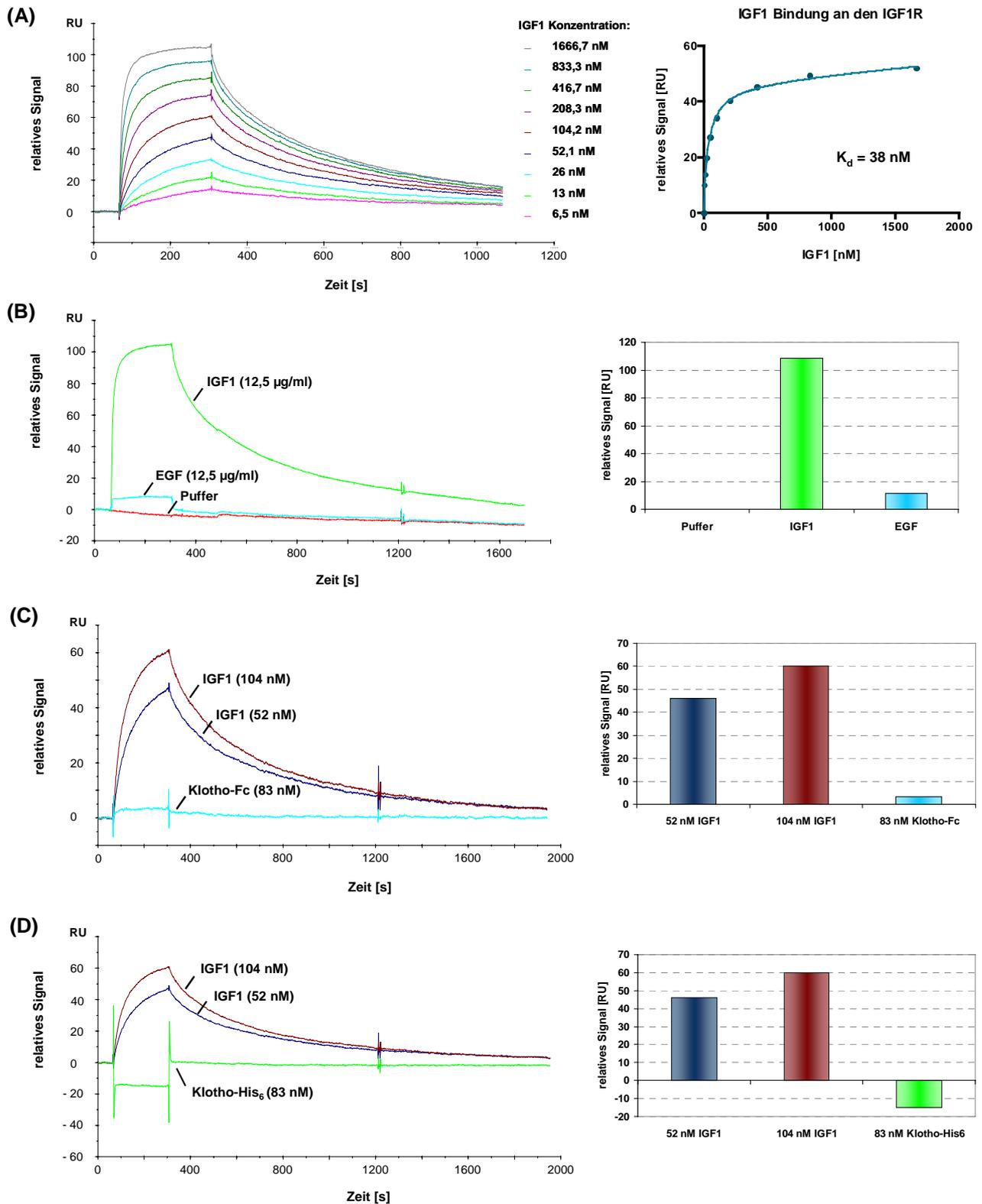
WB:  $\alpha$ -IGF1R $\beta$

**Abb. 26: Bindung von Klotho an L6 Rattenmyoblasten nach Internalisierung des IGF1R.** (A) Unbehandelten oder für 6 h mit 10  $\mu$ g/ml IGF1R-Antikörper behandelte NCI-H322-Zellen wurden mit Klotho-His<sub>6</sub>-RPE oder mit RPE gekoppeltem IGF1R-Antikörper für 30 min inkubiert. Dabei wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit RPE gekoppeltem IGF1R-Antikörper (Endkonzentration: 33 ng/ $\mu$ l, orange) bzw. Klotho-His<sub>6</sub>-RPE (Endkonzentration: 7,7 nM, rot) inkubiert. Die Bindung von markiertem IGF1R-Antikörper bzw. Klotho-His<sub>6</sub> an die Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Tote Zellen wurden mit Sytox Green (= Todzellmarker) angefärbt und von der Analyse ausgeschlossen. Ein Ansatz mit PBS (blau) diente als Negativkontrolle für die Bindung. (B) Unbehandelten oder für 6 h mit IGF1R-Antikörper behandelte L6 Rattenmyoblasten wurden mit HGNT-Puffer lysiert und die Expression des IGF1R mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit einem IGF1R-Antikörper untersucht.

Anhand der Western Blot-Analyse war eine deutliche Abnahme der Gesamt-IGF1R-Expression nach Behandlung mit dem therapeutischen IGF1R-Antikörper zu erkennen (Abb. 26B). Die deutliche IGF1R-Bande der unbehandelten NCI-H322-Zellen war nach Behandlung mit IGF1R-Antikörpern fast vollständig verschwunden. Damit übereinstimmend zeigte die Analyse der behandelten Zellen mittels Durchflusszytometrie eine deutlich geringere IGF1R-Antikörperbindung von lediglich 7 % im Vergleich zu 86 % Bindung bei unbehandelten Zellen und damit eine deutliche Abnahme der IGF1R-Oberflächenexpression (Abb. 26A, mittlerer Graph). Dagegen war keine verringerte Bindung von Klotho-Fc nach Behandlung mit IGF1R-Antikörper erkennbar (Abb. 26 A, rechter Graph). Knapp über 40 % sowohl der unbehandelte als auch der behandelte NCI-H322-Zellen (45 bzw. 41 %) banden Klotho. Eine Bindung von Klotho-Fc an den IGF1R erscheint in Anbetracht dieser Daten sehr unwahrscheinlich.

### **3.4.3 Biacore-Analyse („surface plasmon resonance“)**

Als letztes Experiment zum Nachweis einer möglichen Bindung der löslichen extrazellulären Domäne von Klotho an den IGF1R wurden Studien mit Hilfe der „Surface plasmon resonance“ Technologie von Biacore durchgeführt. Dafür wurde der IGF1R an die Oberfläche eines Biacore-„Chips“ gekoppelt und die entstandene IGF1R-Oberfläche auf ihre Bindungsfähigkeit hin getestet. Dazu wurde die Bindung mit steigenden Konzentrationen an IGF1 titriert. Anhand der Bindungskurven (Abb. 27A links) war wie erwartet eine gute Bindung von IGF1 an seinen Rezeptor erkennbar, die mit steigender Konzentration eine Sättigung erreichte. Dies war daran zu sehen, dass bei den höheren Konzentrationen die Kurven ein Plateau erreichten bevor dann im hinteren Teil der Kurve nach ~ 300-320 s die Dissoziation der Proteine von der Oberfläche begann. Die anhand der erstellten Sättigungskurve ermittelte Dissoziationskonstante betrug 38 nM (Abb. 27A rechts), was nur geringfügig über Angaben aus der Literatur liegt (~ 5-10 nM bei Tollefsen und Thompson, 1988 bzw. Surinya *et al.*, 2007).



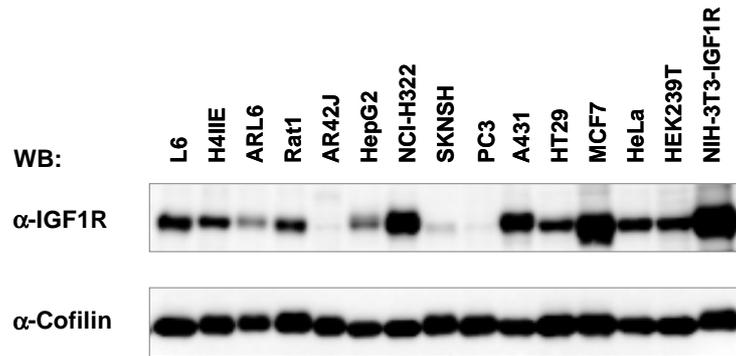
**Abb. 27: Biacore-Analyse der Bindung von Klotho an eine IGF1R-Oberfläche.** Die gereinigte extrazelluläre Domäne des IGF1R (R&D) wurde an die Oberfläche eines Biacore-„Chips“ gekoppelt. **(A)** Die Bindungsfähigkeit der IGF1R-Oberfläche wurde mit steigenden Konzentrationen an IGF1 (6,5 nM - 1666,7 nM) getestet und anhand der ermittelten Daten eine Sättigungskurve erstellt ( $K_d$ -Wert = mittels GraphPad Prism errechnete Dissoziationskonstante). **(B)** Als Kontrolle für die Bindungsspezifität der IGF1R-Oberfläche wurde die Bindung von EGF (12,5 µg/µl) an die Oberfläche gemessen und mit der Bindung von IGF1 (12,5 µg/ml) verglichen. **(C)** und **(D)** Auf die gleiche Weise wurde eine mögliche Bindung von Klotho-Fc bzw. Klotho-His<sub>6</sub> an die IGF1R-Oberfläche getestet. Eingesetzt wurden jeweils 83 nM gereinigtes Klothoprotein. Die gemessenen Werte wurden mit denen der IGF1-Bindung verglichen, bei denen ähnliche Molaritäten an IGF1 wie Klotho eingesetzt worden waren.

Um die Spezifität der Bindung der Oberfläche zu bestimmen, wurde als Negativkontrolle die Bindung von EGF, der kein Ligand des IGF1R ist, getestet. Trotz eingesetzter hoher Konzentration an EGF konnte keine Bindung detektiert werden (Abb. 27B, blaue Kurve). Dies wurde besonders gut im Vergleich mit der IGF1-Bindungskurve (grün) deutlich. Bei dem gemessenen EGF-Signal handelte es sich lediglich um ein Signal, das durch einzelne Komponenten des Puffers, in dem der Ligand (hier EGF) vorlag, verursacht werden kann (= Puffer-„mismatch“). Die Oberfläche zeigte demnach ausschließlich eine spezifische Bindung von Liganden des IGF1R.

Die Bindung von Klotho an die IGF1R-Oberfläche wurde sowohl mit Klotho-Fc (Abb. 27C, blaue Kurve) als auch mit Klotho-His<sub>6</sub> (Abb. 27D, grüne Kurve) getestet. Für beide Klotho-Varianten war anhand der Bindungskurven keine Bindung im Vergleich mit ähnlichen molaren Mengen an IGF1 (blaue und rote Kurve) zu erkennen. Deutlich wurde dies auch in den erstellten Balkendiagrammen, bei denen jeweils die als relative Signale gemessenen Assoziationswerte verglichen wurden. Bei den leichten „Peaks“ in den Bindungskurven bzw. beim negativen Ausschlag bei Klotho-His<sub>6</sub> handelte es sich auch hier lediglich um Signale aufgrund eines Puffer-„Mismatch“. Somit konnte auch mit dieser empfindlichen biophysikalischen Methode keine Bindung der extrazellulären Klothodomäne an den IGF1R nachgewiesen werden.

#### ***3.4.4 Vergleich verschiedener Zelllinien in Bezug auf IGF1R-Expression, Klotho-Bindung und Inhibierung des IGF1-Signalweges durch Klotho***

Da eine direkte Bindung der extrazellulären Domäne von Klotho an den IGF1R nicht nachgewiesen werden konnte, wurde eine Vielzahl von Zelllinien in Bezug auf ihre IGF1R-Expression, Klotho-Bindung und Inhibierung des IGF1-Signalweges durch Klotho auf mögliche Korrelationen hin untersucht. Dabei wurden sechs Rattenzelllinien und zehn humane Zelllinien analysiert. Es wurde sowohl die IGF1R-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie als auch die Gesamt-IGF1R-Expression mittels Western Blot-Analyse (Abb. 28) bestimmt. In Tabelle 2 sind alle Ergebnisse zusammengefasst.



**Abb. 28: Untersuchung der IGF1R-Expression verschiedener Zelllinien mittels Western Blot-Analyse.** Die Proteinkonzentration von Lysaten verschiedener Zelllinien wurde mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt und gleiche Proteinmengen jeder Zelllinie mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Expression des IGF1R wurde mittels Western Blot-Analyse mit einem IGF1R-Antikörper untersucht. Die Cofilin-Expression diente als Kontrolle für den Einsatz gleicher Proteinmengen.

**Tab. 2: IGF1R-Expression und Klothobindung verschiedener Zelllinien.** Die Inhibierung des IGF1-Signalweges nach Klotho-Behandlung wurde durch Kontrolle der Expression des IGF1R bzw. des Phosphorylierungsstatus des IGF1R sowie von Akt durch SDS-PAGE und Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. Die Bindung von Klotho und die Expression des IGF1R wurden mittels Durchflusszytometrie mit RPE-markiertem Klotho und einem RPE-gekoppeltem IGF1R-Antikörper bzw. durch Western Blot-Analyse mit einem IGF1R-Antikörper bestimmt.

Zelllinie	Inhibition des IGF1R Signalweges (WB-Analyse)	Bindung von Klotho (Durchflusszytometrie)	Oberflächenexpression des IGF1R (Durchflusszytometrie)	IGF1R Expression (WB-Analyse)
Rattenzelllinien				
L6	+++++	+++++	/	+++
H4IIE	-	-	/	+++
ARL6	+++	++++	/	++
Rat1	++	+++++	/	+++
AR42J	-	-	/	+
McA-Rh7777	/	-	/	/
Humane Zelllinien				
HepG2	++++	++++	++++	++
NCI-H322	++++	+++	+++	++++
SK-N-SH	+++	++	/	+
PC3	-	++	+	+
A431	+	+	++	++++
HT29	+++	++	++	++
MCF7	++	+++	++++	+++++
HeLa	++	+	+++	+++
HEK293T	-	++++	+++	+++
Stabil transfizierte Mauszelllinie				
NIH-3T3-IGF1R	++++	+++	+++++	+++++

+++++ sehr stark, ++++ stark, +++ mittelmäßig, ++ leicht, + sehr leicht, - nicht vorhanden, / wurde nicht bestimmt

Aus dieser Datenübersicht geht hervor, dass die Inhibition des IGF1-Signalweges, die Klotho-Bindung und die IGF1R-Expression durchaus teilweise miteinander korrelieren. D.h., in Zellen mit hoher IGF1R-Expression und starker Klotho-Bindung findet man auch eine gute Inhibition des IGF1-Signalweges durch Klotho, wie z.B. bei NCI-H322- und HepG2-Zellen. Zellen, die dagegen kaum IGF1R exprimieren, wie z.B. AR42J, zeigen weder eine Inhibierung des IGF1-Signalweges noch binden sie Klotho. Jedoch ist die Korrelation nicht immer eindeutig, wie z.B. im Fall der HEK 293T-Zellen, die den IGF1R zwar gut exprimieren und Klotho sehr gut binden, jedoch keine Inhibierung des IGF1-Signalweges aufweisen.

Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass eine Bindung der extrazellulären Domäne von Klotho an den IGF1R in keinem der vorherigen Versuche nachgewiesen werden konnte, erhärten die Hypothese, dass lösliches Klotho an einen bisher unbekanntem Rezeptor bindet, der im Weiteren identifiziert werden sollte.

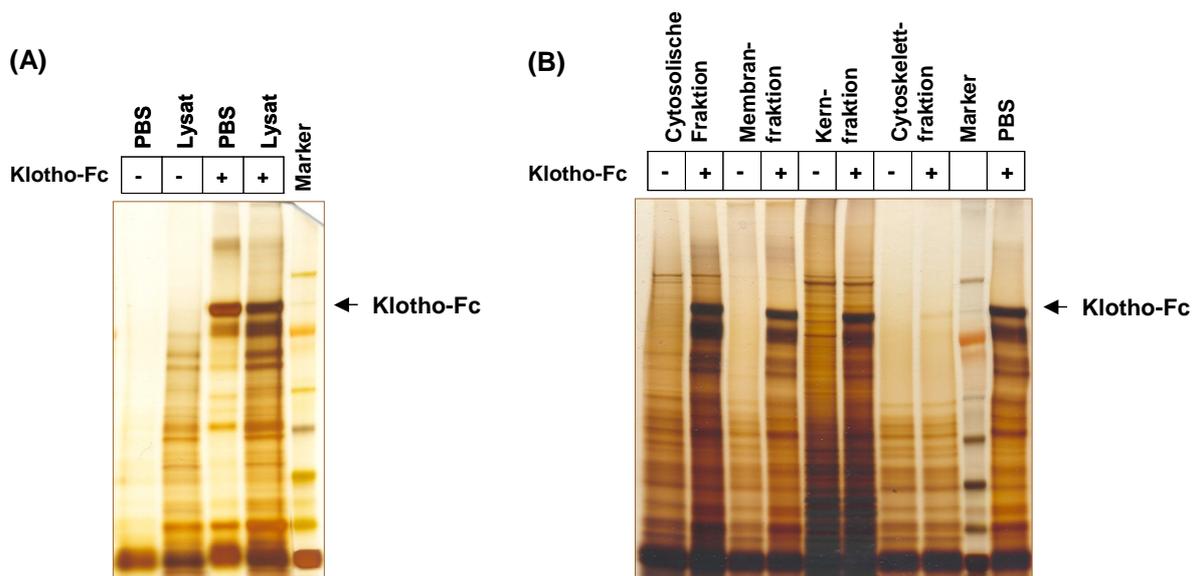
### **3.5 Versuch der Identifizierung eines Klothorezeptors durch „Pull-Down“ und Far-Western mit gereinigtem Klotho-Fc**

#### **3.5.1 „Pull-Down“-Experimente zur Identifizierung eines Klothorezeptors**

Bei der Suche nach Klotho-bindenden Proteinen wurden zuerst L6-Zellen verwendet, da diese in den bisherigen Versuchen die beste Klotho-Bindung und gleichzeitig die stärkste Inhibition des IGF1-Signalweges zeigten. In einem ersten Versuch wurde ein „Pull-Down“ mit an Protein A/G Agarosekügelchen gebundenem Klotho-Fc und L6-Zellysate durchgeführt. Die mittels SDS-PAGE separierten Proteine wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Im gefärbten Gel (Abb. 29A) waren in den zwei Kontrollen, Lysat mit Protein A/G Agarosekügelchen ohne Klotho-Fc (Spur 2) und PBS (statt Lysat) mit an Protein A/G Agarosekügelchen gebundenem Klotho-Fc (Spur 3), bereits viele unspezifische Banden erkennbar. Im Ansatz mit Lysat und an Protein A/G Agarosekügelchen gebundenem Klotho-Fc (Spur 4) waren im Vergleich dazu keine Banden zu sehen, die nicht auch in einem dieser Kontrollansätze vorkamen. Es handelte sich demnach bei allen sichtbaren Banden lediglich um Banden mit unspezifisch an die Agarosekügelchen gebundenen Proteinen aus dem Lysat

oder durch von der Klotho-Fc Präparation verursachte Banden (Klothoabbau oder Restverunreinigungen).

Um den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren, wurden in einem zweiten Ansatz statt der Zelllysate, subzelluläre Fraktionen eingesetzt: (1) eine cytosolische -, (2) eine Membran-, (3) eine Kern- und (4) eine Cytoskelettfraktion (Abb. 29B). Interessant war hier vor allem die Membranfraktion, da das Ziel die Identifizierung eines Plasmamembranrezeptors für Klotho war. Auch hier wurde bei allen Fraktionen in den Kontrollansätzen mit Lysat aber ohne Klotho-Fc (Spur 1, 3, 5 und 7) bzw. PBS mit Klotho-Fc (Spur 10) eine Vielzahl unspezifischer Banden, jedoch keine deutlich zu erkennende zusätzliche Bande in den Ansätzen mit Lysat und Klotho-Fc (Spur 2, 4, 6 oder 8) detektiert. Es handelte sich bei allen Banden erneut lediglich um unspezifisch an die Agarosekügelchen gebundene Proteine aus den Fraktionen bzw. um Klothoabbau oder Restverunreinigungen der Klotho-Fc Präparation. Es konnten keine spezifisch an Klotho-Fc gebundenen Proteine identifiziert werden.



**Abb. 29: „Pull-Down“ von Klotho-bindenden Proteinen aus L6-Zelllysaten.** L6-Zellen wurden **(A)** mit Chaps-Puffer lysiert bzw. **(B)** mit Hilfe des „ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kits“ in vier Fraktionen aufgetrennt. Das Lysat bzw. die Fraktionen wurden für einen „Pull-Down“ mit an Protein A/G-Agarosekügelchen gebundenem Klotho-Fc verwendet. Durch Bindung an Klotho-Fc präzipitierte Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Ansätze mit PBS oder ohne Klotho-Fc dienten als Kontrolle für unspezifische Bindungen.

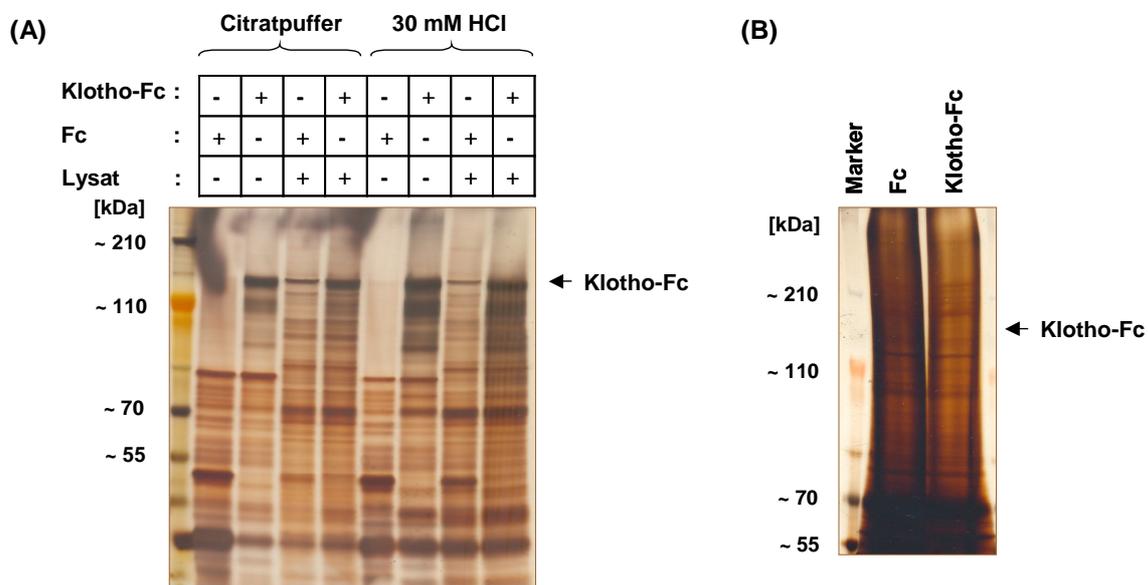
Um die Proteinausgangsmenge für den „Pull-Down“ zu erhöhen und so auch schwächere aber spezifische Bindungen detektieren zu können, wurde im folgenden

Versuch statt mit Zelllysaten mit einer Membranpräparation aus Rattenleber gearbeitet. Das Proteom wurde dadurch zwar auf unterschiedliche Zelltypen erweitert, aber zusätzlich auf Membranproteine eingeschränkt. Da die humane Leberzelllinie HepG2 und die Rattenleberzelllinie ARL6 eine starke Bindung von Klotho zeigten (siehe Tabelle 2), ist davon auszugehen, dass zumindest ein Teil der Leberzellen einen Rezeptor für Klotho besitzt. Pellet 2 und 3 der Membranpräparation wurde am Ende vereinigt, da bei der Kontrolle der Präparation mittels Western Blot-Analyse mit einem Calnexin-Antikörper (= Marker für Membranproteine) beide Fraktionen in etwa gleichem Maße Membranproteine enthielten (Daten nicht gezeigt). Die Trennung der Proteine von den Agarosekügelchen vor der SDS-PAGE erfolgte diesmal nicht durch 6 min Inkubation bei 99 °C, sondern durch 10-minütige Inkubation mit Citratpuffer (pH 5,5) bei Raumtemperatur. Dabei wurde der Puffer gewählt, der bereits für die Elution im Rahmen der Reinigung von Klotho-Fc über eine Protein A Säule verwendet worden war. Es wurde ein möglichst hoher pH gewählt, bei dem sich im besten Fall Klotho-Fc mit den spezifisch gebundenen Proteinen löst, jedoch nicht zusätzlich alle unspezifisch gebundenen Proteine. Proteine, die sich nicht durch Citratpuffer von den Kügelchen lösen ließen, wurden mit Hilfe von 30 mM HCl eluiert. Um unspezifische Bindungen an den Fc-„Tag“ ausschließen zu können, wurde diesmal im Kontroll-„Pull-Down“ gereinigtes Fc eingesetzt.

Ein Vergleich der Banden im gefärbten Gel (Abb. 30A) nach Elution mit Citratpuffer (Spur 1-4) mit denen nach Elution mit 30 mM HCl (Spur 5-8) zeigte ein vollständig übereinstimmendes Bild mit vielen unspezifischen Banden, die entweder unspezifisch gebundene Proteine aus dem Lysat oder Klothoabbau bzw. Restverunreinigungen der Klotho-Fc bzw. Fc Präparation enthielten. Die durch den Citratpuffer erfolgte Elution war demnach nicht spezifischer als die durch 30 mM HCl. In den Ansätzen mit Lysat und Klotho-Fc (Spur 4 und 8) war auch in diesem Versuch keine Bande zu sehen, die nicht auch in einer der drei Kontrollansätze (Spur 1-3 bzw. Spur 4-7) auftauchte. Daher war es nicht möglich ein Klotho-spezifisches Bindeprotein zu identifizieren.

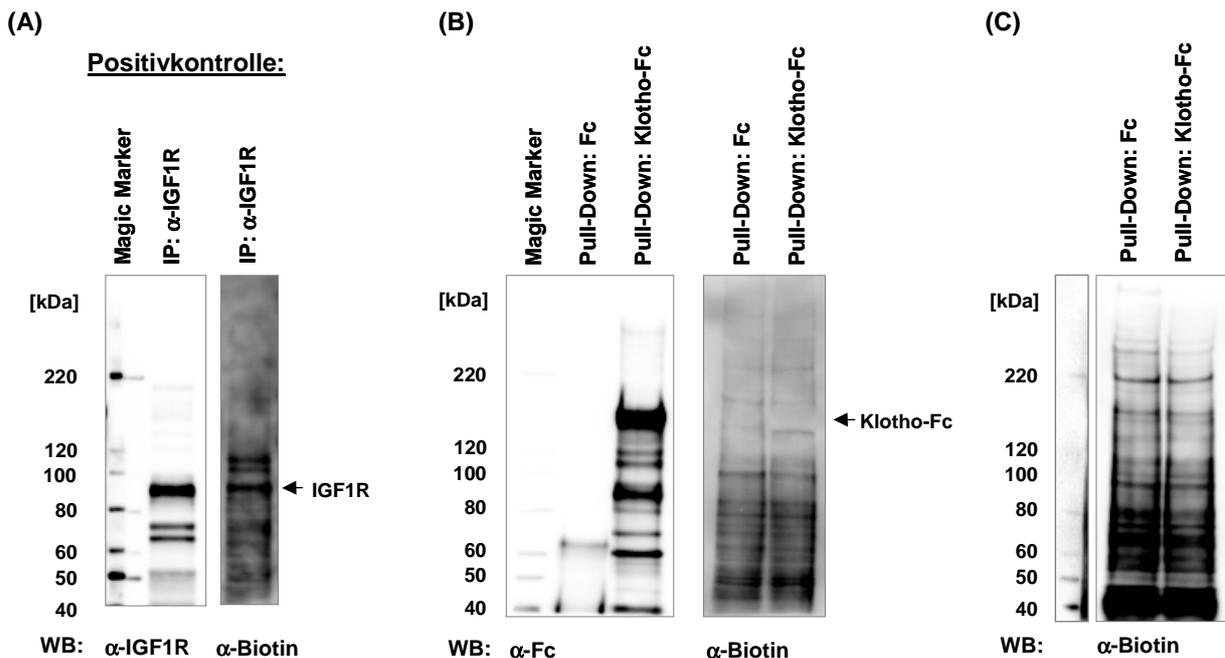
Um zumindest einen Teil der durch die Klotho-Fc Präparation verursachten unspezifischen Banden, die im Kontrollansatz nur mit Klotho-Fc (Spur 2 und 6) erkennbar waren, zu eliminieren, wurde Klotho-Fc mit Hilfe des homobifunktionalen Imidoesters Dimethylpimelimidat x 2 HCl (DMP), der Amidbindungen mit primären Aminen eingeht, fest an Protein A Agarosekügelchen gebunden („Crosslinking“). Beim Lösen

der Proteine durch Inkubation für 6 min bei 99 °C sollte Klotho an den Kügelchen hängen bleiben und so nicht mit auf das Gel aufgetragen werden. Dies reduzierte die dominanten Banden, die in allen vorherigen Kontrollansätzen mit gereinigtem Klotho-Fc zu sehen waren deutlich (Abb. 30B). Trotzdem waren im Vergleich zum Kontrollansatz mit Fc keine zusätzlichen Banden und damit keine spezifisch an Klotho gebundenen Proteinen erkennbar. Um in der Silberfärbung überhaupt Proteinbanden detektieren zu können, musste das Gel relativ lange entwickelt werden, wodurch auch die unspezifische Färbung des Hintergrunds stark zunahm.



**Abb. 30: „Pull-Down“ von Klotho-bindenden Proteinen aus einer Rattenlebermembranpräparation.** Rattenlebern wurden homogenisiert und die Membranen mittels differentieller Zentrifugation präpariert. Membranproteine (in Pellet 2 und 3 nach dem zweiten und dritten Zentrifugationsschritt enthalten) wurden solubilisiert und vereinigt. **(A)** Solubilisierte Proteine wurden für einen „Pull-Down“ mit an Protein A Agarosekügelchen gebundenem Klotho-Fc verwendet. Gebundene Proteine wurden von den Kügelchen durch 10-minütige Inkubation mit Citratpuffer (0,1M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat pH 5,5, 0,2 M NaCl, 0,01 % Tween 20) gelöst bzw. restliche noch gebundene Proteine mit 30 mM HCl abgetrennt. **(B)** Solubilisierte Proteine wurden für einen „Pull-Down“ mit zuvor durch Dimethyl-pimelimidat x 2 HCl (DMP) fest an Protein A Agarosekügelchen gekoppeltem Klotho-Fc verwendet. Gebundene Proteine wurden durch Zugabe von SDS-Ladepuffer und Inkubation für 6 min bei 99 °C von den Kügelchen getrennt. Mittels „Pull-Down“ präzipitierte Proteine aus (A) und (B) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Ansätze mit Fc oder ohne Lysat (ersetzt durch PBS) dienen als Kontrolle für unspezifische Bindungen.

Um die unspezifischen Signale zu reduzieren, wurden in einem alternativen Ansatz die Oberflächenproteine von L6 Zellen biotinyliert und die nach „Pull-Down“ gebundenen biotinylierten Proteine mittels Western Blot-Analyse mit anti-Biotin detektiert. Dadurch sollte die Detektion unspezifisch gebundener Nicht-Membranproteine ausgeschlossen werden.



**Abb. 31: „Pull-Down“ von Klotho-bindenden Proteinen aus L6-Zelllysaten nach Biotinylierung der Oberflächenproteine.** Die Oberflächenproteine von L6 Rattenmyoblasten wurden mit Sulfo-NHS-Biotin biotinyliert. Anschließend wurden die Zellen mit Chaps-Puffer lysiert und das Lysat **(A)** für eine Immunpräzipitation des IGF1R mit an Protein A Agarosekügelchen gebundenem IGF1R-Antikörpern (= Positivkontrolle für eine erfolgreiche Biotinylierung), **(B)** für einen „Pull-Down“ mit an Protein A Agarosekügelchen gebundenem Klotho-Fc bzw. **(C)** für einen „Pull-Down“ mit zuvor durch Dimethylpimelimidat x 2 HCl (DMP) fest an Protein A Agarosekügelchen gekoppeltem Klotho-Fc verwendet. Präzipitierte Proteine aus (A), (B) und (C) wurden durch SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit IGF1R- bzw. Biotin-Antikörpern detektiert. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen im „Pull-Down“ diente ein Ansatz mit Fc anstelle von Klotho-Fc.

Die erfolgreiche Zelloberflächenbiotinylierung sowie die folgende Detektion eines Membranproteins nach Isolierung durch Immunpräzipitation wurde am Beispiel des IGF1R gezeigt und damit der Versuchsaufbau validiert. Der IGF1R konnte in der Western Blot-Analyse (Abb. 31A) nach der Immunpräzipitation sowohl mit einem IGF1R- als auch mit einem Anti-Biotin-Antikörper als Bande in Höhe von ~ 90 kDa

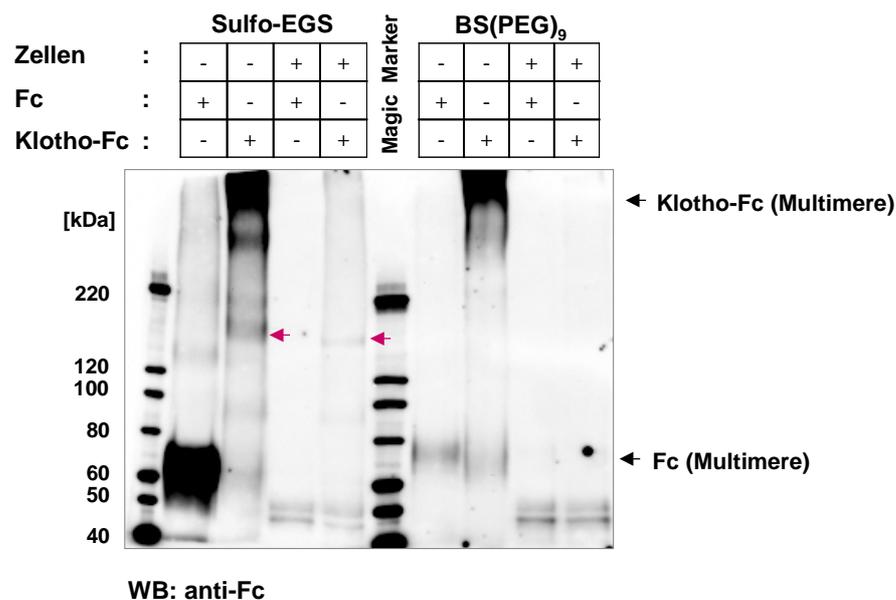
detektiert werden. Der eigentliche „Pull-Down“ wurde dann sowohl ohne als auch mit der Kopplung von Klotho-Fc an die Protein A Agarosekügelchen mittels „Cross-linking“ durchgeführt. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen an den Fc-„Tag“ diente auch hier ein „Pull-Down“ mit gereinigtem Fc. In der Western Blot-Analyse des „Pull-Downs“ ohne Kopplung wurde die Bindung von Klotho-Fc an die Protein A Agarosekügelchen und die folgende Ablösung dieser durch Inkubation bei 99 °C durch Detektion einer starken Bande im Western Blot mit einem Fc-Antikörper nachgewiesen (Abb. 31B, links). Im Western Blot mit Anti-Biotinantikörpern (Abb. 31B, rechts) konnte im Vergleich zur Negativkontrolle mit Fc keine deutliche Bande mit spezifisch an Klotho-Fc gebundenem Protein detektiert werden. Das Bandenmuster beider „Pull-Downs“ stimmte im Wesentlichen überein.

Das gleiche Ergebnis zeigte die Western Blot-Analyse des „Pull-Downs“ mit Kopplung von Klotho-Fc an die Protein A Agarosekügelchen mittels „Crosslinking“ (Abb. 31C). Auch hier war eine Vielzahl von Banden mit unspezifisch gebundenen Proteinen und ein quasi identisches Bandenmuster zwischen dem Kontroll-„Pull-Down“ mit Fc und dem „Pull-Down“ mit Klotho-Fc erkennbar.

In weiteren nicht beschriebenen Ansätzen wurden darüber hinaus zusätzliche Bedingungen getestet. Mit dem Ziel, die Spezifität und Stärke der Bindung zu erhöhen, wurden z.B. verschiedene Lysepuffer eingesetzt, um unterschiedliche Bindungsbedingungen zu schaffen. Um die beobachteten unspezifischen Bindungen zu reduzieren, wurde die Anzahl der Waschschriffe erhöht bzw. verschiedene Waschreagenzien beim Waschen der Protein A Agarosekügelchen nach Bindung der Proteine eingesetzt, sowie die Agarosekügelchen vor Gebrauch mit BSA geblockt. Trotzdem konnte weder die unspezifische Bindung von Proteinen ausreichend reduziert noch die spezifische Bindung eines Proteins an Klotho detektiert werden. Daher wurde angenommen, dass die Bindung von Klotho an den gesuchten Rezeptor unter den gewählten Bedingungen, z.B. in der Anwesenheit von Detergenz, zu schwach ist.

Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Bindung von Klotho-Fc analog zur Bindung im Rahmen der Durchflusszytometrie durchgeführt und im Anschluss Klotho-Fc an gebundene Oberflächenproteine mittels „Crosslinking“ gekoppelt. Um ein optimales Ergebnis bei der Kopplung zu erzielen, wurden zwei unterschiedliche „Crosslinker“ getestet, bei denen es sich in beiden Fällen um NHS (N-Hydroxy-

succinimid)-Ester handelte, die primäre Amine (-NH<sub>2</sub>) miteinander koppeln: Sulfo-EGS (Ethylenglykol-bis-sulfosuccinimidylsuccinat) und BS(PEG)<sub>9</sub> (Bis-succinimid-ester-aktiviertes Polyethylenglykol). BS(PEG)<sub>9</sub> hat den Vorteil, dass es einen längeren PEG-Spacer Arm besitzt, der eine flexiblere Bindung ermöglicht, die Stabilität der Bindung erhöht und die Tendenz zur Aggregation reduziert. Sulfo-EGS dagegen hat den Vorzug, dass die Kopplung durch Spaltung rückgängig gemacht werden kann. Mittels „Pull-Down“ präzipitierte, an Klotho-Fc gekoppelte Proteine sollten durch Western Blot-Analyse mit Fc-Antikörpern detektiert werden, wobei nur Banden oberhalb von 130 kDa interessant waren, da diese das ~ 130 kDa schwere Klotho-Fc mit daran gekoppeltem Protein enthalten müssten. Für jeden „Crosslinker“ wurde eine Negativkontrolle mit Fc sowie zwei Kontrollansätze ohne Zellen mit Fc bzw. Klotho-Fc und „Crosslinkern“ durchgeführt.



**Abb. 32: „Pull-Down“ von Klotho-bindenden Proteinen aus L6-Zelllysaten nach Kopplung von Klotho-Fc an gebundene Oberflächenproteine.** Gereinigtes Klotho-Fc wurde für 30 min mit L6 Rattenmyoblasten inkubiert und an die Oberfläche der Zellen gebundenes Klotho-Fc anschließend durch „Crosslinking“ mit Sulfo-EGS oder BS(PEG)<sub>9</sub> an seine Interaktionspartner gekoppelt. Die Zellen wurden dann mit Chaps-Puffer lysiert und das Lysat für einen „Pull-Down“ durch Protein A Agarosekügelchen verwendet. An Klotho-Fc gekoppelte präzipitierte Proteine wurden durch SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit Fc-Antikörper detektiert. Ansätze mit Fc oder ohne Zellen (ersetzt durch Chaps-Puffer) dienten als Kontrolle für unspezifische Bindungen.

Im Western Blot mit Fc-Antikörpern (Abb. 32) waren sowohl bei Sulfo-EGS (Spur 2-5) als auch bei BS(PEG)<sub>9</sub> (Spur 7-10) bei den beiden Kontrollansätzen (Spur 2 und 3

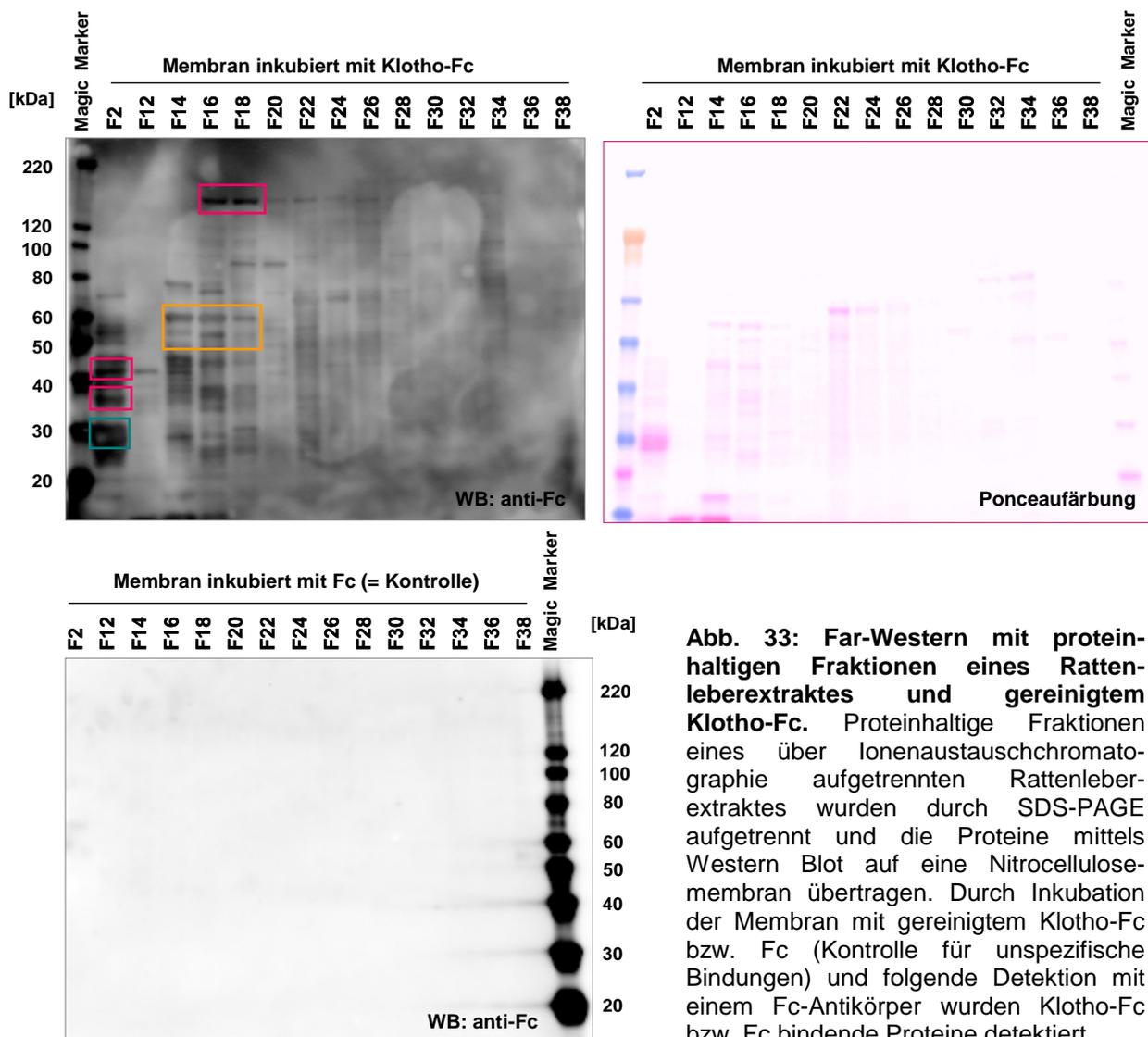
bzw. 7 und 8) durch die „Crosslinker“ entstandene Multimere von Fc bzw. Klotho-Fc anhand von sehr starken Banden in Höhe von ~ 60-70 kDa bzw. am oberen Rand des Blots erkennbar. In den Ansätzen mit Zellen (Spur 4 und 5 bzw. 9 und 10) war die Vielzahl an unspezifischen Banden aus den vorherigen Versuchen eindeutig reduziert, wiederum aber so gut wie keine spezifische Bande sichtbar. Lediglich im Ansatz mit Sulfo-EGS wurde eine möglicherweise spezifische Bande zwischen 130 und 220 kDa detektiert (roter Pfeil), die jedoch auch im Kontrollansatz mit Klotho-Fc ohne Zellen vorzukommen schien. Somit konnte auch durch „Crosslinking“ Experimente kein Interaktionspartner von Klotho identifiziert werden.

### **3.5.2 Far-Western Analyse zur Identifizierung eines Klothorezeptors**

Die Far-Western-Analyse bietet für die Identifizierung eines Klothorezeptors eine Alternative zu „Pull-Down“-Experimenten. Bei dieser Methode wurden proteinhaltigen Fraktionen einer chromatographischen Auftrennung eines Rattenleberextraktes verwendet (siehe Doktorarbeit Vanessa Schadel, 2008). Jede zweite Fraktion wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Statt der üblichen Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper wurde die Membran jedoch mit gereinigtem Klotho-Fc inkubiert, um eine Bindung von Klotho an Interaktionspartner auf der Membran zu erreichen. Die Wahrscheinlichkeit auf diesem Wege Interaktionspartner zu finden, ist jedoch geringer als durch „Pull-Down“-Experimente, da die Proteine auf der Membran in den meisten Fällen durch die vorhergehende SDS-PAGE nicht mehr in ihrem nativen Zustand vorliegen. Dadurch können Bindungsstellen eines möglichen Interaktionspartners zerstört sein. Bindet Klotho jedoch an ein Protein auf der Membran, kann der Bindungspartner-Klotho-Fc-Komplex durch Inkubation mit Fc-Antikörper sichtbar gemacht werden.

Für die Auswertung des Far-Western ist es sinnvoll, den Blot mit der zuvor gemachten Ponceaufärbung zu vergleichen (Abb. 33 oben). Banden, die ein starkes Signal im Western Blot, aber ein schwaches Signal in der Ponceaufärbung zeigten (z.B. roter Kasten in Fraktion 16 und 18), sind möglicherweise interessanter, da ein starkes Signal in der Ponceaufärbung (z.B. grüner Kasten in Fraktion 2) eine große Menge an Protein bedeutet, was leichter zu einer unspezifischen Bindung im Far-Western führen kann. Da hier im Far-Western mit Klotho-Fc eine Vielzahl an Banden

detektiert wurde, ist anzunehmen, dass es sich bei der Mehrzahl um unspezifische Bindungen handelte. Diese unspezifischen Bindungen finden jedoch nicht über den Fc-„Tag“ statt, da die Negativkontrolle, bei der die Membran mit gereinigtem Fc statt mit Klotho-Fc inkubiert wurde, keine Banden aufwies (Abb. 33 unten).

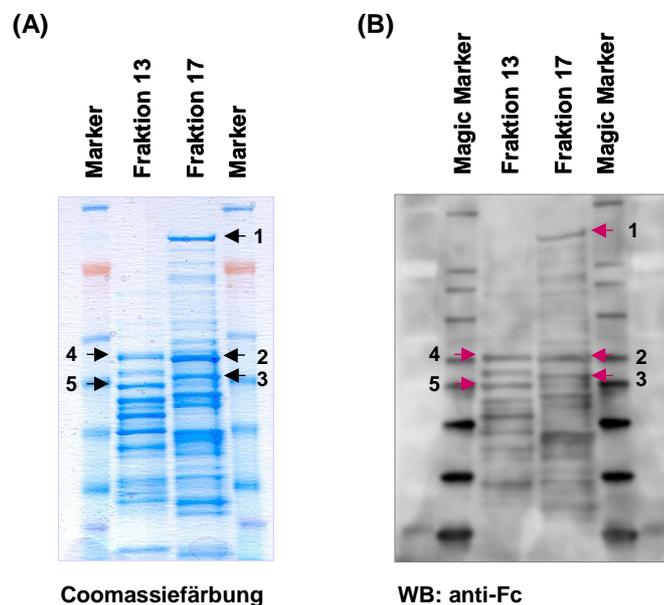


**Abb. 33: Far-Western mit proteinhaltigen Fraktionen eines Rattenleberextraktes und gereinigtem Klotho-Fc.** Proteinhaltige Fraktionen eines über Ionenaustauschchromatographie aufgetrennten Rattenleberextraktes wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Durch Inkubation der Membran mit gereinigtem Klotho-Fc bzw. Fc (Kontrolle für unspezifische Bindungen) und folgende Detektion mit einem Fc-Antikörper wurden Klotho-Fc bzw. Fc bindende Proteine detektiert.

Am vielversprechendsten im Far-Western mit Klotho-Fc (Abb. 33 oben) sahen die rot umrandeten Banden in Fraktion 2 sowie in Fraktion 16 und 18 aus, da sie ein starkes Signal im Western Blot aber ein schwaches Signal in der Ponceaufärbung zeigten. Da jedoch von allen drei Fraktionen für eine weitergehende Analyse nicht genügend Material vorhanden war, wurde im Weiteren zur Analyse der rot umrandeten Banden

in Fraktion 16 und 18 mit Fraktion 17 gearbeitet. Um zusätzlich die orange umrandeten Banden aus Fraktion 14 bzw. 16 untersuchen zu können, die zwar ein relativ starkes Signal in der Ponceaufärbung aber auch im Far-Western zeigten, wurde, da von Fraktion 14 und 15 ebenfalls nicht mehr genügend Material vorhanden war, stattdessen Fraktion 13 in der folgenden Analyse eingesetzt.

Die Proteine aus Fraktion 13 und 17 wurden im doppelten Ansatz mittels SDS-PAGE getrennt, ein Teil des Gels mit Coomassie gefärbt und der andere im Far-Western eingesetzt (Abb. 34). Wie erwartet stimmten die Bandenmuster von Fraktion 13 bzw. 17 mit denen von Fraktion 14 bzw. 16 aus dem vorherigen Blot (Vergleich mit Abb. 33, links oben) überein. Die bereits zuvor gewählten, zu analysierenden Banden (oranger bzw. roter Kasten in Fraktion 14 bzw. 16, Abb. 33) wurden im Far-Western (Abb. 34, rechts) identifiziert (mit Pfeil markierte Banden), die entsprechenden Banden aus dem Coomassiegel (Abb. 34, links) ausgeschnitten und nach Trypsinverdau mittels Massenspektrometrie analysiert. Die massenspektrometrische Analyse wurde von der Abteilung „Protein and Cell Science“ bei Merck Serono durchgeführt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.



**Abb. 34: Far-Western mit ausgewählten Fraktionen eines Rattenleberextraktes und gereinigtem Klotho-Fc.** Fraktion 13 und 17 eines über Ionenaustauschchromatographie aufgetrennten Rattenleberextraktes wurden durch SDS-PAGE separiert und die Proteine **(A)** mittels Coomassiefärbung sichtbar gemacht bzw. **(B)** mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Durch Inkubation der Membran mit gereinigtem Klotho-Fc und folgende Detektion mit einem Fc-Antikörper wurden Klotho-Fc bindende Proteine sichtbar gemacht.

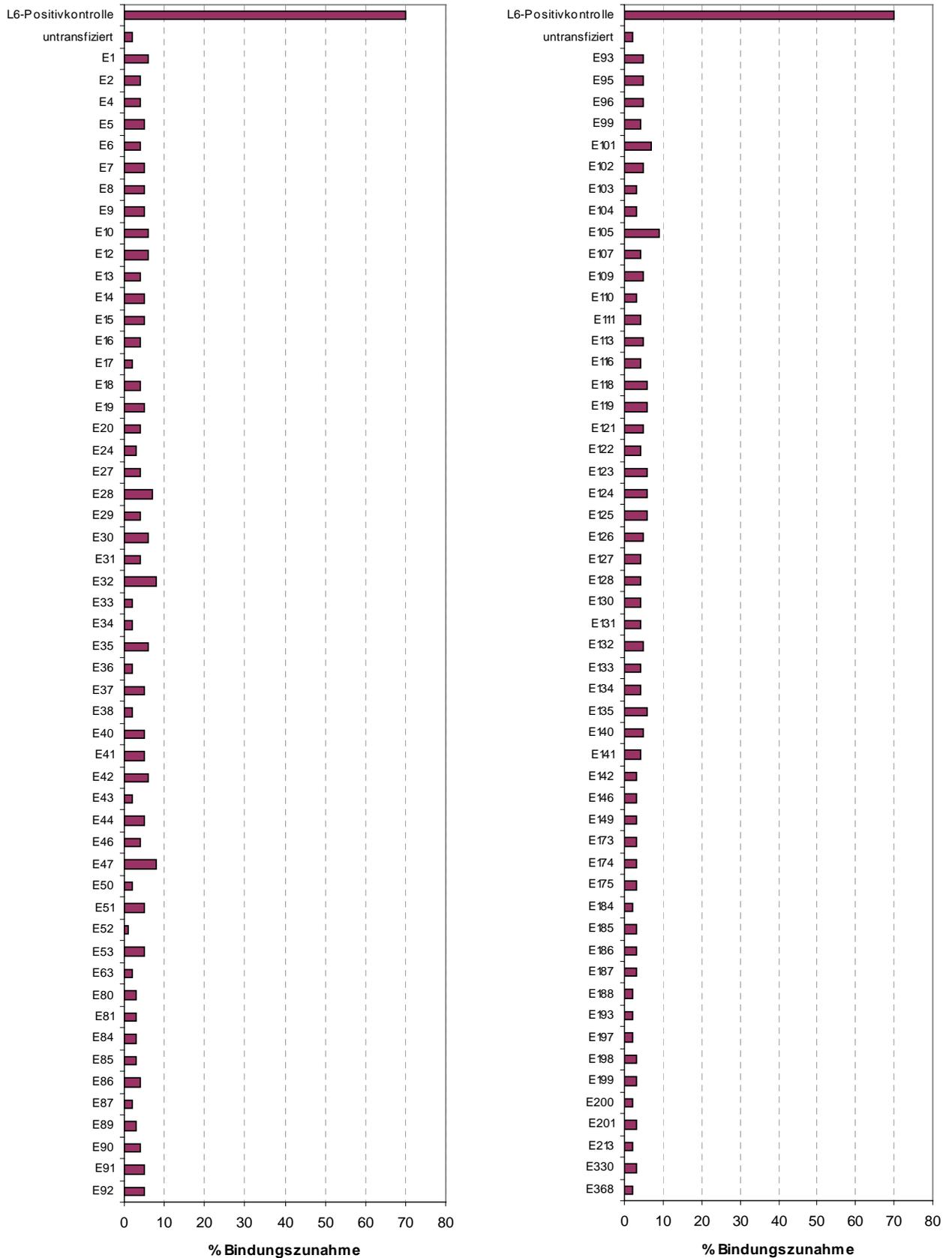
Bei den mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteinen handelte es sich vor allem um Enzyme, wie Katalasen, die in der Leber in großen Mengen vorkommen, jedoch keine Membranproteine sind. Daher war es unwahrscheinlich, dass es sich um Interaktionspartner von Klotho handelt, sondern wahrscheinlicher, dass im Far-Western eine unspezifische Bindung vorlag. Dafür sprach bereits die Tatsache, dass bei diesem Versuch die Signale im Far-Western Blot schwächer, die Banden im Coomassiegel dafür relativ deutlich erkennbar waren, was auf eine große Proteinmenge in der jeweiligen Bande hindeutet und zu unspezifischen Bindungen führen kann. Die Ergebnisse wurden daher nicht weiter verfolgt.

**Tab. 3: Liste der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine aus den mittels Far-Western und Comassiefärbung ausgewählten Proteinbanden.**

	Identifiziertes Protein (Ratte)	Sequenzabdeckung in der massenspektrometrischen Analyse
1	Carbamoyl-phosphate Synthase (mitochondrial)	55 %
2	Katalase und Acyl-coenzyme A synthetase	49 % und 29 %
3	Katalase	71 %
4	Katalase und Carboxylesterase 4	63 % und ?
5	$\alpha$ -Enolase und Hydroxymethylglutaryl-CoA Synthase	31 % und 20 %

### 3.6 Screening von 106 „Orphan“ GPCRs auf Bindung von Klotho-Fc

Es ist beschrieben, dass Klotho in Endothelzellen über die Aktivierung eines cAMP-Signalweges einen anti-oxidativen Effekt ausüben (Rakugie *et al.*, 2007) bzw. die ACE-Aktivität erhöhen kann (Yang *et al.*, 2003). Am Anfang von cAMP-Signalwegen stehen oft G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Daher wurde nun untersucht, ob „Orphan“ GPCRs, also Rezeptoren, die gemäß ihrer Sequenz zu den GPCRs gezählt werden, für die aber noch kein endogener Ligand identifiziert wurde, Klotho binden können.



**Abb. 35: Untersuchung der Bindung von Klotho-Fc an mit „Orphan“-GPCRs transfizierte HeLa-Zellen.** HeLa-Zellen wurden mit Hilfe von Lipofectamin 2000 mit verschiedenen GPCRs (E1-E368) transient transfiziert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Bindung von Klotho-Fc an untransfizierte bzw. transient transfizierte Zellen 48 h nach Transfektion getestet. Dazu wurde gereinigtes Klotho-Fc mit R-Phycoerythrin (RPE) konjugiert, mit  $1 \times 10^6$  Zellen für 30 min inkubiert (eingesetzte Konzentration an Klotho-Fc: 120 nM) und die Bindung mittels Durchflusszytometrie gemessen. Tote Zellen wurden mit Sytox Green (= Todzellmarker) angefärbt und von der Analyse ausgeschlossen. Als Positivkontrolle diente die Bindung an L6 Rattenmyoblasten.

In den letzten 20 Jahren wurde eine Vielzahl an „Orphan“ GPCR-Liganden demaskiert. Von den ~ 800 bekannten GPCRs, gehören ~ 500 zu den chemosensorische GPCRs, von denen ~ 300 noch keinen identifizierten Liganden besitzen. Dazu gehören v.a. Liganden von olfaktorischen und Geschmacks-GPCRs. Daneben gibt es ~ 360 Transmitter-GPCRs, von denen etwa noch 100 zu den „Orphan“-Rezeptoren zählen (Chung *et al.*, 2008). 106 dieser „Orphan“ GPCRs wurden hier auf eine Bindung von Klotho hin analysiert. Dazu wurden HeLa-Zellen, die in der Durchflusszytometrie nur eine sehr geringe Bindung von Klotho zeigten (siehe Tab. 2) mit den verschiedenen GPCR-Plasmiden transfiziert und mittels Durchflusszytometrie getestet, ob eine transiente Expression der einzelnen Rezeptoren zu einer verstärkten Bindung von Klotho-Fc an die Zellen führt. Als Nachweis für eine erfolgreiche Transfektion diente die Kontrolltransfektion mit einem GFP-Plasmid und der Nachweis der GFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie (nicht gezeigt).

Während auch unter diesen Hochdurchsatzbedingungen die L6-Zellen der Positivkontrolle eine robuste Klotho-Bindung von 70 % zeigten, führte die Transfektion von keinem der 106 GPCR-Klone zu einer signifikanten Zunahme der Klotho-Bindung über den Hintergrund der HeLa-Zellen hinaus (Abb. 35). Während nach dem Setzen einer Schranke oberhalb der zuvor gezeigten Bindung von Klotho durch HeLa-Zellen (siehe Tab. 2) 2 % der untransfizierten Zellen eine Bindungszunahme zeigten, schwankte die Bindungszunahme der transfizierten HeLa-Zellen leicht zwischen 1-9 %. Dabei handelte es sich jedoch lediglich um Schwankungen aufgrund unvermeidbarer Ungenauigkeiten in der experimentellen Durchführung.

Zusätzlich wurde mit Hilfe der EPIC-Technologie untersucht, ob L6-Zellen auf die Behandlung mit Klotho hin typische Signale für die Aktivierung eines GPCR-Signalweges zeigen. Die Aktivierung von GPCRs führt in der Zelle zu einer dynamischen Translokation vieler Signalmoleküle und in vielen Fällen zur Cytoskelett-reorganisation. Eine solche Bewegung und/oder Reorganisation führt zu einer dynamischen Verteilung des Zellinhalts (= „dynamic mass redistribution, DMR), die in lebenden Zellen mit Hilfe der EPIC-Technologie verfolgt werden kann. Das System misst Änderungen im lokalen Brechungsindex innerhalb des auf dem Biosensor gewachsenen Zellrasens. Liganden-induzierte DMR in lebenden Zellen wird als Verschiebung der Wellenlänge sichtbar, die vom Sensor reflektiert wird. Die so erzeugte optische Signatur gibt das G-Protein gekoppelte Profil des Rezeptors wieder,

wodurch Rückschlüsse darauf gezogen werden können, ob es sich um einen  $G\alpha_s$ -,  $G\alpha_q$ - oder  $G\alpha_i$ -Protein gekoppelten Rezeptor Signalweg handelt (Schröder *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008). Die Signale nach Klothostimulation von L6-Zellen waren allerdings relativ schwach und schlecht auswertbar, so dass trotz schwacher Hinweise keine fundierte Aussage über die Aktivierung von GPCR-Signalwegen durch Klotho getroffen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Versuche wurden am Institut für pharmazeutische Biologie der Universität Bonn (Gruppe von Prof. Kostenis) durchgeführt.

### **3.7 „Microarray“-Studien zur Ermittlung von Änderungen im Genexpressionsprofil verschiedener Zelllinien nach Behandlung mit Klotho**

Um weitere Informationen zu generieren, die zur Identifizierung eines neuen Klothorezeptors beitragen könnten, wurden „Microarray“-Studien zur Ermittlung von Änderungen im Genexpressionsprofil von ausgewählten Zelllinien nach Behandlung mit Klotho durchgeführt. Dabei wurde die Expression von 20000 Genen untersucht. Für die Studie wurde sowohl gereinigtes Klotho-Fc als auch Klotho-His<sub>6</sub> verwendet. Klotho-His<sub>6</sub> wurde eingesetzt, da es in den bisherigen Versuchen eine bessere Bindung an Zellen bei guter Inhibition des IGF1-Signalweges zeigte. Da sich für Klotho-His<sub>6</sub> jedoch keine Glucuronidasaktivität nachweisen ließ, wurde zusätzlich Klotho-Fc eingesetzt, um auch Funktionen bzw. Effekte abzudecken, die Folge einer enzymatischen Aktivität von Klotho sind.

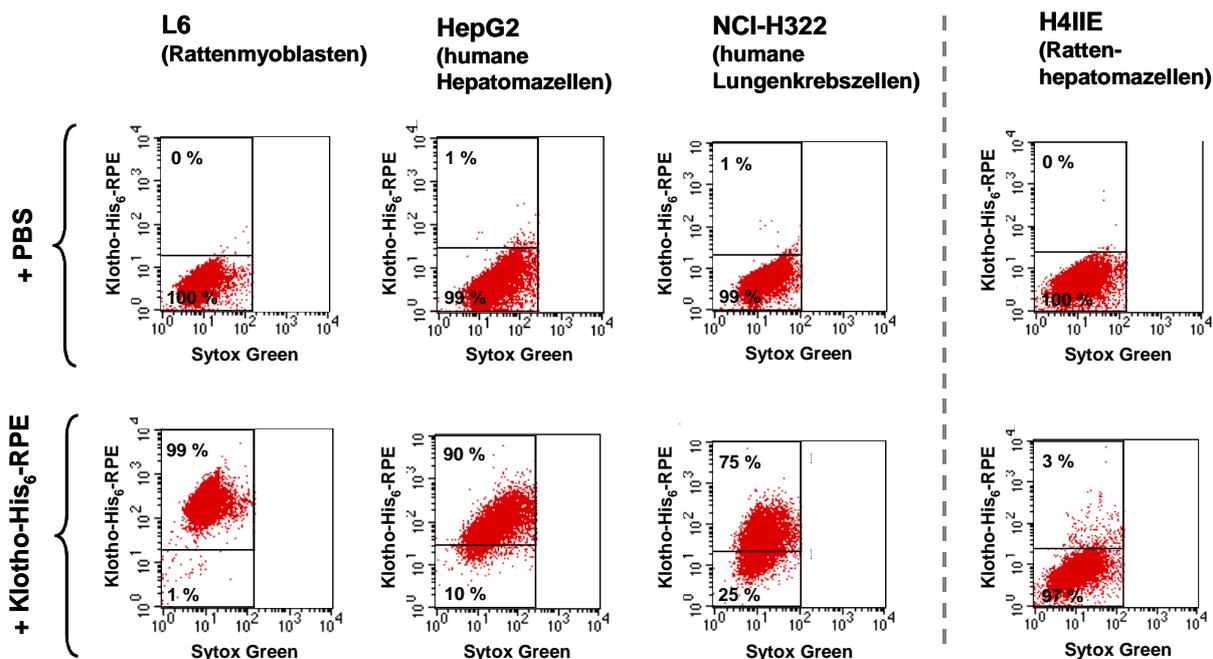
#### **3.7.1 Auswahl von Zelllinien für die „Microarray“-Studien**

Für die Auswahl von Zelllinien für die „Microarray“-Studien wurden folgende Kriterien angesetzt: Die Zellen müssen zum einen Klotho binden können und zum anderen muss eine Inhibierung des IGF1-Signalweges durch Klotho in diesen Zellen nachweisbar sein. Da L6-Zellen bisher bei beiden Kriterien die besten Ergebnisse zeigten, wurde diese Zelllinie als erste gewählt. Da es sich um eine Rattenzelllinie handelt, wurde ein Rattengenom-„Chip“ eingesetzt, die Zellen jedoch mit humanem Klotho behandelt. Dies war möglich, da alle bisherigen Ergebnisse, wie Bindung oder funk-

tionelle Effekte, gezeigt hatten, dass humanes Klotho mit dem Nagersystem kreuzreagiert. Darüber hinaus wurde der im Datenblatt zu humanem Klotho-His<sub>6</sub> von R&D Systems beschriebene Aktivitätstest ebenfalls nicht mit einer humanen, sondern einer Mauszelllinie (Mausfibroblasten) durchgeführt. Zusätzlich wurden zwei humane Zelllinien ausgewählt, um auch Effekte abzudecken, die humanes Klotho möglicherweise in Rattenzellen nicht auslösen kann. Für diese Zellen wurde dementsprechend ein Humangenom-„Chip“ verwendet.

### 3.7.1.1 Bindung von Klotho an die Zelloberfläche

Die Bindung von Klotho an verschiedene Zelllinien zur Auswahl einer geeigneten humanen Zelllinie für die „Microarray“-Studien wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht.



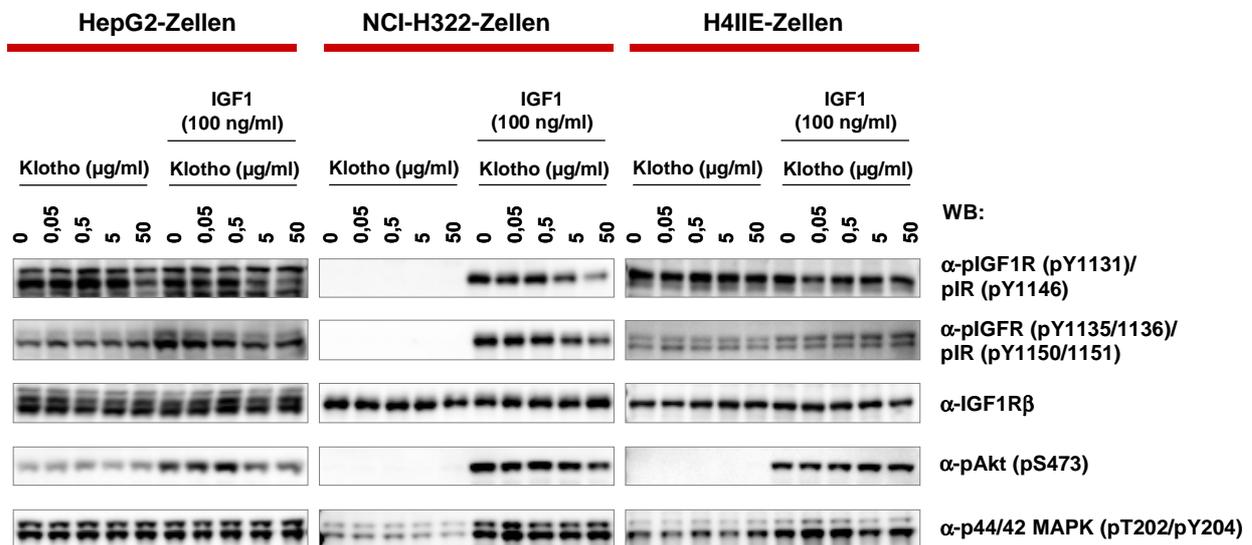
**Abb. 36: Bindung von Klotho an verschiedene Zelllinien.** Klotho-His<sub>6</sub> wurden mit R-Phycoerythrin (RPE) konjugiert und in einer Endkonzentration von 77 nM mit  $1 \times 10^6$  Zellen für 30 min inkubiert. Die Bindung von Klotho-His<sub>6</sub>-RPE an die Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Tote Zellen wurden mit Sytox Green (= Todzellmarker) angefärbt und von der Analyse ausgeschlossen. Als Negativkontrolle für die Bindung dienten Ansätze mit PBS anstelle von Klotho-His<sub>6</sub>-RPE.

Von den getesteten Zellen (siehe Tab. 2) wurden HepG2- und NCI-H322-Zellen ausgewählt, da sie eine gute Klotho-Bindung aufwiesen, wobei 90 % der HepG2- und 75 % der NCI-H322-Zellen Klotho-His<sub>6</sub>-RPE banden (Abb. 36). L6-Zellen, von denen 99 % eine Klothobindung zeigten, dienten hier als Positivkontrolle, während H4IIE-

Zellen dargestellt sind, um als Negativkontrolle die Spezifität der Bindung von Klotho zu verdeutlichen. Eine Klotho-Bindung von 3 %, die H4IIE-Zellen aufwiesen, entspricht wahrscheinlich dem Prozentsatz unspezifischer Bindung, der immer vorliegt.

### 3.7.1.2 Inhibition des IGF1-Signalweges durch Klotho

Die Inhibition des IGF1-Signalweges als zweites Auswahlkriterium wurde, wie bereits beschrieben, mittels Western Blot-Analyse untersucht. Von den getesteten Zellen (siehe Tab. 2) wurden erneut HepG2- und NCI-H322-Zellen ausgewählt, da sie den IGF1-Signalweg, der zur Phosphorylierung von Akt führt, am stärksten hemmten (Abb. 37). Sowohl die IGF1-induzierte Phosphorylierung des IGF1R als auch von Akt nahm bei HepG2 und NCI-H322-Zellen bei zunehmender Konzentration an Klotho deutlich ab. Dies war nicht der Fall bei H4IIE-Zellen, die erneut als Negativkontrolle dienten, um die Spezifität der Inhibierung nachzuweisen. Ein Effekt von Klotho auf die Phosphorylierung der p44/42 MAPK war bei keiner Zelllinie erkennbar, wodurch erneut die spezifische Wirkung von Klotho auf den IGF1R-Akt-Signalweg nachgewiesen wurde.



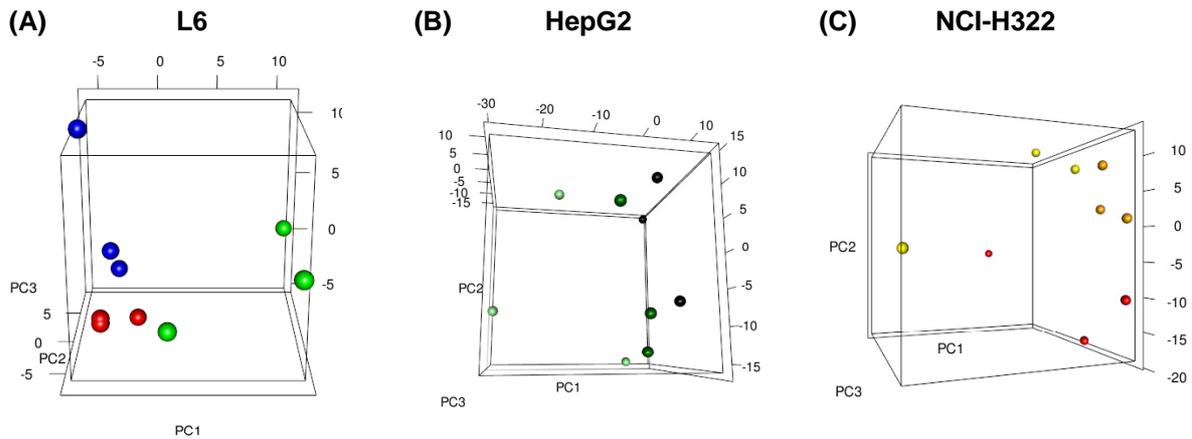
**Abb. 37: Inhibition des IGF1-Signalweges durch Klotho.** HepG2-, NCI-H322- und H4IIE-Zellen wurden mit den angegebenen Klotho-Fc Konzentrationen für 30 min behandelt, 5 min mit 100 ng/ml IGF1 stimuliert und anschließend lysiert. Die Expression des IGF1R bzw. der Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivität des IGF1R sowie die Akt und p44/42 MAPK Phosphorylierung wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mit den entsprechenden Antikörpern analysiert.

### 3.7.2 „Microarray“-Studien

Bei den „Microarray“-Studien wurden aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Vorexperimente (3.7.1) neben L6-Rattenmyoblasten NCI-H322- und HepG2-Zellen eingesetzt. Diese wurden für 24 h mit 50 nM Klotho-His<sub>6</sub> bzw. Klotho-Fc (entspricht ~ 7 µg/ml Klotho-Fc und 5,3 µg/ml Klotho-His<sub>6</sub>) oder PBS (= Negativkontrolle) in serumfreien Medium inkubiert, anschließend lysiert und die synthetisierte RNA für die Genexpressionsanalyse mit Hilfe eines „Microarrays“ von Affymetrix verwendet. Dabei wurden 50 nM Klotho eingesetzt, da bei dieser Konzentration sowohl bei Klotho-Fc als auch bei Klotho-His<sub>6</sub> bereits eine deutliche Inhibition des IGF1-Signalweges erkennbar und somit auch eine Regulation der Genexpression zu erwarten war. Da es bisher keine Erfahrungen mit Klotho in „Microarray“-Studien gab, wurde als Zeitwert für die Genexpressionsanalyse 24 h nach Zugabe von Klotho gewählt. Dieser Zeitwert ist ein typischer mittlerer Zeitwert bei der Durchführung von „Microarray“-Studien, bei dem die Wahrscheinlichkeit eine Regulation der Genexpression zu sehen sehr hoch ist. Frühe und späte Effekte werden dagegen unter Umständen nicht erfasst.

Die Auswertung der Genexpressionsdaten der mit Klotho behandelten bzw. unbehandelten Zellen erfolgte durch die Bioinformatikabteilung der Firma Merck Serono. Dabei wurde als Erstes eine sogenannte Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsprofile von Klotho-behandelten und unbehandelten Zellen durchgeführt. Sie ist eine Technik zur Dimensionsreduktion hochdimensionaler Daten. Das 20000-dimensionale Expressionsprofil einer Probe (hervorgegangen aus 20000 untersuchten Genen) wird letztendlich auf ein dreidimensionales Profil reduziert, das als Punkt in einem dreidimensionalen Raum dargestellt wird (Abb. 38). Da für jeden Ansatz Triplikate angefertigt wurden, sind pro Zelllinie neun Punkte dargestellt (3 x unbehandelt, 3 x behandelt mit Klotho-His<sub>6</sub> und 3 x behandelt mit Klotho-Fc).

Anhand der dreidimensionalen Profile war erkennbar, dass es bei allen drei Zelllinien nach Behandlung mit Klotho-Fc bzw. Klotho-His<sub>6</sub> zu einer Änderung des Genexpressionsprofils kam, da sich die Punkte und damit die Profile der unbehandelten Zellen (grün bei L6, schwarz bei HepG2 und rot bei NCI-H322) gut und eindeutig von den übrigen Profilen durch ziehen einer imaginären Teilungsebene trennen ließen. Lediglich bei den Klotho-Fc behandelten HepG2-Zellen (dunkelgrüne Punkte) lag eine weniger eindeutige Trennung vor, was im Vergleich mit L6-Zellen auf schwächere Unterschiede in der globalen Genexpression nach Klotho-Behandlung hindeutete.



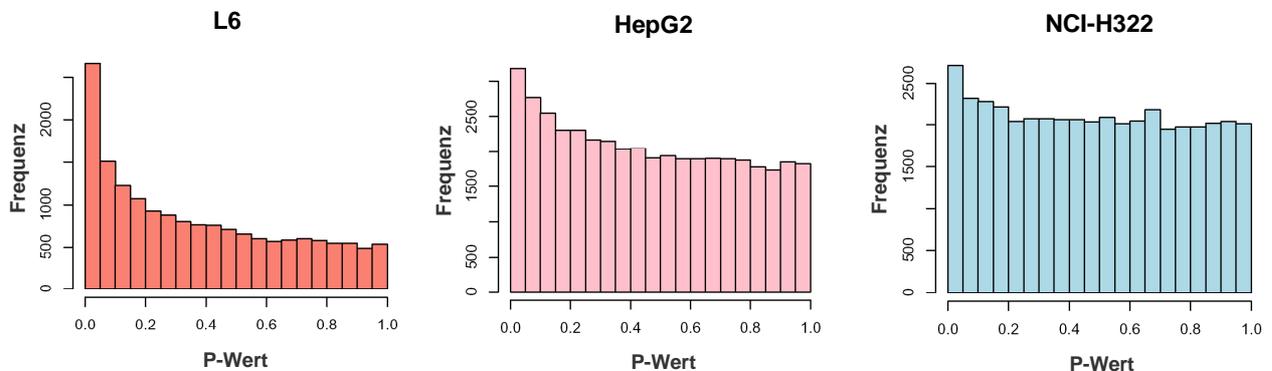
**Abb. 38: Hauptkomponentenanalyse der Genexpressionsprofile von Klotho-behandelten und unbehandelten Zelllinien.** Die mittels „Microarray“-Analyse (Affymetrix) ermittelten Genexpressionsprofile unbehandelter oder 24 h mit Klotho behandelter L6-, HepG2- und NCI-H322-Zellen wurden durch eine Hauptkomponentenanalyse auf ein dreidimensionales Profil reduziert. In den „Microarray“-Studien gemachte Triplikate sind durch drei gleichfarbige Punkte dargestellt. **(A)** L6-Rattenmyoblasten: Expressionprofile unbehandelter Zellen = grün, nach Behandlung mit Klotho-His<sub>6</sub> = rot bzw. mit Klotho-Fc = blau. **(B)** NCI-H322-Zellen: Expressionprofile unbehandelter Zellen = rot, nach Behandlung mit Klotho-His<sub>6</sub> = gelb bzw. mit Klotho-Fc = orange. **(C)** HepG2-Zellen: Expressionprofile unbehandelter Zellen = schwarz, nach Behandlung mit Klotho-His<sub>6</sub> = hellgrün bzw. mit Klotho-Fc = dunkelgrün. PC = „principal component“ (Hauptkomponente).

Bei allen weiteren Analysen wurden nun der Einfachheit halber die Expressionsprofile der mit Klotho-Fc und Klotho-His<sub>6</sub> behandelten Zellen in einer Gruppe zusammengefasst und den Profilen der unbehandelten Proben gegenübergestellt. Dies war möglich, da zu erkennen war, dass Klotho-Fc und Klotho-His<sub>6</sub> die gleichen Effekte bezüglich der Genexpression in den behandelten Zellen auslösten.

Nachdem anhand der Hauptkomponentenanalyse gezeigt wurde, dass durch Klotho-Behandlung ein verändertes Genexpressionsprofil entstand, wurde nun die globale Signifikanz der Expressionsunterschiede in Klotho-behandelten und unbehandelten Zellen abgeschätzt. Bei dieser Abschätzung erhält man aus einem t-Test für differenzielle Expression für jedes untersuchte Gen einen P-Wert. In Abb. 39 sind die Häufigkeiten von P-Werten unterschiedlicher Klassen dargestellt. In einem Zufallsexperiment wären die P-Werte gleichmäßig verteilt, d.h. alle Balken hätten die gleiche Höhe. Ein vermehrtes Auftreten von P-Werten nahe Null belegt einen deutlichen Effekt der Klotho-Behandlung auf die Genexpression.

In der Studie mit L6-Zellen lagen über 2500 P-Werte sehr nahe bei Null (erster Balken), sie nahmen dann gegen Eins sehr schnell bis auf ~ 500 (letzter Balken) ab.

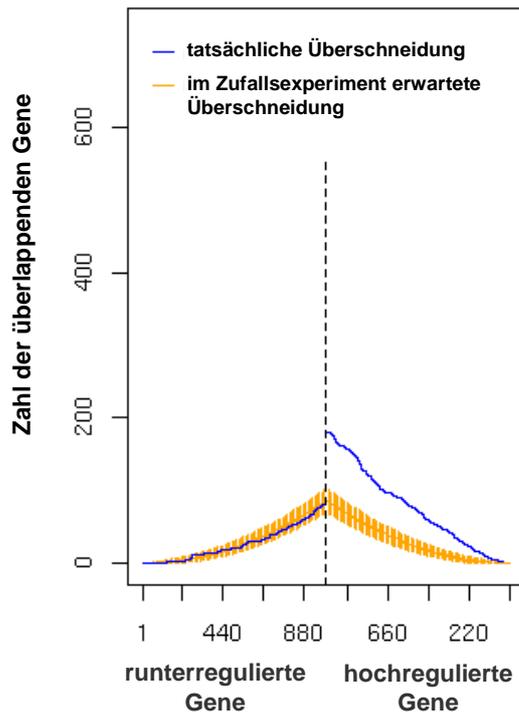
Bei HepG2-Zellen lag die Zahl der P-Werte nahe Null sogar über 3000 (erster Balken), jedoch waren sie insgesamt gleichmäßiger verteilt. Nahe Eins (letzter Balken) waren immer noch ~ 1300 P-Werte zu finden. Die gleichmäßigste Verteilung der P-Werte zeigte jedoch die Studie mit NCI-H322-Zellen (nahe Null knapp über 2500 und zwischen 0,2 und 1 jeweils ~ 2000 P-Werte). Das bedeutet, im Fall der L6-Zellen gibt es sehr viele differentiell exprimierte Gene, weniger im Versuch mit HepG2-Zellen und am wenigsten bei Behandlung von NCI-H322-Zellen. Diese Abschätzung gibt jedoch nur Auskunft über die Zahl der insgesamt regulierten Gene und nicht über die Stärke der einzelnen Expressionsdifferenzen.



**Abb. 39: Abschätzung der globalen Signifikanz der Expressionsunterschiede zwischen Klotho-behandelten und unbehandelten Zellen.** Die Signifikanz der Expressionsunterschiede in den mittels „Microarray“-Analyse (Affymetrix) ermittelten Genexpressionsprofilen unbehandelter oder 24 h mit Klotho behandelter L6-, HepG2- und NCI-H322-Zellen wurden mittels t-Test abgeschätzt. Für jedes untersuchte Gen wurde mit Hilfe eines t-Tests für differentielle Expression ein P-Wert ermittelt. Dargestellt sind die Häufigkeiten von P-Werten unterschiedlicher Klassen.

Im Weiteren wurde eine Überschneidung der differentiell exprimierten Gene zwischen den Zelllinien untersucht. Dabei konnte nur eine Überschneidung im Fall von L6- und HepG2-Zellen, nicht jedoch zwischen NCI-H322 und einer der anderen beiden Zelllinien, festgestellt werden. Die Überschneidung innerhalb der Listen mit differentiell exprimierten Genen aus den Versuchen mit L6- und HepG2-Zellen ist in Abb. 40 dargestellt. Die orange Linie und der orange markierte Bereich ober- und unterhalb der Linie gibt die Überschneidung an, die in einem Zufallsexperiment zu erwarten wäre. Die blaue Linie dagegen zeigt die tatsächliche Überschneidung zwischen L6- und HepG2-Zellen, wobei links der Mittellinie 1000 Gene mit verringertem Expression und rechts der Mittellinie 1000 Gene mit verstärkter Expression dargestellt sind. Hier ist erkennbar, dass lediglich eine deutliche Überschneidung

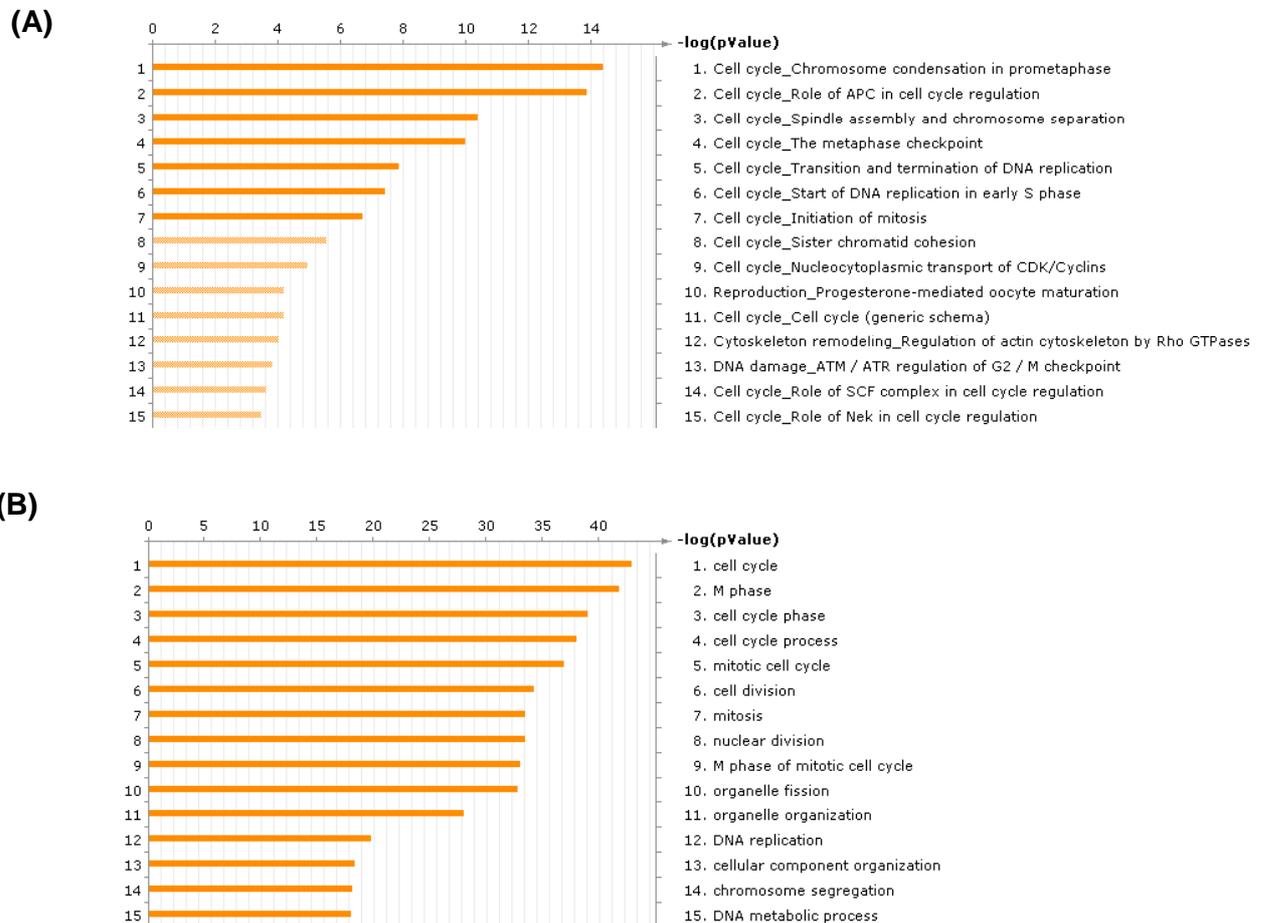
innerhalb der Gene mit verstärkter Expression vorlag, da die blaue Linie im rechten Teil deutlich über dem orangen Bereich liegt. Bei den dargestellten 1000 Genen lag eine Überschneidung von 180 Genen vor. Sie war damit signifikant größer als zufällig erwartet ( $p=0,004$  im Fischer-Test). Die Überschneidung bei den Genen, die eine verringerte Expression zeigten, war dagegen nur genau so groß wie in einem Zufallsexperiment erwartet; die blaue und orange Linie liegen aufeinander.



**Abb. 40: Überschneidung zwischen in L6- und HepG2-Zellen differenziell exprimierten Genen.** Die nach 24 h mit Klotho-Behandlung differenziell exprimierten Gene aus L6- und HepG2-Zellen wurden bezüglich überlappender Gene untersucht. Berücksichtigt wurden die 1000 am stärksten hoch- bzw. runterregulierten Gene. Orange Linie / orangen Bereich: Überschneidung, die in einem Zufallsexperiment zu erwarten wäre; blaue Linie: tatsächliche Überschneidung zwischen L6- und HepG2-Zellen.

Entscheidend für weitere Untersuchungen waren daher nur Gene, die nach Klotho-Behandlung eine verstärkte Expression zeigten. Daher wurden im Folgenden die 180 Gene, die am stärksten durch Klotho hochreguliert waren und sich gleichzeitig in L6- und HepG2-Zellen überschneiden, bezüglich ihrer Funktion untersucht. Die Analyse dieser Gene erfolgte mit Hilfe der MetaCore Software. Dabei wurden die Gene mit Gensets verglichen, die aus zwei verschiedenen Quellen stammten: (1) aus von GeneGo kuriierten biochemischen Signalwegen und (2) aus annotierten biologischen Prozessen des Gene Ontology Projekts. Diese zwei Datenbanken umfassen Informationen über den Großteil der bekannten zellulären Prozesse und Signaltransduktionswege. Mittels Fisher-Test wurde eine Anreicherung der durch Klotho induzierten Gene in jedem einzelnen der Gensets geprüft. Analysen beider Datenbanken ergaben, dass ein Großteil der 180 Klotho-induzierten Gene mit dem Zellzyklus bzw. der Mitose assoziiert sind (Abb. 41). Die Ergebnisse der Datenbankanalysen wiesen

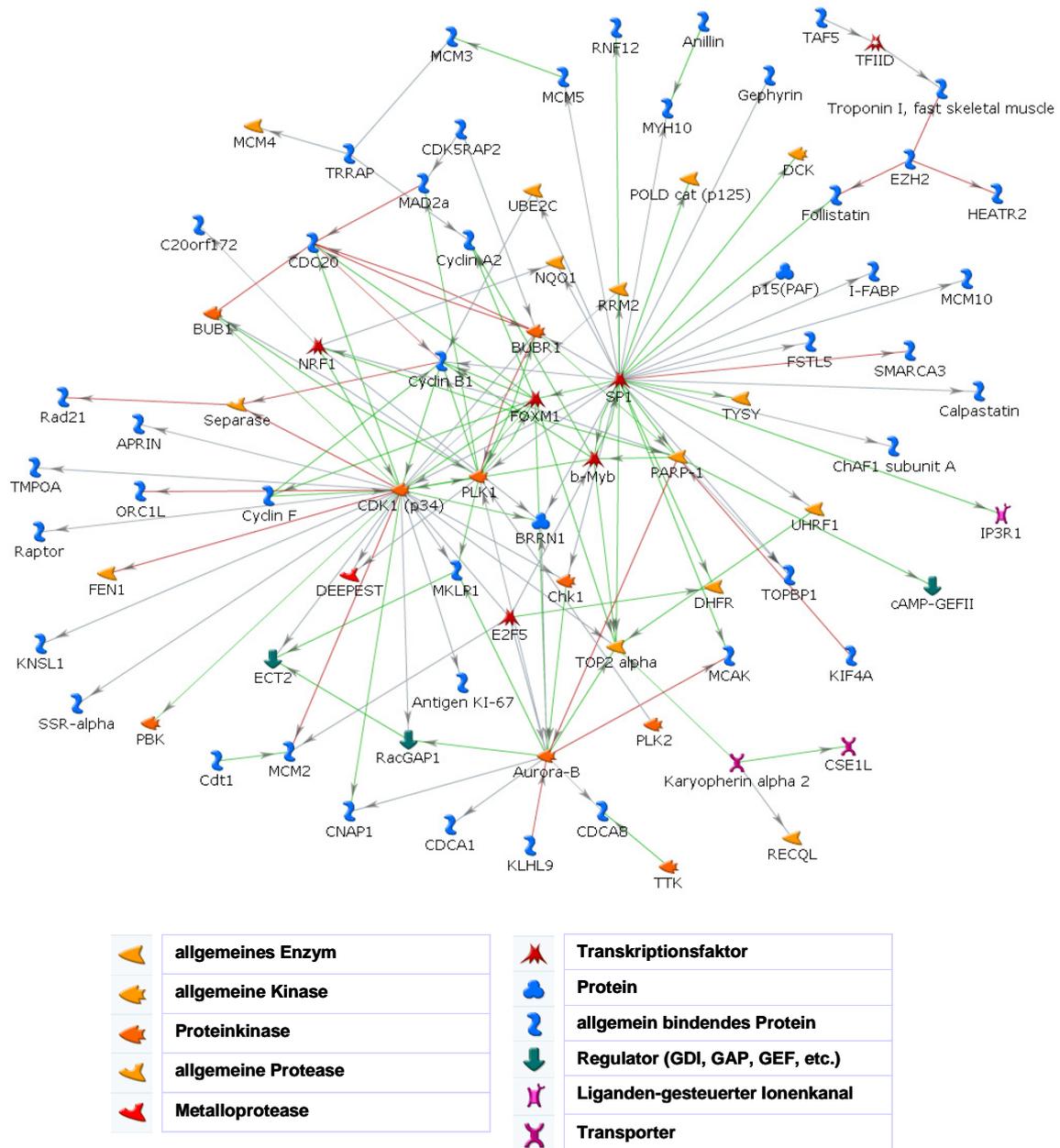
eine statistische Signifikanz von bis zu  $p < 10^{-40}$  auf und waren damit äußerst signifikant.



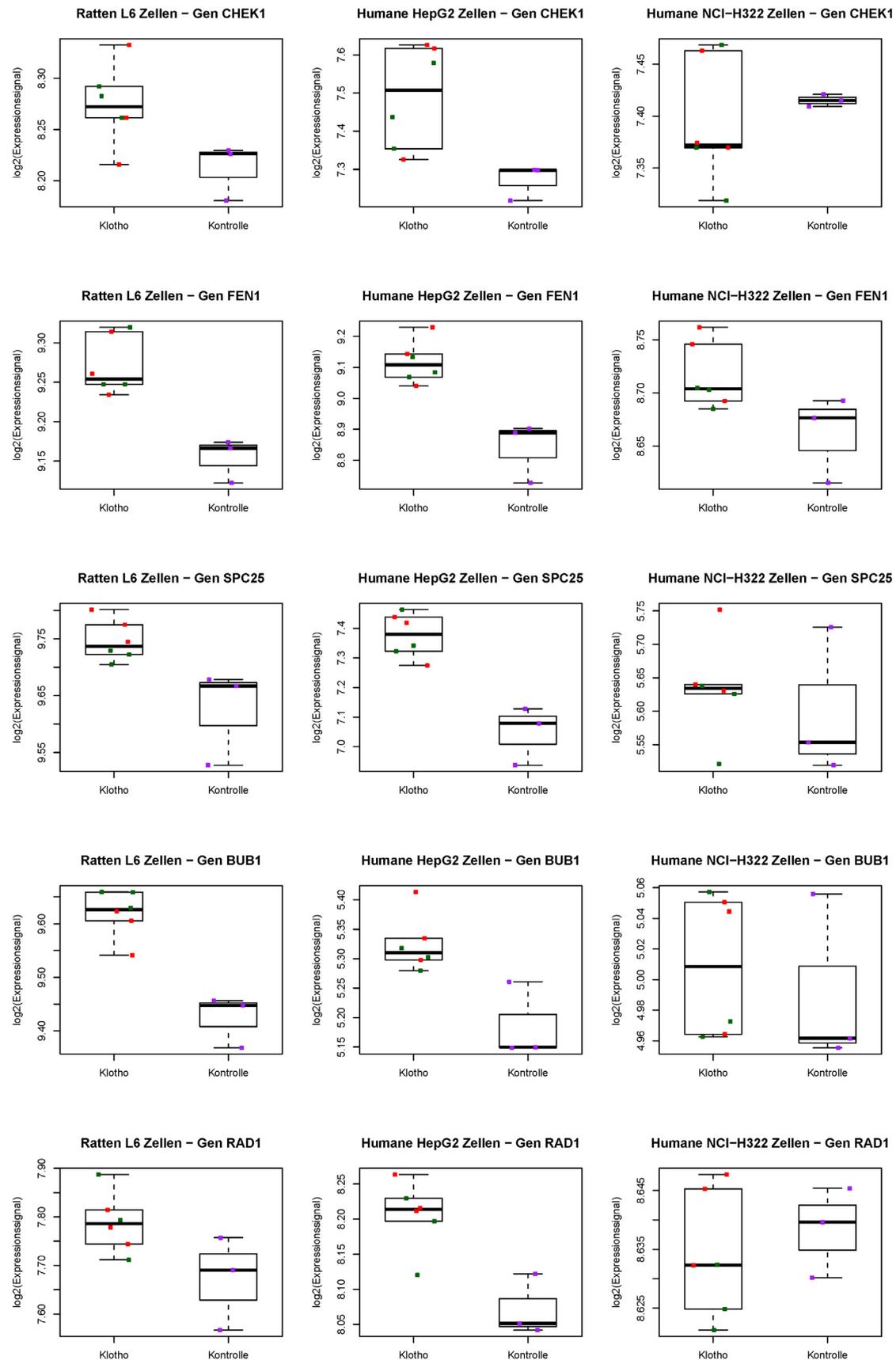
**Abb. 41: Analyse der durch Klotho hochregulierten Gene bezüglich ihrer Funktion.** Mit Hilfe der MetaCore Software von GeneGo (California, USA) wurden 180 in L6- und HepG2-Zellen durch Klotho-Behandlung gemeinsam hochregulierte Gene mit Gensets aus **(A)** von GeneGo kuriierte biochemische Signalwegen und **(B)** annotierten biologischen Prozessen des Gene Ontology Projekts verglichen. Mittels Fisher-Test wurde eine Anreicherung der Klotho-induzierten Gene in jedem der Gensets geprüft.

Die weitere Analyse mit Hilfe der MetaCore Datenbank ergab, dass 81 der 180 untersuchten regulierten Gene einen direkten funktionellen Zusammenhang aufwiesen. Mit Hilfe der MetaCore Software wurde ein funktionelles Netzwerk dieser 81 Gene erstellt (Abb. 42), innerhalb dessen jede Verbindung durch mindestens eine Literaturstelle aus der MetaCore Datenbank belegt ist. Insgesamt sind 139 funktionelle Interaktionen zwischen den Genen bzw. zugehörigen Proteinen dokumentiert. Der Transkriptionsfaktor Sp1 und die Zellzykluskinasen Cdk1 z.B. stehen in Verbindung mit je 34 anderen Kandidaten des Netzwerkes, die Kinasen Plk1 und Aurora-B

immerhin noch mit je 14 anderen Kandidaten. Insgesamt gesehen wurde hier ein Netzwerk erstellt, dessen Gene bzw. Proteine in einem funktionellen Zusammenhang stehen und deren Expression in L6- und HepG2-Zellen durch Klotho induziert wird.



**Abb. 42: Funktionelles Netzwerk aus 81 Klotho-induzierten Genen.** Mit Hilfe der MetaCore Software wurden die mittels „Microarray“-Analyse identifizierte 180 Klotho-induzierten Gene analysiert und ein funktionelles Netzwerk aus 81 dieser Gene erstellt. Jede Verbindung innerhalb des Netzwerkes ist durch mindestens eine Literaturstelle der MetaCore Datenbank belegt.



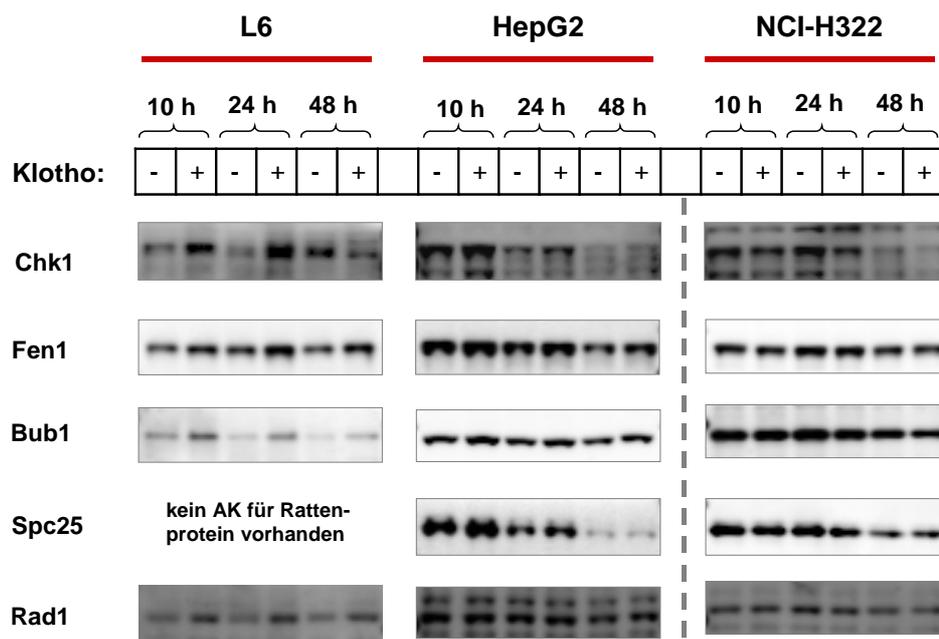
**Abb. 43: „Box-Whisker-Plots“ ausgewählter Zellzyklus-assoziierter Gene, die eine erhöhte Expression 24 h nach Behandlung mit Klotho zeigen.** Die Expression einzelner ausgewählter Zellzyklus-assoziierter Gene in Klotho-behandelten und unbehandelten L6-, HepG2- und NCI-H322-Zellen der „Microarray“-Studie wurden miteinander verglichen und mittels Box-Whisker-Plot visualisiert. In der „Microarray“-Studie gemachte Triplikate sind durch drei gleichfarbige Punkte dargestellt. Kontrolle = unbehandelte Zellen (lila Punkte), Klotho-Fc behandelte Zellen (grüne Punkte), Klotho-His<sub>6</sub>-behandelte Zellen (rote Punkte).

Zusätzlich zu den durchgeführten Datenbankanalysen wurde die Expression einzelner ausgewählter Zellzyklus-assoziiierter Gene in Klotho-behandelten und unbehandelten Zellen exemplarisch miteinander verglichen. Als Darstellungsform wurde der „Box-Whisker-Plot“ gewählt, bei dem die Expressionssignale auf einer logarithmischen Skala ( $\log_2$ ) dargestellt sind (Abb. 43). Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die horizontale Linie in der Box gibt den Median an. Durch die „Whisker“ werden die außerhalb der Box liegenden Werte und Extremwerte dargestellt. Die Auswahl der Gene erfolgte nach folgenden Kriterien: erstens Vorhandensein einer signifikanten Erhöhung der Expression auf RNA-Ebene bei Klotho-behandelten Zellen und zweitens Verfügbarkeit von geeigneten Antikörpern für die folgende Analyse der Expression auf Proteinebene (siehe 3.7.3). Für alle ausgewählten Gene zeigte sich in L6- und HepG2-Zellen eine signifikante moderate Erhöhung der RNA-Expressionslevel durch Behandlung mit Klotho um etwa 10-30 %. NCI-H322-Zellen dagegen wiesen keine erhöhte Expression dieser Gene auf. Dies war jedoch zu erwarten, da bei der Analyse der Überschneidung von differentiell exprimierten Genen keine Überschneidung zwischen NCI-H322- und L6- bzw. HepG2-Zellen festgestellt wurde. Die Funktionen der ausgewählten Gene sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

### **3.7.3 Verifizierung von Ergebnissen der „Microarray“-Studien**

Die Ergebnisse der „Microarray“-Studien wurden exemplarisch anhand der zuvor mit Hilfe des Box-Whisker-Plots dargestellten Gene (Abb. 43) auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse verifiziert. Dazu wurde die Expression der ausgewählten Gene nach Behandlung für 10, 24 und 48 h mit Klotho-His<sub>6</sub> untersucht. NCI-H322-Zellen wurden dabei als Negativkontrolle verwendet, da bei ihnen in der „Microarray“-Studie keine erhöhte Expression dieser Gene festgestellt werden konnte. Die Western Blot-Analyse (Abb. 44) zeigte, dass in L6- und HepG2-, nicht jedoch in NCI-H322-Zellen, nach Behandlung mit Klotho sowohl nach 10, 24 als auch nach 48 h auf Proteinebene eine erhöhte Expression der ausgewählten Zellzyklus-assoziierten Gene vorliegt. Die Banden der behandelten L6- und HepG2-Zellen waren teilweise geringfügig, aber teilweise auch deutlich stärker als die der unbehandelten Zellen. Lediglich bei Rad1 war in HepG2-Zellen keine Erhöhung der Expression nach Klotho-Behandlung erkennbar. In allen anderen Fällen war zumindest ein geringer Anstieg

detektierbar. Nach 48 h war teilweise, wie z.B. bei Spc25, nur noch eine schwache Proteinexpression auch in den unbehandelten Zellen zu sehen. Grund hierfür könnte sein, dass die Zellen nach 48 h sehr dicht waren und daher ihr Wachstum und damit die Expression bestimmter Gene eingeschränkt waren. Die Ergebnisse der „Microarray“-Studien konnten also anhand von ausgewählten Beispielen auf Proteinebene verifiziert werden.



**Abb. 44: Nachweis einer erhöhten Expression ausgewählter Zellzyklus-assoziiierter Proteine 10, 24 und 48 h nach Behandlung mit Klotho.** L6-, HepG2- und NCI-H322-Zellen wurden für 10 h, 24 h bzw. 48 h mit Klotho behandelt und anschließend mit HGNT-Lysepuffer lysiert. Die Expression der angegebenen Proteine wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse mit den entsprechenden Antikörpern analysiert.

Eine Verifizierung der „Microarray“-Daten mit einer größeren Anzahl an Genen und über weitere Methoden, wie z.B. RT-PCR, wäre nun ein sich anschließender logischer Schritt. Darüber hinaus könnten die Ergebnisse mit Hilfe von Proliferationstests oder durch genaue Analyse des Zellzyklus nach Behandlung mit Klotho weiter belegt werden. Die Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus bzw. die Entschlüsselung des Signalweges, der zur Induktion Zellzyklus-assoziiierter Gene durch Klotho führt, wäre dann ein Ziel zukünftiger Arbeiten.

Tab. 4: Liste ausgewählter durch Klotho regulierter Gene und ihrer Funktion.

Protein	Funktion
<b>Chk1</b>	Serin/Threonin-Kinase. Chk ist Teil der Zellzykluskontrollpunkte: phosphoryliert Cdc25A und p53 bzw. Cdc25A und Wee1 als Antwort auf DNA-Schäden, wodurch im Folgenden der Zellzyklus in der G1- bzw. der G2-Phase arretiert (Sancar <i>et al.</i> , 2004). Darüber hinaus spielt Chk1 eine Rolle bei der Replikationsinitiation und der Integrität der Replikationsgabel. (Petermann <i>et al.</i> , 2010; Meuth, 2010)
<b>Fen1</b> (Flap Endonuklease-1)	Mitglied der XPG/RAD2 Endonukleasefamilie, das eine Rolle bei der Replikation und der DNA-Reparatur, u.a. der Basenexzisionsreparatur, spielt und für die genomische Stabilität der DNA bzw. die Telomerstabilität entscheidend ist. (NCBI-Review zu NCBI RefSeq: NP_004102, Saharia <i>et al.</i> , 2010)
<b>Bub1</b>	Serin/Threonin-Kinase, die ein Mitglied des mitotischen Kontrollpunkt-Komplexes phosphoryliert und den Spindel-Kontrollpunkt aktiviert. Mutationen im Gen werden assoziiert mit Aneuploidie und verschiedenen Krebsarten. (NCBI-Review zu NCBI RefSeq: NP_004327)
<b>Spc25</b>	Protein des Kinetochorkomplexes, das eine Rolle bei der Anheftung der Spindelapparatmikrotubuli an die Kinetochore und der Spindelkontrollpunktaktivität spielt. (NCBI-Review zu NCBI RefSeq: NP_065726)
<b>Rad1</b>	Protein des heterotrimeren Zellzyklus Kontrollpunkt Komplexes (9-1-1 Komplex), der als Antwort auf DNA-Schäden oder unvollständige Replikation aktiviert wird, um den Zellzyklus zu stoppen. (NCBI-Review zu NCBI RefSeq: NP_002844)

## 4. Diskussion

Klotho ist ein Typ I Transmembranprotein, das eine Rolle in einer Vielzahl von Signalwegen spielt. Dabei kann es seine Funktion entweder, wie z.B. bei der Regulierung der FGF23-Signaltransduktion, als Transmembranprotein ausüben (Kurosu *et al.*, 2006, Urakawa *et al.*, 2006) oder nach Abspaltung der extrazellulären Domäne als sezernierter löslicher Faktor wirken (Imura *et al.*, 2004). Letzteres ist der Fall bei der Inhibition des Wnt-Signalweges (Liu *et al.*, 2007), der Modulierung von Ionenkanälen (Chang *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2008) und der Regulation der IGF1-Signaltransduktion (Kurosu *et al.*, 2005). Der genaue Mechanismus der meisten beschriebenen Funktionen von Klotho ist bisher unbekannt und daher Gegenstand vieler Untersuchungen.

Thema dieser Arbeit war zu einem großen Teil die Untersuchung des Mechanismus, der zur Inhibition des IGF1-Signalweges durch Klotho führt. Es besteht die Theorie, dass die extrazelluläre Domäne der Transmembranform abgespalten und ins Blut abgegeben wird, durch welches sie dann zu Zellen mit einem bisher unbekanntem Klothorezeptor transportiert wird. Die Bindung von Klotho an diesen Rezeptor verhindert über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Phosphorylierung des IGF1R, wodurch die weitere IGF1-Signaltransduktion gehemmt wird (Kurosu *et al.*, 2005). Die Identifizierung des entsprechenden Klothorezeptors und die Aufklärung der durch Bindung von Klotho ausgelösten zellulären Vorgänge waren die Ziele dieser Arbeit.

### 4.1 Die Reinigung von Klotho-Fc und das Problem der Aggregatbildung

Um einen Rezeptor identifizieren zu können, der die Inhibition der IGF1-Signaltransduktion vermittelt, mussten als erstes adäquate Modellsysteme gefunden und eine Reihe von Werkzeugen hergestellt werden. Wichtigster Schritt dabei war die Reinigung der extrazellulären Domäne des humanen Klothoproteins. Hierfür wurde als erstes eine Klothovariante der extrazellulären Domäne mit Fc-„Tag“ kloniert und mit dieser CHO-Zellen stabil transfiziert. Stabile Klone exprimierten Klotho-Fc dauerhaft und gaben es kontinuierlich in den Überstand ab, aus welchem es dann aufgereinigt

werden konnte. Als „Tag“ wurde der Fc-Teil humaner Antikörper gewählt, da dadurch die Möglichkeit bestand, das Fc-Fusionsprotein über eine Protein A- oder Protein G-Säule in einem Schritt mit hohen Ausbeuten zu reinigen. Protein A und G sind Proteine aus der Zellwand von Bakterien (Protein A aus *Staphylococcus aureus* und Protein G aus *Streptococcus*), die mit hoher Affinität an die Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps IgG binden. Die Bakterien schützen sich so im Körper vor den Abwehrmechanismen des Immunsystems. Durch eine gerichtete Bindung der Antikörper an Protein A oder G verhindern die Bakterien die „normale“ Bindung des Antikörpers, die eine Opsonisierung und Phagozytose des Bakteriums zur Folge hätte. In dieser Arbeit wurde eine Protein A-Säule für die Reinigung gewählt, da eine entsprechende Prozedur bereits von Tohyama *et al.* (2004) beschrieben wurde.

Größtes Problem bei der Reinigung war eine unmittelbare Aggregatbildung der gereinigten Proteine. Vor allem die Elution des Proteins von der Protein A-Säule mit 0,1 M Glycin/HCl (pH 2,7) führte, vermutlich aufgrund des niedrigen pH-Werts des Elutionspuffers, zur Aggregatbildung und zum Ausfallen der Proteine. Auch durch Dialyse konnten ausgefallene Proteine nicht mehr vollständig in Lösung gebracht werden. Aus diesem Grund wurde bei der hier beschriebenen optimierten Reinigung eine Elution mit Hilfe eines konstanten pH-Gradienten von pH 7 bis pH 3 durchgeführt. Für den Gradienten wurde ein Citratpuffer gewählt, der bereits von Tohyama *et al.* (2004) als Puffer mit einem pH von 5,5 bei der Bestimmung der enzymatischen Glucuronidaseaktivität von Klotho beschrieben wurde. Somit war anzunehmen, dass Klotho in diesem Puffer als natives, aktives Protein vorliegt. Die an die Säule gebundenen Proteine eluierten bei einem pH zwischen 5,5 und 3,75. Die somit mildere Elution und das folgende sofortige Einstellen auf einen neutralen pH führten zu einer deutlichen Verringerung der Aggregatbildung. Dies war daran zu erkennen, dass nach der Affinitätschromatographie die Proteinlösung keine oder nur eine geringe Opaleszenz im Vergleich mit der Proteinlösung nach Elution mit 0,1 M Glycin/HCl zeigte. Opalesziert eine Proteinlösung, so deutet dies darauf hin, dass die Proteine nicht vollständig gelöst, sondern ausgefallen vorliegen.

Die weitere Reinigung mittels Gelfiltration führte dann allerdings erneut zur vermehrten Aggregatbildung, was in der abschließenden Analyse der Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse erkennbar wurde (siehe Abb. 11). Daher wurden die Proteine in zwei Fraktionen aufgeteilt: Fraktion A mit den früher eluierten, stärker aggregierten Proteinen und Fraktion B mit den später eluierten, weniger stark

aggregierten Proteinen. Für eine erneute Aufreinigung sollte man daher abwägen, ob ein zusätzlicher Reinigungseffekt durch die Gelfiltration eine stärkere Oligomerisierung der Proteine aufwiegt. Es stellt sich also die Frage, ob eine gewisse Restverunreinigung eher akzeptiert werden kann als eine stärkere Oligomerisierung oder umgekehrt. Da jedoch anhand der abschließenden Analyse im Coomassiegefärbten Gel (siehe Abb. 12) kein zusätzlicher Reinigungseffekt durch die Gelfiltration sichtbar war, wäre es vermutlich sinnvoll, bei einer nächsten Reinigung auf die Gelfiltration zu verzichten bzw. beide Möglichkeiten parallel durchzuführen und im Anschluss den Grad der Oligomerisierung sowie die Aktivität des isolierten Proteins zu vergleichen.

Obgleich eine geringere Oligomerisierung sicherlich wünschenswert wäre, muss eine Oligomerisierung von Klotho nicht unbedingt ein Problem darstellen. Vielmehr ist es so, dass bereits durch Imura *et al.* (2004) nachgewiesen wurde, dass Klotho in der Zelle mit sich selbst assoziiert und in der extrazellulären Flüssigkeit Oligomere bildet. Daher spiegelt eine Oligomerisierung der Proteine, genauer gesagt der extrazellulären Domäne, möglicherweise den natürlichen Zustand des Proteins wider und wäre dann zur Erhaltung der biologische Aktivität sogar wünschenswert. Jedoch sollte diese Oligomerisierung einen gewissen Grad nicht überschreiten. Eine durchschnittliche Tetramerisierung, wie sie in Fraktion B der Aufreinigung laut SLS-Analyse (siehe 3.2.2.1) vorlag, mag akzeptabel sein, eine stärkere Oligomerisierung, wie sie in Fraktion A der Aufreinigung zu finden war, ist dagegen mit Vorsicht zu behandeln. In einem solchen Fall ist es besonders wichtig, die biologische Aktivität des gereinigten Proteins nachzuweisen, was jedoch ohnehin Standard nach der Isolierung eines Proteins ist.

Dieser Aktivitätsnachweis wurde für Klotho-Fc über den Nachweis einer Inhibition des IGF1-Signalweges in L6-Rattenmyoblasten sowie über den Nachweis einer *in vitro* Glucuronidaseaktivität geführt (siehe 3.2.2.3 und 3.2.2.2). Ein Problem, das sich durch eine zu starke Oligomerisierung ergeben kann, war hier bei Fraktion A besonders gut bei der Bestimmung der Glucuronidaseaktivität erkennbar (siehe Abb. 14). Die Proteine der Fraktion A zeigten eine geringere Aktivität als Proteine der Fraktion B. Daher musste eine höhere Konzentration von Fraktion A eingesetzt werden, um die gleiche Aktivität zu erzielen. Die teilweise starke Aggregation war sicherlich auch ein Grund, warum u.a. bei der Inhibition des IGF1-Signalweges, im Vergleich zu von Kurosu *et al.* (2005) durchgeführten Experimenten, relativ hohe Konzentrationen an

aufgereinigten Klotho-Fc eingesetzt werden mussten (50-350 nM im Vergleich zu 200-400 pM bei Kurosu *et al.*).

Darüber hinaus ist es jedoch wichtig, im Auge zu behalten, dass eine Oligomerisierung notwendig für die Funktionsfähigkeit von Klotho sein könnte. Zumindest bezüglich der Dimerisierung von Klotho gibt es eine Vielzahl an Hinweisen darauf, dass sie einen Einfluss auf die Aktivität des Proteins hat. Die Dimerisierung ist ein bekanntes Charakteristikum für Glykosidasen der Familie 1 (Mian, 1998), zu denen auch Klotho gehört. Darüber hinaus ist eine Dimerisierung für viele integrale Membranproteine essentiell für den Export aus dem endoplasmatischen Reticulum (Hurtley *et al.*, 1989; Pelham, 1989). Eine funktionelle Variante des humanen Klothoproteins, beschrieben von Arking *et al.* (2002), bei der u.a. ein Aminosäureaustausch an Position 352 von Phenylalanin zu Valin vorliegt, zeigt als Folge einer gestörten Sekretion eine um das 6-fache reduzierte extrazelluläre Konzentration an Klotho. Darüber hinaus gibt es deutliche Hinweise auf eine reduzierte enzymatische Aktivität dieser Variante. Aufgrund der Tatsache, dass das Phenylalanin an Position 352 bemerkenswert konserviert in der Evolution zwischen homologen Proteinen eukaryotischer Organismen ist, geht man davon aus, dass es essentiell für die Funktion dieser Proteine ist. Eine mögliche Erklärung wäre, dass diese Aminosäure eine Rolle bei der Dimerisierung oder der Interaktion mit anderen Proteinen und dadurch bei der Sekretion und/oder der Aktivität von Klotho spielt (Arking *et al.*, 2002). Ein weiterer Punkt, der für die Theorie spricht, dass eine Dimerisierung von Klotho notwendig für seine enzymatische Aktivität ist, ist die Tatsache, dass Klotho-His<sub>6</sub>, welches hauptsächlich als Monomer vorlag (siehe Abb. 19), im Gegensatz zu Klotho-Fc, keine Glucuronidaseaktivität aufwies (siehe Abb. 20).

Im Fall von Klotho-Fc kann man davon ausgehen, dass eine Dimerisierung bereits allein durch den Fc-„Tag“ stattfindet, da dieser auch für die Dimerisierung von Antikörperketten verantwortlich ist. Die Dimerisierung wird daher durch die Wahl des „Tags“ verstärkt. Dies könnte wiederum auch zu einer verstärkten Oligomerisierung führen, da Klotho-Fc, das von vornherein zu einem größeren Teil dimerisiert vorliegt, möglicherweise auch schneller Oligomere bildet.

## 4.2 Bindungseigenschaften – Klotho-Fc und Klotho-His<sub>6</sub> im Vergleich

Nachdem die Aktivität des isolierten Klotho-Fc nachgewiesen worden war, wurden Bindungstest sowohl mit gereinigten Klotho-Fc als auch mit kommerziellem Klotho-His<sub>6</sub> durchgeführt. Dabei wurde zuerst die Spezifität der Bindung überprüft. Eine Bindung ist dann spezifisch, wenn eine Sättigung der Bindung erreicht und die Bindung des markierten Liganden durch unmarkierten Liganden verdrängt werden kann. Beide Bedingungen waren bei der getesteten Bindung von Klotho an L6 Rattenmyoblasten erfüllt (siehe Abb. 17).

Da bei diesen und auch folgenden Versuchen sowohl Klotho-Fc als auch Klotho-His<sub>6</sub> eingesetzt wurde, war es sinnvoll die Bindungseigenschaften dieser beiden Proteine miteinander zu vergleichen. Dazu wurde zum einen die Konzentration, bei der eine Sättigung der Bindung erreicht ist, bzw. der anhand der Sättigungskurve ermittelte  $K_D$ -Wert und zum anderen die Salzresistenz der Bindung betrachtet (siehe Abb. 18). Während bei Klotho-His<sub>6</sub> bereits bei etwa 25-30 nM eine Sättigung der Bindung erreicht war, näherte sich die Kurve bei Klotho-Fc erst bei ca. 1000-1500 nM einer Sättigung. Um die gleiche Anzahl an Rezeptoren zu besetzen, muss man demnach die ca. 30- bis 60-fache Menge an Klotho-Fc im Vergleich zu Klotho-His<sub>6</sub> einsetzen. Dieser Unterschied spiegelt sich auch im  $K_D$ -Wert wider, der bei Klotho-His<sub>6</sub> bei 3 nM und bei Klotho-Fc bei 107 nM lag. Die Konzentration, bei der sich ein Gleichgewicht der Dissoziationsreaktion einstellte, lag bei Klotho-Fc somit bei einer 33-fach höheren Konzentration als bei Klotho-His<sub>6</sub>. Betrachtet man dagegen die Salzresistenz der Bindung, sieht man, dass die Bindung von Klotho-Fc deutlich resistenter gegenüber einer hohen NaCl-Konzentration war als die Bindung von Klotho-His<sub>6</sub>. Während Klotho-Fc bis zu einer NaCl-Konzentration von 500 mM relativ stabil binden konnte (> 90 % Bindung) und ein Rückgang der Bindung auf weniger als 70 % erst bei 1000 mM NaCl erreicht wurde, nahm die Bindung von Klotho-His<sub>6</sub> bereits bei 100 mM NaCl deutlich ab (< 70 % Bindung) und ging bei 1000 mM NaCl auf weniger als 10 % zurück. Somit scheint Klotho-Fc im Vergleich zu Klotho-His<sub>6</sub> zwar erst bei höheren Konzentrationen an Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu binden, die Bindung ist dann jedoch stabiler.

Interessant wäre hier die Frage, um welche Art von Bindung es sich handelt bzw. welches Bindungsmodell vorliegt. Um jedoch fundierte Aussagen darüber treffen zu können, ob hier, wie einfachheitshalber angenommen, wirklich eine 1:1 Bindung vorliegt, oder ob zwei Klothomoleküle pro Rezeptor binden bzw. ein Klothomolekül

gleichzeitig mehrere Rezeptoren binden und diese vernetzen kann, hätten weitere Versuche durchgeführt werden müssen. Genaue Aussagen lassen sich selbstverständlich besser treffen, wenn der Rezeptor bekannt ist. Dann können z.B. auch Bindungsstudien mittels Biacore-Technologie durchgeführt werden, mit Hilfe derer man Aussagen über Bindungskinetik, -spezifitäten und -affinitäten treffen kann. Zusätzlich liegt das Problem bei der hier verwendeten Analyse mittels Durchflusszytometrie darin, dass unbekannt ist, wieviel Ligand letztendlich gebunden hat. Ungebundener Ligand wird lediglich gewaschen. Seine Menge konnte jedoch nicht einfach bestimmt werden. Darüber hinaus beruht auch die Angabe der eingesetzten Konzentration an markiertem Klotho auf der Annahme, dass bei der Konjugation mit RPE die gesamte eingesetzte Klothomenge mit RPE gekoppelt wurde. Dies muss nicht unbedingt der Fall sein, da nach Protokoll zwar ein Überschuss an RPE bei der Kopplungsreaktion eingesetzt wurde, es jedoch keine einfache Möglichkeit gibt, die 100 %ige Kopplung des Klothoproteins zu überprüfen. Lediglich eine massenspektrometrische Analyse in Verbindung mit Flüssigchromatographie könnte vermutlich Aufschluss über den Markierungszustand (unmarkiert bzw. einfach- oder mehrfachmarkiert) und das Verhältnis zueinander geben. Da jedoch für die Bindung beider Klothovarianten die gleiche Annahme (100 %ige Einfachmarkierung) gemacht wurde, können die Bindungsdaten trotzdem verglichen werden.

Ein Verdacht bezüglich der unterschiedlichen Bindungseigenschaften der beiden Klothovarianten war, dass das Vorliegen des aufgereinigten Klotho-Fc in einer polydisperse Lösung mit teilweise großen Oligomeren (siehe 3.2.2.1) ein Grund dafür sein könnte, dass größere Mengen Protein zum Erreichen einer Sättigung der Bindung eingesetzt werden müssen. Um diesen Verdacht zu prüfen, wurde auch Klotho-His<sub>6</sub> mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung bezüglich des Vorliegens von Oligomeren untersucht. Der Vergleich der beiden Proteinaufreinigungen nach Trennung im Gel (mit und ohne reduzierendes Agens) bestätigte den Verdacht, dass Klotho-His<sub>6</sub> im Gegensatz zu Klotho-Fc hauptsächlich als Monomer vorlag (Abb. 12, Vergleich mit Abb. 19). Größere Oligomere dagegen waren nicht vorhanden. Die schlechtere Bindung von Klotho-Fc an die Zellen könnte daher durchaus eine Folge der teilweise starken Oligomerbildung sein. Tatsächlich konnten auch zwischen verschiedenen Aufreinigungen von Klotho-Fc Unterschiede bei der Bindung festgestellt werden. Ein früher hergestelltes Klotho-Fc, das stärker aggregiert vorlag als die Proteine der hier dokumentierten Aufreinigung, zeigte eine teilweise schlechtere

Bindung an L6-Zellen (Daten nicht gezeigt). Somit liegt ein Zusammenhang zwischen schlechter Bindung und zu starker Oligomerisierung nahe. Denkbar wäre auch, dass das Vorliegen als Oligomer ebenso für die stabilere Bindung bei höheren Salzkonzentrationen verantwortlich ist. Durch eine hohe Salzkonzentration können nicht-kovalente Wechselwirkungen (z.B. ionische Bindungen), die eine wichtige Rolle bei der Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor spielen, zerstört werden. Gebundene Oligomere könnten aufgrund ihrer höheren Avidität eine salz-resistentere Bindung eingehen, z.B. über die simultane Bindung mehrerer Rezeptoren. Die genauen Gründe für die unterschiedlichen Bindungseigenschaften können anhand der durchgeführten Versuche jedoch nicht bestimmt werden.

Natürlich darf man bei Bindungsversuchen mit Zellen nicht außer Acht lassen, dass das zu untersuchende Protein durchaus an verschiedene Rezeptoren auf der Oberfläche binden kann. Für Klotho wurde z.B. bereits eine Bindung an verschiedene FGF-Rezeptoren beschrieben (Kurosu *et al.*, 2006; Urakawa *et al.*, 2006; Goetz *et al.*, 2010). Allerdings kann eine Bindung an FGF-Rezeptoren im Fall der hier verwendeten L6-Zellen nicht vorliegen, da diese endogen keine FGF-Rezeptoren exprimieren (Mohammadi *et al.*, 1992). Des Weiteren wurde von Wolf *et al.* (2007) eine Bindung an den IGF1R beschrieben, die jedoch erst im folgenden Abschnitt diskutiert werden soll. Es ist somit nicht auszuschließen, dass Klotho an mehr als einen Rezeptortyp auf den L6-Zellen bindet.

### 4.3 Bindet Klotho an den IGF1R?

Die von Kurosu *et al.* 2005 beschriebene Inhibition des IGF1-Signalweges und die fehlende Kompetition der Bindung von IGF1 an seinen Rezeptor durch Klotho, die in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesen wurden (siehe Abb. 15 und 25), führte zu der Theorie, dass es einen unbekanntem Klothorezeptor gibt, über den die inhibitorische Wirkung vermittelt wird. Eine Alternative dazu wäre prinzipiell die Bindung von Klotho an IGF1 selbst, wodurch IGF1 vorübergehend neutralisiert werden könnte, wie es der Fall bei den bekannten IGF-Bindeproteinen (IGFBPs) ist (Clemmons, 2007). Diese Möglichkeit kann jedoch zum einen aufgrund des beschriebenen nicht vorhandenen Einflusses steigender Mengen an Klotho auf die IGF1-Bindung an den IGF1R und zum anderen aufgrund der fehlenden Inhibierung der IGF1-induzierten p44/42

MAPK-Aktivierung, die besonders gut im Fall der NCI-H322-Zellen zu erkennen war (siehe Abb. 37), ausgeschlossen werden.

Die 2007 von Wolf *et al.* beschriebene Bindung von Klotho an den IGF1R führte jedoch erneut zu der Frage, ob Klotho vielleicht nicht doch direkt über den IGF1R wirken könnte. Wolf *et al.* zeigten eine Interaktion durch Co-Immunpräzipitation von Klotho-HA mit dem IGF1R nach stabiler oder transienter Transfektion von MCF7-Zellen mit Klotho-HA. Bei der verwendeten Klotho-Variante handelte es sich um die Transmembranform von Klotho mit HA-„Tag“. Um sicherzustellen, dass die nachgewiesene Interaktion kein Artefakt ist, wurde in dieser Arbeit in einem ersten Schritt versucht, die Bindung zu verifizieren. Im zweiten Schritt hätte die Bindung dann näher charakterisiert und der genaue Mechanismus der Inhibition entschlüsselt werden können. Bei der transienten Transfektion von HEK 293T-Zellen mit IGF1R und Klotho-V5 (= Transmembranform von Klotho mit V5-„Tag“) konnte tatsächlich eine Co-Immunpräzipitation und damit eine Bindung von Klotho-V5 an den IGF1R gezeigt werden (Abb. 21). Um eine unspezifische Bindung auszuschließen, wurde im Folgenden eine zusätzliche Negativkontrolle eingesetzt. Dafür wurde die Bindung von Klotho an den EGFR gewählt, da bei Kurosu *et al.* (2005) und Wolf *et al.* (2007) beschrieben wurde, dass Klotho keinen Einfluss auf die EGF-Signaltransduktion ausübt. Dementsprechend sollte Klotho auch nicht an den EGFR binden. Da jedoch nach Immunpräzipitation mit einem EGFR-Antikörper eindeutig Klotho-V5 im Präzipitat nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 22), kann man nicht ausschließen, dass es sich bei beiden Bindungen, sowohl an den EGFR als auch an den IGF1R, um methodisch bedingte Artefakte handelt.

Diese These wird gestärkt durch die Tatsache, dass in dieser Arbeit die Interaktion zwischen Klotho und dem IGF1R nicht mit endogenem IGF1R und transient exprimiertem Klotho-V5 nachgewiesen werden konnte (Abb. 23). Bei der gezeigten Bindung handelt es sich also möglicherweise lediglich um eine unspezifische Interaktion, die aus einer starken Überexpression der zwei Proteine nach Transfektion hervorgeht. Transfektionen haben immer den Nachteil, dass die erzeugten Bedingungen nicht unbedingt den natürlichen Verhältnissen in der Zelle entsprechen und daher z.B. Interaktionen hervorgerufen werden können, die unter physiologischen Bedingungen nicht vorkommen. Wiederum kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der IGF1R tatsächlich mit der Transmembranform von

Klotho interagiert, da die Bindung bei Wolf *et al.* (2007), im Gegensatz zu hier dargestellten Ergebnissen, mit endogenem IGF1R gezeigt werden konnte.

Entscheidender jedoch als die Frage, ob die Transmembranform von Klotho mit dem IGF1R interagiert, ist die Frage, ob die lösliche extrazelluläre Domäne von Klotho an den IGF1R binden kann, denn die von Kurosu *et al.* (2005) beschriebene Inhibition des IGF1-Signalweges wird durch diese lösliche Form vermittelt. Mit Hilfe von „Pull-Down“-Experimenten mit Klotho-Fc (lösliche extrazelluläre Domäne mit Fc-„Tag“) und Zellen, die eine starke Expression des IGF1R aufweisen, konnte jedoch keine Interaktion zwischen Klotho-Fc und dem IGF1R nachgewiesen werden (siehe Abb. 24). Eine mögliche Erklärung für einen fehlenden Nachweis trotz bestehender Interaktion wäre auch hier, dass die Interaktion zu schwach oder nur transient ist, so dass sie bei den gewählten Bedingungen nicht detektiert werden konnte.

Daher wurde im Folgeexperiment ein neuer Ansatz gewählt, bei dem die Bindung mittels Durchflusszytometrie untersucht wurde. Die Idee dabei war, dass die Bindung der extrazellulären Domäne von Klotho an Zellen, sofern sie über den IGF1R stattfindet, bei sinkender IGF1-Rezeptordichte in der Membran abnehmen müsste. Daher wurden NCI-H322-Zellen, die sowohl IGF1R auf ihrer Oberfläche exprimieren als auch Klotho binden (siehe Tabelle 2), für mehrere Stunden mit einem therapeutischen IGF1R-Antikörper von Merck Serono behandelt, von dem bekannt war, dass er eine Internalisierung und einen Abbau des IGF1R und damit eine Abnahme der Rezeptordichte auslöst. In der folgenden Analyse von behandelten und unbehandelten Zellen mittels Durchflusszytometrie konnte jedoch kein Unterschied in der Bindung von löslichem Klotho detektiert werden, obwohl eine Internalisierung und ein Abbau des IGF1R eindeutig nachgewiesen wurde (siehe Abb. 26). Sollte die extrazelluläre Domäne von Klotho wirklich an den IGF1R binden, wäre eine merkliche Abnahme der Bindung zu erwarten gewesen. Eine vollständige Kompensation des fehlenden Bindungspartners durch andere Klothorezeptoren auf der Oberfläche ist sehr unwahrscheinlich. Man kann daher schlussfolgern, dass Klotho an einen oder mehrere andere Rezeptoren auf der Zelloberfläche, aber nicht an den IGF1R, bindet.

Diese These wird gestützt durch Studien, die mit Hilfe der „Surface plasmon resonance“ Technologie von Biacore im Anschluss durchgeführt wurden. Hierbei konnte durch Kopplung der löslichen Domäne des IGF1R an einen Biacore-„Chip“ eine IGF1R-Oberfläche hergestellt werden, die eine erwartete gute Bindung von IGF1

zeigte (siehe Abb. 27A). EGF, der kein Ligand des IGF1R ist, wurde dagegen nicht gebunden (siehe Abb. 27B), was als Zeichen für eine gute Bindungsspezifität der Oberfläche gedeutet werden kann. Das im Bindungsdiagramm bei EGF sichtbare niedrige Signal ist lediglich eine Folge von Unterschieden in den verwendeten Puffern (= Puffer-„Mismatch“). Da die eingesetzten aufgereinigten Proteine in unterschiedlichen Puffern vorlagen, ist es nicht ungewöhnlich, dass einzelne Komponenten dieser Puffer, die im eigentlichen Laufpuffer nicht enthalten sind, solche Signale bei der Messung verursachen. Eine Bindung der extrazellulären Domäne von Klotho konnte weder mit Klotho-Fc noch mit Klotho-His<sub>6</sub> detektiert werden (siehe Abb. 27C und D). Auch hier waren lediglich schwache Signale, in diesem Fall in Form von niedrigen „Peaks“, erkennbar, deren Ursache erneut ein Puffer-„Mismatch“ ist. Die etwas stärkeren „Peaks“ zusammen mit dem leicht negativen Ausschlag bei Klotho-His<sub>6</sub> wurden vermutlich durch Glycerol verursacht, das der Präparation vom Hersteller zugegeben wurde.

Obwohl die beiden verwendeten Klotho-Varianten hier keine Bindung zeigten, kann ein falsch-negatives Ergebnis nicht mit voller Sicherheit ausgeschlossen werden, da bei der ungerichteten Kopplung des IGF1R an die „Chip“-Oberfläche über Lysinreste durchaus Klotho-Bindungsstellen blockiert werden können. Da die Kopplung in der Regel jedoch über verschiedene Lysine der Proteinoberfläche erfolgt, sollte zumindest ein gewisser Prozentsatz der gekoppelten Proteine freie Bindungsstellen aufweisen. Lediglich in sehr unwahrscheinlichen Ausnahmefällen kann die Kopplung nur über ein bestimmtes Lysin erfolgen, wodurch unter Umständen eine Interaktion, an der dieser Lysinrest beteiligt ist, nicht detektiert werden kann.

Ein weiterer Ansatz, mit dessen Hilfe Rückschlüsse auf eine mögliche Bindung der extrazellulären Domäne an den IGF1R geschlossen werden sollte, war die Untersuchung einer Vielzahl von Zelllinien in Bezug auf ihre IGF1R-Expression, Klotho-Bindung und Inhibition des IGF1-Signalweges durch Klotho (siehe Tabelle 2). Die Ergebnisse der sechs Ratten- und zehn humanen Zelllinien zeigt durchaus eine teilweise deutliche Korrelation zwischen IGF1R-Expression, Inhibition des IGF1-Signalweges und Klotho-Bindung, d.h., in Zellen mit hoher IGF1R-Expression und starker Klotho-Bindung findet man auch eine gute Inhibition des IGF1-Signalweges, wie z.B. bei NCI-H322- und HepG2-Zellen. Wohingegen Zellen, die kaum IGF1R exprimieren, z.B. AR42J, dementsprechend keine Inhibition des IGF1-Signalweges zeigen und auch kein Klotho binden. Sollte jedoch Klotho wirklich an den IGF1R binden, würde

man in Zellen, die eine sehr starke IGF1R-Expression aufweisen, wie z.B. MCF7-Zellen, eine ebenso starke Klotho-Bindung, aber vor allem eine bessere Inhibition des IGF1-Signalweges durch Klotho erwarten. HEK 293T-Zellen exprimieren den IGF1R zwar und binden Klotho sehr gut, doch sie zeigen keine Inhibition des IGF1-Signalweges. Die Korrelation ist damit nicht immer eindeutig, was vermuten lässt, dass noch weitere Faktoren eine Rolle spielen, wie z.B. die Bindung von Klotho an einen anderen putativen Rezeptor, dessen Aktivierung die Inhibition des IGF1-Signalweges vermittelt. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass eine Bindung der extrazellulären Domäne von Klotho an den IGF1R in keinem der vorherigen Versuche nachgewiesen werden konnte, besteht also weiterhin die Vermutung, dass lösliches Klotho an einen bisher unbekanntem Rezeptor bindet, der im Rahmen dieser Arbeit besser charakterisiert und idealerweise identifiziert werden sollte.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass für eine Bindung der extrazellulären Klotho-Domäne an den IGF1R in dieser Arbeit keine Hinweise gefunden werden konnten, weder in sorgfältig kontrollierten zellpharmakologischen, noch in präzisen biophysikalischen Ansätzen. Eine Bindung der Transmembranform von Klotho, wie bei Wolf *et al.* (2007) beschrieben, könnte natürlich über die intrazelluläre Domäne oder die Transmembrandomäne stattfinden, was erklären würde, warum die lösliche extrazelluläre Form nicht bindet. Bisher beschriebene Interaktionen von Klotho mit Zielproteinen, wie den Wnt-Liganden (Liu *et al.*, 2007) oder FGF23 und FGF19 (Wu *et al.*, 2008) sowie verschiedenen FGF-Rezeptoren (Kurosu *et al.*, 2006; Urakawa *et al.*, 2006; Goetz *et al.*, 2010) werden allerdings alle über die extrazelluläre Domäne vermittelt. Die Bildung eines ternären Komplexes aus Klotho, einem FGF-Rezeptor und dem zugehörigen Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF19 oder FGF23), der zur Aktivierung des entsprechenden FGF-Signalweges führt, ist die einzige beschriebene Funktion von Klotho, bei der davon ausgegangen wird, dass sie durch die Transmembranform ausgeübt wird. Jedoch auch die lösliche extrazelluläre Domäne kann diese Funktion übernehmen (Wu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008; Goetz *et al.*, 2010). Somit scheint die extrazelluläre Domäne in allen Fällen die entscheidende Rolle zu spielen.

Auch bei der Inhibition des IGF1-Signalweges ist die gängige Theorie, dass diese durch die extrazelluläre Domäne, die zuvor von der Transmembranform abgespalten wird, vermittelt wird. Sollte diese Wirkung also nicht über einen neuen Klothorezeptor

sondern über Bindung an den IGF1R vermittelt sein, ist die Bindung der löslichen Form von Klotho entscheidend. Eine solche Bindung konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Frage nach einem neuen Klothorezeptor bleibt also nach wie vor offen.

#### 4.4 Identifizierung eines Klothorezeptors

Da aufgrund der im vorherigen Abschnitt besprochenen Daten berechnete Zweifel bestanden, dass die Inhibition des IGF1-Signalweges über eine Bindung von Klotho an den IGF1R vermittelt wird, wurden verschiedene Versuche unternommen, einen neuen Rezeptor für Klotho zu identifizieren, der die beschriebene biologische Wirkung auf die IGF1-Achse vermittelt (siehe 3.5). Grundsätzlich kann man für ein derartiges Vorhaben verschiedene experimentelle Strategien verfolgen, wie z.B. Liganden-Affinitätschromatographie, Expressionsklonierung, „Yeast-Two-Hybrid“ bzw. „Phage-Display“ oder das gezielte „Screening“ von Rezeptorbibliotheken.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Wesentlichen der erste sowie der letzte Ansatz verfolgt. Die Methode der Liganden-Affinitätschromatographie war hier erste Wahl, da sie bereits erfolgreich bei der Identifizierung verschiedener Rezeptortypen eingesetzt wurde, wie z.B. von Rezeptoren mit intrazellulärer Kinasedomäne oder von Integrinen (Henderson und Mesher, 2007; Matsubayashi *et al.*, 2006; Yahiro *et al.*, 2006; Khare *et al.*, 2003). Für die Identifizierung von GPCRs als Rezeptor ist diese Methode jedoch weniger geeignet. Da aber beschrieben ist, dass Klotho auch über die Aktivierung eines cAMP-Signalweges zelluläre Effekte ausüben kann (Rakugie *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2003) und am Anfang von cAMP-Signalwegen häufig GPCRs stehen, wurde für den Fall, dass es sich bei dem gesuchten Rezeptor um einen GPCR handelt, ein gezieltes „Screening“ einer GPCR Rezeptorbibliothek durchgeführt. Andere Rezeptoridentifizierungsmethoden, wie z.B. die „Yeast-Two-Hybrid“-Methode sind v.a. für den Nachweis intrazellulärer Interaktionen geeignet. Da jedoch ein Plasmamembranrezeptor gesucht wurde, wurden diese Methoden hier nicht berücksichtigt.

Eine der Grundvoraussetzungen für eine solche Rezeptorsuche ist die Auswahl eines geeigneten Modellsystems. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Zellsystem vor allem die Rattenzelllinie L6 verwendet, da diese die erste in der Literatur beschriebene Klotho-sensitive Zelllinie war, bei der ein Effekt auf den Insulin-/IGF1-

Signalweg beschrieben wurde (Kurosu *et al.*, 2005). Diese Befunde wurden im Rahmen dieser Arbeit bestätigt und durch solide Bindungsstudien mittels Durchflusszytometrie erweitert (siehe Abb. 18). Ein zusätzlicher Vorteil dieser Zelllinie war, dass ausgeschlossen werden konnte, dass durch Klotho vermittelte Effekte über die Bindung an einen FGF-Rezeptor stattfinden, da sie keine FGFR-Expression aufweist (Mohammadi *et al.*, 1992).

Um für pharmakologische Studien und affinitätschromatographische Ansätze einen molekular definierten und in größeren Mengen rein herzustellenden Liganden zur Verfügung zu haben, wurde, wie bereits beschrieben, die extrazelluläre Domäne von Klotho mit einem Fc-„Tag“ konstruiert und in CHO-Zellen für die folgende Reinigung stabil exprimiert. Fc-Fusionsproteine sind ein in der pharmazeutischen Forschung etabliertes Format und können z.B. auch als Therapeutika im Menschen eingesetzt werden (Huang, 2009). Als Alternative wurden zudem gezielte Experimente mit einer kommerziell erhältlichen His<sub>6</sub>-„getaggten“ Klothovariante durchgeführt. Die Vorteile von Klotho-Fc lagen dabei zum einen in der durch den Fc-„Tag“ vermittelten Dimerisierung, die zumindest für die Glucuronidaseaktivität von Klotho notwendig zu sein schien und zum anderen in seiner hohen salzresistenten Bindungseigenschaft. Nachteil dieser Variante war jedoch die Tendenz des Proteins zur stärkeren Oligomerisierung, deren Folge der notwendige Einsatz relativ hoher Konzentrationen war.

Trotz der nachgewiesenen biologischen Aktivität und der robusten, salzstabilen zellulären Bindung von Klotho-Fc konnte in affinitätschromatographischen „Pull-Down“-Experimenten kein spezifischer Interaktionspartner bzw. Rezeptor von Klotho identifiziert werden. Eines der Hauptprobleme bei dieser Methode war die Vielzahl an unspezifischen Bindungen, die auftraten. Diese wurden auf unterschiedlichsten Wegen versucht zu reduzieren. Zum einen wurde das Proteom durch verschiedene Methoden auf Membranproteine eingegrenzt, wie z.B. durch subzelluläre Fraktionierung, durch Membranpräparation mittels differentieller Zentrifugation oder durch Biotinylierung der Oberflächenproteine. Dadurch sollten unspezifische Bindungen an Proteine anderer Kompartimente der Zelle aus der Analyse ausgeschlossen werden. Zum anderen wurde versucht, unspezifische Bindungen an Protein A oder A/G Agarosekügelchen zu vermindern. Zum einen wurden dazu die Kügelchen zuvor mit BSA blockiert oder einfach häufiger bzw. stärker gewaschen und zum anderen wurde das Lysat mit Kügelchen vorinkubiert, die dann verworfen wurden, um sich so den

unspezifisch bindenden Proteinen vor dem „Pull-Down“ zu entledigen. Ein allgemeines Problem war jedoch, dass, da der Bindungspartner nicht bekannt war, immer eine in gewisser Weise unspezifische Detektionsmethode gewählt werden musste, die eine Vielzahl an Proteinen bzw. alle Proteine anfärbte, wie z.B. die Silberfärbung. Neben der unspezifischen Bindungen war das zweite entscheidende Problem wahrscheinlich, dass die eigentlich gesuchte spezifische Bindung an den Rezeptor sensitiv gegenüber Pufferkomponenten war und es nicht gelang diese Störfaktoren zu eliminieren. Auch eine feste Kopplung („Crosslinking“) von Interaktionspartnern an die Membranproteine führte nicht zur Detektion einer spezifischen Bindung. Man kann daher davon ausgehen, dass trotz vielfältiger Versuche nicht die geeigneten Bedingungen vorlagen, um eine Interaktion der löslichen extrazellulären Domäne von Klotho mit einem putativen Rezeptor nachzuweisen.

Als weiterer Ansatz zur Identifizierung eines Rezeptors wurde das gezielte „Screening“ einer Rezeptorbibliothek, die 106 „Orphan“ GPCRs umfasste, gewählt. Durch Transfektion von HeLa-Zellen mit den verschiedenen GPCR-Plasmiden und folgender Analyse der Klotho-Bindung an die Zellen mittels Durchflusszytometrie, wurde getestet, ob eine transiente Expression der einzelnen Rezeptoren zu einer verstärkten Bindung von Klotho-Fc führt. Jedoch konnte keine signifikante Zunahme der Klotho-Bindung über den Hintergrund der HeLa-Zellen hinaus detektiert werden (Abb. 35). Zu beobachtende leichte Schwankungen von bis zu 7 % weisen nicht auf eine verstärkte Bindung hin, sondern lassen sich durch Ungenauigkeiten in der experimentellen Durchführung erklären, die sich bei Ansätzen dieser Größenordnung nicht vermeiden lassen. Trotz der großen Anzahl an Proben, die hier markiert und gemessen wurden, zeigten L6-Zellen, die als Positivkontrolle für die Bindungsfähigkeit von Klotho eingesetzt wurden, eine gute Klotho-Bindung. Der einzige Schwachpunkt in diesem System war, dass eine umfassende Kontrolle der Transfektion nicht möglich war, da die „Orphan“ GPCRs der Bibliothek keinen „Tag“ besaßen. Daher war eine Kontrolle der Transfektion bzw. ein Nachweis der GPCR-Expression mittels Lyse der Zellen und Western Blot-Analyse nicht möglich. Als Nachweis für eine erfolgreiche Transfektion diente hier lediglich eine Kontrolltransfektion mit einem GFP-Plasmid und der Nachweis der GFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie. Da jedoch eine deutliche GFP-Expression detektiert werden konnte, ist wahrscheinlich, dass auch die Transfektion mit den GPCR-

Plasmiden funktioniert hat. Somit ist es auch wahrscheinlich, dass Klotho an keinen dieser GPCRs bindet.

Ein mögliche weitere Methode zur Identifizierung eines Klothorezeptors wäre eine Art der Expressionklonierung gewesen. Bei dieser wird eine genomische oder eine cDNA-Bibliothek in einem Bakteriophagen  $\lambda$ -Expressionsvektor angelegt. Durch Infektion von *E. coli* mit dem rekombinierten  $\lambda$ -Phagen werden die Proteine der Bibliothek exprimiert. Die im *E. coli* Zellrasen gebildeten lytischen Plaques mit den potenziellen Interaktionspartnern werden auf Membranen übertragen. Diese Membranen könnten dann mit Klotho-Fc inkubiert werden und  $\lambda$ -Klone, deren gebildete Proteine Klotho-Fc binden, durch mit Enzymen konjugierte Fc-Antikörper visuell detektiert und im Folgenden identifiziert werden. Dieser Ansatz konnte leider im Rahmen dieser Arbeit aufgrund des relativ großen experimentellen Aufwandes nicht mehr durchgeführt werden, wäre aber eine durchaus vielversprechende Option für die Zukunft.

#### **4.5 Ergebnisse der Genexpressionsstudien und mögliche Schlussfolgerungen**

Um mehr über die Signaltransduktion von Klotho und den hypothetischen neue Klothorezeptoren zu lernen wurden „Microarray“-Studien mit ausgewählten Klotho-sensitiven Zelllinien durchgeführt, bei denen die Expression von 20000 Genen untersucht wurde. Durch die Ermittlung von Unterschieden in den Genexpressionsprofilen Klotho-behandelter und unbehandelter Zellen sollten neue Erkenntnisse bzw. Informationen über Gene und damit über Signalwege gewonnen werden, die durch Klotho beeinflusst werden.

Bei diesen Studien wurden Zellen sowohl mit gereinigtem Klotho-Fc als auch mit Klotho-His<sub>6</sub> behandelt und die Effekte verglichen. Die Regulation der Gene erfolgte bei beiden Klothovarianten überwiegend gleichgerichtet, d.h. zahlreiche übereinstimmende Gene wurden verstärkt exprimiert, lediglich die Stärke der Regulation schwankte leicht. Man kann daher davon ausgehen, dass beide Klotho-Varianten trotz unterschiedlicher Oligomerisierungszustände und Glucuronidaseaktivität die gleichen zellulären Effekte auslösten. In weiterführenden Analysen wurden daher die Expressionsprofile der mit Klotho-Fc und Klotho-His<sub>6</sub> behandelten Zellen in einer

Gruppe zusammengefasst und den Profilen der unbehandelten Zellen gegenübergestellt.

Leider gaben die beobachteten Genexpressionsprofile keine eindeutigen Hinweise auf die Natur des putativen Klothorezeptor. Die Komplexität von Signaltransduktionsnetzwerken in der Zelle macht es allerdings oft schwer, über einzelne Gene oder eine Gruppe regulierter Gene Rückschlüsse auf einen bestimmten Signalweg und auf einen möglichen Rezeptor zu ziehen, der am Anfang dieses Signalweges steht (persönliche Mitteilung E. Staub, BCI, Merck Serono). Allerdings wurden Gene identifiziert, die eindeutig in Zusammenhang mit von Klotho beeinflussten Signalwegen gebracht werden konnten, wie z.B. der Transkriptionsfaktor PITX2, der über den kanonischen Wnt-Signalweg induziert wird. PITX2 spielt eine entscheidende Rolle bei der zelltypspezifischen Proliferation durch die Aktivierung spezifischer wachstumregulierender Gene (Kioussi *et al.*, 2002). In den „Microarray“-Studien wurde eine verminderte Expression von PITX2 in Klotho-behandelten Zellen beobachtet. Dies würde die bestehende Theorie der Inhibition des Wnt-Signalweges durch Klotho von Liu *et al.* (2007) bestärken. Leider konnte dies nur in NCI-H322-Zellen und nicht in HepG2 oder L6-Zellen gezeigt werden. NCI-H322 war von den untersuchten Zelllinien diejenige, bei der die globale Signifikanz der Expressionsunterschiede zwischen Klotho-behandelten und unbehandelten Zellen (Abb. 39) nur geringfügig höher als in einem Zufallsexperiment erwartet war. Darüber hinaus lässt die detektierte verminderte Expression von PITX2 durch Klotho keine weiteren Rückschlüsse auf bisher unbekannte Interaktionen oder Wirkmechanismen von Klotho zu.

Aus HepG2- und L6-Zellen stammende, übereinstimmende Ergebnisse, die eine verstärkte Expression einer Vielzahl an Proliferationsgenen durch Klotho zeigten, wurden im Gegensatz dazu näher untersucht. Eine Induktion von Zellzyklus-assoziierten Genen durch Klotho war in dieser Weise und diesem Umfang bisher nicht bekannt. Hierbei wurde zuerst eine Überschneidung der differentiell exprimierten Gene mit einer verstärkten Expression zwischen HepG2- und L6-Zellen gezeigt. Dabei lag bei den 1000 am stärksten regulierten Genen eine Überschneidung von 180 Genen vor. Die Überschneidung war mit einem ermittelten P-Wert von  $p = 0,004$  größer als zufällig erwartet und damit signifikant.

Eine Überschneidung mit in NCI-H322 regulierten Genen konnte nicht festgestellt werden. Daher stellt sich die Frage, warum NCI-H322-Zellen trotz guter Effekte in

den Vorexperimenten (siehe Abb. 36 und 37) in den „Microarray“-Studien nur schlechte Effekte und keine Übereinstimmung mit HepG2- und L6-Zellen zeigten. Ein wichtiger Punkt ist sicherlich, dass hier drei völlig unterschiedliche Zelllinien untersucht wurden. Bei L6-Zellen handelt es sich um Myoblasten, bei HepG2 um Leber- und bei NCI-H322 um Lungentumorzellen. Verschiedene Zelllinien weisen von vornherein unterschiedliche Expressionsprofile auf, bei denen unterschiedliche Signalwege an- oder abgeschaltet sind, weshalb sie auch unterschiedlich auf die Behandlung mit ein und demselben Wirkstoff bzw. Protein reagieren können.

Über die Frage, warum NCI-H322-Zellen insgesamt gesehen kaum Effekte zeigten (Abb. 39), kann jedoch nur spekuliert werden. Das Problem könnte hier in der längeren Behandlungszeit bzw. der längeren Inkubationszeit in Hungermedium (Kulturmedium ohne FCS) liegen. Bei der Analyse der Inhibition des IGF1-Signalweges (Vorexperiment) zur Auswahl der Zelllinien wurden die Zellen lediglich über Nacht in Hungermedium kultiviert und dann 30 min mit Klotho behandelt. Hier jedoch wurden die Zellen 24 h behandelt und daher zusätzliche 24 h in Hungermedium kultiviert. Dabei wurde beobachtet, dass L6- und HepG2-Zellen trotz Hungermedium weiter wuchsen, NCI-H322 ihr Wachstum jedoch einstellten. Möglicherweise überschritten die NCI-H322-Zellen in diesen zusätzlichen 24 h eine Grenze, die den Zellzyklus an einem Punkt arretieren ließ. Die Induktion von Zellzyklus-assoziierten Genen durch Klotho, die hier den Haupteffekt in HepG2- und L6-Zellen ausmachte, könnte dann durch andere Mechanismen unterdrückt worden sein. Daher fand im Weiteren eine Fokussierung auf die in HepG2- und L6-Zellen regulierte Gene statt.

Eine Analyse der 180 in HepG2- und L6-Zellen übereinstimmend am stärksten regulierten Gene mit Hilfe der MetaCore Software von GeneGo (California, USA) und Gensets aus Datenbanken von GeneGo und dem „Gene Ontology Project“ ergab eine deutliche Induktion von Genen, die am Zellzyklus beteiligt sind (siehe Abb. 41). Die Ergebnisse der Datenbankanalysen wiesen eine statistische Signifikanz von bis zu  $p < 10^{-40}$  auf und waren damit äußerst signifikant. Mit 81 dieser Gene konnte mit Hilfe der MetaCore Software ein fundiertes Netzwerk erstellt werden, das funktionelle Interaktionen zwischen den einzelnen Genen bzw. Proteinen aufzeigt und innerhalb dessen jede Verbindung durch mindestens eine Literaturstelle aus der MetaCore Datenbank belegt ist. Viele Kandidaten des Netzwerkes weisen mehr als eine, sogar bis zu 34, funktionelle Interaktionen zu anderen Kandidaten auf.

Der nächste wichtige Schritt war die Verifizierung der „Microarray“-Ergebnisse. Dazu wurde die verstärkte Expression einzelner ausgewählter Gene mit Erfolg zusätzlich auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen (siehe Abb. 44). Eine Verifizierung im größeren Maßstab und über weitere Methoden, wie z.B. RT-PCR, wäre ein möglicher nächster sinnvoller Schritt. Darüber hinaus könnten mit Hilfe von Proliferationstests oder durch genauere Analyse des Zellzyklus die Ergebnisse untermauert werden. Eine Untersuchung des Zellzyklus wäre z.B. mit Hilfe der Guava-Technologie möglich, bei der die Zellzyklusphasen, in der sich die Zellen vor und nach Klotho-Behandlung befinden, durch Färbung der DNA mit Propidiumiodid und folgender Fluoreszenzmessung bestimmt werden können.

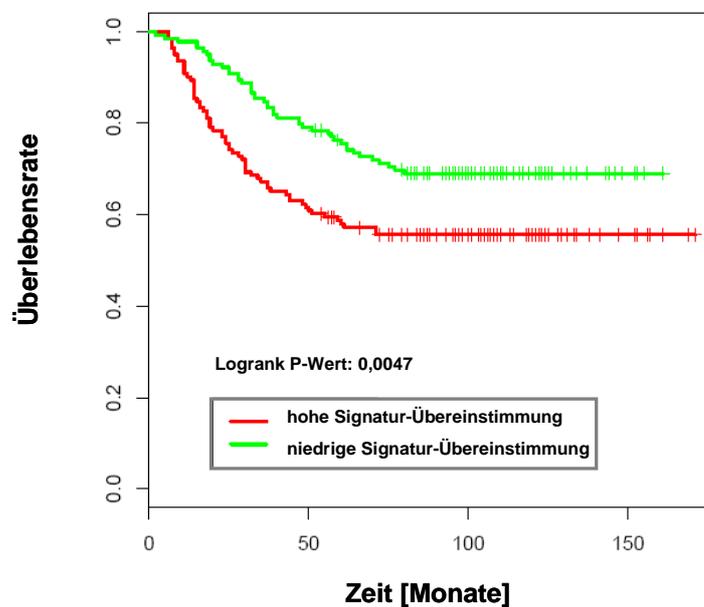
Eine entscheidende Frage war, ob eine Induktion von Zellzyklus-assoziierten Genen mit den bereits beschriebenen Funktionen von Klotho in Zusammenhang gebracht werden kann. Klotho wurde in einem Mäusestamm entdeckt, bei dem ein Defekt in diesem Gen zu vielfältigen Funktionsstörungen führte, die an ein frühzeitiges Altern beim Menschen erinnerten (Kuro-o, *et al.*, 1997). Mäuse, die Klotho dagegen überexprimieren, leben 20-30 % länger als Wildtypmäuse und zeichnen sich durch eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress und einer leichten Insulin- und IGF1-Resistenz aus (Kuro-o, *et al.*, 1997; Kurosu *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2005). Klotho wird daher häufig als eine Art „anti-ageing“ Hormon bezeichnet. Die Wirkung von Klotho, die Alterung zu unterdrücken, wird unterschiedlichen Funktionen zugesprochen. Zum einen wird die Funktion von Klotho als Inhibitor des Insulin- und IGF1-Signalweges dafür verantwortlich gemacht. Eine moderate negative Regulation der Insulin- und IGF1-Signaltransduktion gilt schon länger als ein in der Evolution konservierter Mechanismus zur Unterdrückung der Alterung (Tatar *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Inhibition des Insulin-/IGF1-Signalweges durch Klotho sowohl zu einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Yamamoto *et al.*, 2005) als auch zu einer Reduktion der über den p53/21 Signalweg vermittelten Seneszenz von Zellen nach DNA-Schäden (de Oliveira, 2006, Ikushima *et al.*, 2006) führt. Zum anderen wird davon ausgegangen, dass auch die Funktion als Cofaktor/Corezeptor bzw. Aktivator des FGF23-Signalweges und die damit verbundene Regulation des Vitamin D- bzw. Phosphatmetabolismus eine entscheidende Rolle bei der Unterdrückung von Alterungserscheinungen spielt (Kurosu *et al.*, 2006, Urakawa *et al.*, 2006; Kuro-o, 2008 und 2009).

Eine Stimulation der Proliferation durch Klotho ist, im Zusammenhang mit einer lebensverlängernden Funktion des Proteins gesehen, nicht abwegig und wurde bereits in Verbindung mit dem FGF23-Signalweg beschrieben (Medici *et al.*, 2008). Dabei wurde gezeigt, dass Klotho zusammen mit FGF23, nicht jedoch Klotho oder FGF23 allein, die Proliferation von Zellen stimuliert und die durch einen Überschuss an Vitamin D ausgelöste Apoptose verhindert. Da zumindest die in dieser Arbeit verwendeten L6-Zellen keine FGF-Rezeptoren exprimieren, kann die durch Genexpressionsanalysen identifizierte Induktion von Zellzyklus-assoziierten Genen in L6-Zellen nicht über den FGF23-Signalweg vermittelt sein. Daher muss es einen weiteren Weg geben, über den Klotho die verstärkte Expression von Proliferationsgenen induziert.

Unter den regulierten Genen des erstellten Netzwerkes (Abb. 42), erkennt man viele typische Zellzyklus-assoziierte Proteine, wie z.B. verschiedene Cycline (A2, B1 und F) und Zellzyklus-assoziierte Kinasen, wie Cdk1, Aurora B oder Plk1 und 2. Einige der Proteine spielen darüber hinaus eine Rolle an den Kontrollpunkten des Zellzyklus und bei der DNA-Reparatur, wie z.B. Chk1, Bub1, Bub1B und Fen1 (siehe auch Tab. 4). Ohne die Proteine solcher Kontrollpunkte wäre die genomische Stabilität jeder einzelnen Zelle nicht mehr gewährleistet. Zellen mit Mutationen könnten sich weiter teilen und unter Umständen zu Tumorzellen mit unkontrolliertem Wachstum werden. Auch bei der Analyse der durch Klotho hochregulierten Gene bezüglich ihrer Funktion mit Hilfe der MetaCore Software war unter den vielen Zellzyklus spezifischen Wegen ein DNA-Reparatur-Mechanismus vertreten (siehe Abb. 41A, Punkt 13: ATM/ATR Regulation des G2/M Kontrollpunktes). Dies war jedoch zu erwarten, da bei der Proliferation von Zellen immer auch Kontrollmechanismen und die DNA-Reparatur eine Rolle spielen. Eine Induktion von Proliferationsgenen ohne Kontrollgene ist unter normalen Bedingungen undenkbar. Lediglich in Tumoren findet eine derart unkontrollierte Proliferation statt.

Eine exemplarisch durchgeführte Analyse, bei der die Gensignaturen von Brustkrebspatienten einer Studie von Wang *et al.* (2005) mit einer aus den 81 Genen des Klotho-induzierten Netzwerkes (Abb. 42) erstellten Gensignatur verglichen wurden, ergab, dass Patienten mit einer hohen Übereinstimmung der Gensignatur eine schlechtere Überlebenschance aufwiesen als Patienten mit niedriger Übereinstimmung (siehe Abb. 45). Daraus könnte man schlussfolgern, dass Klotho bei Brustkrebs das Tumorstadium eher fördert. Diese These wird gestützt durch eine

Studie mit Ovarialkarzinompatienten von Lu *et al.* (2008), die ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einer hohen Expression an sezerniertem Klotho und einem erhöhten Risiko für das Fortschreiten der Krankheit und einer erhöhten Sterberate nachwies. Dieses Ergebnis war jedoch eher unerwartet, da der IGF1-Signalweg, der durch Klotho inhibiert wird, ebenso mit einem hohen Krebsrisiko und dem Fortschreiten der Krankheit assoziiert ist. Überraschend an der Studie von Lu *et al.* war auch, dass eine hohe Expression von Klotho, trotz antagonistischer Wirkung zu IGF1, mit einer höheren Konzentration dieses Wachstumsfaktors korrelierte.



**Abb. 45: Prognostische Signifikanz einer Signatur aus den 81 Genen des Klotho-induzierten Zellzyklusnetzwerkes.** Zur Ermittlung der prognostischen Signifikanz des erstellten Klotho-induzierten Zellzyklusnetzwerkes (Abb. 42) wurde die Gensignatur der 81 Gene des Netzwerkes mit der Gensignatur einer Brustkrebsstudie von Wang *et al.* (2005) verglichen. Die Kohorte der untersuchten Brustkrebspatienten umfasst insgesamt 286 ER („Estrogen Receptor“)-positive und ER-negative Patienten, von deren Tumoren mittels „Microarray“ Expressionsprofile erstellt wurden. Für 72 der 81 Klotho-induzierten Gene sind Expressionswerte verfügbar. Durch Median-Zentrierung für jedes Gen und Aufsummierung der Expressionssignale für jedes Experiment wurde eine Signatur erstellt. Der Median dieser Expressionssignatur unterteilt die Patienten in solche mit guter (niedrige Signatur-Übereinstimmung) und schlechter Prognose (hohe Signatur-Übereinstimmung). Mit Hilfe des Logrank-Tests wurde die Signifikanz des Unterschieds in der Prognose (hier: Rezidiv-freies Überleben) ermittelt ( $p = 0.0047$ ).

Es gibt jedoch eine Reihe von Daten, die im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Studie stehen. Beispielsweise zeigen immunhistochemische Analysen von humanem

Brustkrebsgewebe eine deutlich niedrigere Expression von Klotho in Mamma-karzinomen verglichen mit gesundem Brustgewebe (Wolf *et al.*, 2008). In der Firma Merck Serono generierte Daten, bei denen eine Vielzahl an Tumorarten bzw. Normalgewebe mittels „Microarray“ auf eine Klothoexpression hin untersucht wurden, untermauern dieses Ergebnis. Sowohl die Brustkrebsgewebeprobe als auch die meisten anderen untersuchten Tumorarten, wie z.B. Lungen-, Magen- und Nierentumore, wiesen eine verringerte Klotho-Expression auf (siehe Abb. 5). Untersuchungen von Wolf *et al.* (2008) mit kultivierten Brustkrebszellen ergaben, dass eine Überexpression von Klotho zu einem verminderten Wachstum der Zellen führt, wohingegen ein „knockdown“ der Klothoexpression mittels siRNA das Wachstum fördert. Die Schlussfolgerung dieser Daten zusammen mit den Tumordaten war, dass Klotho in Brustkrebs als Tumorsuppressor fungiert. Auch Chen *et al.* (2010) zeigten ein vermindertes Wachstum von Krebszellen, in diesem Fall der Lungenkrebszelllinie A549, sowie darüber hinaus eine vermehrte Apoptose durch eine Überexpression von Klotho.

Sowohl Wolf als auch Chen *et al.* weisen jedoch auf Unterschiede in der Regulation durch Klotho je nach Zelllinie hin. Beide Gruppen detektierten eine abweichende Regulation in HEK 293-Zellen. Im Gegensatz zu Chen *et al.*, die keinen Effekt durch Klotho in HEK 293-Zellen fanden, konnten Wolf *et al.* eine entgegengesetzte Regulation im Vergleich mit der Brustkrebszelllinie MCF7 beobachten. Während in MCF7-Zellen die Expression von p53 nach Überexpression von Klotho anstieg, nahm sie in HEK-293-Zellen ab. Die p53-Expression wurde untersucht, da zuvor von de Oliveira *et al.* (2006) in MRC-5-Zellen (= humane primäre Fibroblasten) gezeigt wurde, dass Klotho die Seneszenz von Zellen durch eine Verminderung der p53 Expression reduziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass hier anscheinend eine differentielle Regulation von Genen durch Klotho sowohl in unterschiedlichen Zelltypen als auch auf höherer Ebene in unterschiedlichen Tumorarten eine entscheidende Rolle spielt.

#### **4.6 Ausblick**

Aufgrund der hier aufgezeigten unterschiedlichen Einflüsse von Klotho auf das Überleben der Zelle wäre eine Aufgabe für die Zukunft, zu klären, in welchem Zusammenhang die Proliferation durch Klotho gefördert und in welchem sie inhibiert wird und welche weiteren Faktoren eine Rolle spielen. Wichtig dafür ist jedoch

weiterhin ein besseres Verständnis der grundlegenden Mechanismen der Klotho-Wirkungsweise. Schlüssel hierzu bleibt nach wie vor die Identifizierung der Rezeptor- oder Bindeproteine, welche die Wirkung von sekretiertem Klotho vermitteln. Nur ein besseres molekulares Verständnis der Signaltransduktionskomponenten kann helfen, scheinbare Widersprüche, wie die Förderung bzw. Inhibition der Zellproliferation durch Klotho aufzuklären.

Ebenso die Frage, welche Funktion Klotho bei der Krebsentstehung bzw. Tumorentstehung übernimmt und ob man diese Funktion überhaupt eindeutig definieren kann, bleibt zu ergründen. Die hier beschriebenen Ergebnisse, deuten darauf hin, dass Klotho nicht nur die Rolle eines Tumorsuppressors, sondern kontextabhängig vielleicht auch die eines Onkoproteins übernehmen kann. Dies würde den Einsatz von Klotho in der Krebstherapie bedeutend erschweren und vielleicht sogar unmöglich machen. Ungeachtet dessen wäre es jedoch vorstellbar, Klotho als Prognosemarker für bestimmte Krebsarten, wie z.B. Ovarialkrebs, einzusetzen. Voraussetzung hierfür wären jedoch genauere Kenntnisse darüber, welche Rolle Klotho in den einzelnen Krebsarten übernimmt.

Die Entschlüsselung des Signalweges, der zu der in dieser Arbeit beschriebenen Induktion Zellzyklus-assoziiierter Gene durch Klotho führt, wäre ein entscheidender Schritt in der Aufklärung der Rolle, die Klotho nicht nur bei der Tumorentstehung und -progression, sondern auch im gesunden Menschen übernimmt und somit ein erstrebenswertes Ziel für zukünftige Arbeiten.

## Literaturverzeichnis

Altomare, D.A., Testa, J.R. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24, 7455-7464.

Antoniou, A.C., Easton, D.F. (2006). Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 25, 5898-5905.

Arking, D.E., Krebsova, A., Macek, M., Sr, Macek, M., Jr, Arking, A., Mian, I.S., Fried, L., Hamosh, A., Dey, S., McIntosh, I., Dietz, H.C. (2002). Association of human aging with a functional variant of *klotho*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 856-861.

Arking, D.E., Becker, D.M., Yanek, L.R., Fallin, D., Judge, D.P., Moy, T.F., Becker, L.C., Dietz, H.C. (2003). *KLOTHO* allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1154-1161.

Barker, N., Clevers, H. (2006). Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5, 997-1014.

Bartek, J., Lukas, J. (2001). Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett.* 490, 117-122.

Baserga, R. (1995). The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth? *Cancer Res.* 55, 249-252.

Baserga, R., Peruzzi, F., Reiss, K. (2003). The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int. J. Cancer* 107, 873-877.

Ben-Dov, I.Z., Galitzer, H., Lavi-Moshayoff, V., Goetz, R., Kuro-o, M., Mohammadi, M., Sirkis, R., Naveh-Many, T., Silver, J. (2007). The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J. Clin. Invest.* 117, 4003-4008.

Bloch, L., Sineshchekova, O., Reichenbach, D., Reiss, K., Saftig, P., Kuro-o, M., Kaether, C. (2009). *Klotho* is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase. *FEBS Lett.* 583, 3221-3224.

Blüher, M., Kahn, B.B., Kahn, C.R. (2003). Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299, 572-574.

Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.

Borkhardt, A., Repp, R., Haas, O.A., Leis, T., Harbott, J., Kreuder, J., Hammermann, J., Henn, T., Lampert, F. (1997). Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene* 14, 195-202.

Bruchim, I., Attias, Z., Werner, H. (2009). Targeting the IGF1 axis in cancer proliferation. *Expert Opin. Ther. Targets* 13, 1179-1192.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-68.

Cardillo, M.R., Monti, S., Di Silverio, F., Gentile, V., Sciarra, F., Toscano, V. (2003). Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and IGF type I receptor (IGFR-I) expression in prostatic cancer. *Anticancer Res.* 23, 3825-3835.

Cha, S.K., Ortega, B., Kurosu, H., Rosenblatt, K.P., Kuro-o, M., Huang, C.L. (2008). 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.* 105, 9805-9810.

- Cha, S.K., Hu, M.C., Kurosu, H., Kuro-o, M., Moe, O., Huang, C.L. (2009). Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K(+) excretion by Klotho. *Mol. Pharmacol.* **76**, 38-46.
- Cha, S.K., Kuro-o, M., Huang, C.L. (2009). The anti-aging hormone Klotho regulates cell surface abundance of TRPC6. *J. Am. Soc. Nephrol.* [abstract]. (Available online at <http://www.asn-online.org>).
- Chan, J.M., Stampfer, M.J., Giovannucci, E., Gann, P.H., Ma, J., Wilkinson, P., Hennekens, C.H., Pollak, M. (1998). Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* **279**, 563-566.
- Chang, Q., Hoefs, S., van der Kemp, A.W., Topala, C.N., Bindels, R.J., Hoenderop, J.G. (2005). The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* **310**, 490-493.
- Chen, C.D., Podvin, S., Gillespie, E., Leeman, S.E., Abraham, C.R. (2007). Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**, 19796-19801.
- Chen, B., Wang, X., Zhao, W., Wu, J. (2010). Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **29**, 99.
- Choi, M., Moschetta, A., Bookout, A.L., Peng, L., Umetani, M., Holmstrom, S.R., Suino-Powell, K., Xu, H.E., Richardson, J.A., Gerard, R.D., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A. (2006). Identification of a hormonal basis for gallbladder filling. *Nat. Med.* **12**, 1253-1255.
- Choi, B.H., Kim, C.G., Lim, Y., Lee, Y.H., Shin, S.Y. (2010). Transcriptional activation of the human Klotho gene by epidermal growth factor in HEK293 cells; role of Egr-1. *Gene* **450**, 121-127.
- Chung, S., Funakoshi, T., Civelli, O. (2008). Orphan GPCR research. *Br. J. Pharmacol.* **153**, S339-346.
- Clancy, D.J., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leevers, S.J., Partridge, L. (2001). Extension of life-span by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein. *Science* **292**, 104-106.
- Clemmons, D.R. (2007). Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 821-833.
- Davis, R.J., D'Cruz, C.M., Lovell, M.A., Biegel, J.A., Barr, F.G. (1994). Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* **54**, 2869-2872.
- DeAlmeida, V.I., Miao, L., Ernst, J.A., Koeppen, H., Polakis, P., Rubinfeld, B. (2007). The soluble wnt receptor Frizzled8CRD-hFc inhibits the growth of teratocarcinomas in vivo. *Cancer Res.* **67**, 5371-5379.
- DeAngelis, T., Ferber, A., Baserga, R. (1995). Insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the platelet-derived growth factor receptor. *J. Cell. Physiol.* **164**, 214-221.
- Dietrich, A., Gudermann, T. (2007). TRPC6. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 125-141.
- Farmer, S.R. (2005). Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. *Int. J. Obes. (Lond)*. **29**, Suppl. 1, S13-16.
- Fodde, R., Brabletz, T. (2007). Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **19**, 150-158.
- Fuchs, S.Y., Ougolkov, A.V., Spiegelman, V.S., Minamoto, T. (2005). Oncogenic beta-catenin signaling networks in colorectal cancer. *Cell Cycle* **4**, 1522-1539.
- Fukino, K., Suzuki, T., Saito, Y., Shindo, T., Amaki, T., Kurabayashi, M., Nagai, R. (2002). Regulation of angiogenesis by the aging suppressor gene klotho. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 332-337.

- Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y.D., Ellis, L.M., Semenza, G.L. (2002). Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 38205-38211.
- Galili, N., Davis, R.J., Fredericks, W.J., Mukhopadhyay, S., Rauscher, F.J., 3rd, Emanuel, B.S., Rovera, G., Barr, F.G. (1993). Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat. Genet.* *5*, 230-235.
- Goetz, R., Nakada, Y., Hu, M.C., Kurosu, H., Wang, L., Nakatani, T., Shi, M., Eliseenkova, A.V., Razzaque, M.S., Moe, O.W., Kuro-o, M., Mohammadi, M. (2010). Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 407-412.
- Gomis, R.R., Alarcón, C., Nadal, C., Van Poznak, C., Massagué, J. (2006). C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell.* *10*, 203-214.
- Greer, E.L., Brunet, A. (2008). FOXO transcription factors in ageing and cancer. *Acta Physiol. (Oxf)* *192*, 19-28.
- Guan, Y., Zhang, Y., Breyer, M.D. (2002). The role of PPARs in the transcriptional control of cellular processes. *Drug News Perspect.* *15*, 147-154.
- Hankinson, S.E., Willett, W.C., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Michaud, D.S., Deroo, B., Rosner, B., Speizer, F.E., Pollak, M. (1998). Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* *351*, 1393-1396.
- Haruna, Y., Kashihara, N., Satoh, M., Tomita, N., Namikoshi, T., Sasaki, T., Fujimori, T., Xie, P., Kanwar, Y.S. (2007). Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *104*, 2331-2336.
- He, B., Reguart, N., You, L., Mazieres, J., Xu, Z., Lee, A.Y., Mikami, I., McCormick, F., Jablons, D.M. (2005). Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. *Oncogene* *24*, 3054-3058.
- Henderson, B., Mesher, J. (2007). The search for the chaperonin 60 receptors. *Methods* *43*, 223-228.
- Hoenderop, J.G., Nilius, B., Bindels, R.J. (2005). Calcium absorption across epithelia. *Physiol. Rev.* *85*, 373-422.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Géløën, A., Even, P.C., Cervera, P., Le Bouc, Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* *421*, 182-187.
- Hu, M.C., Lee, D.F., Xia, W., Golfman, L.S., Ou-Yang, F., Yang, J.Y., Zou, Y., Bao, S., Hanada, N., Saso, H., Kobayashi, R., Hung, M.C. (2004). I kappa B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* *117*, 225-237.
- Huang, C. (2009). Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* *20*, 692-699.
- Huang, C.L. (2010). Regulation of ion channels by secreted Klotho: mechanisms and implications. *Kidney Int.* *77*, 855-860.
- Hurtley, S.M., Bole, D.G., Hoover-Litty, H., Helenius, A., Copeland, C.S. (1989). Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J Cell Biol.* *108*, 2117-2126.
- Ikushima, M., Rakugi, H., Ishikawa, K., Maekawa, Y., Yamamoto, K., Ohta, J., Chihara, Y., Kida, I., Ogihara, T. (2006). Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *339*, 827-832.

- Imura, A., Iwano, A., Tohyama, O., Tsuji, Y., Nozaki, K., Hashimoto, N., Fujimori, T., Nabeshima, Y. (2004). Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett.* **565**, 143-147.
- Imura, A., Tsuji, Y., Murata, M., Maeda, R., Kubota, K., Iwano, A., Obuse, C., Togashi, K., Tominaga, M., Kita, N., Tomiyama, K., Iijima, J., Nabeshima, Y., Fujioka, M., Asato, R., Tanaka, S., Kojima, K., Ito, J., Nozaki, K., Hashimoto, N., Ito, T., Nishio, T., Uchiyama, T., Fujimori, T., Nabeshima, Y. (2007). alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science* **316**, 1615-1618.
- Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., Gerard, R.D., Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A. (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* **2**, 217-225.
- Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., Elmquist, J.K., Gerard, R.D., Burgess, S.C., Hammer, R.E., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A. (2007). Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* **5**, 415-425.
- Ito, S., Fujimori, T., Hayashizaki, Y., Nabeshima, Y. (2002). Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1576**, 341-345.
- Jones, J.I., Clemmons, D.R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* **16**, 3-34.
- Kaleko, M., Rutter, W.J., Miller, A.D. (1990). Overexpression of the human insulinlike growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 464-473.
- Kamemori, M., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Takahashi, K., Nagai, R., Furuya, N. (2002). Expression of Klotho protein in the inner ear. *Hear. Res.* **171**, 103-110.
- Kawaguchi, H., Manabe, N., Miyaura, C., Chikuda, H., Nakamura, K., Kuro-o, M. (1999). Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in klotho mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *J. Clin. Invest.* **104**, 229-237.
- Kawaguchi, H., Manabe, N., Chikuda, H., Nakamura, K., Kuro-o, M. (2000). Cellular and molecular mechanism of low-turnover osteopenia in the klotho-deficient mouse. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 731-737.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366**, 461-464.
- Khare, P.D., Khare, M., Tandon, R., Chaturvedi, U.C. (2003). Identification, purification and characterization of a receptor for dengue virus-induced macrophage cytotoxin (CF2) from murine T cells. *FEMS Immunol. Med- Microbiol.* **38**, 35-43.
- Kharitonov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., Gromada, J., Brozinick, J.T., Hawkins, E.D., Wroblewski, V.J., Li, D.S., Mehrbod, F., Jaskunas, S.R., Shanafelt, A.B. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* **115**, 1627-1635.
- Kioussi, C., Briata, P., Baek, S.H., Rose, D.W., Hamblet, N.S., Herman, T., Ohgi, K.A., Lin, C., Gleiberman, A., Wang, J. (2002) Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* **111**, 673-685.
- Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B.T., Jacobsen, S.E., Nerlov, C. (2006). Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat. Immunol.* **7**, 1048-1056.
- Kops, G.J., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W., Coffey, P.J., Huang, T.T., Bos, J.L., Medema, R.H., Burgering, B.M. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* **419**, 316-321.

- Krajisnik, T., Björklund, P., Marsell, R., Ljunggren, O., Akerström, G., Jonsson, K.B., Westin, G., Larsson, T.E. (2007). Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 $\alpha$ -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J. Endocrinol.* *195*, 125-131.
- Kuro-o, M., Hanaoka, K., Hiroi, Y., Noguchi, T., Fujimori, Y., Takewaki, S., Hayasaka, M., Katoh, H., Miyagishi, A., Nagai, R., et al. (1995). Salt-sensitive hypertension in transgenic mice overexpressing Na(+)-proton exchanger. *Circ. Res.* *76*, 148-153.
- Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., Iwasaki, H., Iida, A., Shiraki-Iida, T., Nishikawa, S., Nagai, R., Nabeshima, Y.I. (1997). Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* *390*, 45-51.
- Kuro-o, M. (2008). Endocrine FGFs and Klothos: emerging concepts. *Trends Endocrinol. Metab.* *19*, 239-245.
- Kuro-o, M. (2008). Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol. Chem.* *389*, 233-241.
- Kuro-o, M. (2009). Klotho and aging. *Biochim. Biophys. Acta* *1790*, 1049-1058.
- Kuro-o, M. (2010). Overview of the FGF23-Klotho axis. *Pediatr. Nephrol.* *25*, 583-590.
- Kuro-o, M. (2010) Klotho. *Pflugers Arch.* *459*, 333-343.
- Kurosuo, H., Yamamoto, M., Clark, J.D., Pastor, J.V., Nandi, A., Gurnani, P., McGuinness, O.P., Chikuda, H., Yamaguchi, M., Kawaguchi, H., Shimomura, I., Takayama, Y., Herz, J., Kahn, C.R., Rosenblatt, K.P., Kuro-o, M. (2005). Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* *309*, 1829-1833.
- Kurosuo, H., Ogawa, Y., Miyoshi, M., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K.P., Baum, M.G., Schiavi, S., Hu, M.C., Moe, O.W., Kuro-o, M. (2006). Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho. *J. Biol. Chem.* *281*, 6120-6123.
- Kurosuo, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A.S., Goetz, R., Eliseenkova, A.V., Mohammadi, M., Rosenblatt, K.P., Kliewer, S.A., Kuro-o, M. (2007). Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J. Biol. Chem.* *282*, 26687-26695.
- Kurosuo, H., Kuro-o, M. (2008). The Klotho gene family and the endocrine fibroblast growth factors. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* *17*, 368-372.
- Kurosuo, H., Kuro-o, M. (2009). The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Mol. Cell. Endocrinol.* *299*, 72-78.
- Kyoung Kim, H., Kyoung Kim, Y., Song, I.H., Baek, S.H., Lee, S.R., Hye Kim, J., Kim, J.R. (2005). Down-regulation of a forkhead transcription factor, FOXO3a, accelerates cellular senescence in human dermal fibroblasts. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *60*, 4-9.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lee, P.H., Gao, A., van Staden, C., Ly, J., Salon, J., Xu, A., Fang, Y., Verkleeren, R. (2008). Evaluation of dynamic mass redistribution technology for pharmacological studies of recombinant and endogenously expressed G protein-coupled receptors. *Assay Drug. Dev. Technol.* *6*, 83-94.
- Li, S.A., Watanabe, M., Yamada, H., Nagai, A., Kinuta, M., Takei, K. (2004). Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell Struct. Funct.* *29*, 91-99.
- Liu, S., Tang, W., Zhou, J., Stubbs, J.R., Luo, Q., Pi, M., Quarles, L.D. (2006). Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J. Am. Soc. Nephrol.* *17*, 1305-1315.

- Liu, S., Gupta, A., Quarles, L.D. (2007). Emerging role of fibroblast growth factor 23 in a bone-kidney axis regulating systemic phosphate homeostasis and extracellular matrix mineralization. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 16, 329-335.
- Liu, H., Fergusson, M.M., Castilho, R.M., Liu, J., Cao, L., Chen, J., Malide, D., Rovira, I.I., Schimel, D., Kuo, C.J., Gutkind, J.S., Hwang, P.M., Finkel, T. (2007). Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 317, 803-806.
- Lu, P., Boros, S., Chang, Q., Bindels, R.J., Hoenderop, J.G. (2008). The beta-glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23, 3397-3402.
- Luo, J., Manning, B.D., Cantley, L.C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4, 257-262.
- Lu, L., Katsaros, D., Wiley, A., de la Longrais, I.A., Puopolo, M., Yu, H. (2008). Klotho expression in epithelial ovarian cancer and its association with insulin-like growth factors and disease progression. *Cancer Invest.* 26, 185-192.
- Maekawa, Y., Ishikawa, K., Yasuda, O., Oguro, R., Hanasaki, H., Kida, I., Takemura, Y., Ohishi, M., Katsuya, T., Rakugi, H. (2009). Klotho suppresses TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-kappaB activation. *Endocrine* 35, 341-346.
- Masuda, H., Chikuda, H., Suga, T., Kawaguchi, H., Kuro-o, M. (2005). Regulation of multiple ageing-like phenotypes by inducible klotho gene expression in klotho mutant mice. *Mech. Ageing Dev.* 126, 1274-1283.
- Matsubayashi, Y., Shinohara, H., Ogawa, M. (2006). Identification and functional characterization of phytosulfokine receptor using a ligand-based approach. *Chem. Rec.* 6, 356-364.
- Matsumura, Y., Aizawa, H., Shiraki-Iida, T., Nagai, R., Kuro-o, M., Nabeshima, Y. (1998). Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 626-630.
- Medici, D., Razzaque, M.S., Deluca, S., Rector, T.L., Hou, B., Kang, K., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Olsen, B.R., Lanske, B. (2008). FGF-23-Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D-induced apoptosis. *J. Cell. Biol.* 182, 459-465.
- Meuth, M. (2010). Chk1 suppressed cell death. *Cell Div.* 5, 21.
- Mian, I.S. (1998). Sequence, structural, functional, and phylogenetic analyses of three glycosidase families. *Blood Cells Mol. Dis.* 24, 83-100.
- Miyauchi, H., Minamino, T., Tateno, K., Kunieda, T., Toko, H., Komuro, I. (2004). Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J.* 23, 212-220.
- Mohammadi, M., Dionne, C.A., Li, W., Li, N., Spivak, T., Honegger, A.M., Jaye, M., Schlessinger, J. (1992). Point mutation in FGF receptor eliminates phosphatidylinositol hydrolysis without affecting mitogenesis. *Nature.* 358, 681-684.
- Morris, J.Z., Tissenbaum, H.A., Ruvkun, G. (1996). A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382, 536-539.
- Nabeshima, Y. (2006). Toward a better understanding of Klotho. *Sci. Aging Knowledge Environ.* 2006, pe11.
- Nagai, T., Yamada, K., Kim, H.C., Kim, Y.S., Noda, Y., Imura, A., Nabeshima, Y., Nabeshima, T. (2003). Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *FASEB J.* 17, 50-52.

- Nehlin, J.O., Mogensen, J.P., Petterson, I., Jeppesen, L., Fleckner, J., Wulff, E.M., Sauerberg, P. (2006). Selective PPAR agonists for the treatment of type 2 diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1067*, 448-453.
- Nijenhuis, T., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. (2005). TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca(2+) entry at the gate. *Pflugers Arch.* *451*, 181-192.
- de Oliveira, R.M. (2006). Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Lett.* *580*, 5753-5758.
- Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Masuda, H., Nakamura, T., Aihara, Y., Kaname, T., Suga, T., Arai, M., Aizawa, H., Matsumura, Y., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Nagai, R. (1998). Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *251*, 920-925.
- Ouban, A., Muraca, P., Yeatman, T., Coppola, D. (2003). Expression and distribution of insulin-like growth factor-1 receptor in human carcinomas. *Hum. Pathol.* *34*, 803-808.
- Parry, P., Wei, Y., Evans, G. (1994). Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes Chromosomes Cancer* *11*, 79-84.
- Parsons, R. (2004). Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* *15*, 171-176.
- Pelham, H.R. (1989). Heat shock and the sorting of luminal ER proteins. *EMBO J.* *8*, 3171-3176.
- Petermann, E., Woodcock, M., Helleday, T. (2010). Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 16090-16095.
- Petridou, E., Koukoulomatis, P., Alexe, D.M., Voulgaris, Z., Spanos, E., Trichopoulos, D. (2003). Endometrial cancer and the IGF system: a case-control study in Greece. *Oncology* *64*, 341-345.
- Polakis, P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *17*, 45-51.
- Probst-Hensch, N.M., Yuan, J.M., Stanczyk, F.Z., Gao, Y.T., Ross, R.K., Yu, M.C. (2001). IGF-1, IGF-2 and IGFBP-3 in prediagnostic serum: association with colorectal cancer in a cohort of Chinese men in Shanghai. *Br. J. Cancer* *85*, 1695-1699.
- Quarles, L.D. (2003). FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *285*, E1-9.
- Rakugi, H., Matsukawa, N., Ishikawa, K., Yang, J., Imai, M., Ikushima, M., Maekawa, Y., Kida, I., Miyazaki, J., Ogihara, T. (2007). Anti-oxidative effect of Klotho on endothelial cells through cAMP activation. *Endocrine* *31*, 82-87.
- Resnicoff, M., Burgaud, J.L., Rotman, H.L., Abraham, D., Baserga, R. (1995). Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors. *Cancer Res.* *55*, 3739-3741.
- Roy, R.N., Gerulath, A.H., Cecutti, A., Bhavnani, B.R. (1999). Discordant expression of insulin-like growth factors and their receptor messenger ribonucleic acids in endometrial carcinomas relative to normal endometrium. *Mol. Cell. Endocrinol.* *153*, 19-27.
- Rye, C.S., Withers, S.G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *4*, 573-580.
- Saharia, A., Teasley, D.C., Duxin, J.P., Dao, B., Chiappinelli, K.B., Stewart, S.A. (2010). FEN1 ensures telomere stability by facilitating replication fork re-initiation. *J. Biol. Chem.* *285*, 27057-27066.
- Saito, Y., Yamagishi, T., Nakamura, T., Ohyama, Y., Aizawa, H., Suga, T., Matsumura, Y., Masuda, H., Kurabayashi, M., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Nagai, R. (1998). Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *248*, 324-329.

- Saito, Y., Nakamura, T., Ohyama, Y., Suzuki, T., Iida, A., Shiraki-Iida, T., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Kurabayashi, M., Nagai, R. (2000). In vivo *klotho* gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 767-772.
- Saito, H., Maeda, A., Ohtomo, S., Hirata, M., Kusano, K., Kato, S., Ogata, E., Segawa, H., Miyamoto, K., Fukushima, N. (2005). Circulating FGF-23 is regulated by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and phosphorus in vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 2543-2549.
- Samani, A.A., Brodt, P. (2001). The receptor for the type I insulin-like growth factor and its ligands regulate multiple cellular functions that impact on metastasis. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 10, 289-312.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kaçmaz, K., Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 39-85.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 24, 104-108.
- Schadel, V. (2008). Identifikation neuer Komponenten der Chk1 vermittelten Signaltransduktion. Dissertation. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Scheller, M., Huelsken, J., Rosenbauer, F., Taketo, M.M., Birchmeier, W., Tenen, D.G., Leutz, A. (2006). Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat. Immunol.* 7, 1037-1047.
- Schindler, F. (2000). Surface plasmon resonance-was steckt dahinter? *LaborPraxis* 24, 38-42.
- Schröder, R., Janssen, N., Schmidt, J., Kebig, A., Merten, N., Hennen, S., Müller, A., Blättermann, S., Mohr-Andrä, M., Zahn, S., Wenzel, J., Smith, N.J., Gomeza, J., Drewke, C., Milligan, G., Mohr, K., Kostenis, E. (2010). Deconvolution of complex G protein-coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements. *Nat Biotechnol.* 28, 943-949.
- Selman, C., Lingard, S., Choudhury, A.I., Batterham, R.L., Claret, M., Clements, M., Ramadani, F., Okkenhaug, K., Schuster, E., Blanc, E., Piper, M.D., Al-Qassab, H., Speakman, J.R., Carmignac, D., Robinson, I.C., Thornton, J.M., Gems, D., Partridge, L., Withers, D.J. (2008). Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J.* 22, 807-818.
- Sitara, D., Razzaque, M.S., Hesse, M., Yoganathan, S., Taguchi, T., Erben, R.G., Jüppner, H., Lanske, B. (2004). Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in *PheX*-deficient mice. *Matrix Biol.* 23, 421-432.
- Shimada, T., Kakitani, M., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Tomizuka, K., Yamashita, T. (2004). Targeted ablation of *Fgf23* demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J. Clin. Invest.* 113, 561-568.
- Shimada, T., Takeshita, Y., Murohara, T., Sasaki, K., Egami, K., Shintani, S., Katsuda, Y., Ikeda, H., Nabeshima, Y., Imaizumi, T. (2004). Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging *klotho* mouse. *Circulation* 110, 1148-1155.
- Shiraki-Iida, T., Aizawa, H., Matsumura, Y., Sekine, S., Iida, A., Anazawa, H., Nagai, R., Kuro-o, M., Nabeshima, Y. (1998). Structure of the mouse *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett.* 424, 6-10.
- Stubbs, J.R., Liu, S., Tang, W., Zhou, J., Wang, Y., Yao, X., Quarles, L.D. (2007). Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2116-2124.
- Suga, T., Kurabayashi, M., Sando, Y., Ohyama, Y., Maeno, T., Maeno, Y., Aizawa, H., Matsumura, Y., Kuwaki, T., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Nagai, R. (2000). Disruption of the *klotho* gene causes pulmonary emphysema in mice. Defect in maintenance of pulmonary integrity during postnatal life. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 22, 26-33.

Sugiura, H., Yoshida, T., Tsuchiya, K., Mitobe, M., Nishimura, S., Shiota, S., Akiba, T., Nihei, H. (2005). Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20, 2636-2645.

Surinya, K.H., Forbes, B.E., Occhiodoro, F., Booker, G.W., Francis, G.L., Siddle, K., Wallace, J.C., Cosgrove, L.J. (2008). An investigation of the ligand binding properties and negative cooperativity of soluble insulin-like growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 283, 5355-5363.

Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., Toyota, M., Tokino, T., Hinoda, Y., Imai, K., Herman, J.G., Baylin, S.B. (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 36, 417-422.

Taguchi, A., Wartschow, L.M., White, M.F. (2007). Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science* 317, 369-372.

Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M., Garofalo, R.S. (2001). A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 292, 107-110.

Tatar, M., Bartke, A., Antebi, A. (2003). The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299, 1346-1351.

Thurston, R.D., Larmonier, C.B., Majewski, P.M., Ramalingam, R., Midura-Kiela, M., Laubitz, D., Vandewalle, A., Besselsen, D.G., Mühlbauer, M., Jobin, C., Kiela, P.R., Ghishan, F.K. (2010). Tumor necrosis factor and interferon-gamma down-regulate Klotho in mice with colitis. *Gastroenterology* 138, 1384-1394

Tohyama, O., Imura, A., Iwano, A., Freund, J.N., Henrissat, B., Fujimori, T., Nabeshima, Y. (2004). Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J. Biol. Chem.* 279, 9777-9784.

Tollefsen SE, Thompson K. (1988). The structural basis for insulin-like growth factor I receptor high affinity binding. *J. Biol. Chem.* 263, 16267-16273.

Toyama, R., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Itoh, Y., Tsuji, Y., Osamura, R.Y., Nabeshima, Y. (2006). Impaired regulation of gonadotropins leads to the atrophy of the female reproductive system in klotho-deficient mice. *Endocrinology* 147, 120-129.

Treins, C., Giorgetti-Peraldi, S., Murdaca, J., Monthouël-Kartmann, M.N., Van Obberghen, E. (2005). Regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and expression of HIF hydroxylases in response to insulin-like growth factor I. *Mol. Endocrinol.* 19, 1304-1317.

Tsujikawa, H., Kurotaki, Y., Fujimori, T., Fukuda, K., Nabeshima, Y. (2003). Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol. Endocrinol.* 17, 2393-2403.

Unger, R.H. (2006). Klotho-induced insulin resistance: a blessing in disguise? *Nat. Med.* 12, 56-57.

Urakawa, I., Yamazaki, Y., Shimada, T., Iijima, K., Hasegawa, H., Okawa, K., Fujita, T., Fukumoto, S., Yamashita, T. (2006). Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 444, 770-774.

Utsugi, T., Ohno, T., Ohyama, Y., Uchiyama, T., Saito, Y., Matsumura, Y., Aizawa, H., Itoh, H., Kurabayashi, M., Kawazu, S., Tomono, S., Oka, Y., Suga, T., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Nagai, R. (2000). Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. *Metabolism* 49, 1118-1123.

Valentinis, B., Baserga, R. (2001). IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol. Pathol.* 54, 133-137.

- Wahl, G.M., Carr, A.M. (2001). The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat. Cell. Biol.* 3, E277-286.
- Wang, Y., Klijn, J.G., Zhang, Y., Sieuwerts, A.M., Look, M.P., Yang, F., Talantov, D., Timmermans, M., Meijer-van Gelder, M.E., Yu, J., Jatko, T., Berns, E.M., Atkins, D., Foekens, J.A. (2005). Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 365, 671-679.
- Weber, M.M., Fottner, C., Liu, S.B., Jung, M.C., Engelhardt, D., Baretton, G.B. (2002). Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human colon carcinomas. *Cancer* 95, 2086-2095.
- Werner, H., LeRoith, D. (1996). The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. *Adv. Cancer Res.* 68, 183-223.
- Wolf, I., O'Kelly, J., Rubinek, T., Tong, M., Nguyen, A., Lin, B.T., Tai, H.H., Karlan, B.Y., Koeffler, H.P. (2006). 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is a tumor suppressor of human breast cancer. *Cancer Res.* 66, 7818-7823.
- Wolf, I., Levanon-Cohen, S., Bose, S., Ligumsky, H., Sredni, B., Kanety, H., Kuro-o, M., Karlan, B., Kaufman, B., Koeffler, H.P., Rubinek, T. (2008). Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene* 27, 7094-7105.
- Wolf, I., Laitman, Y., Rubinek, T., Abramovitz, L., Novikov, I., Beer, R., Kuro-o, M., Koeffler, H.P., Catane, R., Freedman, L.S., Levy-Lahad, E., Karlan, B.Y., Friedman, E., Kaufman, B. (2010). Functional variant of KLOTHO: a breast cancer risk modifier among BRCA1 mutation carriers of Ashkenazi origin. *Oncogene* 29, 26-33.
- Wu, X., Ge, H., Gupte, J., Weiszmann, J., Shimamoto, G., Stevens, J., Hawkins, N., Lemon, B., Shen, W., Xu, J., Veniant, M.M., Li, Y.S., Lindberg, R., Chen, J.L., Tian, H., Li, Y. (2007). Co-receptor requirements for fibroblast growth factor-19 signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 29069-29072.
- Wu, X., Lemon, B., Li, X., Gupte, J., Weiszmann, J., Stevens, J., Hawkins, N., Shen, W., Lindberg, R., Chen, J.L., Tian, H., Li, Y. (2008). C-terminal tail of FGF19 determines its specificity toward Klotho co-receptors. *J. Biol. Chem.* 283, 33304-33309.
- Yahiro, K., Morinaga, N., Satoh, M., Matsuura, G., Tomonaga, T., Nomura, F., Moss, J., Noda, M. (2006). Identification and characterization of receptors for vacuolating activity of subtilase cytotoxin. *Mol. Microbiol.* 62, 480-490.
- Yamamoto, M., Clark, J.D., Pastor, J.V., Gurnani, P., Nandi, A., Kurosu, H., Miyoshi, M., Ogawa, Y., Castrillon, D.H., Rosenblatt, K.P., Kuro-o, M. (2005). Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J. Biol. Chem.* 280, 38029-38034.
- Yamashita, T., Nifuji, A., Furuya, K., Nabeshima, Y., Noda, M. (1998). Elongation of the epiphyseal trabecular bone in transgenic mice carrying a klotho gene locus mutation that leads to a syndrome resembling aging. *J. Endocrinol.* 159, 1-8.
- Yamashita, T., Nabeshima, Y., Noda, M. (2000). High-resolution micro-computed tomography analyses of the abnormal trabecular bone structures in klotho gene mutant mice. *J. Endocrinol.* 164, 239-245.
- Yamashita, T., Konishi, M., Miyake, A., Inui, K., Itoh, N. (2002). Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 28265-28270.
- Yang, J., Matsukawa, N., Rakugi, H., Imai, M., Kida, I., Nagai, M., Ohta, J., Fukuo, K., Nabeshima, Y., Ogihara, T. (2003). Upregulation of cAMP is a new functional signal pathway of Klotho in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 424-429.
- Yoshida, T., Fujimori, T., Nabeshima, Y. (2002). Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1 $\alpha$ -hydroxylase gene. *Endocrinology* 143, 683-689.

Yu, H., Spitz, M.R., Mistry, J., Gu, J., Hong, W.K., Wu, X. (1999). Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* *91*, 151-156.

Yu, X., Ibrahimi, O.A., Goetz, R., Zhang, F., Davis, S.I., Garringer, H.J., Linhardt, R.J., Ornitz, D.M., Mohammadi, M., White, K.E. (2005). Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23. *Endocrinology* *146*, 4647-4656.

Zhao, H., Grossman, H.B., Spitz, M.R., Lerner, S.P., Zhang, K., Wu, X. (2003). Plasma levels of insulin-like growth factor-1 and binding protein-3, and their association with bladder cancer risk. *J. Urol.* *169*, 714-717.

Zhang, D., Brodt, P. (2003). Type 1 insulin-like growth factor regulates MT1-MMP synthesis and tumor invasion via PI 3-kinase/Akt signaling. *Oncogene* *22*, 974-982.

Zhang, H., Li, Y., Fan, Y., Wu, J., Zhao, B., Guan, Y., Chien, S., Wang, N. (2008). Klotho is a target gene of PPAR-gamma. *Kidney Int.* *74*, 732-739.

## Datenbankverzeichnis

Gene Ontology database. <http://www.geneontology.org>