

**Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen**

**Abteilung Physiologie I**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. F. Lang**

**Auswirkungen einer reduzierten Klotho-Genexpression  
bei Mäusen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Stephanie Sophie Fischer**

**aus**

**Schorndorf**

**2012**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. B. Nürnberg

3. Berichterstatter: Professor Dr. C. Korbmacher



## Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1α,25-Dihydroxycholecalciferol, Calcitriol
ACE	Angiotensin-converting Enzym
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon (Synonym: AVP)
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
ATII	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AVP	Argininvasopressin (Synonym: ADH)
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
D <sup>-</sup>	dauerhafte Vitamin-D-arme Diät
D <sup>-/+</sup>	vorübergehende Vitamin-D-arme Diät in den ersten vier Lebenswochen und anschließend Kontrolldiät
D <sup>+</sup>	Vitamin-D-haltige Kontrolldiät
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EIA	Enzymimmunoassay
EIPA	Ethylisopropylamilorid
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FOXO	Forkhead transcription factor
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter)
GH	Growth hormone
Hb	Hämoglobin
HDL	High density lipoprotein
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N2-ethan-sulfonsäure
Hkt	Hämatokrit

HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-7	Interleukin-7
IP3	Inositoltriphosphat
Klotho <sup>-/-</sup>	Klotho-Knockout
Klotho <sup>+/+</sup>	Klotho-Wildtyp
Klotho <sup>kl/kl</sup>	Klotho-defizient mit geringer Restexpression
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
NO	Nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
PAF	Platelet activating factor
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA/PKC	Proteinkinase A/Proteinkinase C
PPAR	Peroxisome-proliferator-activated receptors
PTH	Parathormon
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
ROMK	Renal outer medullary potassium channel
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSC	Seitwärtsstreulicht (Side-Scatter)
tert-BOOH	Tert-butyl-hydroxyl-peroxid
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
TRPV5	Transient receptor potential vanilloid 5
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VDR	Vitamin-D-Rezeptor

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Klotho.....	1
1.1.1 Klotho-exprimierende Organe und Regulation der Klothoexpression	2
1.1.2 Beeinflussung von Signalwegen durch Klotho.....	4
1.2 Auswirkungen einer reduzierten Klotho-Genexpression.....	4
1.2.1 Knochenstruktur.....	5
1.2.2 B-Lymphopoese.....	8
1.2.3 Herz-Kreislauf-System.....	8
1.2.4 Nieren.....	10
1.2.5 Lunge.....	10
1.2.6 Energiehaushalt und Glukosestoffwechsel.....	11
1.2.7 Neurologische Veränderungen.....	12
1.2.8 Effekte therapeutischer Maßnahmen.....	13
1.3 Relevanz von Klotho für den Menschen.....	14
1.4 Kalzium- und Phosphathaushalt.....	15
1.4.1 Einfluss von Klotho auf den Kalzium- und Phosphathaushalt.....	21
1.5 Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts.....	25
1.5.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	26
1.5.2 Atriales natriuretisches Peptid (ANP).....	28
1.5.3 Antidiurese Hormon (ADH).....	29
1.5.4 Hyperaldosteronismus.....	29
1.6 Säure-Basen-Haushalt.....	30
1.7 Eryptose.....	31
1.8 Fragestellung der Arbeit.....	33
2 Material und Methoden.....	35
2.1 Versuchstiere.....	35
2.2 Verwendete Futtersorten.....	36
2.3 Blutentnahmen.....	36
2.4 Versuche zur Eryptose.....	37

2.4.1	Behandlung der Mäuse.....	37
2.4.2	Verwendete Substanzen.....	38
2.4.3	Verwendete Lösungen.....	40
2.4.4	FACS-Analyse.....	41
2.4.5	Phosphatidylserinexposition und Forward-Scatter.....	43
2.4.6	Messung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Menge.....	43
2.4.7	Analyse der Blutbildparameter.....	44
2.4.8	Bestimmung der Retikulozytenzahl.....	44
2.4.9	Bestimmung des Milzgewichts.....	45
2.5	Versuche zum Mineralstoff- und Elektrolythaushalt.....	45
2.5.1	Behandlung der Mäuse.....	45
2.5.2	Bestimmung des Körpergewichts und der Trinkmenge.....	46
2.5.3	Blutgasanalyse.....	46
2.5.4	Bestimmung der Elektrolyt- und Harnstoffstoffkonzentrationen.....	46
2.5.5	Osmolalitätsmessungen.....	47
2.5.6	Versuche mittels ELISA oder EIA.....	47
2.5.7	Radioimmunoassays (RIA).....	50
2.5.8	Blutdruckmessung.....	51
2.5.9	Experimente mit der Ussing-Kammer.....	52
2.6	Statistik.....	53
3	Ergebnisse.....	54
3.1	Blutbild Klotho-defizienter Mäuse.....	54
3.2	Körpergewicht und Milzgewicht.....	55
3.3	Zytosolische Ca <sup>2+</sup> -Konzentration.....	56
3.4	Forward-Scatter.....	58
3.5	Annexin-V-Bindung.....	60
3.6	Annexin-V-Bindung nach Inkubation mit EIPA.....	61
3.7	Stimulation der Eryptose durch oxidativen Stress.....	63
3.8	Stimulation der Eryptose durch Energiemangel.....	64
3.9	Auswirkungen einer Vitamin-D-armen Diät.....	68
3.10	Einfluss von 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> auf den intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Gehalt und die	

Annexin-V-Bindung.....	70
3.11 Körpergewicht und Trinkmenge von Klotho-defizienten Mäusen und Wildtypen mit und ohne Vitamin-D-arme Diät.....	71
3.12 Mineralstoff- und Elektrolytkonzentrationen im Plasma.....	72
3.13 Säure-Basen-Haushalt.....	75
3.14 Plasmakonzentrationen von Calcitriol und PTH.....	76
3.15 Aldosteronkonzentration.....	78
3.16 Plasmaosmolalität.....	79
3.17 Harnstoffkonzentration.....	80
3.18 Blutdruck.....	81
3.19 ENaC-Aktivität im Kolon.....	82
3.20 ACTH- und Corticosteronkonzentration im Plasma.....	84
3.21 Plasmakonzentration von AVP.....	85
4 Diskussion.....	86
4.1 Überlegungen zur Bedeutsamkeit der Versuche.....	86
4.2 Fehlerdiskussion.....	87
4.2.1 Vergleichbarkeit trotz unterschiedlich großer Tiere.....	87
4.2.2 Blutdruckmessung.....	87
4.2.3 Schwierigkeiten aufgrund der Multimorbidität von Klothokl/kl-Mäusen.....	88
4.3 Versuche zur Eryptose.....	88
4.3.1 Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Konzentration und Zellvolumen.....	88
4.3.2 Phosphatidylserinexposition.....	89
4.3.3 Hinweise auf einen erhöhten Erythrozytenumsatz.....	90
4.3.4 Auswirkung von oxidativem Stress und Energiemangel.....	91
4.3.5 Einfluss von Calcitriol und Vitamin-D-armer Diät auf die Eryptose...92	
4.4 Versuche zum Mineralstoff- und Elektrolythaushalt.....	93
4.4.1 Einfluss von Klotho und Vitamin-D-armer Diät auf den Ca <sup>2+</sup> - und Phosphathaushalt.....	93
4.4.2 Einfluss eines Klothomangels und Vitamin-D-armer Diät auf den Volumen- und Elektrolythaushalt.....	94

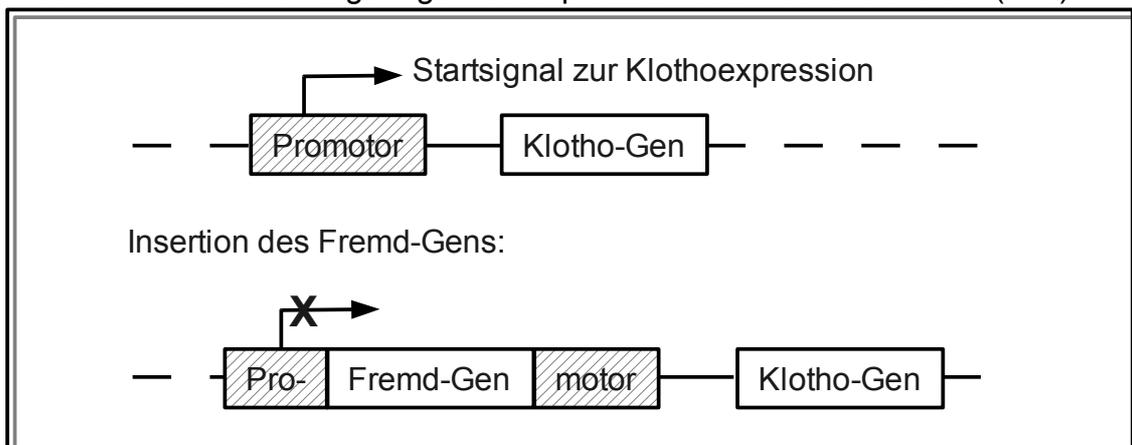
4.4.3 Mögliche Ursachen für den Volumenmangel Klotho-defizienter Mäuse.....	96
4.4.4 Aldosteronwirkung bei Klotho-defizienten Mäusen.....	96
4.4.5 ACTH- und Corticosteronkonzentration bei Klothokl/kl-Mäusen.....	97
4.5 Schlussfolgerung.....	97
5 Zusammenfassung.....	99
6 Literatur.....	103
6.1 Publikationen.....	103
6.2 Literaturverzeichnis.....	103
7 Danksagung.....	121

# 1 Einleitung

## 1.1 Klotho

Klotho wurde 1997 rein zufällig entdeckt, als für einen Versuch transgene Mäuse benötigt wurden. Mit Hilfe eines Vektors sollte ein fremdes Gen in das Genom der Mäuse eingeschleust werden (62). Dies erfolgt jedoch an einer zufälligen Stelle im Genom, weshalb die Fremd-DNA auch in eine für ein anderes Gen kodierenden DNA-Sequenz eingebaut werden und so dessen Funktion beeinträchtigen kann. Durch Verpaarung der transgenen Mäuse wurden Jungtiere mit homozygotem Gendefekt gezüchtet (62). Eines der Jungtiere fiel aufgrund ausgeprägter vorzeitiger Alterungserscheinungen auf und wurde daher nach der Göttin Klotho benannt, die laut griechischer Mythologie die Lebensfäden spinnt (62).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass das Fremd-Gen bei dieser Maus zufällig im Promotor des bis dahin noch unbekanntes Klotho-Gens eingebaut wurde (62, 72). Als Promotor bezeichnet man einen Abschnitt der DNA, der ein kontrolliertes Ablesen eines Gens ermöglicht. Durch die Insertionsmutation wurde der Promotor in seiner Funktion so sehr geschädigt, dass die Klothoexpression stark herunter reguliert wurde, während das eigentliche Klotho-Gen unbeschädigt blieb (145). Die ursprünglich entdeckte „Klotho-Maus“ wies deshalb noch eine geringe Restexpression des Klotho-Gens auf (145).



**Abbildung 1:** Funktionsverlust des Promotors durch eine Insertionsmutation

Das Klotho-Gen befindet sich bei Mäusen auf Chromosom Nr. 5. Es kodiert für ein aus 1014 Aminosäuren bestehendes Protein, das eine Signalsequenz, eine transzelluläre und eine extrazelluläre Domäne enthält (3, 62). Beim Splicen können zwei verschiedene Gentranskripte gebildet werden, von denen eines für die Membranform und eines für die sezernierte Form des Klotho-Proteins kodiert (129). Zusätzlich kann die extrazelluläre Domäne des Membranproteins abgetrennt und ins Blut freigesetzt werden (17). In vitro weist die extrazelluläre Domäne des Klotho-Proteins eine Enzymaktivität als  $\beta$ -Glucuronidase auf (142). Somit kann Klotho vielfältige Aufgaben als Membranprotein, Enzym, Korezeptor und Hormon erfüllen (64, 129, 142, 159).

### **1.1.1 Klotho-exprimierende Organe und Regulation der Klothoexpression**

Klotho wird vorwiegend in Organen, die an der Regulation der Kalziumhomöostase beteiligt sind, exprimiert (94). Als Hauptexpressionsorte sind daher das distale Konvolut der Niere, die Epithelkörperchen und die Ependymzellen des Plexus choroideus zu nennen. Darüber hinaus kann die Expression von Klotho, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß, auch in anderen Organen nachgewiesen werden. Zu diesen gehören Hypophyse, Innenohr, Skelettmuskulatur, Aorta, Harnblase, Pankreas, Kolon, Schilddrüse, Plazenta, Rückenmark und die reifen Keimzellen der Gonaden. In Magen, Lunge, Haut und Knochen kann das Klotho-Gentranskript jedoch nicht nachgewiesen werden, obwohl diese Organe bei Klotho-defizienten Mäusen schwer geschädigt sind. (3, 46, 62, 72, 93, 129)

Es ist bereits eine Vielzahl von Faktoren bekannt, die zur Regulation der Klothoexpression beitragen. Unter anderem konnte bei Ratten nachgewiesen werden, dass eine chronische Kreislaufbelastung, beispielsweise aufgrund von Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie oder chronischem Nierenversagen, zu reduzierter Klothoexpression führt (2). Oxidativer Stress wirkt zumindest in vitro ebenfalls hemmend auf die Klothoexpression.

Umgekehrt weisen Klotho-überexprimierende Zellen nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Exposition eine geringere Apoptoserate auf als Kontrollzellen (85, 161). Auch Angiotensin-II bewirkt langfristig eine Reduktion der renalen Klothoexpression. Dabei entstehen tubulointerstitielle Schäden, die durch exogene Klothozufuhr gebessert werden können (84). Des Weiteren hemmen bakterielle Lipopolysaccharide die Klothoexpression (102).

Eine Steigerung der Klothoexpression kann in vitro durch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, die zur Hemmung der Cholesterinsynthese eingesetzt werden, erzielt werden (99, 172). Darüber hinaus wird Klotho in Adipozyten während deren Differenzierung sowie unter dem Einfluss des Schilddrüsenhormons Trijodthyronin (T<sub>3</sub>) vermehrt gebildet (86). Auch Phosphatrestriktion induziert eine verstärkte Bildung von Klotho (126).

PPAR-gamma-Agonisten vermitteln eine gesteigerte Klothoexpression, während PPAR-gamma-Antagonisten das Gegenteil bewirken. Darum wird angenommen, dass Klotho ein Zielgen von PPAR-gamma ist (172).

**Tabelle 1:** Faktoren, die zur Regulation der Klothoexpression beitragen

Hochregulation von Klotho	Herunterregulation von Klotho
➤ Trijodthyronin	➤ Chronische Kreislaufbelastung
➤ HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren	➤ Lipopolysaccharide
➤ PPAR-gamma-Agonisten	➤ Oxidativer Stress
➤ Phosphatrestriktion	➤ PPAR-gamma-Antagonisten
	➤ Langfristige AT-II-Infusion

### **1.1.2 Beeinflussung von Signalwegen durch Klotho**

In vitro aktiviert Klotho den cAMP-Signalweg in allen Zellen sowie den PKC-Signalweg in Klotho-exprimierenden Zellen von Nieren und Hoden (40).

Außerdem konnte in vitro gezeigt werden, dass Klotho die Aktivierung von FOXOs (forkhead transcription factors) auslöst. FOXOs sind Transkriptionsfaktoren für die Superoxiddismutase MnSOD, einem Enzym zur Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies. Über diesen Mechanismus trägt Klotho zur Resistenz gegenüber oxidativem Stress bei. Zusätzlich konnte eine Inhibition der intrazellulären Signalkaskade von Insulin und IGF-1 durch Klotho nachgewiesen werden. Bei Hemmung des Insulin-stimulierten IGF-1/PI3K/Akt-Signalweges entfällt die Akt-induzierte negative Regulation auf die FOXOs. Die unter dem Einfluss von Klotho beobachtete Aktivierung der FOXOs erfolgt demnach über eine Hemmung des Insulin-/IGF-1-Signalwegs. (64, 164)

Darüber hinaus vermittelt Klotho als Korezeptor die Wirkung von FGF19, FGF21 und FGF23 an deren Rezeptoren (63, 159). In vitro inhibiert der Klotho-FGF23-Komplex apoptotische Signalwege unter Einbeziehung der PI3-Kinase und induziert Zellproliferation durch Aktivierung des Proto-Onkogens Ras (82).

## **1.2 Auswirkungen einer reduzierten Klotho-Genexpression**

Klotho-defiziente Mäuse weisen vorzeitige Alterungserscheinungen in ähnlicher Weise auf, wie sie beim alternden Menschen beobachtet werden können. Die Lebensspanne ist mit nur ca. acht bis neun Wochen extrem verkürzt. Die normale Lebenserwartung gesunder Mäuse beträgt rund zwei Jahre. Im Gegensatz dazu führt eine gesteigerte Klothoexpression zur Verlängerung der Lebensspanne (62, 64, 145). Einhergehend mit der vorzeitigen Alterung Klotho-defizienter Mäuse fallen eine Osteoporose mit reduzierter Knochendichte, eine Kyphose, eine reduzierte Spontanaktivität und eine Hypokinese mit Gangstörungen auf. Des Weiteren kann eine Atrophie verschiedener Organe

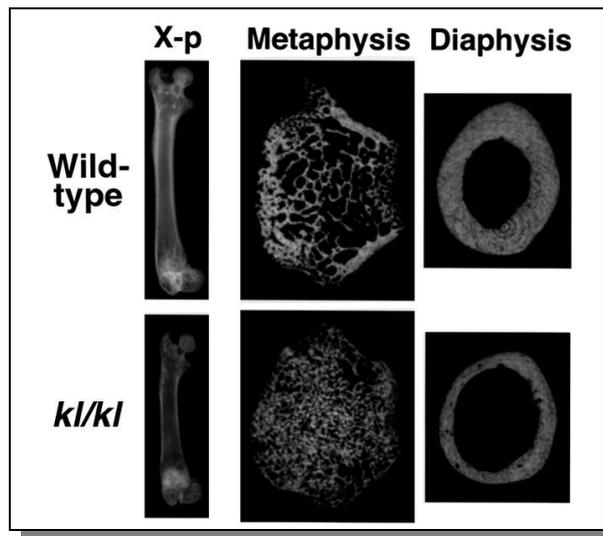
festgestellt werden. Dazu gehören Haut, Muskulatur, Darm und Thymus (62, 98). Aufgrund einer Gonadenatrophie mit gestörter Keimzellreifung sind Klotho-defiziente Mäuse infertil.

Ebenfalls erwähnenswert sind die histologisch nachweisbaren ektopen Kalzifizierungen, die unter anderem in Arterien, in der Magen- und Bronchialschleimhaut, in Alveolarzellen, im Plexus Choroideus, in der Haut, im Hoden und im Herzmuskel nachweisbar sind (62). Diesem Pathomechanismus liegen vermutlich stark erhöhte Plasmakonzentrationen von Kalzium, Phosphat und Calcitriol zugrunde (siehe Kapitel 1.4.1).

Bereits im Alter von drei Wochen kann bei Klotho-defizienten Mäusen eine deutliche Wachstumsretardierung festgestellt werden, die therapierefraktär gegenüber Wachstumshormonen ist (49, 62, 145). Damit einhergehend erreichen neun Wochen alte Klotho-defiziente Mäuse lediglich ein Körpergewicht von 11,8 g und sind somit knapp halb so schwer wie gleichaltrige Wildtypen mit durchschnittlich 24,9 g Körpergewicht (98).

### **1.2.1 Knochenstruktur**

Klotho-defiziente Mäuse weisen neben einer pathologischen Knochenstruktur eine gestörte Zahnbildung und -mineralisierung auf. Im Rahmen einer Osteopenie kann bei Klotho-defizienten Mäusen eine Reduktion der Knochendichte in den Diaphysen von Femur und Tibia beobachtet werden. Dies ist auf eine verdünnte Kortikalis zurückzuführen (51, 139). Andererseits liegt in den Epi- und Metaphysen der langen Knochen und Wirbelkörper eine abnorme Kalzifizierung vor (145, 168). Die dort erhöhte Knochenmineraldichte kommt durch verdichtete und verlängerte Trabekularknochen zustande (51, 165). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass Klotho die Aktivität von Wnt hemmt, einem Faktor zur Stammzellregulation. Eine gesteigerte Wnt-Aktivität, welche demnach bei einem Klothomangel zu erwarten ist, führt zu erhöhter Knochendichte und ist bei Klotho-defizienten Mäusen in den osteopetrotischen Regionen aufzufinden (74).



**Abbildung 2:** Röntgen-Bilder (X-p, linke Spalte) und CT-Bilder (mittlere und rechte Spalte) der Oberschenkelknochen von Wildtyp- bzw. Klotho-defizienten Mäusen (kl/kl) im Alter von sieben Wochen. Die CT-Bilder zeigen Querschnitte der Metaphyse und Diaphyse (51).

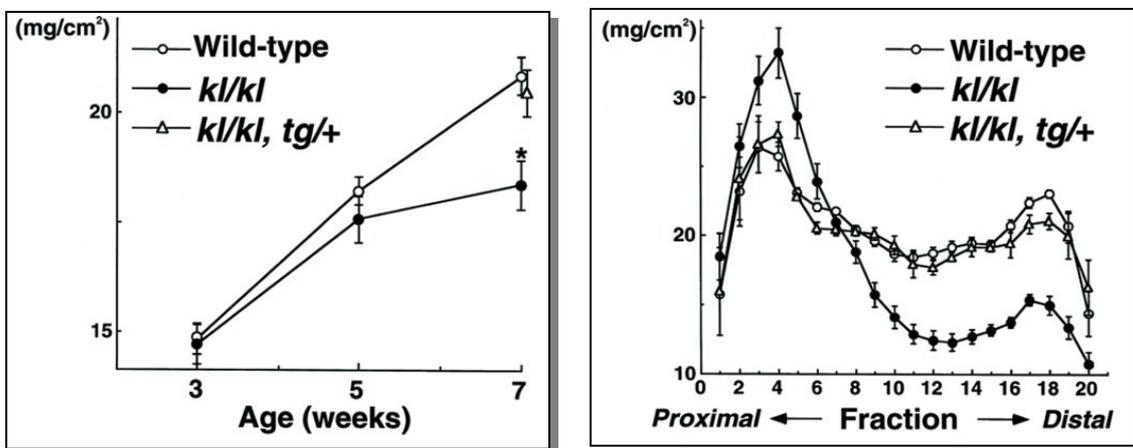
Einhergehend mit einem Osteoklastenmangel ist die Knochenresorption in den Tibiae von Klotho-defizienten Mäusen signifikant erniedrigt (50, 78). Kultivierte Osteoklasten Klotho-defizienter Mäuse zeigen eine normale Resorptionsaktivität und Überlebensrate, lediglich die Differenzierung aus Vorläuferzellen ist beeinträchtigt. Die für den Knochenabbau verantwortlichen Osteoklasten differenzieren sich aus Zellen der Makrophagen-Monozyten-Linie, die im Knochenmark Klotho-defizienter Mäuse in normaler Häufigkeit anzutreffen sind (51, 78). Aber auch Knochenmarkzellen der B-Lymphozyten-Linie unterstützen die Osteoklastendifferenzierung. Daher wird der Osteoklastenmangel auf die ebenfalls verminderte Anzahl von Knochenmarkzellen der B-Lymphozyten-Linie zurückgeführt (78).

Die Anzahl der Osteoblasten-Vorläufer in Knochenmarkkultur ist bei Klotho-defizienten Mäusen ebenfalls reduziert. Dabei liegt eine gestörte Differenzierung vor, die zu Funktionsverlusten führt. In Folge dessen lassen sich weniger alkalische Phosphatase und mineralisierte Matrix in Osteoblastenkulturen von Klotho-defizienten Mäusen nachweisen (50, 51). Die Osteoblasten

scheinen stattdessen vermehrt nicht kollagene Strukturen zu synthetisieren. Außerdem kann eine erhöhte Apoptoserate von Osteoblasten, Osteozyten und Knochenmarkzellen Klotho-defizienter Mäuse nachgewiesen werden (137). Auch die Funktion der Chondrozyten Klotho-defizienter Mäuse ist beeinträchtigt. So ist die charakteristische Säulenordnung der Chondrozyten in der Wachstumsplatte bezüglich Form und Größe irregulär. (49)

Insgesamt ist die Knochenmineraldichte bei Klotho-defizienten Mäusen verringert. Bezogen auf die Knochenoberfläche lässt sich sowohl eine Reduktion der Osteoblasten als auch der Osteoklasten feststellen. Dementsprechend sind Knochenbildungsrate und erodierte Oberfläche in Bezug auf die Knochenoberfläche ebenfalls vermindert. (51)

Folglich liegt bei Klotho-defizienten Mäusen ein verlangsamter Knochenstoffwechsel vor. Dabei ist die Geschwindigkeit des Knochenaufbaus stärker reduziert als die des Abbaus, was in einem Netto-Knochenverlust resultiert und daher mit der senilen Osteoporose des Menschen vergleichbar ist. (51)



**Abbildung 3:** Knochenmineraldichte (mg/cm<sup>2</sup>) der gesamten Tibia (links) sowie von 20 verschiedenen Regionen von proximal nach distal (rechts) bei Wildtyp-Mäusen, Klotho-defizienten Mäusen (kl/kl) und transgenen Klotho-defizienten Mäusen mit exogener Klothoexpression (kl/kl, tg/+) (51).

### **1.2.2 B-Lymphopoese**

Im Laufe der Alterung nimmt sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen die Hämatopoese ab, insbesondere die B-Lymphopoese. Bei Klotho-defizienten Mäusen lässt sich in diesem Zusammenhang eine gestörte B-Zellentwicklung feststellen (78, 103). Die Funktion der hämatopoetischen Stammzellen, einschließlich deren Fähigkeit zur B-Lymphopoese ist in vitro jedoch normal (103). Allerdings lässt sich eine Reduktion der Gesamtzahl kernhaltiger Zellen in Milz und Knochenmark Klotho-defizienter Mäuse feststellen. Im Knochenmark liegt dabei ein B-Zell-Mangel vor, der alle Reifungsstadien betrifft. Bei Klotho-defizienten Mäusen befinden sich im Blut dementsprechend nur halb so viele Leukozyten im Vergleich zu Wildtypen. Dies ist größtenteils auf den Mangel an B-Lymphozyten zurückzuführen (103).

Im Knochenmark befindet sich eine Vielzahl unterschiedlicher, miteinander interagierender Zellarten, zu denen Osteoblasten, Osteoklasten, Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Prä-Adipozyten und schließlich die hämatopoetischen Stammzellen gehören. Diese Umgebung, insbesondere die funktionelle Balance von Osteoklasten und -blasten, spielt eine wichtige Rolle für die B-Lymphopoese. Daher könnte die Osteoporose der Klotho-defizienten Maus zu einer Veränderung der Knochenmarkszusammensetzung mit konsekutiver Beeinträchtigung der B-Lymphopoese führen. (103)

### **1.2.3 Herz-Kreislauf-System**

Eine weitere vorzeitige Alterungserscheinung der Klotho-defizienten Mäuse ist eine Arteriosklerose mit Verkalkung der arteriellen Gefäßmedia und Intimaverdickung (120). Darüber hinaus weisen die Mitral- und Aortenklappen Klotho-defizienter Mäuse frühzeitig Verkalkungen auf (140).

Die durch Acetylcholin vermittelte Relaxation arterieller Gefäße ist bei Klothodefizienz reduziert. Klotho-heterozygote Mäusen scheiden zudem weniger NO-Metaboliten im Urin aus als Wildtypen. Des Weiteren lässt sich in

der Aorta Klotho-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtypen weniger NO-Synthase und NO-Freisetzung nachweisen. NO (Stickstoffmonoxid, nitric oxide) wird unter anderem im Gefäßendothel durch die NO-Synthase gebildet und führt über Relaxation benachbarter glatter Muskelzellen zur Vasodilatation. Aus diesem Grund wird angenommen, dass Klotho das kardiovaskuläre System durch gesteigerte endotheliale NO-Produktion schützt (95, 97, 120, 127). In vitro gelang bereits der Nachweis einer Klotho-getriggerten NO-Bildung, aus der eine gesteigerte MnSOD-Bildung und folglich erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress resultiert (112). Darüber hinaus korreliert die Klothokonzentration im Blut mit der MnSOD-Expression in der Muskulatur (164).

Auch im Rahmen menschlicher Alterungsprozesse lässt sich, wie bei Klotho-defizienten Mäusen, Arteriosklerose mit reduzierter Endothel-vermittelter Vasodilatation nach Exposition gegenüber Acetylcholin nachweisen (95).

Exogene Zufuhr von Klotho bewirkt eine Verbesserung der vaskulären Endothelfunktion, eine Steigerung der NO-Produktion, eine Blutdrucksenkung sowie eine Reduktion der Dicke der Gefäßmedia und der perivaskulären Fibrose (119).

Auch an der Vermeidung von Thrombosen scheint Klotho beteiligt zu sein, denn Plasminogenaktivator-Inhibitor-1, PAI-1, ein Schlüsselmolekül in der Thromboseentstehung, wird bei Klothomangel verstärkt exprimiert (141).

Des Weiteren fällt bei Klotho-defizienten Mäusen eine eingeschränkte Angiogenese auf (33, 127). Damit einhergehend liegt in der Aorta Klotho-defizienter Mäuse sehr wenig VEGF (vascular endothelial growth factor) vor (97).

Auf Stresssituationen reagieren Klotho-defiziente Mäuse äußerst empfindlich. Paradoxerweise sinkt dabei sowohl die NoradrenalinKonzentration im Plasma als auch die Herzfrequenz aufgrund einer Sinusknotendysfunktion. Bei den meisten Klotho-defizienten Mäusen führt dies letztendlich zum Herzstillstand. Wildtypen reagieren dagegen erwartungsgemäß mit einer Steigerung der Herzfrequenz und des Noradrenalinspiegels. In Ruhe weisen Klotho-defiziente

Mäuse tendenziell niedrigere Herzfrequenzen, aber signifikant höhere NoradrenalinKonzentrationen auf als Wildtypen. Morphologisch ist der Sinusknoten bei Klotho-defizienten Mäusen unauffällig. Allerdings lässt sich in der Sinusknotenarterie eine milde Arteriosklerose feststellen. (140)

#### **1.2.4 Nieren**

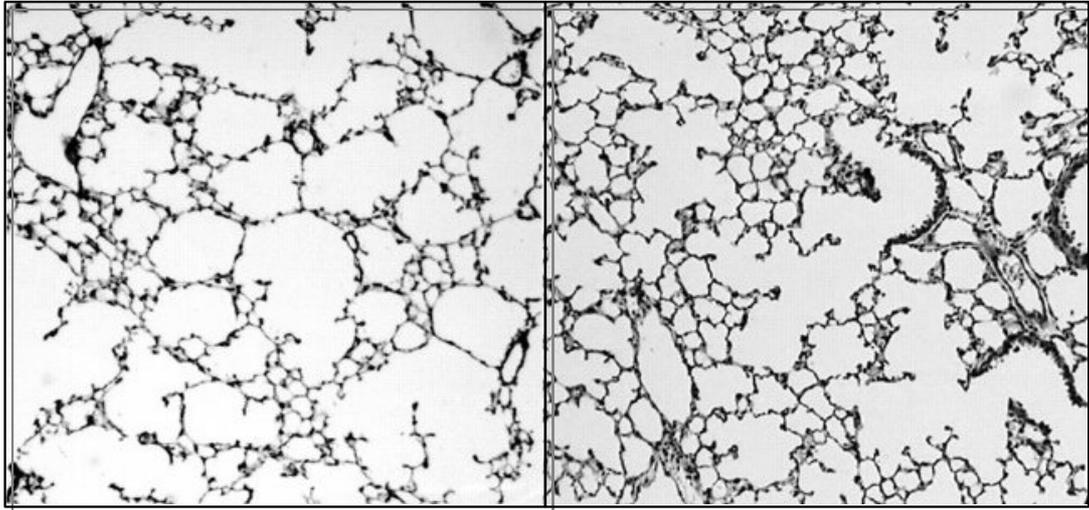
Die Nieren Klotho-defizienter Mäuse sind, bezogen auf die Körpergröße, normal groß (88). Allerdings liegt eine Verkalkung der kleinen Nierenarterien vor (62). Bei Ratten führt eine induzierte renale Ischämie mit anschließender Reperfusion zu einer Reduktion der Klothoexpression. Exogene Klothozufuhr vermindert die nachfolgende Apoptose von Zellen. Folglich wird eine Beteiligung von Klotho an der Pathophysiologie renaler Ischämie-Reperfusionsschäden angenommen. (134)

Vor allem weisen Klotho-defiziente Mäuse aber einen extrem gestörten Kalzium-, Phosphat- und Vitamin-D-Haushalt auf, an dem in der Niere ablaufende Prozesse maßgeblich beteiligt sind. Darauf soll jedoch in einem eigenen Kapitel (1.4.1) genauer eingegangen werden.

#### **1.2.5 Lunge**

Als weitere Folge des Klothomangels entstehen Lungenemphyseme. Diese sind anatomisch definiert als eine distal der terminalen Bronchiolen auftretende Destruktion des Lungenparenchyms ohne Fibrose. Bei Klotho-defizienten Mäusen fällt zunächst ein erhöhtes Lungenvolumen pro Körpergewicht auf. Im Alter von vier Wochen treten die ersten histologischen Veränderungen in Erscheinung. Dabei zeigen sich eine Zerstörung der Alveolarwände und Erweiterung der Lufträume (siehe Abb. 4). Außerdem sind in den Alveolarsepten Kalzifizierungsknoten und degenerierte Typ-2-Pneumozyten nachweisbar. Des Weiteren haben Klotho-defiziente Mäuse im Lungenfunktionstest eine verlängerte Expiration. Klotho scheint demnach auch für die Erhaltung der

postnatalen Lungenintegrität eine wichtige Rolle zu spielen. Dabei sprechen die homogene Verteilung der pathologischen Lungenveränderungen sowie deren Verhinderung durch Vitamin-D-Restriktion für eine systemische Ursache, die mit dem gestörten Vitamin-D-Haushalt in Verbindung steht. (121, 132, 133)



**Abbildung 4:** Histologisches Bild der emphysematösen Lunge einer Klotho-defizienten Maus (links) und der normalen Lunge einer Wildtyp-Maus (rechts) im Alter von vier Wochen (132).

### 1.2.6 Energiehaushalt und Glukosestoffwechsel

Auch am Glukosestoffwechsel und Energiehaushalt scheint Klotho beteiligt zu sein. Beim oralen Glukosetoleranztest weisen Klotho-defiziente Mäuse zu jedem Zeitpunkt deutlich niedrigere Blutzuckerwerte als Wildtypen auf. Die Glykogenspeicher sind bei Klotho-defizienten Mäusen ebenfalls reduziert (88). Gleichzeitig ist die Insulinkonzentration im Blut bis an die Grenze der Nachweisbarkeit erniedrigt. Damit einhergehend lässt sich im Pankreas ein verminderter Insulingehalt sowie eine Reduktion der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen feststellen. Dem gegenüber steht ein unveränderter Glukagongehalt. Des Weiteren stellt sich bei Klotho-defizienten Mäusen eine gesteigerte Insulinsensitivität im Insulintoleranztest heraus. Dazu passt die vermehrte

Expression des Insulin-abhängigen Glukosetransporters GLUT4 im Skelettmuskel. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Klotho die intrazelluläre Signalübertragung von Insulin und IGF-1 hemmt, indem es die Autophosphorylierung der Insulin- und IGF1-Rezeptoren sowie die nachfolgende Signalübermittlung unterdrückt. (88, 149)

Durch gezielte Inhibition des Insulin-/IGF-1-Signalwegs lässt sich die Lebensspanne Klotho-defizienter Mäuse verlängern. Auf gleiche Art und Weise werden Arteriosklerose, ektope Kalzifizierungen, Hautatrophie, pulmonale Emphyse und Hypogonadismus reduziert (64).

Klotho-defiziente Mäuse besitzen zwar deutlich weniger weißes Fettgewebe, dafür aber verhältnismäßig mehr braunes Fettgewebe als Wildtypen (88, 145). Ebenfalls auf einen veränderten Energiehaushalt weist die verringerte Körpertemperatur hin. Die Nahrungsaufnahme pro Körpergewicht sowie die Plasmawerte von Albumin, Cholesterin, Triglyceriden und Gesamtproteinen sind jedoch normwertig (50, 62, 88).

### **1.2.7 Neurologische Veränderungen**

Im zentralen Nervensystem Klotho-defizienter Mäuse sind ebenfalls Veränderungen zu beobachten, die bei älteren Tieren ohne Klotho-Gendefekt in ähnlicher Weise auftreten. Unter anderem liegt in den Pyramidenzellen des Hippokampus eine neuronale Degeneration mit deutlicher Reduktion der Synapsen vor. Zudem deuten vermehrt auftretende oxidative DNA-Schäden auf erhöhten oxidativen Stress hin (96, 128).

Außerdem zeigt sich in den zervikalen und lumbalen Rückenmarksegmenten Klotho-defizienter Mäuse eine Verringerung der Querschnittsfläche von grauer und weißer Substanz. Die Gesamtzahl aller Neurone der grauen Substanz im Vorderhorn ist unauffällig, obwohl weniger große Vorderhornzellen vorhanden sind (3).

Mittels Hirnstammaudiometrie lassen sich bei Klotho-defizienten Mäusen

erhöhte Hörschwellen nachweisen, die auf eine bestehende Schwerhörigkeit hindeuten. Da Klotho auch in der Stria vascularis des Innenohres exprimiert wird, ist eine Beteiligung von Klotho an der Endolymphproduktion denkbar (46).

### **1.2.8 Effekte therapeutischer Maßnahmen**

Bei Klotho-defizienten Männchen kann mit phosphatarmer Diät eine deutliche Besserung der Symptome erreicht werden (89). Die Phosphatrestriktion induziert bei ihnen eine Zunahme der Klothoexpression (126). Männchen, welche ab der vierten Lebenswoche mit phosphatarmer Diät behandelt werden, erreichen ein normales Körpergewicht (89). Des Weiteren wird eine deutliche Verlängerung der Lebensspanne sowie eine Reduktion der ektopen Kalzifizierungen unter der phosphatarmer Diät erreicht. Überraschenderweise ist bei Weibchen eine zusätzliche Anreicherung der phosphatarmer Diät mit Zink-Orotat notwendig, um eine ähnliche Wirkung zu erzielen (89). Die Wirksamkeit der phosphatarmer Diät kann allerdings nur bei den ursprünglich entdeckten Klotho-defizienten Mäusen mit unvollständigem Verlust der Klothoexpression nachgewiesen werden (145). Bei Mäusen, deren Klotho-Gen völlig funktionslos ist, können zwar dieselben Symptome beobachtet werden, die phosphatarmer Diät bewirkt bei ihnen jedoch lediglich eine Senkung der Phosphatkonzentration im Plasma (145).

Kalziumarme Diät verhindert selbst bei Mäusen, deren Klotho-Gen vollständig zerstört ist, die Bildung ektoper Kalzifizierungen und senkt die Kalziumkonzentration im Plasma. Eine Größenzunahme lässt sich jedoch nicht eindeutig nachweisen. Demnach können die Folgen eines Klothomangels nur teilweise durch kalziumarme Diät beseitigt werden (145).

Unter Vitamin-D-arter Diät können jedoch alle Symptome gebessert werden. In dem von Tsujikawa et al. durchgeführten Versuch erhielten bereits die Muttertiere nach Einsetzen der Schwangerschaft Vitamin-D-arme Diät, die anschließend bei den Jungtieren fortgeführt wurde. Durch diese Diät wird bei den Jungtieren eine Suppression des Vitamin-D-Spiegels bis auf reguläre

Plasmaspiegel, welche auch bei Wildtypen zu messen sind, erreicht. Entsprechendes gilt für die Kalzium- und Phosphatkonzentrationen im Plasma. In Folge dessen lassen sich, außer in der Nierenrinde, in der zum Teil noch leichte Verkalkungen nachweisbar sind, keine ektopen Kalzifizierungen unter der Diät feststellen. Ebenso ließ sich die bei unbehandelten Klotho-defizienten Mäusen beschriebene frühzeitige Arteriosklerose durch Vitamin-D-arme Diät vermeiden. Auch andere histologische Veränderungen, die bei Klotho-defizienten Mäusen beobachtet wurden, konnten durch Vitamin-D-Restriktion verhindert werden. Darüber hinaus kommt es zu einer Normalisierung der Blutzuckerwerte. Mit Vitamin-D-armer Diät erreichen die Tiere schließlich ein normales Körpergewicht und ein Lebensalter von mehr als 15 Wochen (145). Erwartungsgemäß können alle bei der Klotho-defizienten Maus beobachteten Veränderungen durch exogene Klothoexpression, zum Beispiel durch Injektion eines Klotho-exprimierenden Plasmids gebessert werden (62, 130). Unter anderem kommt es dabei zu einer signifikanten Verlängerung der Lebensspanne und zu einer Zunahme des Körpergewichts (130). Des Weiteren konnte bei Klotho-defizienten Mäusen mit regulierbarer exogener Klothoexpression gezeigt werden, dass die Alterserscheinungen bei Aktivierung reduziert werden und bei ausgeschalteter Klothoexpression wieder auftreten (81).

### **1.3 Relevanz von Klotho für den Menschen**

Beim Menschen befindet sich das Klotho-Gen auf Chromosom 13. Es ist zu 86% mit dem Klotho-Gen der Maus identisch. Im Plasma ist die Klothokonzentration vor dem zehnten Lebensjahr sehr niedrig. Das Maximum wird mit 30 bis 40 Jahren erreicht, bevor die Klothokonzentration mit zunehmendem Alter wieder absinkt (160).

Auch für den Menschen scheint Klotho eine bedeutende Rolle zu spielen. So gibt es eine Assoziation bestimmter Genpolymorphismen von Klotho mit Hypertonie, HDL-Cholesterin, Schlaganfall, Blutzucker, Knochendichte und

sogar mit der Dauer der Lebensspanne (6, 52, 56, 101, 109, 117). Außerdem wurde bei Japanern ein Klotho-Gen-Polymorphismus entdeckt, der einen genetischen Risikofaktor für koronare Herzerkrankungen darzustellen scheint (41). Patienten mit chronischem Nierenversagen weisen eine deutlich reduzierte renale Klothoexpression auf (59). Ein ähnlicher Klothomangel besteht bei primärem Hyperparathyreoidismus in den Epithelkörperchen (9). Selbst bei der Entstehung von Brustkrebs scheint Klotho eine wichtige Funktion einzunehmen, denn die Klothoexpression ist in gesundem Brustdrüsengewebe wesentlich höher als in Gewebe mit Tumorbefall. Klotho reduziert die Proliferationsrate von Brustkrebszellen, während eine Reduktion der Klothoexpression Gegenteiliges bewirkt (157).

Darüber hinaus konnte mit einem Klotho-RNA-Inhibitor in vitro die vorzeitige Alterung menschlicher Zellen getriggert werden (21).

#### **1.4 Kalzium- und Phosphathaushalt**

Kalzium und Phosphat sind für den Körper außerordentlich wichtige Mineralstoffe, für deren Homöostase komplexe Regulationsmechanismen verantwortlich sind. Im Blut herrscht eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von ca. 2,5 mmol/l (123). Die Plasmakonzentration von Phosphat beträgt ca. 1 mmol/l, damit ist jedoch nur das anorganische Phosphat (vor allem  $\text{HPO}_4^{2-}$  und  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) gemeint, welches nicht einmal die Hälfte des gesamten Phosphors im Körper ausmacht (58, 123).  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{HPO}_4^{2-}$  können schwer lösliche Salze bilden. Dies gilt einerseits als Voraussetzung für die Knochenmineralisierung, kann aber andererseits bei erhöhten Kalzium- und Phosphatkonzentrationen zur Überschreitung des Löslichkeitsprodukts und damit zum Ausfallen von Kalzium-Phosphat-Komplexen im Plasma führen (58, 123).

Kalzium besitzt verschiedene intra- und extrazelluläre Funktionen. In ruhenden Zellen liegt die intrazelluläre freie Kalziumkonzentration bei nur ca. 0,1  $\mu\text{mol/l}$  (92, 123). In aktivierten Zellen kann sie durch Einstrom extrazellulären Kalziums

oder durch Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern auf das 10 bis 100-fache ansteigen (92). Für die Erreichung des steilen Gradienten zwischen intra- und extrazellulärer Kalziumkonzentration sind eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und ein  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher verantwortlich (123). Mit Hilfe epithelialer Kalziumkanäle wird die enterale Absorption sowie die renale Reabsorption bewerkstelligt (123). Kalzium wirkt intrazellulär als Second messenger und als Kofaktor für viele Enzyme (92). Darüber hinaus werden einige Ionenkanäle durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration reguliert (123). Somit trägt Kalzium zur Hormonsekretion, Neurotransmission, Muskelkontraktion, Genexpression, zum Glykogenmetabolismus und epithelialen Transport bei (92, 123). Außerdem werden Zellmigration und -proliferation sowie Apoptose unter anderem durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration gesteuert (123).

Nicht weniger wichtig ist das Kalzium im Extrazellulärraum als Kofaktor für Adhäsionsmoleküle, Gerinnungsfaktoren oder andere Proteine (92). Des Weiteren beeinflusst es die neuromuskuläre Erregbarkeit und dient als unverzichtbarer Baustein in Knochen (92, 123). An sogenannten G-Proteingekoppelten Kalzium-sensitiven Rezeptoren wirkt es als first messenger (92). 99% des Kalziums liegt im Knochen als Hydroxylapatitkristall ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ) vor. Einerseits gewährleistet es die Stabilität des Knochens, andererseits dient Hydroxylapatit als Kalzium- und Phosphatreservoir, das bei mangelnder Kalzium- und Phosphataufnahme aus Niere und Darm einem Abfallen der Plasmakonzentrationen entgegenwirkt (58, 92).

Phosphor ist Bestandteil zahlreicher Verbindungen (z. B. Phospholipide, ATP, cAMP, Substrate des Intermediärstoffwechsels). Somit nimmt es an der zellulären Signaltransduktion, der Nukleinsäuresynthese, dem zellulären Energiestoffwechsel, dem Knochenaufbau und an der Bildung von Lipiddoppelschichten teil (92, 123). Durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert es zudem die Aktivität vieler Enzyme und Transportproteine (123). Eine wesentliche Funktion erfüllt es als Puffer in Form von  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  (123). Insgesamt befinden sich 85% des

Phosphats im Knochen (58). Die Phosphataufnahme in Epithelien erfolgt mittels  $\text{Na}^+$ -gekoppelten Transportprozessen, vor allem NaPi-II- und NaPi-III-Transportern (92, 123).

Phosphat und Kalzium werden in der Niere im Glomerulum filtriert und anschließend hauptsächlich im proximalen Tubulus reabsorbiert (110, 123). Phosphat wird dort durch NaPi-IIa-Kotransporter in die Zelle aufgenommen und verlässt die Zelle basolateral passiv über einen Uniporter (58, 123). Im Dünndarm wird Phosphat sekundär-aktiv über den apikal gelegenen NaPi-IIb-Kotransporter resorbiert (58, 92).

Kalzium wird im proximalen Tubulus vorwiegend passiv reabsorbiert (123). In der Henle-Schleife gelangt es aufgrund des Lumen-positiven transepithelialen Potentials durch die Tight junctions vom Lumen ins Blut (58, 123). Bei erhöhter extrazellulärer Kalziumkonzentration werden diese beiden Transportprozesse gehemmt (123). Zusätzlich wird Kalzium im frühdistalen Tubulus über den Kanal TRPV5 in die Zelle aufgenommen, in der es von Calbindin-D28k, einem Vitamin-D-sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportprotein, gebunden und zur basolateralen Membran transportiert wird (92, 123). Dort gelangt es über den sekundär-aktiven  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher 1 (NCX1) ins Blut (92). Das Ausmaß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Reabsorption hängt entscheidend von der Aktivität von TRPV5 ab (143).

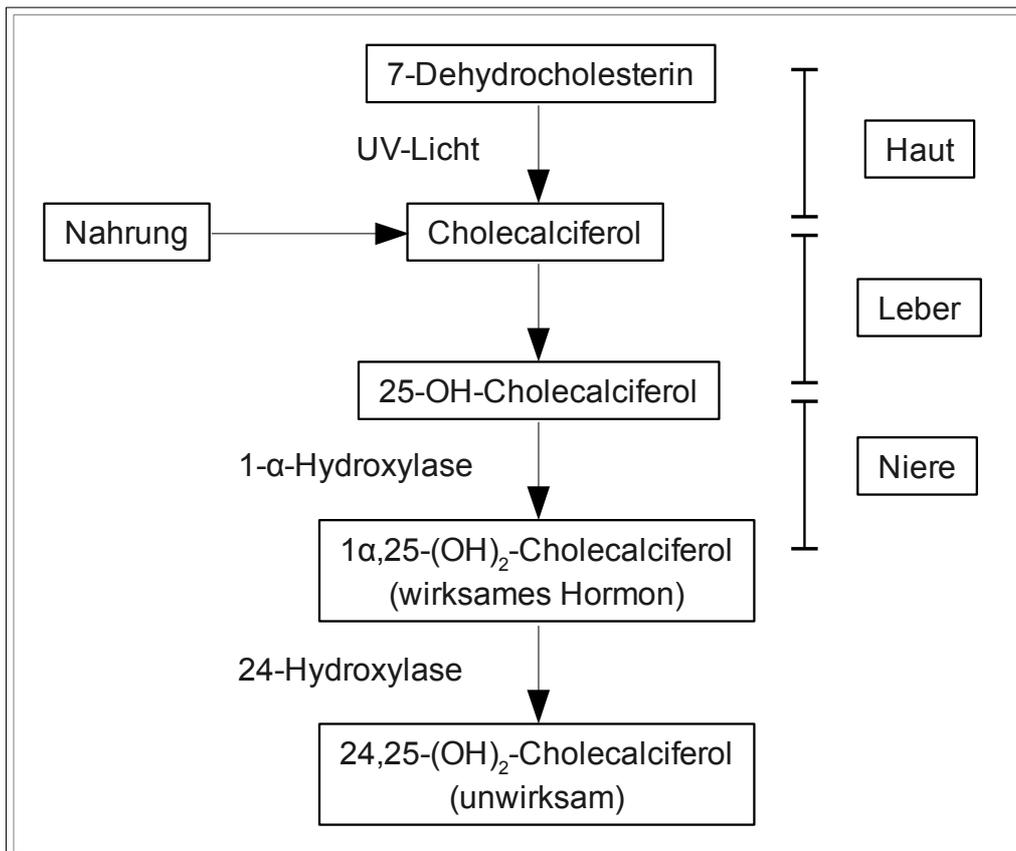
Im oberen Dünndarm kann Kalzium sowohl resorbiert als auch sezerniert werden (58). Der aktive Kalziumtransport im Duodenum erfolgt apikal entlang eines elektrochemischen Gradienten durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (58). Anschließend gelangt Kalzium mit Hilfe von Calbindin an die basolaterale Membran und von dort entweder über die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase oder über einen  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ins Blut (58). Calcitriol-vermittelte Änderungen der Proteinexpression, insbesondere von Calbindin, ermöglichen die Regulation des aktiven Kalziumtransports (58).

Phosphat- und Kalziumtransportprozesse werden hauptsächlich durch PTH, Calcitonin, Calcitriol und FGF23 (92, 123) beeinflusst. Das Steroidhormon

Calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ,  $1\alpha,25$ -Dihydroxycholecalciferol) wird mit Hilfe der im proximalen Tubulus der Niere gelegenen  $1\text{-}\alpha$ -Hydroxylase aus seiner Vorstufe Calcidiol ( $25(\text{OH})\text{D}_3$ ,  $25$ -Hydroxycholecalciferol) gebildet (92, 123). Calcidiol entsteht in der Leber aus Vitamin  $\text{D}_3$  (Cholecalciferol), das in der Nahrung vorkommt und in der Haut unter dem Einfluss von UV-Strahlung aus  $7$ -Dehydrocholesterin produziert wird (123). Abgebaut wird Calcitriol durch ein Enzym namens  $24$ -Hydroxylase (131).

Calcitriol wird unter dem Einfluss von PTH, Calcitonin und Kalzium- oder Phosphatmangel vermehrt gebildet (123). Erhöhte Kalzium- und Phosphatkonzentrationen verringern die Aktivität der  $1\text{-}\alpha$ -Hydroxylase. Des Weiteren hemmt Calcitriol durch negative Rückkopplung seine eigene Bildung (131).

Als bekannteste Wirkungen von Calcitriol sind die Förderung der Kalzium- und Phosphatresorption in Niere und Darm sowie die Unterstützung der Knochenmineralisierung zu nennen (123). Calcitriol inhibiert außerdem die PTH-Sekretion und unterstützt durch Aktivierung von Osteoblasten den Knochenaufbau zusätzlich (58, 131). Darüber hinaus trägt Calcitriol zur Stimulation von Makrophagen und Monozyten sowie zur Steigerung der Erythropoese bei. Des Weiteren hemmt es die Aktivität von T-Lymphozyten, was in einer Reduktion der Immunabwehr resultiert (123). Seine Wirkung entfaltet Calcitriol über den Vitamin-D-Rezeptor, VDR (92).



**Abbildung 5:** Bildung und Abbau von Calcitriol

Parathormon (Parathyrin, PTH) entsteht als Peptid in den Epithelkörperchen. Zu gesteigerter PTH-Sekretion führen Hypokalzämie, Hyperphosphatämie und Adrenalin. Gegenteilige Wirkung entfalten  $Mg^{2+}$ -Mangel und Hyperkalzämie. PTH vermittelt eine Zunahme der Plasmakonzentration von Kalzium durch Kalziummobilisierung aus den Knochen, gesteigerte Kalziumresorption und Stimulation der Calcitriolsynthese. Um das Ausfällen von Kalziumphosphat zu verhindern wird gleichzeitig die renale Phosphatresorption reduziert (58, 123).

Calcitonin entsteht als Peptidhormon in den C-Zellen der Schilddrüse und wird bei Hyperkalzämie ausgeschüttet (123). Unter dem Einfluss von Calcitonin wird vermehrt Kalziumphosphat in Knochen eingebaut und durch gesteigerte Calcitriolbildung die Kalzium- und Phosphataufnahme aus dem Darm erhöht. In der Niere wird die Kalzium- und Phosphatresorption dagegen reduziert (123).

**Tabelle 2:** Auswirkung von PTH, Calcitriol und Calcitonin auf den  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{P}_i$ -Haushalt.

	Calcitriol	PTH	Calcitonin
$\text{Ca}^{2+}$ -Resorption	↑	↑	↓
$\text{P}_i$ -Resorption	↑	↓	↓
$\text{CaHPO}_4$ -Gehalt Knochen	↑	↓	↑
$\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration Plasma	↑	↑	↓
$\text{P}_i$ -Konzentration Plasma	↑	↓	↓

Ein Anstieg der Phosphatkonzentration im Plasma stimuliert die PTH-Ausschüttung aus den Epithelkörperchen (92). PTH hemmt daraufhin die Phosphatreabsorption in der Niere, indem es in proximalen Tubuluszellen zum Rückzug der NaPi-II-Kotransporter aus der Zellmembran führt (92, 110).

Die Epithelkörperchen reagieren auch auf veränderte Kalziumkonzentrationen mit einer Anpassung der Parathormonsekretion. Hyperkalzämie bewirkt eine Abnahme der PTH-Sekretion (92). Dabei kommt es zur Aktivierung des Calcium-sensing-receptors (CasR) mit nachfolgender Öffnung von Kalziumkanälen und Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dies führt letztendlich zu einer Reduktion der PTH-Sekretion (92). In der Folge kommt es zu renalen Kalziumverlusten sowie Phosphatretention, reduzierter Freisetzung von Kalzium und Phosphat aus dem Knochen und aufgrund verminderter Calcitriol-Synthese zu einer Abnahme der intestinalen Mineralstoffaufnahme (92). Außerdem unterstützt eine Hyperkalzämie die Calcitoninausschüttung aus den C-Zellen der Schilddrüse. Somit bilden die C-Zellen und die Zellen der Epithelkörperchen die sensorische Komponente des Kalzium-regulierenden Systems (92). Hauptsächlich beeinflusst wird die Kalziumhomöostase durch Calcitriol und PTH, die durch Bindung an Rezeptoren an ihren Zielzellen Aufnahme, Metabolismus und Abgabe von Kalzium regulieren (92).

#### 1.4.1 Einfluss von Klotho auf den Kalzium- und Phosphathaushalt

Klotho-defiziente Mäuse weisen einen enorm gestörten Kalzium- und Phosphathaushalt auf. Diese Pathologie wird derzeit als Hauptgrund für deren frühzeitige Alterung und vorzeitiges Sterben angesehen. Bei einer signifikanten Hyperkalzämie und Hyperphosphatämie lassen sich im Liquor erniedrigte Kalziumkonzentrationen nachweisen (43, 62, 126, 145). Aufgrund der deutlich erhöhten Kalzium- und Phosphatkonzentrationen im Plasma bilden sich Kalzium-Phosphat-Komplexe, die zu ektope Kalzifizierungen in vielen Geweben führen. Diese betreffen unter anderem die Nieren, arterielle Gefäße, Magen, Darm, Lunge, Herz, Haut, Hoden und den Plexus choroideus (62, 145). In diesem Zusammenhang ist besonders erwähnenswert, dass bei alternden Menschen die gleiche Verteilung ektope Kalzifizierungen zu beobachten ist und dass auch die Veränderungen der arteriellen Gefäßwände mit Intimaverdickung und Verkalkung der Media sehr der Mönckeberg-Arteriosklerose ähneln, die ebenfalls bei älteren Menschen auftritt (62).

Ein Mangel an Klotho verursacht unter anderem in Nieren, Lunge und Herz eine Kalzium-abhängige Proteolyse, die auch bei Wildtyp-Mäusen mit altersbedingter Reduktion der Klothoexpression einhergeht (93).

Bereits vor dem Auftreten histologischer Auffälligkeiten weisen Klotho-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtypen eine signifikant erhöhte Calcitriolkonzentration im Plasma auf, die als erste Veränderung bei Klotho-defizienten Mäusen zu beobachten ist (145, 170). Im Gegensatz dazu sind die Plasmakonzentrationen der inaktiven Vitamin-D-Derivate, nämlich 25-Hydroxyvitamin D und 24,25-Dihydroxyvitamin D, erniedrigt. Dies führt zur Annahme, dass 25-Hydroxyvitamin D, die Vorstufe aktiver und inaktiver Formen, vorzugsweise zum aktiven Calcitriol umgewandelt wird (145, 170). Passend dazu exprimieren Klotho-defiziente Mäuse signifikant mehr 1- $\alpha$ -Hydroxylase, die zur Bildung von Calcitriol benötigt wird und deshalb als Grund für die erhöhte Calcitriolkonzentration verantwortlich gemacht wird (145). Darüber hinaus ist auch die Expression des Calcitriol-inaktivierenden Enzyms 24-Hydroxylase gesteigert,

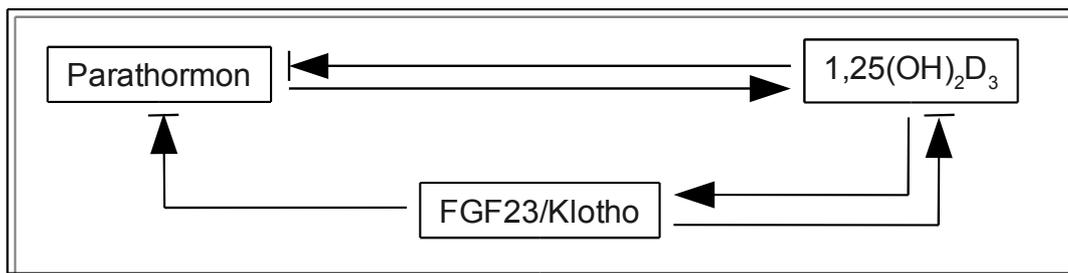
dies führt jedoch offensichtlich nicht zur Normalisierung der Calcitriolkonzentration (145, 170). Nun stellt sich die Frage nach der Ursache für die erhöhte 1- $\alpha$ -Hydroxylase-Expression.

Nach Zufuhr von Calcitriol lässt sich bei Klotho-defizienten Mäusen eine intakte Regulation nachweisen, die durch eine gesteigerte Expression des VDR (Vitamin-D-Rezeptor) und der 24-Hydroxylase sowie durch eine abfallende Expression der 1- $\alpha$ -Hydroxylase gekennzeichnet ist. Allerdings weisen ältere Klotho-defiziente Mäuse eine abgeschwächte Sensibilität gegenüber Calcitriol auf (145). Eine adäquate Zunahme der 1- $\alpha$ -Hydroxylase-Expression wird bei Klotho-defizienten Mäusen unter dem Einfluss von Calcitonin und PTH erreicht (145). Da die bekannten Regelkreise weitestgehend intakt sind, die 1- $\alpha$ -Hydroxylase bei Klotho-defizienten Mäusen verglichen mit Wildtypen jedoch deutlich stärker exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass Klotho eine direkte Hemmung der 1- $\alpha$ -Hydroxylase-Expression bewirkt (145). Die 1- $\alpha$ -Hydroxylase wird in harnableitenden Tubuluszellen exprimiert, wobei die Lokalisation teilweise mit dem Expressionsort der 24-Hydroxylase mRNA, nicht aber der Klotho-mRNA, überlappt. Folglich sind die durch Klotho vermittelten Effekte nicht zellautonom (145).

Als Ursache für die pathologische 1- $\alpha$ -Hydroxylaseaktivität gelten gestörte Feedbackmechanismen zwischen Calcitriol und Klotho mit FGF23, einem Fibroblasten-Wachstumsfaktor, der in Osteoblasten und Osteoklasten gebildet wird und regulierend in die Nierenfunktion eingreift. Klotho wandelt als Kofaktor den FGF-Rezeptor in einen spezifischen Rezeptor für FGF23 um. Erst dadurch wird eine Bindung von FGF23 an seinen Rezeptor (FGFR1c) und damit die Funktionsfähigkeit von FGF23 ermöglicht (92, 110, 148). FGF23, dessen Synthese durch Calcitriol induziert wird, vermittelt eine Inhibition der 1- $\alpha$ -Hydroxylase, der PTH-Expression und der Klothoexpression sowie eine Stimulation der 24-Hydroxylase (92, 110).

Calcitriol hemmt in der Niere seine eigene Synthese und steigert die 24-

Hydroxylase- und Klothoexpression (92). Bei Klotho-defizienten Mäusen kann FGF23 seine Wirkung als negativer Regulationsfaktor der 1- $\alpha$ -Hydroxylase nicht entfalten, da Klotho als Kofaktor benötigt wird. Dies führt schließlich zu den massiv erhöhten Calcitriol-Konzentrationen im Blut Klotho-defizienter Mäuse und erklärt, weshalb FGF23- und Klotho-defiziente Mäuse identische Phänotypen aufweisen, die jeweils durch Reduktion der Calcitriolkonzentration normalisiert werden können (113).



**Abbildung 6:** Gegenseitige Regulation von FGF23/Klotho, PTH und Calcitriol.

Die Calcitoninkonzentration ist bei Klotho-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen ebenfalls erhöht, während die Plasmakonzentration von PTH leicht erniedrigt ist und mit zunehmendem Alter auf 50% des Wildtyp-Niveaus sinkt (43, 92, 145, 170). Dazu konnte gezeigt werden, dass in kalziumarmer Umgebung die PTH-Sekretion in Abhängigkeit von Klotho und der Na-K-ATPase induziert wird (43, 92). Vermutlich erfolgt in Klotho-exprimierenden Zellen die Rekrutierung der Na-K-ATPase zur Zelloberfläche einerseits auf einem Klotho-unabhängigen Weg, andererseits auf einem Klotho-abhängigen Weg, der mit abnehmender Kalziumkonzentration stärker ins Gewicht fällt (92). Durch die Aktivität der Na-K-ATPase, die drei Na<sup>+</sup>-Ionen aus der Zelle und nur zwei K<sup>+</sup>-Ionen in die Zelle transportiert, wird ein elektrochemischer Gradient generiert, der andere Transportprozesse ermöglicht. Dieser Gradient führt wahrscheinlich über bisher unbekannte Mechanismen zur PTH-Sekretion (43, 92).

Im 24-h-Urin lassen sich bei Klotho-defizienten Mäusen signifikant erhöhte Calcitriol- und Kalziumkonzentrationen nachweisen (126). Die Phosphatausscheidung im Urin ist zwar nicht signifikant, aber dennoch vermindert (126). Im distalen Konvolut und im Verbindungsstück der Niere wird der Kalziumtransport über den Kalzium-Kanal TRPV5, Calbindin-D28K und den  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher 1 (NCX1) vermittelt, die mit Klotho kolokalisiert sind. Diese Kolokalisation scheint für die Regulation der Kalzium-Reabsorption in der Niere wichtig zu sein (16, 92). Der Transport über den  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher beruht auf einem  $\text{Na}^+$ -Gradienten, der durch die Na-K-ATPase generiert wird, deren Aktivität vermutlich von Klotho abhängt (92). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Klotho einen stimulativen Effekt auf  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme ausübt. Darüber hinaus bewirkt Klotho als  $\beta$ -Glucuronidase die Anreicherung von TRPV5 in der Zellmembran, wodurch die Membrandurchlässigkeit für Kalzium weiter verbessert wird. Somit beeinflusst Klotho sowohl den apikalen Kalziumeinstrom als auch den basolateralen Kalziumausstrom im distalen Konvolut der Niere (15, 16, 92).

Bei Klotho-defizienten Mäusen kann eine signifikant erhöhte Phosphataufnahme in den Nieren und im Darm nachgewiesen werden (126). Es wird vermutet, dass die Hyperphosphatämie Klotho-defizienter Mäuse durch die erhöhten Calcitriolkonzentrationen zustande kommt (126). Zudem bewirkt FGF23 mit Hilfe von Klotho im intakten Organismus eine Reduktion des Einbaus von NaPi-IIa- und NaPi-IIb-Kotransportern in die Zellmembran (92, 110). Dementsprechend lässt sich bei Klotho-defizienten Mäusen eine Anreicherung der am Phosphattransport beteiligten intestinalen NaPi-IIb-Kotransporter in der apikalen Membran nachweisen (126). Auch die renalen NaPi-IIa- und NaPi-IIc-Kotransporter werden bei Klotho-defizienten Mäusen verstärkt exprimiert (126). Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass der Zytoplasmapool an NaPi-IIa-Kotransportern reduziert ist. Dieser Sachverhalt deutet auf eine Translokalisierung der Proteine zur apikalen Oberfläche hin (72).

**Tabelle 3:** Übersicht über den  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{P}_i$ -Haushalt bei Klotho-defizienten Mäusen

Ca <sup>2+</sup> -P <sub>i</sub> -Haushalt bei Klotho-defizienten Mäusen	
➤ 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> -Konzentration ↑	➤ Ca <sup>2+</sup> -Konzentration im Plasma ↑
➤ PTH-Konzentration ↓	➤ P <sub>i</sub> -Konzentration im Plasma ↑
➤ Calcitonin-Konzentration ↑	

### 1.5 Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts

Der Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt unterliegt einem komplexen Regelkreis. Zwei Drittel des Körperwassers befinden sich im intrazellulären Raum, während der extrazelluläre Raum, bestehend aus interstitieller und intravasaler Flüssigkeit, nur ein Drittel des Körperwassers anteilig ausmacht (38). Die Zufuhr von Flüssigkeit und Elektrolyten erfolgt zum einen durch orale Aufnahme, zum anderen durch Bildung von Oxidationswasser bei Stoffwechselprozessen (124). Über renale und intestinale Ausscheidung, Schweißsekretion und Perspiratio insensibilis, dem Verdunsten von Wasser über Haut und Lunge, wird Flüssigkeit abgegeben. Elektrolyte werden ebenfalls über die Nieren, den Darm und mit dem Schweiß ausgeschieden. Den größten Beitrag zur Einhaltung der Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz leistet jedoch die Niere (124). Insgesamt weisen die im Plasma gelösten Elektrolyte gemeinsam mit anderen osmotisch wirksamen Teilchen eine Osmolalität von 290 mosm/kg H<sub>2</sub>O auf (124). Unterscheiden sich zwei Räume, die über eine nahezu ausschließlich für Wasser durchlässige Membran getrennt sind, in der Konzentration osmotisch wirksamer Teilchen, also in ihrer Osmolalität, so erfolgt ein Ausgleich der Osmolalität durch Diffusion von Wasser entlang dem Konzentrationsgradienten. Aus diesem Grund besteht eine enge Verbindung zwischen Wasser- und Elektrolythaushalt (124, 131).

Zu den bedeutendsten Elektrolyten gehören Natrium, Kalium, Chlorid, Magnesium, Kalzium, Bikarbonat und Phosphat. Im Extrazellulärraum dominiert mengenmäßig Na<sup>+</sup> mit 141 mmol/l, welches für die Aufrechterhaltung des

Extrazellulärvolumens hauptsächlich verantwortlich ist (58, 124, 131). Im Gegensatz dazu befindet sich  $K^+$  vorwiegend intrazellulär. Die Plasmakonzentration von  $K^+$  sollte zwischen 3 und 5 mmol/l betragen.  $K^+$  ist vor allem an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials beteiligt (124). Schon geringe Abweichungen der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration können daher zu Herz-Rhythmus-Störungen führen (58). Adrenalin, Insulin und Aldosteron führen zu einem verstärkten Einstrom von Kalium in Zellen (38). Auch der Säure-Basen-Haushalt steht in engem Zusammenhang mit dem Kaliumhaushalt, da bei einer Azidose  $H^+$ -Ionen im Austausch gegen  $K^+$  in die Zellen strömen. Umgekehrtes gilt für eine Alkalose. Somit geht eine Azidose mit einer Hyperkaliämie und eine Alkalose mit einer Hypokaliämie einher (38).

Für die Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts sind hauptsächlich das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, ADH und ANP verantwortlich (124). Sie regulieren gemeinsam eine Vielzahl von Kanälen und Transportprozessen, über die Elektrolyte und Wasser aufgenommen beziehungsweise ausgeschieden werden können.

### **1.5.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System**

Aldosteron ist ein Mineralokortikoid, das in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde aus der Vorstufe des Glukokortikoids Corticosteron gebildet wird. Zu den wichtigsten Funktionen von Aldosteron gehören die Steuerung des  $Na^+$ - und  $K^+$ -Transportes in Niere, Darm, Schweißdrüsen und anderen Organen (124, 131).

Aldosteron bewirkt vor allem eine gesteigerte  $Na^+$ -Resorption im distalen Nephron der Niere, indem es einerseits den epithelialen Natriumkanal (EnaC) stimuliert, andererseits die Anzahl der basolateral gelegenen Na-K-ATPase-Moleküle erhöht (58, 124, 131). Somit kann  $Na^+$  apikal in die Zellen aufgenommen und basolateral wieder ins Blut abgegeben werden. Dadurch entsteht ein transepitheliales Lumen-negatives Potential, welches im Ausgleich

dazu die  $K^+$ -Sekretion begünstigt (58, 124, 131). Zusätzlich fördert Aldosteron den Einbau von  $K^+$ -Kanälen (ROMK) in die Zellmembran, was ebenfalls die  $K^+$ -Sekretion fördert. Des Weiteren werden unter dem Einfluss von Aldosteron mehr Protonen ausgeschieden (124, 131).

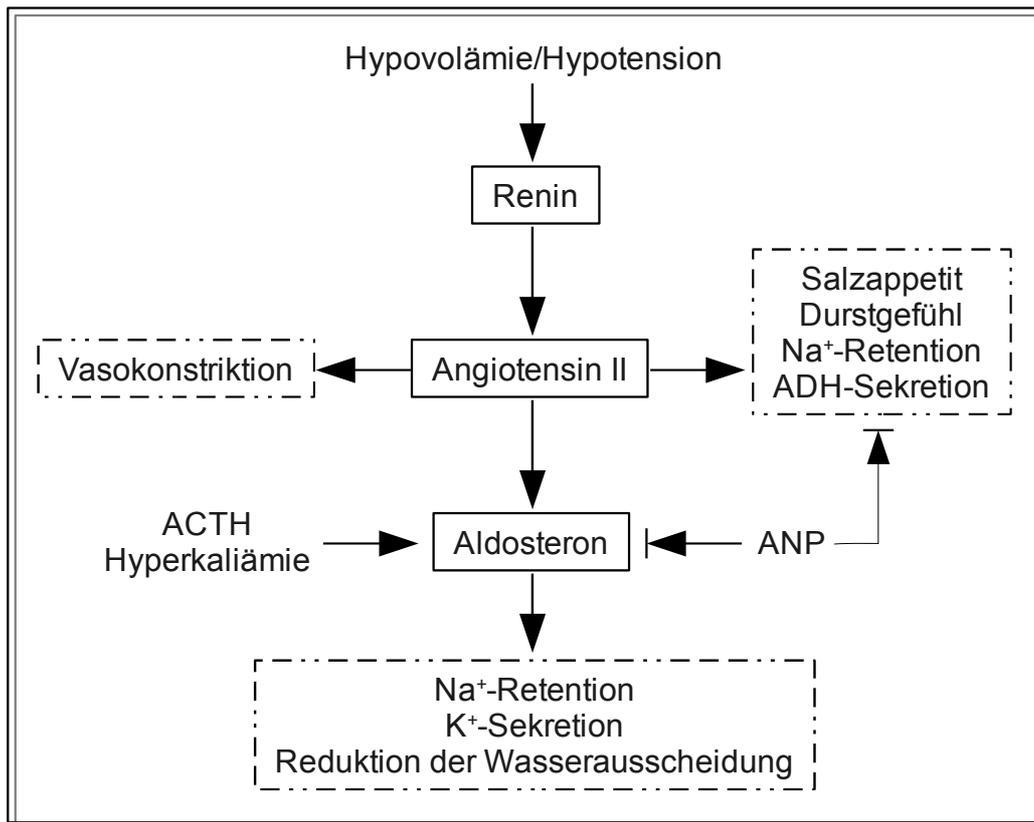
Da  $Na^+$  im Extrazellulärraum am stärksten vertreten ist, hat es den größten Einfluss auf die osmotisch bedingte Wasserverteilung und zieht deshalb stets Wasser mit sich. Aus diesem Grund geht eine durch Aldosteron bedingte  $Na^+$ -Retention gleichzeitig mit einer Zunahme des Extrazellulärvolumens einher (58, 131).

Auch im Kolon fördert Aldosteron die luminale  $Na^+$ -Absorption und  $K^+$ -Sekretion ähnlich wie in der Niere. Außerdem steigert Aldosteron den Salzappetit. Hyperaldosteronismus führt zudem zu kardialer Fibrose und Hypertrophie (58, 124, 131).

Zusammenfassend lässt sich eine  $Na^+$ -retinierende, volumensteigernde und im Ausgleich dazu  $K^+$ -senkende Wirkung von Aldosteron feststellen. Die Aldosteronausschüttung wird durch Hypovolämie, Hyponatriämie, Hypotension und Hyperkaliämie stimuliert. ACTH, das in der Hypophyse gebildet wird, steigert ebenfalls die Aldosteronsynthese. ANP und Hypokaliämie hemmen dagegen die Aldosteronausschüttung (124, 131).

Die Steigerung der Aldosteronausschüttung aufgrund von erniedrigtem Blutdruck, Salzangel und reduziertem Blutvolumen erfolgt über Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, kurz RAAS (124, 131). Eine Absenkung des mittleren renalen Blutdrucks führt im juxtaglomerulären Apparat der Niere zur Ausschüttung von Renin ins Plasma. Renin trennt als Peptidase Angiotensin I vom in der Leber gebildeten Angiotensinogen ab. Angiotensin I wird anschließend durch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), welches zwar ubiquitär, aber vorwiegend in der Lunge vorkommt, zu Angiotensin II umgewandelt. Dieses steigert schließlich unter anderem die Aldosteronausschüttung (124, 131). Weitere Effekte von Angiotensin II sind eine

Zunahme des Durstgefühls, des Salzappetits, der  $\text{Na}^+$ -Resorption im proximalen Tubulus und der ADH-Sekretion. Außerdem steigert Angiotensin II die Adrenalinausschüttung und ist einer der potentesten Vasokonstriktoren. Somit trägt auch Angiotensin II zur Zunahme des Blutdrucks und durch die  $\text{Na}^+$ -Retention zu erhöhtem Blutvolumen bei (124, 131).



**Abbildung 7:** Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

### 1.5.2 Atriales natriuretisches Peptid (ANP)

ANP wird bei erhöhter Volumenbelastung im Vorhof des Herzens gebildet, hemmt antagonistisch dazu die Aldosteronausschüttung und steigert die  $\text{Na}^+$ -Ausscheidung, indem es einerseits die Filtrationsfraktion erhöht, andererseits die Resorption im Sammelrohr hemmt. Zusätzlich unterdrückt es die ADH-Sekretion, den Salzappetit und das Durstgefühl. (58, 124, 131)

### **1.5.3 Antidiurese Hormon (ADH)**

ADH (Antidiurese Hormon, Vasopressin, AVP) regelt die Plasmaosmolalität. Bei erhöhter Osmolalität, welche von zentralen Osmosensoren gemessen wird, sowie bei reduziertem Plasmavolumen fördert ADH den Einbau von Wasserkanälen, sogenannten Aquaporinen, ins Sammelrohr der Niere, wodurch die Wasseraufnahme erleichtert wird. Zusätzlich führt ADH zur Vasokonstriktion. Eine erhöhte Osmolalität bewirkt außerdem über zentrale Mechanismen die Zunahme des Durstgefühls. (58, 124, 131)

### **1.5.4 Hyperaldosteronismus**

Bei erhöhten Aldosteronkonzentrationen unterscheidet man zwischen einem primären und einem sekundären Hyperaldosteronismus. Hypertonie, Hypokaliämie und eine metabolische Alkalose sind typische Symptome eines primären Hyperaldosteronismus, dem Conn-Syndrom. Eine Hypokaliämie ist jedoch für die Diagnose nicht zwingend erforderlich. Neben einer erhöhten Aldosteronkonzentration im Plasma liegt eine erniedrigte Reninkonzentration vor. Dem primären Hyperaldosteronismus liegt meist eine idiopathische Hyperplasie der Zona glomerulosa in der Nebenniere zugrunde. Weitere Ursachen sind Aldosteron-produzierende Adenome der Nebennierenrinde oder seltene Gendefekte (38).

Dagegen entsteht ein sekundärer Hyperaldosteronismus bei verstärkter Aktivierung des RAAS. Dies kann funktionell durch Volumenmangel oder Hyponatriämie bedingt sein. Aber auch eine renale Ischämie bei Nierenarterienstenose führt zur Aktivierung des RAAS (111, 126). Die Klinik des sekundären Hyperaldosteronismus hängt von der zugrunde liegenden Ursache ab (38).

## 1.6 Säure-Basen-Haushalt

Die Aufrechterhaltung der  $H^+$ -Ionenkonzentration, die durch den pH-Wert angegeben wird, erfolgt durch verschiedene Puffersysteme. An der Pufferung sind Bikarbonat, Phosphat, Hämoglobin und Plasmaproteine beteiligt. Die größte Bedeutung kommt dem Kohlensäure-Bikarbonatsystem zu, da es durch Niere und Lunge gut reguliert werden kann.  $H_2CO_3$  steht im Gleichgewicht mit Bikarbonat ( $HCO_3^-$ ) und  $H^+$ . Bikarbonat kann zudem in  $CO_2$  und  $OH^-$  dissoziieren. Dies ermöglicht einerseits eine Beeinflussung des pH-Wertes durch Abatmung von  $CO_2$ , andererseits durch verminderte oder gesteigerte renale Ausscheidung von Bikarbonat und Wasserstoffionen (38, 131).

Daher unterscheidet man zwischen respiratorischen Störungen, die durch veränderte  $CO_2$ -Abatmung entstehen, und metabolischen Störungen, die mit veränderter Bikarbonatkonzentration einhergehen. Der pH-Wert im Blut sollte Werte zwischen 7,37 und 7,45 einnehmen. Bei Unterschreitung spricht man von einer Azidose, bei Überschreitung von einer Alkalose. Die Standardbikarbonat-Konzentration liegt normalerweise zwischen 21 und 26 mmol/l. Eine gleichsinnige Störung von pH-Wert und Standardbikarbonat-Konzentration ist bei einer Alkalose oder Azidose mit metabolischer Ursache zu erwarten. Verstärkte oder verminderte Säurebildung oder -ausscheidung können beispielsweise eine metabolische Störung verursachen. (38)

Eine respiratorische Ursache zeichnet sich dagegen durch gegensinnige Veränderung des  $CO_2$ -Partialdruckes ( $pCO_2$ ) und pH-Wertes aus. Der  $CO_2$ -Partialdruck sollte je nach Geschlecht zwischen 32 und 46 mmHg liegen. (38)

Von einer kompensierten Störung spricht man, wenn der pH-Wert durch metabolische oder respiratorische Gegenregulationsmechanismen im Normbereich gehalten wird. (38)

Der Wasser- und Elektrolythaushalt steht in engem Zusammenhang mit dem Säure-Basen-Haushalt. Einerseits beeinflussen sich  $K^+$ - und  $H^+$ -Ionen gegenseitig. Beispielsweise treten bei einer Hypokaliämie  $K^+$ -Ionen im

Austausch gegen  $H^+$ -Ionen aus den Zellen ins Blut aus. Dadurch wird eine Alkalose von Hypokaliämie und eine Azidose von Hyperkaliämie begleitet. Andererseits bewirkt das Mineralokortikoid Aldosteron eine vermehrte Ausscheidung von  $H^+$ -Ionen durch die Niere. (38)

## 1.7 Eryptose

Erythrozyten, die roten Blutkörperchen, sind für den Sauerstoff- und  $CO_2$ -Transport im Blut verantwortlich und gewährleisten somit die Sauerstoffversorgung im Gewebe. Zusätzlich erfüllt das in Erythrozyten enthaltene Hämoglobin eine wichtige Aufgabe als pH-Puffer. Die Lebenszeit von Erythrozyten beträgt ungefähr 120 Tage. Da pro Liter Blut ca.  $4,2-5,9 \cdot 10^{12}$  Erythrozyten im Körper zirkulieren, ist eine enorme Neubildungs- und Abbaurate erforderlich, um diese Zahl konstant zu halten. Die Neubildung erfolgt im Knochenmark aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Abgebaut werden die roten Blutkörperchen vom mononukleären Phagozytensystem, indem sie von Makrophagen phagozytiert werden (12, 58).

Unter Eryptose versteht man den programmierten Zelltod von Erythrozyten. Sie ist charakterisiert durch das Auftreten von Zellschrumpfung, Zerstörung der Membranintegrität mit Delokalisation der Phospholipide und Phosphatidylserinexposition an der Zelloberfläche (12, 32). Zu den bereits bekannten Eryptose-auslösenden Faktoren gehören osmotischer Schock, oxidativer Stress, Energiemangel, Ceramid, Prostaglandin  $E_2$  und platelet activating factor (PAF) (32, 65, 71). Gesteigerte Eryptose tritt auch im Rahmen verschiedener Anämieformen oder Zuständen, die zur Entstehung einer Anämie beitragen, auf, zu denen Eisenmangel, Phosphatmangel, Sepsis, Malaria, Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS), Morbus Wilson, Sichelzellanämie, Thalassämie und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-mangel gehören (54, 65). Erythropoietin, Adenosin, Katecholamine, Cystein-Proteinase-Inhibitoren und NO wirken dagegen inhibitorisch auf die Eryptose (12, 32).

Als Schlüsselereignis der Eryptose ist der verstärkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Erythrozyten anzusehen, der den Mechanismus zur Beseitigung im Blut zirkulierender Erythrozyten in Gang setzt (12). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erfolgt über  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kationenkanäle, die sich unter anderem durch oxidativen Stress oder osmotischen Schock aktivieren lassen. Diese erythrozytären Kanäle können im Gegensatz zu anderen Kationenkanälen durch Amilorid und Ethylisopropylamilorid blockiert werden (25, 26, 39, 67). Aufgrund des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms steigt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit konsekutiver Delokalisation von Phospholipiden in der Zellmembran. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt zum Verlust der Phospholipidasymmetrie in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran (7, 12, 23, 158). Dadurch wird unter anderem das normalerweise in der inneren Lipidschicht gelegene Phosphatidylserin an der Erythrozytenoberfläche exponiert, ein charakteristisches Merkmal der Eryptose. Die geschilderten Veränderungen des Membranaufbaus sind auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Aktivität des erythrozytären Proteins Scramblase zurückzuführen (7, 68, 71, 158).

Außerdem führt  $\text{Ca}^{2+}$  zur Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver  $\text{K}^+$ -Kanäle (Gardos-Kanäle), die den Austritt von  $\text{K}^+$  aus der Zelle ermöglichen. Dadurch kommt es zur Hyperpolarisation der Zellmembran und nachfolgendem  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom. Der gemeinsame Austritt von  $\text{KCl}$  aus der Zelle baut einen osmotischen Gradienten auf, der zum Wasserverlust der Zelle und folglich zur Zellschrumpfung führt (13, 65, 68). Zusätzlich stimuliert das intrazellulär angehäuften  $\text{Ca}^{2+}$  die Protease Calpain mit nachfolgender Degradation des Zytoskeletts (7, 32, 65). Interessanterweise treten bei gealterten Zellen generell erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auf (12, 68, 118).

Ein weiterer Eryptose-vermittelnder Signalweg führt zur Freisetzung von PAF, wodurch es zur Aktivierung von Sphingomyelinase und zur Ceramidbildung kommt. Auch Ceramid verursacht die Phosphatidylserinexposition an der Zelloberfläche (32, 65, 66).

Phosphatidylserin-exponierende Erythrozyten werden von Makrophagen phagozytiert und auf diese Art und Weise aus dem Blutkreislauf entfernt (7, 12). Dies ist unbedingt notwendig, da an der Membranaußenseite präsentiertes Phosphatidylserin zur Adhäsion der Erythrozyten an Gefäßwände führen kann. Dadurch kann die Mikrozirkulation stark beeinträchtigt werden (68). Gefäßverschlüsse, die auch im Alter, zum Beispiel im Rahmen eines Schlaganfalls, vermehrt auftreten, können die Folge sein.

**Tabelle 4:** Faktoren, die das Auftreten von Eryptose beeinflussen

<b>Eryptose-steigernd</b>	<b>Eryptose-hemmend</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Osmotischer Schock</li> <li>➤ Oxidativer Stress</li> <li>➤ Energiemangel</li> <li>➤ Prostaglandin E<sub>2</sub></li> <li>➤ Plättchenaktivierender Faktor</li> <li>➤ Verschiedene Anämieformen</li> <li>➤ Sepsis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Erythropoietin</li> <li>➤ Katecholamine</li> <li>➤ NO</li> <li>➤ Adenosin</li> <li>➤ Cystein-Proteinase-Inhibitoren</li> </ul>

### 1.8 Fragestellung der Arbeit

Klotho ist ein Protein, das vor allem in den Epithelkörperchen, in der Niere und im Plexus choroideus gebildet wird. Neben der membranständigen Form gibt es eine sezernierte Form von Klotho, die ins Blut oder den Liquor abgegeben werden kann. Als Hauptfunktionen von Klotho sind zum einen die Regulation der Kalziumhomöostase durch Regulation der PTH-Sekretion, Aktivierung von TRPV5 und Vermittlung der FGF23-Wirkung, zum anderen die Beeinflussung der intrazellulären Signalübermittlung von Insulin und IGF-1 zu nennen (94). Als besonders wichtige Funktion ist die gemeinsame Hemmung der Calcitriolbildung durch FGF23 und Klotho hervorzuheben. Klotho-defiziente Mäuse leiden daher an massiv erhöhten Calcitriolkonzentrationen.

Es ist bereits bekannt, dass exzessive Calcitriolbildung den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in verschiedene Zellen fördert (11, 18, 44, 135). Außerdem weiß man, dass erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Erythrozyten deren programmierten Zelltod stimuliert. Bisher unerforscht ist jedoch die Klotho-abhängige Regulation der Aktivität erythrozytärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Des Weiteren dienen Klotho-defiziente Mäuse in der Forschung als Modell für vorzeitige Alterung. Im höheren Alter kommt es unter anderem häufiger zu Störungen der Mikrozirkulation mit nachfolgenden Gefäßverschlüssen. Auch eine gesteigerte Eryptose kann solche Störungen der Mikrozirkulation mit sich bringen. Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluss eines Klothomangels auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Erythrozyten und auf die Eryptose untersucht werden. Außerdem soll in diesem Zusammenhang die Rolle der durch den Klothomangel bedingten exzessiven Calcitriolbildung erforscht werden.

Klotho-defiziente Mäuse weisen zudem einen gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ - und Phosphathaushalt auf, zu dem in der Niere ablaufende Transportprozesse sowie Calcitriol und andere regulierende Hormone einen enormen Teil beitragen. Die Niere nimmt auch entscheidend an der Regulation des  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Haushalts teil, der bei Klotho-defizienten Mäusen weitgehend unerforscht ist. Deshalb sollen in dieser Arbeit zusätzlich die Auswirkungen eines Klothomangels und der dadurch bedingten exzessiven Calcitriolbildung auf den Mineralstoff- und Elektrolythaushalt sowie auf den Flüssigkeitshaushalt untersucht werden. Dabei soll auch auf die an der Regulation beteiligten Hormone eingegangen werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Alle Tierversuche wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und von den lokalen Behörden genehmigt (Antragsnummer PY 7/09 und PY 3/07). Bei den Versuchen wurden Klotho-defiziente Mäuse (Klotho<sup>kl/kl</sup>) mit altersentsprechenden Wildtypen (Klotho<sup>+/+</sup>), beide vom Typ Sv129, verglichen. Die verwendeten Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäuse entsprachen der ursprünglich von Kuro-o et al. entdeckten Klotho-Maus, die keine vollständige Knockout-Maus war, sondern noch eine geringe Restexpression des Klotho-Gens aufwies (62).

## 2.2 Verwendete Futtersorten

Für alle Versuche wurden Futtersorten der Firma Altromin (Lage, Deutschland) verwendet. Als Kontrolldiät dienten die Diäten C1000 oder C1310. Des Weiteren wurde Vitamin-D-arme Diät mit der Nummer C1017 verabreicht.

**Tabelle 5:** Überblick über die wichtigsten Inhaltsstoffe der Diäten

	C1310 – Standarddiät	C1000 – Kontrolldiät	C1017 - Vitamin-D-arm
Umsetzbare Energie [kcal/kg]	2988	3518,1	3486,8
Rohprotein [g/kg]	225,0	176,1	176,2
Rohfett [g/kg]	50	50,8	50,8
Rohfaser [g/kg]	45	40,5	40,5
Vitamin D <sub>3</sub> [IE/kg]	600	500	< 50
Kalzium [g/kg]	9	9,31	9,54
Phosphor [g/kg]	7	7,52	7,53
Natrium [g/kg]	2	2,49	2,50
Kalium [g/kg]	9	7,09	7,17
Chlor [g/kg]	n.a.	3,63	3,63
Vitamin B <sub>12</sub> [mg/kg]	0,02	0,04	0,03
Folsäure [mg/kg]	2	10,0	10,0
Eisen [mg/kg]	150	178,6	178,6

## 2.3 Blutentnahmen

Um Blutproben zu erhalten wurden die Tiere mit Diethylether (Roth, Karlsruhe, Deutschland) leicht narkotisiert. Mit Hilfe von Na-Heparin-beschichteten Einmal-Kapillarpipetten (10 µl, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland) wurde der retroorbitale Venenplexus punktiert und je nach Versuch ca. 5-200 µl Blut in die jeweiligen Blutentnahmeröhrchen entnommen.

Zur Bestimmung der Blutbildparameter wurden ca. 20 µl Vollblut in EDTA-

enthaltende Röhrchen (Firma Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen und direkt im Anschluss untersucht. Auch für die Ermittlung der Retikulozytenzahl und für die Untersuchung der Erythrozyten mittels FACS-Analyse diente Vollblut. In diesem Fall wurden ca. 5 µl in EDTA-enthaltende Röhrchen entnommen.

Für alle anderen Blutanalysen wurde je nach Bedarf ca. 50-200 µl Blut in Microtainer SST Röhrchen der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) entnommen. Diese Röhrchen enthalten ein Polymergel, das nach 1,5-2 min Zentrifugation (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 10 000 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur eine Trennschicht zwischen Plasma und zellulären Blutbestandteilen bildet, so dass das letztendlich oben liegende Plasma abpipettiert werden kann. Das Plasma wurde entweder direkt verwendet oder bei -20°C bis zur Versuchsdurchführung tiefgefroren.

## **2.4 Versuche zur Eryptose**

### **2.4.1 Behandlung der Mäuse**

Die Versuche zur Eryptose wurden an Mäusen beider Geschlechter im Alter von sechs bis acht Wochen durchgeführt. Ihnen stand Wasser und Standarddiät (Altromin C1310) oder Vitamin-D-armes Futter (C1017) frei zur Verfügung. Das jeweilige Futter wurde bereits den Zuchttieren verabreicht. Deren Nachkommen, die schließlich als Versuchstiere verwendet wurden, erhielten das entsprechende Futter ohne Unterbrechung lebenslang.

## 2.4.2 Verwendete Substanzen

### Annexin-V-Fluos

Die Expression von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Beseitigung apoptotischer Zellen durch Makrophagen (60). Annexin-V ist ein antikoagulierendes Protein, welches  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Phospholipide bindet (4). An Phosphatidylserin bindet Annexin-V mit besonders hoher Affinität. Phosphatidylserin erscheint jedoch nur an der Zelloberfläche apoptotischer Zellen, nicht an der Oberfläche gesunder Zellen. Darum ermöglicht Fluoresceinisothiocyanat-markiertes Annexin-V bei der Durchflusszytometrie den spezifischen Nachweis apoptotischer Zellen. Die Phosphatidylserinexposition und damit auch deren Nachweisbarkeit durch Annexin-V fällt zeitlich mit der Kernkondensation zusammen, die bereits in einer frühen Phase der Apoptose erfolgt. Sie geht außerdem schwerwiegenden Membranschäden, die zum Enzym Austritt aus der Zelle führen würden, voraus. (60, 153)

Für die durchgeführten Experimente wurde Annexin-V-Fluos der Firma Roche aus Mannheim, Deutschland, verwendet. Annexin-V-Fluos besitzt eine Exzitationswellenlänge von 488 nm und eine Emissionswellenlänge von 530 nm.

### Fluo3/AM

Fluo3/AM ist ein Fluoreszenzfarbstoff zum Nachweis von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ . Die Acetoxymethylestergruppe (AM) verleiht dem Farbstoff seine Membrangängigkeit. Nach Eintritt in die Zelle spalten unspezifische Esterasen die Estergruppe jedoch ab, wodurch der nun geladene Farbstoff die Zelle nicht mehr verlassen kann. Nach Bindung an intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  nimmt die Fluoreszenzintensität von Fluo3 um ein Vielfaches zu. Diese Eigenschaft macht ihn zu einem beliebten Farbstoff zum Nachweis von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  mittels Durchflusszytometrie (48, 106). Seine Anregungswellenlänge beträgt 488 nm. Die Emissionswellenlänge liegt bei 530 nm. Für die Bestimmung des

intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  wurde Fluo3/AM von der Firma Calbiochem (Bad Soden, Deutschland) benutzt.

### **Ionomycin**

Ionomycin ist ein Kalzium-Ionophor, das  $\text{Ca}^{2+}$  bindet und es von einer wässrigen Phase in eine organische Phase transportieren kann. So ermöglicht es den Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  durch biologische Membranen (28, 73). Es mobilisiert einerseits intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und gewährleistet andererseits den Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ . Beide Mechanismen tragen zu einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei (87).

Um die Fluoreszenzintensität von maximal aktiviertem Fluo3/AM zu bestimmen, wurde von der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland) hergestelltes Ionomycin in der Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

### **Thiazol-Orange**

Thiazol-Orange ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich durch eine enorme Zunahme seiner Fluoreszenzintensität und durch eine hohe Photonenausbeute bei Bindung an Nukleinsäuren, besonders RNA, auszeichnet. Zusätzlich durchdringt der Farbstoff vitale Zellmembranen (55). Aufgrund dieser günstigen physikalischen Eigenschaften wurde er zur Retikulozytenanalyse eingesetzt. Dazu wurden die Proben mit Thiazol-Orange angefärbt und anschließend mittels FACS-Analyse gemessen. Thiazol-Orange besitzt eine Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Ergebnisse einer Retikulozytenanalyse, die mit Hilfe eines FACS-Gerätes durchgeführt wurde, korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen, die durch konventionelle mikroskopische Zählung gewonnen werden können. Die Retikulozytenquantifizierung stellt ein einfaches Mittel zur Beurteilung der erythropoetischen Aktivität von Knochenmark dar und kann somit als wertvolle diagnostische Hilfe bei der Einteilung von Anämien eingesetzt werden. (55)

Für die vorliegenden Versuche wurde von der Firma Becton Dickinson hergestelltes Thiazol-Orange (Retic-COUNT) verwendet.

### 2.4.3 Verwendete Lösungen

Die Versuche zur Eryptose wurden bei 37°C in Ringerlösung durchgeführt, die als Puffer N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure (HEPES) enthielt. Mit NaOH wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die nachfolgende Tabelle gibt die genaue Zusammensetzung der verwendeten Ringerlösung wieder.

**Tabelle 6:** Zusammensetzung der Ringerlösung

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	125
KCl	5
MgSO <sub>4</sub>	1
HEPES	32
Glukose	5
CaCl <sub>2</sub>	1
NaOH	Nach Bedarf

Zur Induktion von oxidativem Stress wurde Tert-butyl-hydroxyl-peroxid (tert-BOOH, Sigma, Taufkirchen, Germany) in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt.

Wo angegeben, wurde 50 mM Ethylisopropylamilorid (EIPA, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) zur Blockierung des erythrozytären Kationen-Kanals oder 100 nM 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) verwendet.

#### 2.4.4 FACS-Analyse

FACS steht für "fluorescence activated cell sorting" und ist eine Anwendung der Durchflusszytometrie, die sowohl zur Zählung als auch zur Differenzierung von Zellen dient (111). Die Durchflusszytometrie hat zur Grundlage, dass eine Zellsuspension Licht in alle Richtungen streut. Zu untersuchende Zellen passieren in einem dünnen Flüssigkeitsstrom nacheinander die Messkammer eines Durchflusszytometers. Dort werden sie von einem Laserstrahl getroffen, dessen Licht die Zellen je nach Größe und Struktur streuen. Das so entstandene Streulicht kann nun in verschiedenen Winkeln gemessen werden. Der Winkel und die Intensität des Streulichts helfen bei der Zellidentifizierung. Licht, das in kleinen Winkeln zur Vorwärtsrichtung gestreut wurde (Forward-Scatter, FSC), gibt Aufschluss über die Zellgröße, während Licht, das im rechten Winkel (Side-Scatter, SSC) gestreut wurde, Informationen über die innere Struktur und die optische Homogenität der Zelle liefert. (14, 104)

Das weitreichende Anwendungsgebiet der Durchflusszytometrie beinhaltet unter anderem die Bestimmung des DNA-Gehalts von Zellen, die Immunphänotypisierung durch Analyse von Zelloberflächenmarkern sowie den Nachweis apoptotischer Zellen, wodurch eine genaue Unterscheidung von Zellen ermöglicht wird. Dazu werden jedoch zusätzlich spezifische Fluorochrome benötigt. Die Zellen werden entweder direkt oder indirekt mit Antikörpern, die gegen bestimmte Oberflächenantigene oder Proteine gerichtet sind, markiert. Beim direkten Nachweis trägt der gegen die Zelle gerichtete Antikörper den Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung selbst. Bei der indirekten Methode ist ein sekundärer Antikörper notwendig, der in diesem Fall mit Farbstoff markiert ist und an den ersten bindet. Dadurch ist es bei Vorhandensein eines jeweils geeigneten Antikörpers theoretisch möglich, jedes Protein oder Oberflächenantigen, solange es in ausreichender Menge vorhanden ist, nachzuweisen. (104)

Die wichtigsten Bestandteile eines Durchflusszytometers sind eine Lichtquelle,

eine Messkammer, durch die, angetrieben von der strömungstechnischen Einheit, die Zellsuspension fließt, verschiedene optische Filter, Detektoren mit Verstärker und Analog-Digital-Konverter sowie der Computer zur Auswertung der elektrischen Signale. Wird ein an Zellen gebundener Fluoreszenzfarbstoff in der Messkammer vom Laserstrahl getroffen, dann absorbieren dessen Elektronen das Licht und gelangen durch die so aufgenommene Energie in einen angeregten Energiezustand, der jedoch bald wieder verlassen wird. Bei der Rückkehr des Elektrons in seinen Grundzustand gibt es die Energie in Form von Photonen mit einer bestimmten, von der Energie abhängigen Wellenlänge wieder ab. Diese Strahlung wird nach Passage des optischen Filters, der das Licht mit der entsprechenden Wellenlänge heraus filtert, von einem Photodetektor erfasst. Zusätzlich gibt es noch Photodetektoren für das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, das unabhängig von der Fluoreszenz, wie bereits oben beschrieben, entsteht. Anschließend wird das analoge Signal verstärkt und von einem Analog-Digital-Wandler in ein digitales umgewandelt, welches daraufhin vom Computer ausgewertet wird. Die Signalstärke korreliert dabei mit der durch Fluoreszenz entstandenen Strahlung, so dass Rückschlüsse auf die Menge der an Zellen gebundenen Fluoreszenzmarkierten Antikörper gemacht werden können. Die Messungen werden dann beispielsweise in einem „Dot Plot Histogramm“ graphisch dargestellt, wobei jeder Punkt einem Messwert entspricht. (104)

Für die FACS-Analysen wurde das Gerät FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson aus Heidelberg, Deutschland, benutzt. Es besitzt vier verschiedene Kanäle, denen mit Hilfe eines Interferenzfilters die entsprechenden Fluoreszenzspektren des emittierten Lichts zugeordnet werden. Der für die Versuche verwendete Kanal FL1 misst Wellenlängen im grünen Farbbereich mit 515-545 nm. Zur Datenauswertung wurde die CellQuest Research Software eingesetzt.

#### **2.4.5 Phosphatidylserinexposition und Forward-Scatter**

Neben der Bestimmung des MCV (mittleres korpuskuläres Volumen) wurde das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter) zur Analyse des Zellvolumens gemessen. Die Bestimmung des Forward-Scatter ist parallel zur Messung der Annexin-V-Bindung von Zellen möglich, die Aufschluss über die Phosphatidylserinexposition an der Zelloberfläche gibt (91).

Für die FACS-Analyse wurden 50µl Erythrozytensuspension einmal mit Ringerlösung, die 5 mM CaCl<sub>2</sub> enthielt, gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin-V-Fluos, das in einer 500-fachen Verdünnung mit dem Annexin-Waschpuffer vorlag, markiert. Nach 15 min lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben schließlich mittels FACS-Analyse gemessen. Dabei wurde sowohl das Zellvolumen durch Bestimmung des Forward Scatters analysiert, als auch die Phosphatidylserinexposition durch Messung der Fluoreszenzintensität von Annexin-V-Fluos im Fluoreszenzkanal FL1. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm, die Emissionswellenlänge 530 nm.

#### **2.4.6 Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Menge**

Auch die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Menge kann mit der FACS-Analyse bestimmt werden. Dazu wurden 50µl Erythrozytensuspension in Ringerlösung gewaschen und anschließend mit dem Farbstoff Fluo3/AM (Calbiochem, Bad Soden, Germany) in Ringerlösung, die 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 2 µM Fluo3/AM enthielt, beladen. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Zellen zweimal in Ringerlösung, die 5 mM CaCl<sub>2</sub> enthielt, gewaschen. Die mit Fluo3/AM beladenen Erythrozyten wurden in 200 µl Ringer resuspendiert. Dann wurde mittels FACS-Analyse die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Fluoreszenzintensität im Fluoreszenz-Kanal FL1 bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen. Wo angegeben, wurde Ionomycin (1 µM) als Positivkontrolle hinzugefügt um die Fluoreszenz von maximal aktiviertem Färbemittel zu bestimmen.

#### **2.4.7 Analyse der Blutbildparameter**

Leukozyten, Erythrozyten, Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration (Hb), MCV (mittleres korpuskuläres Volumen), MCHC (mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration) und MCH (mittleres korpuskuläres Hämoglobin) der Klotho<sup>kl/kl</sup>- und Klotho<sup>+/+</sup>-Mäuse wurden in 20 µl Vollblut durch ein automatisiertes Gerät (Poch-100iV Diff, Sysmex, Norderstedt, Deutschland), dessen Messprinzip auf elektrischer Impedanz beruht, unter Befolgung der Anweisungen des Herstellers analysiert.

#### **2.4.8 Bestimmung der Retikulozytenzahl**

Um den Retikulozytenanteil bestimmen zu können, wurde 5 µl Vollblut zu 1 ml Retic-COUNT (Thiazol-Orange) hinzugefügt. Die Proben wurden für 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die FACS-Analyse nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt wurde. Es wurden Forward-Scatter (FSC), Side-Scatter (SSC) und die Fluoreszenz-Intensität der mit Thiazol-Orange gefärbten Zellen (im FL1-Kanal) an einem FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson bestimmt. Die Menge der Retic-COUNT-positiven Retikulozyten wurde als prozentualer Anteil der gesamten gezählten Erythrozytenpopulation angegeben. Die Erythrozytenzahl wurde durch Analyse von FSC versus SSC mit Hilfe der CellQuest-Software bestimmt.

### **2.4.9 Bestimmung des Milzgewichts**

Um das Milzgewicht bestimmen zu können, wurden sieben Wochen alte Mäuse mittels Etherinhalation (Diethylether, Roth, Karlsruhe, Deutschland) getötet. Direkt im Anschluss daran wurde die Milz entnommen und gewogen (L420 P, Sartorius laboratory, Göttingen, Deutschland). Das Milzgewicht wurde zur Vergleichbarkeit auf das zuvor bestimmte Körpergewicht bezogen.

## **2.5 Versuche zum Mineralstoff- und Elektrolythaushalt**

### **2.5.1 Behandlung der Mäuse**

Die Versuche zum Elektrolyt- und Mineralstoffhaushalt wurden an den oben beschriebenen Mäusen im Alter von ca. acht bis zehn Wochen durchgeführt und schlossen ebenfalls sowohl Männchen als auch Weibchen ein. Die Mäuse hatten freien Zugriff auf Wasser und Kontrollfutter (Altromin C1000) oder Vitamin-D-armes Futter (C1017). Das jeweilige Futter wurde bereits den Zuchttieren verabreicht. Deren Nachkommen, die schließlich als Versuchstiere verwendet wurden, erhielten das entsprechende Futter in der Regel lebenslang ohne Unterbrechung (Kontrolldiät:  $Klotho^{kl/kl}D^+$  bzw.  $Klotho^{+/+}D^+$ ; Vitamin-D-arme Diät:  $Klotho^{kl/kl}D^-$ ). Einige Tiere wurden jedoch nur bis zum Alter von vier Wochen mit Vitamin-D-armer Diät behandelt. Anschließend wurden diese Tiere mit Kontrolldiät (C1000) gefüttert ( $Klotho^{kl/kl}D^{-/+}$ ).

### **2.5.2 Bestimmung des Körpergewichts und der Trinkmenge**

Das Körpergewicht wurde bei acht Wochen alten Mäusen mit einer Waage der Firma Sartorius (L420 P, Sartorius laboratory, Göttingen, Deutschland) bestimmt.

Um die tägliche Trinkmenge zu ermitteln, wurden Wildtypen sowie Klotho-defiziente Mäuse für ca. eine Woche einzeln in Käfige gesetzt und deren Trinkflaschen täglich zur selben Uhrzeit gewogen. Als tägliche Trinkmenge einer Maus wurde die Gewichts Differenz der entsprechenden Flasche zwischen zwei Tagen angenommen. Zur Normierung wurde die Trinkmenge jeweils auf das Körpergewicht bezogen. Um ein genaueres Ergebnis zu erhalten, wurde für jede Maus der Mittelwert der normierten Trinkmenge von sieben bis zehn aufeinander folgenden Tagen bestimmt.

### **2.5.3 Blutgasanalyse**

Die Blutgasanalyse erfolgte mit einem automatischen Analysesystem (System ECO 2000C, Eschweiler, Kiel, Germany). Dazu wurde Vollblut sofort nach der Entnahme verwendet.

### **2.5.4 Bestimmung der Elektrolyt- und Harnstoffstoffkonzentrationen**

Mit Hilfe einer potentiometrischen Methode, die auf Spannungsunterschieden zwischen angelegten Ionen-selektiven Elektroden beruht, wurden die Plasmakonzentrationen von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  bestimmt. Im Gegensatz dazu wurden Phosphat- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Plasma mit einer photometrischen Methode ermittelt, bei der die Absorption von monochromatischem Licht durch die Probe gemessen wird (111). Auch die Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Plasma erfolgte mit Hilfe der photometrischen Methode. Die Messungen wurden mit einem automatisierten Gerät (FUJI FDC 3500i, Sysmex, Norderstedt, Deutschland) unter Befolgung der Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

### **2.5.5 Osmolalitätsmessungen**

Die Plasmaosmolalität wurde mit einem Dampfdruck-Osmometer (VAPRO 5520, Wescor, Logan, Utah, USA) gemessen, dessen Messverfahren auf der Bestimmung der Dampfdruckerniedrigung beruht, die vom osmotischen Wert einer Lösung abhängt. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Zunächst wurde das Gerät mit den Standards der Osmolalität 100 mosm, 290 mosm und 1000 mosm kalibriert. Im Anschluss daran konnten die Proben gemessen werden, wofür jeweils 10 µl Probe auf eine in der Messkammer befindliche Papierscheibe gegeben wurden. Das Gerät zeigte nach einer Messzeit von 75 s den gemessenen Wert direkt an.

### **2.5.6 Versuche mittels ELISA oder EIA**

ELISA ist eine Abkürzung für enzyme-linked immuno-sorbent assay und gehört zu den Enzym-Immunoassays (EIA). Das Prinzip beruht auf der Kombination einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit einer spezifischen Immunreaktion. Der ELISA ist eine immunologische Methode, die dem Nachweis bestimmter Antigene dient. Dazu sind meist spezifische Antikörper, die gegen die gesuchten Antigene gerichtet sind, bereits an einen Träger gebunden. Bei Aufeinandertreffen von Antikörper und Antigen entstehen Immunkomplexe, die durch einen weiteren spezifischen Antikörper nachgewiesen werden können. Dieser wiederum ist an ein Enzym gekoppelt, welches sich nach Reaktion mit einem chromogenen Substrat photometrisch nachweisen lässt. (111)

Im physiologischen Institut der Universität Tübingen wurde dafür ein Mikrotiterplatten-Lesegerät (Sunrise, TECAN Austria GmbH, Grödig, Österreich) mit der zugehörigen Software Magellan V.03 verwendet. Alle ELISA-Messungen wurden mit kommerziellen Kits unter Befolgung der Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

## **Parathormon-ELISA**

Die Plasmakonzentrationen von intaktem Parathormon (PTH) wurden mit einem ELISA-Kit der Firma Immunotopics (Mouse Intact PTH ELISA Kit, Immunotopics, San Clemente, USA) gemessen.

Der folgende Abschnitt soll einen kurzen Überblick über das Versuchsprinzip verschaffen. Zunächst wurden auf eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte die Proben beziehungsweise Standards, ein biotinylierter Antikörper gegen PTH sowie ein HRP-konjugierter Antikörper gegen PTH gegeben. Die anschließende Inkubation sollte zur Bildung sogenannter "Sandwich"-Komplexe führen:

Streptavidin – biotinylierter Antikörper – PTH – HRP-konjugierter Antikörper

### **Abbildung 8:** Antigen-Antikörperkomplex beim PTH-ELISA

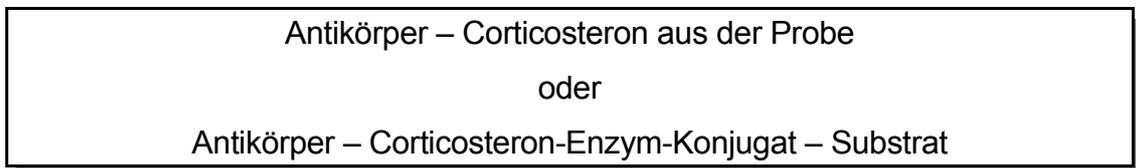
Bei einem anschließenden Waschvorgang wurden die ungebundenen Bestandteile entfernt. Im nächsten Schritt wurde HRP-Substrat hinzugefügt, das bei einer weiteren Inkubation durch die Peroxidase (HRP) des HRP-konjugierten Antikörpers umgesetzt werden sollte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit einer sogenannten "Stopp-Lösung" die Reaktion beendet, so dass die Absorption bei 450 nm mit dem Spektrophotometer für Mikrotiterplatten gemessen werden konnte. Die Berechnung der unbekanntenen Proben erfolgte den Anweisungen des Herstellers entsprechend.

## **ACTH-ELISA**

Für die Bestimmung der ACTH-Konzentration im Plasma wurde ebenfalls ein kommerzielles ELISA-Kit verwendet (ACTH ELISA, MD Bioproducts, Zürich, Schweiz). Die Versuchsdurchführung erfolgte auf ähnliche Weise wie die PTH-Bestimmung, nur dass gegen ACTH gerichtete Antikörper an Stelle der Antikörper gegen PTH zum Einsatz kamen. Die Absorption wurde am Ende dieses ELISA bei 405 nm gemessen. Anhand der Standardkurve, die mit Hilfe der Software SigmaPlot 2001 Version 7.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) erstellt wurde, konnten die ACTH-Konzentrationen der Proben errechnet werden.

### **Corticosteron-EIA**

Der Corticosteron-EIA von DRG Instruments (Marburg, Deutschland) beruhte auf dem Prinzip kompetitiver Bindung. Die im Kit enthaltene Mikrotiterplatte war bereits mit Antikörpern gegen Corticosteron beschichtet. Zunächst wurden Proben beziehungsweise Standards und ein Corticosteron-Enzym-Konjugat dazu pipettiert. Während der nachfolgenden Inkubationszeit sollte das in den Proben enthaltene Corticosteron beziehungsweise das Corticosteron-Enzym-Konjugat kompetitiv an die Antikörper binden. Anschließend wurden ungebundene Bestandteile beim Waschvorgang entfernt und die Substratlösung hinzugefügt. Bei der Umsetzung des Substrats durch das gebundene Enzym-Konjugat kam es zu einer Farbentwicklung, die schließlich bei 450 nm mit dem Spektrophotometer gemessen werden konnte. Aufgrund der oben beschriebenen kompetitiven Bindung war die Farbintensität bei diesem Test umgekehrt proportional zur Corticosteronkonzentration in den Proben. Die Corticosteronkonzentrationen der Proben konnten anhand einer Standardkurve, die mit SigmaPlot 2001 erstellt wurde, berechnet werden.

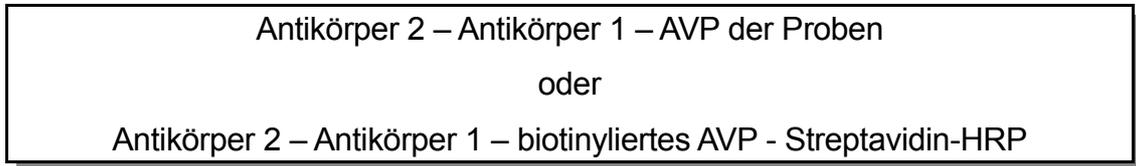


**Abbildung 9:** Antigen-Antikörperkomplex beim Corticosteron-EIA

### **AVP-EIA**

Um die Plasmakonzentration von AVP zu bestimmen, wurde ein EIA-Kit verwendet (AVP EIA Kit, Phoenix Europe, Karlsruhe, Deutschland). Dazu wurde eine mit einem sekundären Antikörper (Antikörper 2) beschichtete Platte verwendet. Zunächst wurden der primäre Antikörper (Antikörper 1), ein biotinyliertes Peptid und die Proben beziehungsweise Standards hinzugefügt. Während der anschließenden Inkubation konnte der primäre Antikörper an einer Seite an den sekundären Antikörper binden. Die andere Seite des primären Antikörpers diente als kompetitive Bindungsstelle für AVP oder für das biotinylierte

Peptid. Anschließend wurde das Streptavidin-konjugierte Enzym HRP (horseradish peroxidase) hinzugefügt, das bei der nachfolgenden Inkubation eine Bindung mit dem biotinylierten Peptid eingehen sollte.



**Abbildung 10:** Antigen-Antikörperkomplex beim AVP-EIA

Nach Hinzufügen des Substrats für das Enzym HRP wurde erneut inkubiert. Im letzten Schritt beendete wieder eine Stopp-Lösung die Reaktion, bevor die Absorption bei 450 nm gemessen wurde. Auch hier musste mit SigmaPlot 2001 eine Standardkurve erstellt werden, um die unbekannt Konzentrationen von AVP aus den Proben berechnen zu können.

### 2.5.7 Radioimmunoassays (RIA)

Der Radioimmunoassay ist eine Methode, bei der bestimmte Substanzen mit radioaktiv markierten Markern nachgewiesen werden können (111).

#### Vitamin-D-RIA

Die Bestimmung der 1,25-OH<sub>2</sub>-VitaminD<sub>3</sub>-Konzentration im Plasma erfolgte mit einem RIA-Kit (1,25-Dihydroxy Vitamin D RIA, immunodiagnostic systems (IDS), Boldon, UK) den Anweisungen des Herstellers entsprechend. Zunächst wurden in den Proben enthaltene Lipide entfernt und Vitamin D mit Hilfe eines Antikörpers immunoextrahiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung mit dem eigentlichen Radioimmunoassay. Dazu wurden die aus der Immunoextraktion gewonnenen Vitamin-D-enthaltenden Eluate und die Kalibratoren mit einem Antikörper gegen Vitamin D inkubiert. Daraufhin wurde an I<sup>125</sup> gebundenes Vitamin D hinzu gegeben und erneut inkubiert. Mit Hilfe eines mitgelieferten Gels wurde die freie

von der gebundenen Radioaktivität getrennt. Letztere wurde schließlich mit einem Multi-crystal LB-2103 Gamma-Counter (Berthold, Bad-Wildbad, Deutschland) gemessen. Die gebundene Radioaktivität ist bei diesem Test umgekehrt proportional zur Konzentration von Vitamin D. Die Vitamin-D-Konzentration in den Proben wurde anhand einer Standardkurve berechnet, die mit SigmaPlot 2001 Version 7.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) erstellt wurde.

### **Aldosteron-RIA**

Die Aldosteronkonzentration im Plasma wurde ebenfalls mit einem kommerziellen RIA-Kit (Immunotech SAS, Marseille, Frankreich) nach den Anweisungen des Herstellers gemessen. Das Testprinzip beruhte auf kompetitiver Bindung. Standards beziehungsweise Proben wurden zusammen mit I<sup>125</sup>-markiertem Aldosteron in Röhren, die mit monoklonalen Antikörpern gegen Aldosteron beschichtet waren, inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus den Röhren entfernt und die Radioaktivität des im Röhren gebundenen I<sup>125</sup> mit dem Gamma-Counter (Multi-crystal LB-2103, Berthold, Bad-Wildbad, Deutschland) bestimmt. Auch hier besteht eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Aldosteronkonzentration der Proben und der gemessenen Radioaktivität. Auch hier wurde mit SigmaPlot 2001 eine Standardkurve erstellt, anhand der die Aldosteronkonzentrationen in den Proben berechnet wurden.

### **2.5.8 Blutdruckmessung**

Der systolische arterielle Blutdruck wurde nicht-invasiv mittels Schwanzplethysmographie gemessen (IITC, Model 179, Woodland Hills, Kalifornien, USA). Für diese Methode musste eine Blutdruckmanschette an den Schwanz der Mäuse angelegt werden. Dies bedurfte jedoch einiger Vorkehrungen, um die Belastung für die Mäuse zu reduzieren. Dazu erfolgte ein angemessenes mehrtägiges Training der Mäuse sowie eine adäquate Vorwärmung, um eine Dilatation der Schwanzarterie zu bewirken. Die Mäuse wurden in eine beheizte Kammer mit einer Umgebungstemperatur von 30-32 °C

gesetzt und von jeder Maus wurden pro Versuchstag so viele Blutdruckmessungen durchgeführt bis die Abweichung von mindestens fünf Messungen weniger als 5 mmHg betrug. Es wurden jeweils die Messergebnisse von drei Tagen verwertet, um den mittleren Blutdruck unter der jeweiligen Diät zu erhalten. Alle Aufzeichnungen und Datenanalysen wurden mit einem Datenakquirierungssystem und der entsprechenden Software durchgeführt (PowerLab 400 und Chart 4, beide von AdInstruments, Colorado, USA). Die Messungen wurden während einer definierten Zeit (14-16 Uhr) durchgeführt.

### 2.5.9 Experimente mit der Ussing-Kammer

Die ENaC-Aktivität wurde anhand einer Amilorid-sensitiven Potentialdifferenz entlang des Kolonepithels bestimmt: Nach Mikroskop-gestützter Entfernung der äußeren Serosa und der Muskelschicht des späten distalen Kolon wurden die Gewebe auf eine selbst gebaute Mini-Ussing-Chamber mit einem Öffnungsdurchmesser von 0,99 mm und einer Öffnungsfläche von 0,00769 cm<sup>2</sup> geladen. Die Gewebe wurden sowohl an der serösen Seite als auch an der luminalen Seite von einem Perfusat umspült. Für die Herstellung des Perfusats wurden die in der folgenden Tabelle angegebenen Substanzen (Tabelle 7) in destilliertem Wasser gelöst, das mit Hilfe des Geräts Milli-Q Biocel A10 (Millipore, Molsheim, Frankreich) gewonnen wurde.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung des serösen und des luminalen Perfusats

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	145
MgCl	1
Ca-Gluconat	2,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,6
Glukose	5

Um den ENaC-medierten Transport zu bestimmen, wurden 50  $\mu\text{M}$  Amilorid (Sigma, Schnelldorf, Deutschland) in Ethanol zum luminalen Perfusat hinzugefügt. Amilorid hemmt die Aktivität des epithelialen Natriumkanals (ENaC) im Kolon. Die Änderung der transepithelialen Potentialdifferenz nach Zugabe von Amilorid zum Perfusat entspricht folglich dem Ausmaß des ENaC-vermittelten Transports (116). Bei allen Ussing-Kammer-Versuchen wurde die transepitheliale Potentialdifferenz ( $V_t$ ) kontinuierlich bestimmt und der transepitheliale Widerstand ( $R_t$ ) wurde aufgrund der Spannungsabweichungen ( $\Delta V_t$ ) nach Anlegung von Testströmen ( $I_t$ ) beurteilt. Der resultierende transepitheliale Widerstand wurde nach dem Ohmschen Gesetz berechnet:  $U (\Delta V_t) = R (R_t) \times I (I_t)$ . Die äquivalenten Kurzschlussströme pro Öffnungsfläche wurden vor und nach Amiloridzufuhr ebenfalls mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes ermittelt, indem die jeweils spontane transepitheliale Potentialdifferenz ( $V_t$ ) ohne Anlegen von Testströmen und der mit der Fläche multiplizierte transepitheliale Widerstand ( $R_t \times A$ ) in die Formel eingesetzt wurden. Dieser Kurzschlussstrom entspricht dem Ionentransport über das Epithel. Die Differenz der vor und nach Amiloridzufuhr ermittelten äquivalenten Kurzschlussströme pro Fläche, gibt somit den Amilorid-sensitiven Strom pro Fläche wider.

## 2.6 Statistik

Bei der Datenauswertung wurden jeweils die arithmetischen Mittelwerte sowie der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus den gemessenen Daten erhoben. "n" bezeichnet dabei die Anzahl der voneinander unabhängigen Messungen. Die statistische Auswertung erfolgte je nach Anwendbarkeit mit dem gepaarten oder ungepaarten Student t-Test oder mit dem ANOVA-Test, wenn mehrere Messreihen miteinander verglichen wurden. Falls möglich, wurde dafür GraphPad InStat Version 3.05 für Windows 95 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet. P-Werte mit  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Blutbild Klotho-defizienter Mäuse

Zunächst wurde das Blutbild Klotho-defizienter Mäuse ( $Klotho^{kl/kl}$ ) mit dem von Wildtypen ( $Klotho^{+/+}$ ) unter Kontrolldiät und Vitamin-D-armer Diät verglichen (Tabelle 8). Dabei fiel auf, dass Klotho-defiziente Mäuse, die mit Kontrolldiät behandelt wurden ( $Klotho^{kl/kl}D^+$ ), signifikant weniger Leukozyten besaßen als Wildtypen ( $Klotho^{+/+}D^+$ ) (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Dieser Unterschied wurde durch Vitamin-D-arme Diät weitestgehend aufgehoben, so dass Vitamin-D-arm behandelte Klotho-defiziente Mäuse ( $Klotho^{kl/kl}D^-$ ) im Vergleich zu Wildtypen ( $Klotho^{+/+}D^+$ ) nur noch tendenziell erniedrigte Leukozytenzahlen aufwiesen.

Weder die Hämoglobinkonzentration noch der Hämatokrit waren signifikant verschieden zwischen Klotho-defizienten Mäusen und Wildtypen. Mit Vitamin-D-haltiger Kontrolldiät ( $D^+$ ) behandelte  $Klotho^{kl/kl}$ -Mäuse hatten im Vergleich zu Wildtypen ( $Klotho^{+/+}D^+$ ) signifikant mehr Erythrozyten (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Vitamin-D-arme Diät führte bei den Klotho-defizienten Mäusen ( $Klotho^{kl/kl}D^-$ ) zu einer Normalisierung der Werte. Sowohl das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) als auch das mittlere korpuskuläre Hämoglobin (MCH) waren bei  $Klotho^{kl/kl}$ -Mäusen unter Kontrolldiät signifikant geringer als bei Wildtypen, die Kontrolldiät erhielten ( $Klotho^{+/+}D^+$ ) (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Unter Vitamin-D-armer Diät erreichten Klotho-defiziente Mäuse ( $Klotho^{kl/kl}D^-$ ) im Vergleich zu Wildtypen ( $Klotho^{+/+}D^+$ ) nur noch tendenziell erniedrigte MCH- beziehungsweise MCV-Werte. Bezüglich der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration (MCHC) ließ sich kein Unterschied zwischen den Gruppen feststellen. Der Retikulozytenanteil war bei Klotho-defizienten Mäusen ( $Klotho^{kl/kl}D^+$ ) signifikant höher als bei Wildtypen ( $Klotho^{+/+}D^+$ ) und deutete somit auf einen erhöhten Umsatz zirkulierender Erythrozyten hin (t-Test,  $p < 0,05$ , Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM der Blutbildparameter (ohne Thrombozyten) Klotho-defizienter Mäuse (Klotho<sup>kl/kl</sup>) und Wildtypen (Klotho<sup>+/+</sup>) mit Vitamin-D-armer Diät (Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>-</sup>, Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>) oder Kontrolldiät (Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>, Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>). “n” gibt die Anzahl der Versuchstiere an. “\*” markiert einen signifikanten Unterschied gegenüber Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>, “#” weist auf einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup> hin.

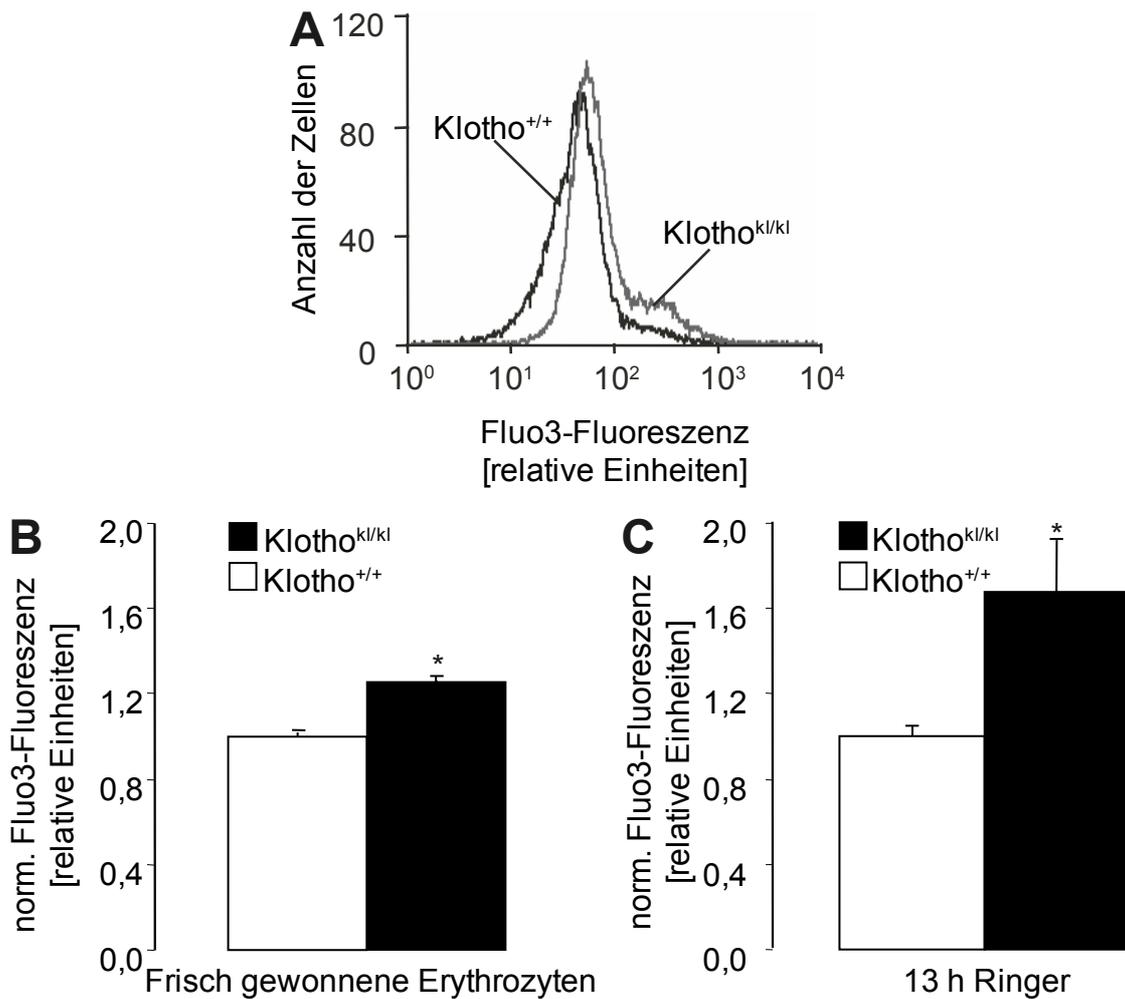
	Klotho <sup>kl/kl</sup> D <sup>+</sup> (n = 15)	Klotho <sup>+/+</sup> D <sup>+</sup> (n = 17)	Klotho <sup>kl/kl</sup> D <sup>-</sup> (n = 12)	Klotho <sup>+/+</sup> D <sup>-</sup> (n = 10)
Leukozyten (10 <sup>6</sup> /μl)	3,8 $\pm$ 0,6*	8,0 $\pm$ 0,9	6,7 $\pm$ 1,2	11,9 $\pm$ 1,0
Erythrozyten (10 <sup>6</sup> /μl)	11,3 $\pm$ 0,2*	10,2 $\pm$ 0,3	9,3 $\pm$ 0,5#	10,5 $\pm$ 0,5
Hämoglobin (g/dl)	15,8 $\pm$ 0,3	15,8 $\pm$ 0,3	13,8 $\pm$ 0,6#	16,0 $\pm$ 0,7
Hämatokrit (%)	44,7 $\pm$ 0,7	44,5 $\pm$ 1,0	39,7 $\pm$ 2,0	44,1 $\pm$ 1,9
MCV (fl)	39,7 $\pm$ 0,5*	43,7 $\pm$ 0,6	42,9 $\pm$ 0,4#	41,9 $\pm$ 0,7
MCHC (g/dl)	35,4 $\pm$ 0,4	35,6 $\pm$ 0,3	35,0 $\pm$ 0,6	36,4 $\pm$ 0,2
MCH (pg)	14,0 $\pm$ 0,1*	15,5 $\pm$ 0,3	15,0 $\pm$ 0,3#	15,3 $\pm$ 0,3
Retikulozyten (%)	6,5 $\pm$ 1,1* (n = 7)	3,1 $\pm$ 0,4 (n = 7)	1,75 $\pm$ 0,1# (n = 9)	

### 3.2 Körpergewicht und Milzgewicht

Das Körpergewicht von Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen (10,6  $\pm$  1,0 g, n = 7) war unter Kontrolldiät signifikant erniedrigt im Vergleich zum Körpergewicht gleichaltriger Klotho<sup>+/+</sup>-Mäuse (21,4  $\pm$  0,6 g, n = 6). Das Milzgewicht von Klotho<sup>kl/kl</sup>- und Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen war bezogen auf das jeweilige Körpergewicht ähnlich. Bei den Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen (n = 8) lag das Milzgewicht pro Körpergewicht bei 3,8  $\pm$  1,1 mg/g, während es bei Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen (n = 6) 3,6  $\pm$  0,5 mg/g erreichte.

### 3.3 Zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration

Erhöhte zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Aktivität gehört zu den Triggerfaktoren der Eryptose. Deshalb wurde die Fluo3-Fluoreszenz analysiert, um festzustellen, ob ein Klothomangel die zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beeinflusst. Sowohl in frisch abgenommenem Blut als auch nach 13 Stunden Inkubation in Ringerlösung war die Fluo3-Fluoreszenz von Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten signifikant höher als von gleich behandelten Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten (Abb. 11 A, B, C). Nach Inkubation in Ringerlösung war der Unterschied jedoch größer. In frisch abgenommenem Blut erreichte die Fluo3-Fluoreszenz bei Wildtypen den Wert  $1,0 \pm 0,02$ , bei Klotho-defizienten Mäusen den Wert  $1,25 \pm 0,03$  ( $n = 4-5$ , relative Einheiten). Nach 13 h Inkubation lag die Fluo3-Fluoreszenz von Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten bei  $1,0 \pm 0,04$ , die Fluo3-Fluoreszenz von Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten bei  $1,68 \pm 0,24$  ( $n = 6-7$ , relative Einheiten). Bei Klothomangel war die zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration demnach erhöht. Um eine unterschiedliche Färbung auszuschließen, wurde mit Hilfe von Ionomycin die Fluoreszenzintensität von maximal aktiviertem Fluo3 bestimmt. Im Anschluss an eine 30-minütige Behandlung mit  $1 \mu\text{M}$  Ionomycin, einem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor, war die Fluo3-Fluoreszenz von Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten ( $6,4 \pm 0,7$  relative Einheiten) der von Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten ( $6,3 \pm 0,7$  relative Einheiten) ähnlich. Die vor Behandlung mit Ionomycin beobachteten Unterschiede in der Fluo3-Fluoreszenz von Klotho<sup>kl/kl</sup>- und Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten ist also nicht auf eine unterschiedliche Färbung zurückzuführen.



**Abbildung 11:** Zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in Erythrozyten von Klotho<sup>kl/kl</sup>- und Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen

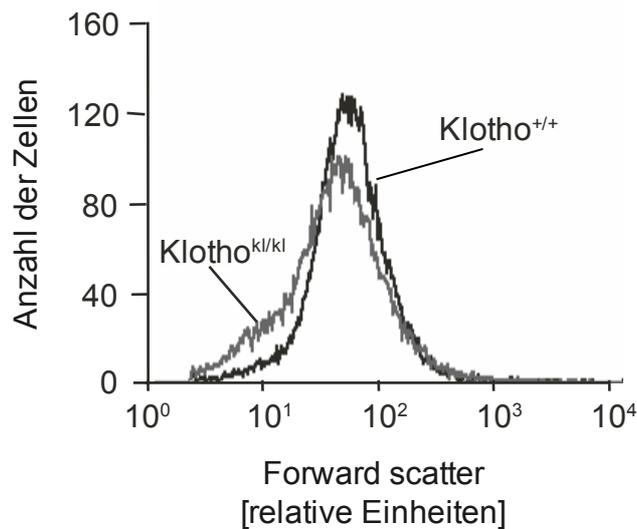
**A.** Histogramm der Fluo3-Fluoreszenz in einem repräsentativen Experiment mit Erythrozyten von Klotho-defizienten Mäusen (Klotho<sup>kl/kl</sup>) und Wildtypen (Klotho<sup>+/+</sup>).

**B.** Arithmetische Mittelwerte ± SEM (n = 4-5) der normalisierten Fluo3-Fluoreszenz in frisch gewonnenen Erythrozyten von Klotho<sup>+/+</sup>- (weißer Balken) und Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen (schwarzer Balken). “\*” bedeutet einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen (t-Test, p < 0,001).

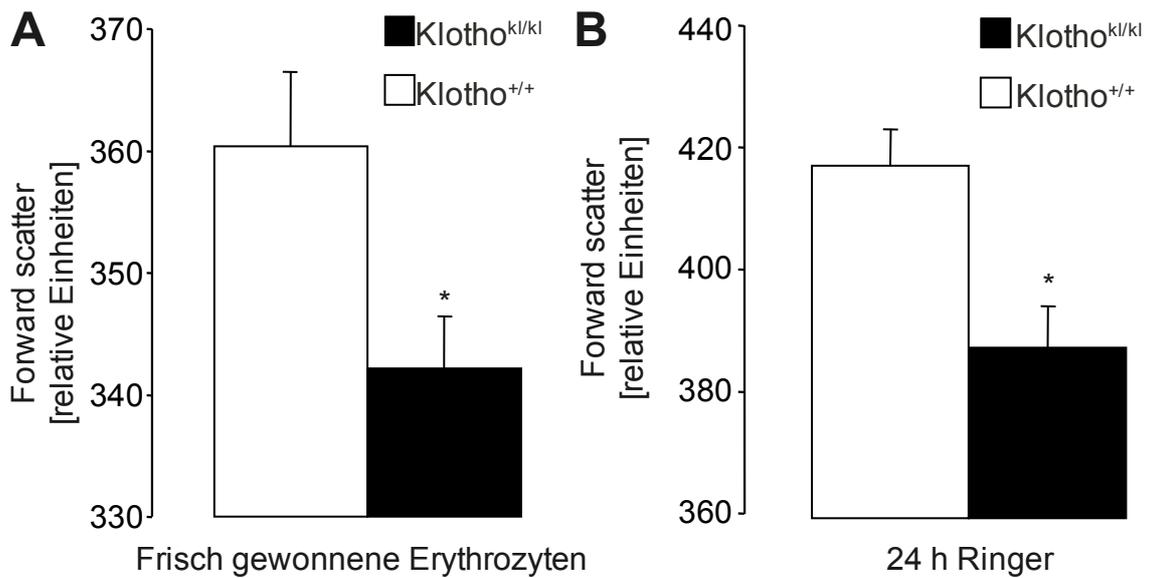
**C.** Arithmetische Mittelwerte ± SEM (n = 6-7) der normalisierten Fluo3-Fluoreszenz in Erythrozyten von Klotho<sup>+/+</sup>- (weißer Balken) und Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen (schwarzer Balken) nach 13 Stunden Inkubation in Ringerlösung. “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen (t-Test, p < 0,05).

### 3.4 Forward-Scatter

Eine Zunahme der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration stimuliert  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive  $\text{K}^+$ -Kanäle, was zum Ausstrom von  $\text{KCl}$  und osmotisch bedingtem Wasseraustritt mit nachfolgender Zellschrumpfung führt. Daher wurde das Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter) als Indikator für das Zellvolumen bestimmt (Abb. 12 und 13 A, B). Die spontanen Forward-Scatter-Werte von  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ -Erythrozyten ( $342,2 \pm 4,2$  relative Einheiten) waren signifikant geringer als die von  $\text{Klotho}^{+/+}$ -Erythrozyten ( $360,4 \pm 6,2$  relative Einheiten) ( $n = 4-5$ ). Nach 24 h Inkubation lagen die Forward-Scatter-Werte von  $\text{Klotho}^{+/+}$ -Erythrozyten bei  $417,6 \pm 6,2$ , die von  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ -Erythrozyten bei  $387,9 \pm 6,6$  (relative Einheiten,  $n = 12-13$ ). Klothomangel bewirkte also tatsächlich eine Verminderung des Zellvolumens.



**Abbildung 12:** Histogramm des Forward-Scatter in einem repräsentativen Experiment mit Erythrozyten von Klotho-defizienten Mäusen ( $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ ) und Wildtypen ( $\text{Klotho}^{+/+}$ ).



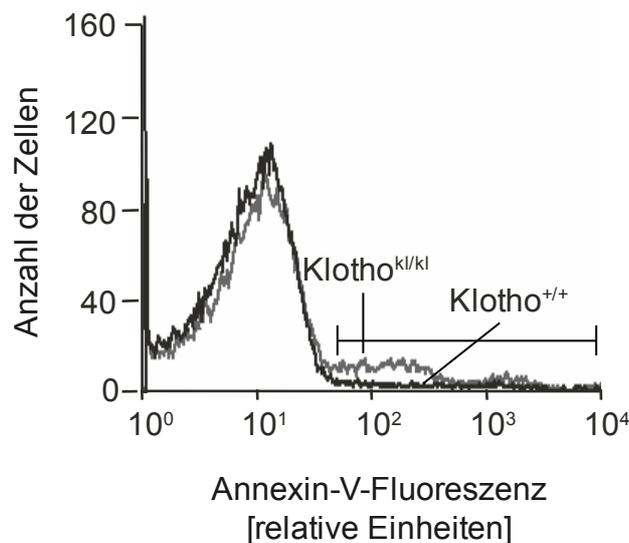
**Abbildung 13:** Forward-Scatter der Erythrozyten von Klotho<sup>kl/kl</sup>- und Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen

**A.** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 4-5) des Forward-Scatter frisch gewonnener Erythrozyten von Klotho<sup>+/+</sup>- (weißer Balken) und Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen (schwarzer Balken). “\*” steht für einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen (t-Test, p < 0,05).

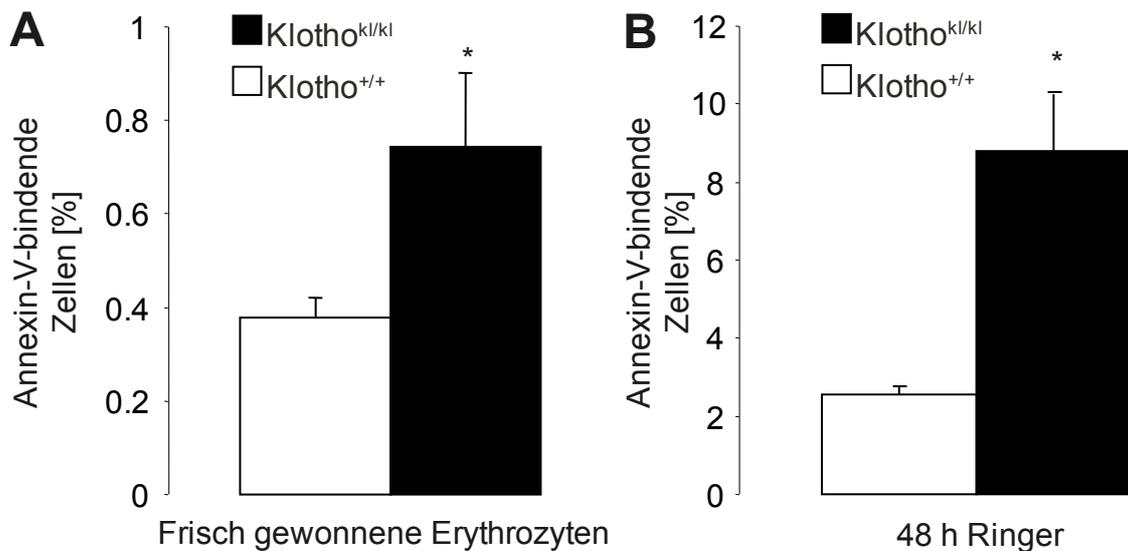
**B.** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 12-13) des Forward-Scatter der Erythrozyten von Klotho<sup>+/+</sup>- (weißer Balken) und Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen (schwarzer Balken) nach 24-stündiger Inkubation in Ringerlösung. “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen (t-Test, p < 0,01).

### 3.5 Annexin-V-Bindung

Eine Zunahme der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt außerdem zum Phospholipidscrambling an der Zellmembran mit nachfolgender Phosphatidylserinexposition an der Erythrozytenoberfläche, dem charakteristischen Merkmal der Eryptose. Deshalb wurde die Phosphatidylserinexposition anhand der Annexin-V-Bindung bestimmt. Wie in Abbildung 14 und 15 A, B dargestellt, wiesen  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ -Erythrozyten im Vergleich zu  $\text{Klotho}^{+/+}$ -Erythrozyten eine signifikant gesteigerte Annexin-V-Bindung auf. Spontan lag der Anteil Annexin-V-bindender Erythrozyten bei  $0,38 \pm 0,04 \%$  ( $\text{Klotho}^{+/+}$ ) bzw.  $0,74 \pm 0,15 \%$  ( $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ ),  $n = 4-5$ , während er nach 48 h Stunden Inkubation in Ringerlösung bei  $2,5 \pm 0,2 \%$  ( $\text{Klotho}^{+/+}$ ) bzw.  $8,8 \pm 1,5 \%$  ( $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ ),  $n = 6-7$ , lag.  $\text{Klotho}$ -defiziente Erythrozyten wiesen demnach eine verstärkte Phosphatidylserinexposition auf.



**Abbildung 14:** Histogramm der Annexin-V-Bindung in einem repräsentativen Experiment mit Erythrozyten von  $\text{Klotho}$ -defizienten Mäusen ( $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ ) und Wildtypen ( $\text{Klotho}^{+/+}$ ).



**Abbildung 15:** Phosphatidylserinexposition an der Erythrozytenoberfläche von Klotho<sup>kl/kl</sup>- und Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen

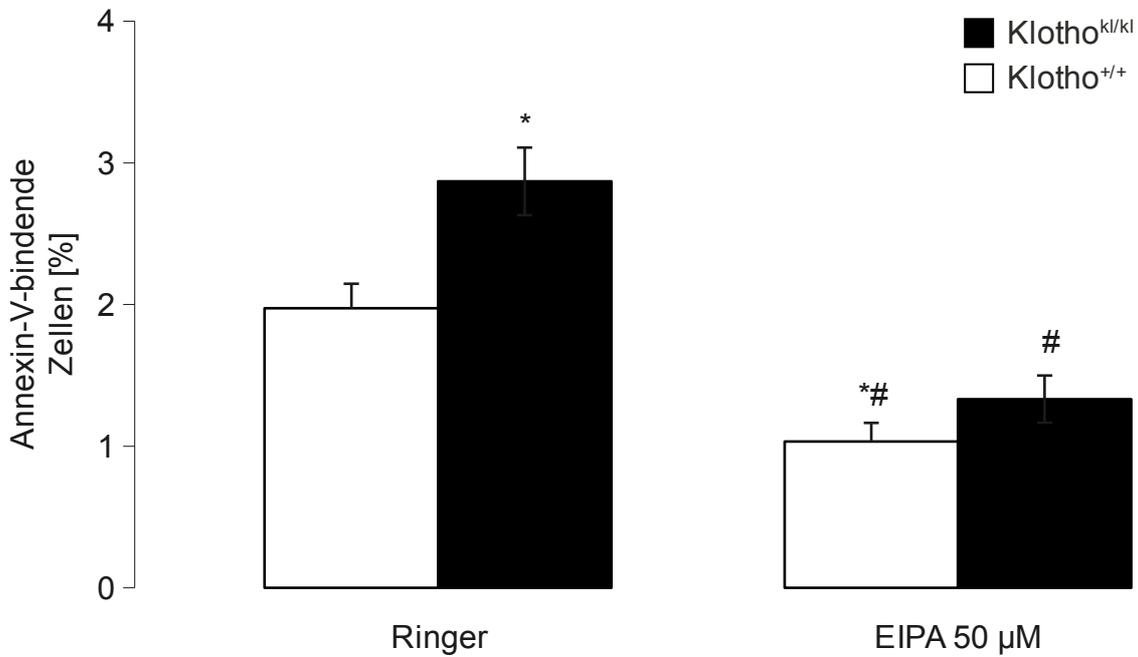
**A.** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 4-5) des prozentualen Anteils der Annexin-V-Bindung an frisch gewonnene Erythrozyten von Klotho<sup>+/+</sup>- (weißer Balken) und Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen (schwarzer Balken). “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen (t-Test, p < 0,05).

**B.** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 6-7) des prozentualen Anteils der Annexin-V-Bindung an Erythrozyten von Klotho<sup>+/+</sup>- (weißer Balken) und Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen (schwarzer Balken) nach 48 Stunden Inkubation in Ringerlösung. “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen (t-Test, p < 0,01).

### 3.6 Annexin-V-Bindung nach Inkubation mit EIPA

EIPA ist ein Inhibitor des erythrozytären Kationen-Kanals und hemmt folglich auch das Scrambling der Zellmembran. Abbildung 16 zeigt, dass eine Inkubation mit 50  $\mu$ M EIPA die Annexin-V-Bindung sowohl von Klotho<sup>kl/kl</sup>- als auch von Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten signifikant abschwächte und den Unterschied zwischen den Genotypen aufhob. EIPA senkte die Annexin-V-Bindung von Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten von  $1,97 \pm 0,17$  % auf  $1,03 \pm 0,13$  % ab (p < 0,01, ANOVA). Bei Klotho<sup>kl/kl</sup>-

Erythrozyten fiel die Annexin-V-Bindung durch EIPA von  $2,87 \pm 0,24$  % auf  $1,33 \pm 0,17$  % ( $p < 0,001$ , ANOVA). Die Annexin-V-Bindung von Klotho<sup>kl/kl</sup>- im Vergleich zu Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten war ohne EIPA mit  $p < 0,01$  (ANOVA) signifikant unterschiedlich, nach Inkubation mit EIPA bestand kein Unterschied.

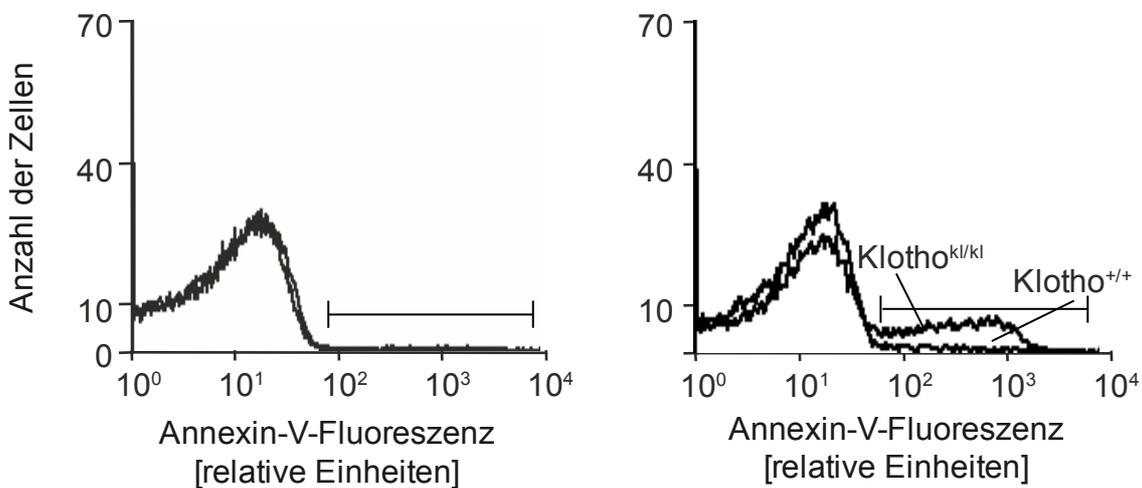


**Abbildung 16:** Phosphatidylserinexposition an der Erythrozytenoberfläche von Klotho<sup>+/+</sup>- und Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen

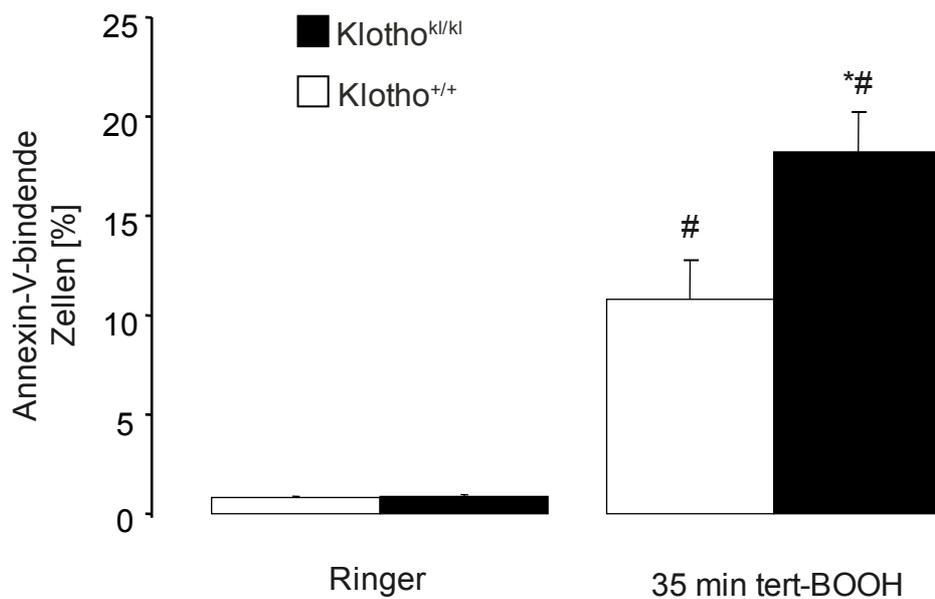
Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 4-5$ ) des prozentualen Anteils der Annexin-V-Bindung an Erythrozyten von Klotho<sup>+/+</sup> (weißer Balken) und Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen (schwarzer Balken) nach 48-stündiger Inkubation in Abwesenheit (linke Balken) und Anwesenheit (rechte Balken) des Kationenkanal-Inhibitors EIPA (50  $\mu$ M). “#” markiert einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Werten ohne Zugabe von EIPA (ANOVA,  $p < 0,01$ ), “\*” steht für signifikante Unterschiede zu den Werten von Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten nach Inkubation in Ringerlösung (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

### 3.7 Stimulation der Eryptose durch oxidativen Stress

Weitere Experimente sollten klären, ob Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten empfindlicher auf bekannte Auslöser der Eryptose reagieren, wie zum Beispiel oxidativen Stress und Energiedepletion in Form von Glukoseentzug. Oxidativer Stress, der durch 35-minütige Exposition gegenüber 1 mM Tert-Butyl-Hydroxyl-Peroxid (tert-BOOH) erzeugt wurde, resultierte in einem erwarteten statistisch signifikanten Anstieg der Phosphatidylserinexposition bei beiden Genotypen ( $p < 0,001$ , ANOVA) (Abb. 17 und 18). Der erreichte Wert war bei Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten ( $18,24 \pm 1,95$  %) signifikant höher als bei Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten ( $10,78 \pm 1,98$  %). Unter Kontrollbedingungen war die Annexin-V-Bindung bei Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten ( $0,85 \pm 0,11$  %) tendenziell höher als bei Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten ( $0,80 \pm 0,09$  %). Der Unterschied erreichte hier jedoch keine statistische Signifikanz. Die absolute Differenz zwischen der Annexin-V-Bindung mit tert-BOOH und der Annexin-V-Bindung ohne tert-BOOH war bei Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten signifikant größer als bei Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten ( $17,4 \pm 2,4$  % vs.  $9,9 \pm 2,3$  %, t-Test  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 17:** Histogramme der Annexin-V-Bindung in einem repräsentativen Experiment mit Erythrozyten von Klotho-defizienten Mäusen (Klotho<sup>kl/kl</sup>) und Wildtypen (Klotho<sup>+/+</sup>), die 35 min in Abwesenheit (linkes Bild) oder Anwesenheit (rechtes Bild) von 1 mM tert-BOOH inkubiert wurden.



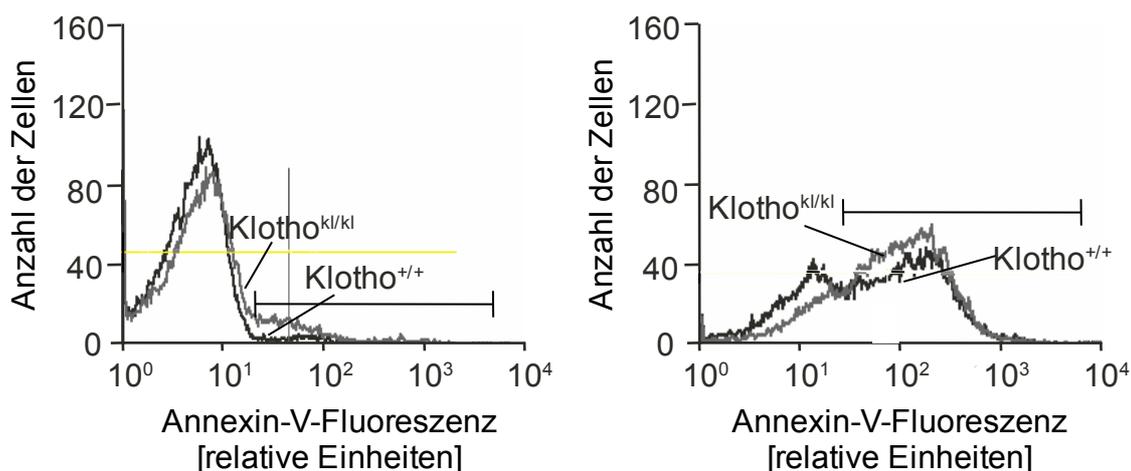
**Abbildung 18:** Effekt von oxidativem Stress auf Erythrozyten von Klotho<sup>+/+</sup>- und Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 6) des prozentualen Anteils der Annexin-V-bindenden Erythrozyten von Klotho<sup>+/+</sup>- (weiße Balken) und Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen (schwarze Balken) nach einer 35-minütigen Inkubation in Abwesenheit (linke Balken) und Anwesenheit (rechte Balken) von 1 mM tert-BOOH. “#” markiert einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Werten bei Abwesenheit von 1 mM tert-BOOH (ANOVA, p < 0,001), “\*” steht für einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen (ANOVA, p < 0,05).

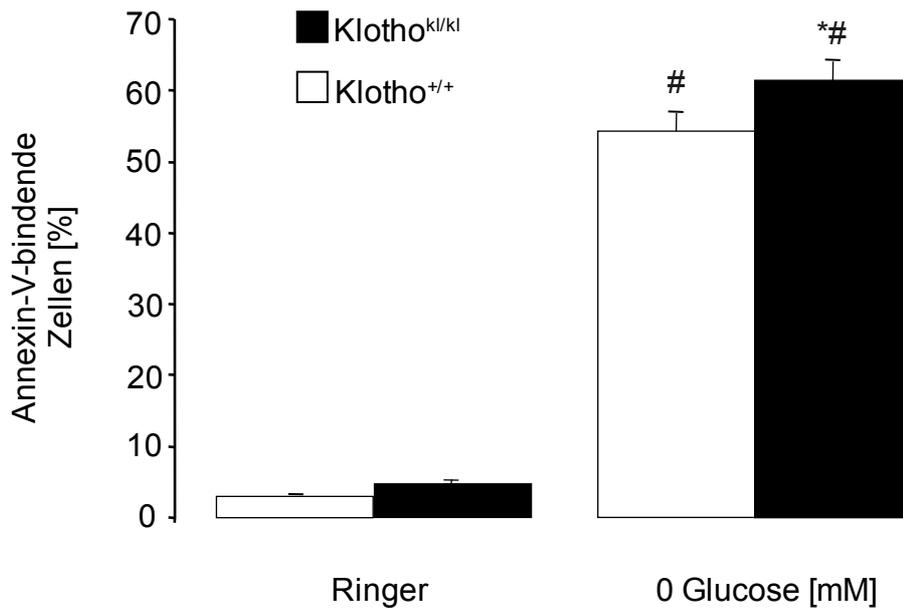
### 3.8 Stimulation der Eryptose durch Energiemangel

Ähnlich der Auswirkung von oxidativem Stress führte Energiedepletion durch 13-stündigen Glukoseentzug erwartungsgemäß zu einem signifikanten Anstieg der Phosphatidylserinexposition bei Klotho-defizienten Mäusen und Wildtypen (Abb. 19 und 20). Auch hier erreichten Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten ( $61,52 \pm 2,51$  %) signifikant höhere Werte als Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten ( $54,25 \pm 2,54$  %). Wieder war die unter Kontrollbedingungen beobachtete Annexin-V-Bindung von Klotho<sup>kl/kl</sup>-

Erythrozyten ( $4,73 \pm 0,55$  %) tendenziell höher als die von  $\text{Klotho}^{+/+}$ -Erythrozyten ( $3,05 \pm 0,25$  %). Dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Die durch Glukoseentzug induzierte Zunahme der Annexin-V-Bindung war bei  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ -Erythrozyten signifikant stärker ausgeprägt als bei  $\text{Klotho}^{+/+}$ -Erythrozyten ( $53,9 \pm 3,4$  % vs.  $64,8 \pm 2,7$  %,  $p < 0,05$ , t-Test). Bei beiden Genotypen wurde die bei Glukoseentzug gesteigerte Phosphatidylserinexposition von einer Zunahme der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration begleitet. Während der Energiedepletion war die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ -Erythrozyten ( $13,7 \pm 1,25$  relative Einheiten) ebenfalls signifikant höher als in  $\text{Klotho}^{+/+}$ -Erythrozyten ( $9,8 \pm 1,12$  relative Einheiten) (Abb. 21). Auch unter Kontrollbedingungen war die normalisierte Fluo3-Fluoreszenz von  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ -Erythrozyten ( $3,5 \pm 0,47$  relative Einheiten) tendenziell höher als die von  $\text{Klotho}^{+/+}$ -Erythrozyten ( $1,5 \pm 0,21$  relative Einheiten).

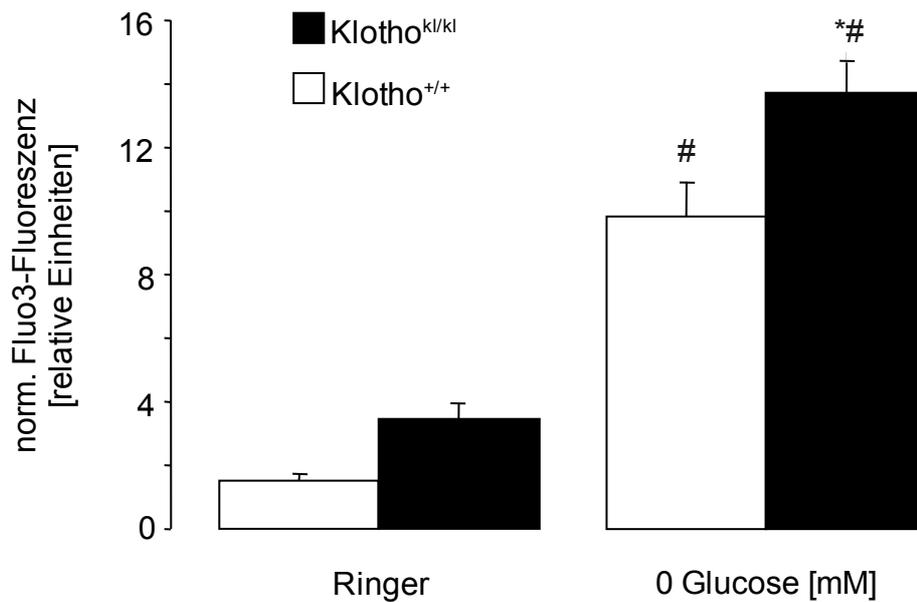


**Abbildung 19:** Histogramme der Annexin-V-Bindung in einem repräsentativen Experiment mit Erythrozyten von  $\text{Klotho}$ -defizienten Mäusen ( $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ ) und Wildtypen ( $\text{Klotho}^{+/+}$ ) nach 13-stündiger Inkubation in Anwesenheit von Glukose (linkes Bild) oder unter Glukoseentzug (rechtes Bild).



**Abbildung 20:** Effekt der Energiedepletion auf Erythrozyten von Klotho<sup>kl/kl</sup>- und Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 18) des prozentualen Anteils der Annexin-V-bindenden Erythrozyten von Klotho<sup>+/+</sup>- (weiße Balken) und Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen (schwarze Balken) nach 13 Stunden Inkubation in Anwesenheit (linke Balken) und Abwesenheit (rechte Balken) von Glukose. “#” markiert einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Werten bei Anwesenheit von Glukose (ANOVA, p < 0,001). “\*#” steht für einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen (ANOVA, p < 0,05).

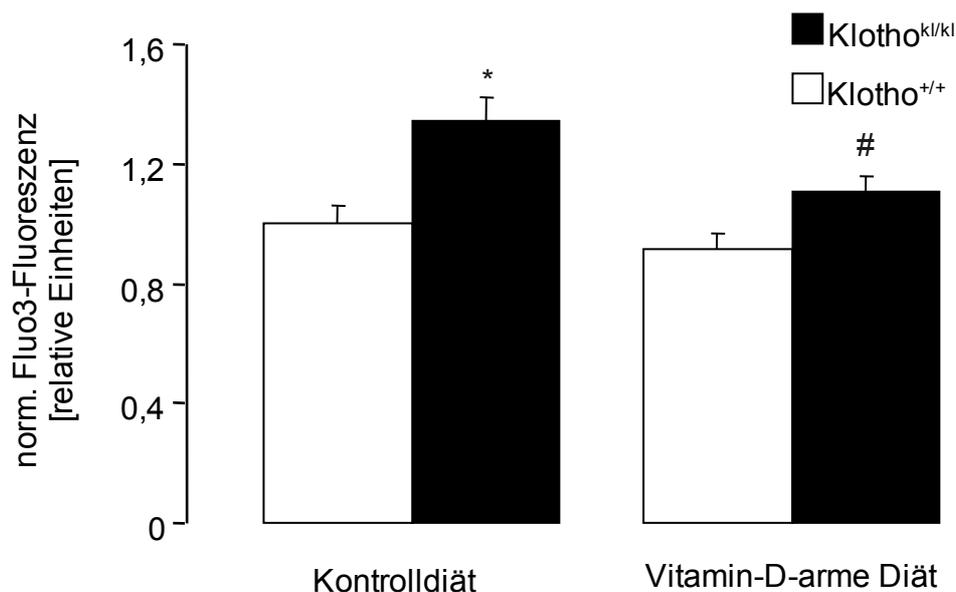


**Abbildung 21:** Effekt der Energiedepletion auf Erythrozyten von Klotho<sup>kl/kl</sup>- und Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 6-14) der normalisierten Fluo3-Fluoreszenz der Erythrozyten von Klotho<sup>+/+</sup> (weiße Balken) und Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen (schwarze Balken) nach 13-stündiger Inkubation in Glukose-haltiger (Ringer, linke Balken) und Glukose-freier (0 Glukose, rechte Balken) Ringerlösung. “#” weist auf einen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Werten bei Anwesenheit von Glukose hin (ANOVA, p < 0,001). “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>-Mäusen (ANOVA, p < 0,05).

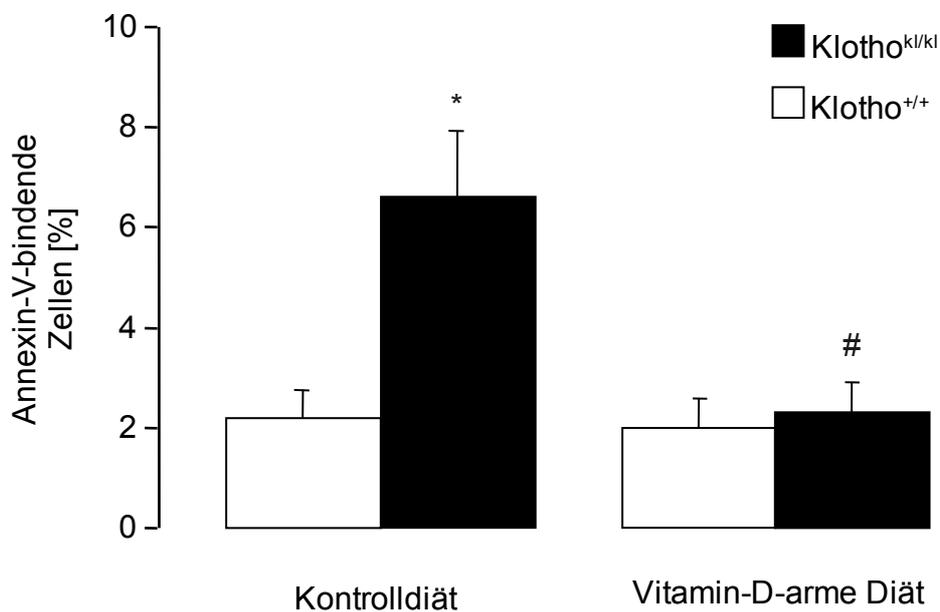
### 3.9 Auswirkungen einer Vitamin-D-armen Diät

Um herauszufinden, ob der gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritt und die gesteigerte Erythrose bei  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ -Mäusen dem Verlust einer direkten Interaktion zwischen  $\text{Klotho}$  und Erythrozyten zugrunde lag oder sekundär als Folge der vermehrten Calcitriolbildung auftrat, wurden Experimente an Erythrozyten von Mäusen, die mit Vitamin-D-armer Diät behandelt wurden, durchgeführt. Wie in Abbildung 22 dargestellt, beeinflusste Vitamin-D-Mangel den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in  $\text{Klotho}^{+/+}$ -Erythrozyten nicht signifikant ( $1,0 \pm 0,06$  vs.  $0,91 \pm 0,06$ , relative Einheiten), senkte aber signifikant den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ -Erythrozyten ( $1,35 \pm 0,08$  vs.  $1,11 \pm 0,05$  relative Einheiten) ( $n = 6-11$ ). Als Ergebnis der Behandlung mit Vitamin-D-armer Diät war der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nicht signifikant verschieden zwischen  $\text{Klotho}^{+/+}$ - und  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ -Erythrozyten.



**Abbildung 22:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 6-11$ ) der normalisierten Fluo3-Fluoreszenz in Erythrozyten von  $\text{Klotho}^{+/+}$  (weiße Balken) und  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ -Mäusen (schwarze Balken), die Kontrolldiät (linke Balken) oder Vitamin-D-arme Diät (rechte Balken) erhielten, nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung. “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu  $\text{Klotho}^{+/+}$ -Mäusen (ANOVA,  $p < 0,001$ ), “#” steht für einen signifikanten Unterschied zur Kontrolldiät (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Der Annexin-V-Bindung zufolge beseitigte Vitamin-D-Restriktion außerdem die gesteigerte Eryptose von  $Klotho^{kl/kl}$ -Erythrozyten. Vitamin-D-arme Diät beeinflusste die Annexin-V-Bindung von  $Klotho^{+/+}$ -Erythrozyten nicht signifikant ( $2,18 \pm 0,58$  % vs.  $2,00 \pm 0,58$  %), während die Annexin-V-Bindung von  $Klotho^{kl/kl}$ -Erythrozyten signifikant reduziert wurde ( $6,61 \pm 1,30$  % vs.  $2,30 \pm 0,59$  %) (n = 6-13) (Abb. 23). Als Ergebnis der Behandlung mit Vitamin-D-armer Diät war die Annexin-V-Bindung ebenfalls nicht signifikant zwischen  $Klotho^{+/+}$ - und  $Klotho^{kl/kl}$ -Erythrozyten.



**Abbildung 23:** Phosphatidylserinexposition an der Erythrozytenmembran von  $Klotho^{kl/kl}$ - und  $Klotho^{+/+}$ -Mäusen mit oder ohne Vitamin-D-arme Diät

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 6-13) des prozentualen Anteils der Annexin-V-bindenden Erythrozyten von  $Klotho^{+/+}$ - (weiße Balken) und  $Klotho^{kl/kl}$ -Mäusen (schwarze Balken), die Kontrolldiät (linke Balken) oder Vitamin-D-arme Diät erhielten (rechte Balken), nach 48-stündiger Inkubation in Ringerlösung. “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu  $Klotho^{+/+}$ -Mäusen (ANOVA,  $p < 0,001$ ), “#” weist auf einen signifikanten Unterschied zur Kontrolldiät hin (ANOVA,  $p < 0,001$ ).

### **3.10 Einfluss von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auf den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Gehalt und die Annexin-V-Bindung**

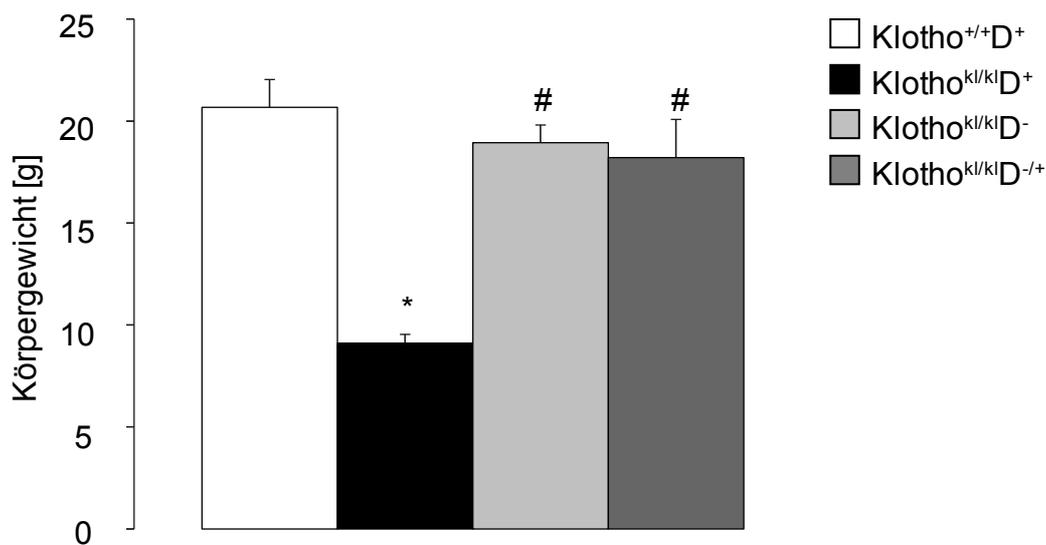
Um herauszufinden, ob Calcitriol die erythrozytäre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und das Scrambling der Zellmembran direkt beeinflusst, wurden Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten für 24 Stunden 100 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ausgesetzt. Die jeweiligen Werte der Fluo3-Fluoreszenz waren nicht signifikant verschieden zwischen Abwesenheit (1,0 ± 0,1 relative Einheiten, n = 4) und Anwesenheit (1,1 ± 0,1 relative Einheiten, n = 4) von 100 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Darüber hinaus war der prozentuale Anteil der Annexin-V-bindenden Erythrozyten bei Abwesenheit (2,7 ± 0,2 %, n = 4) und Anwesenheit (3,2 ± 0,4 %, n = 4) von 100 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ähnlich. Folglich bewirkte die akute Verabreichung von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> weder eine nennenswerte Stimulation des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms noch der Eryptose.

### 3.11 Körpergewicht und Trinkmenge von Klotho-defizienten Mäusen und Wildtypen mit und ohne Vitamin-D-arme Diät

Im Alter von acht Wochen besaßen Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse mit 9,1 ± 0,4 g ein signifikant geringeres Körpergewicht als Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse mit 20,7 ± 1,4 g (Abb. 25). Sowohl vorübergehende als auch kontinuierliche Vitamin-D-arme Diät beseitigte die Wachstumsretardierung Klotho-defizienter Mäuse, das heißt, das Körpergewicht der Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup> (18,9 ± 0,9 g) und Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>-Mäuse (18,2 ± 1,9 g) war nicht signifikant verschieden vom Körpergewicht der Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse (Abb. 25). Bezogen auf ihr Körpergewicht tranken Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse signifikant mehr als Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse (549 ± 62 µl/g/24h vs. 366 ± 14 µl/g/24h, n = 6-9, p < 0,01, t-Test).



**Abbildung 24:** Foto einer acht Wochen alten Klotho-defizienten Maus (Klotho<sup>kl/kl</sup>) und einer Wildtypmaus (Klotho<sup>+/+</sup>), jeweils mit Vitamin-D-haltiger Kontrolldiät behandelt (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup> und Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>), sowie von Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen, die entweder dauerhaft (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>) oder nur in den ersten vier Lebenswochen Vitamin-D-arme Diät und anschließend Kontrolldiät erhielten (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>).



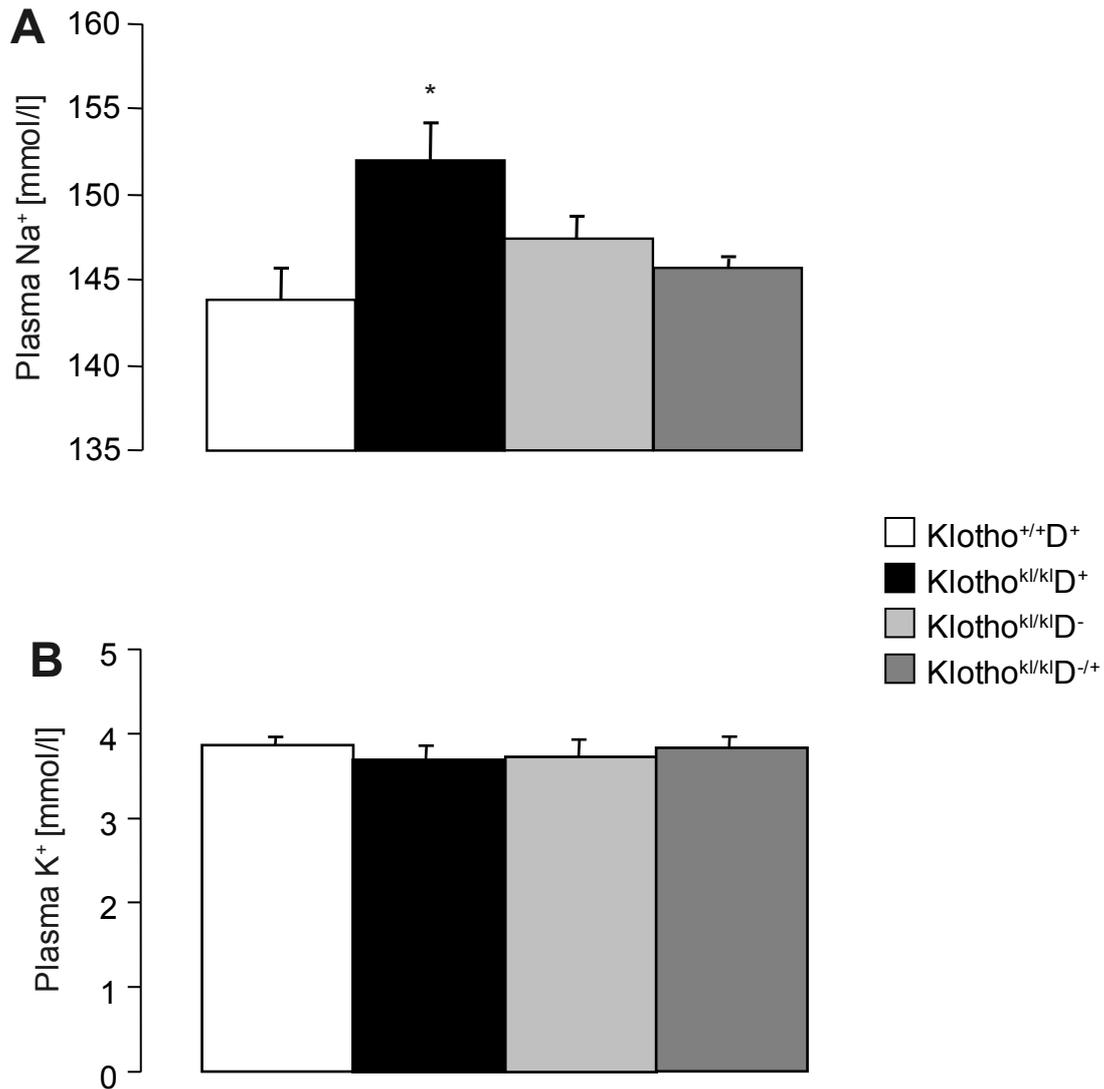
**Abbildung 25:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 7-12) des Körpergewichts von Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-, Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-, Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>- und Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>-Mäusen. “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen, während “#” einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen anzeigt (ANOVA, p < 0,001).

### 3.12 Mineralstoff- und Elektrolytkonzentrationen im Plasma

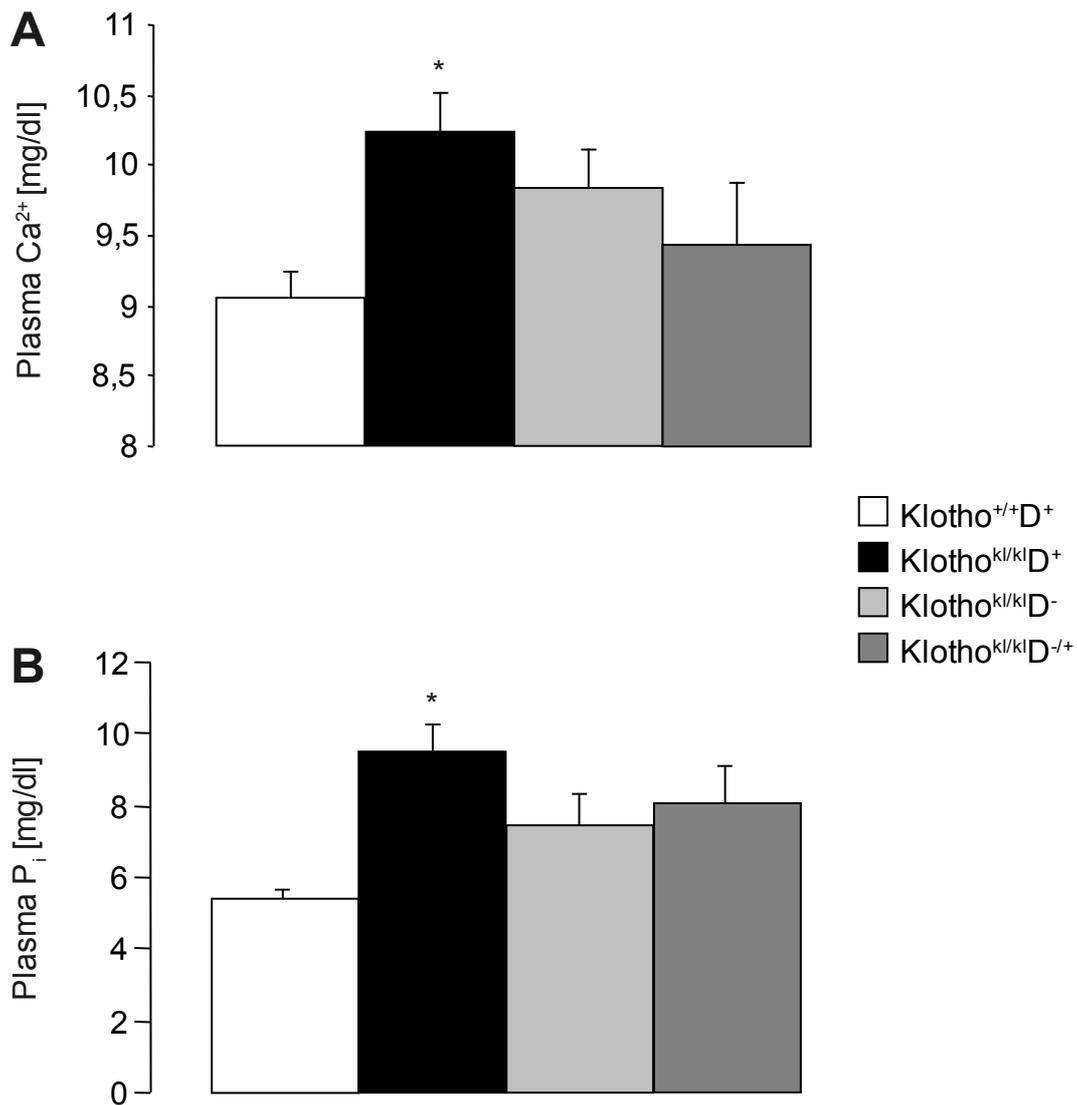
Die Plasmakonzentrationen von Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> und Phosphat (P<sub>i</sub>) lagen bei Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen signifikant höher bei Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen. Allerdings waren die Plasmakonzentrationen von Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> und Phosphat nicht signifikant verschieden zwischen Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>- und Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen oder zwischen Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>- und Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen. Die Plasmakonzentrationen von K<sup>+</sup> ließen keinen Unterschied zwischen den Gruppen erkennen. (Tabelle 9 und Abb. 26-27).

**Tabelle 9:** Mittelwerte  $\pm$  SEM der Elektrolyt- und Mineralstoffkonzentrationen

	Klotho <sup>+/+</sup> D <sup>+</sup>	Klotho <sup>kl/kl</sup> D <sup>+</sup>	Klotho <sup>kl/kl</sup> D <sup>-</sup>	Klotho <sup>kl/kl</sup> D <sup>-/+</sup>
Na <sup>+</sup> [mmol/l] (n = 6-14)	143,9 $\pm$ 1,8	152,0 $\pm$ 2,3	147,5 $\pm$ 1,3	145,8 $\pm$ 0,5
K <sup>+</sup> [mmol/l] (n = 6-14)	3,85 $\pm$ 0,1	3,68 $\pm$ 0,2	3,72 $\pm$ 0,2	3,83 $\pm$ 0,1
Ca <sup>2+</sup> [mg/dl] (n = 10-19)	9,05 $\pm$ 0,2	10,23 $\pm$ 0,3	9,85 $\pm$ 0,3	9,44 $\pm$ 0,4
P <sub>i</sub> [mg/dl] (n = 10-19)	5,28 $\pm$ 0,2	9,50 $\pm$ 0,8	7,65 $\pm$ 0,8	8,06 $\pm$ 1,0



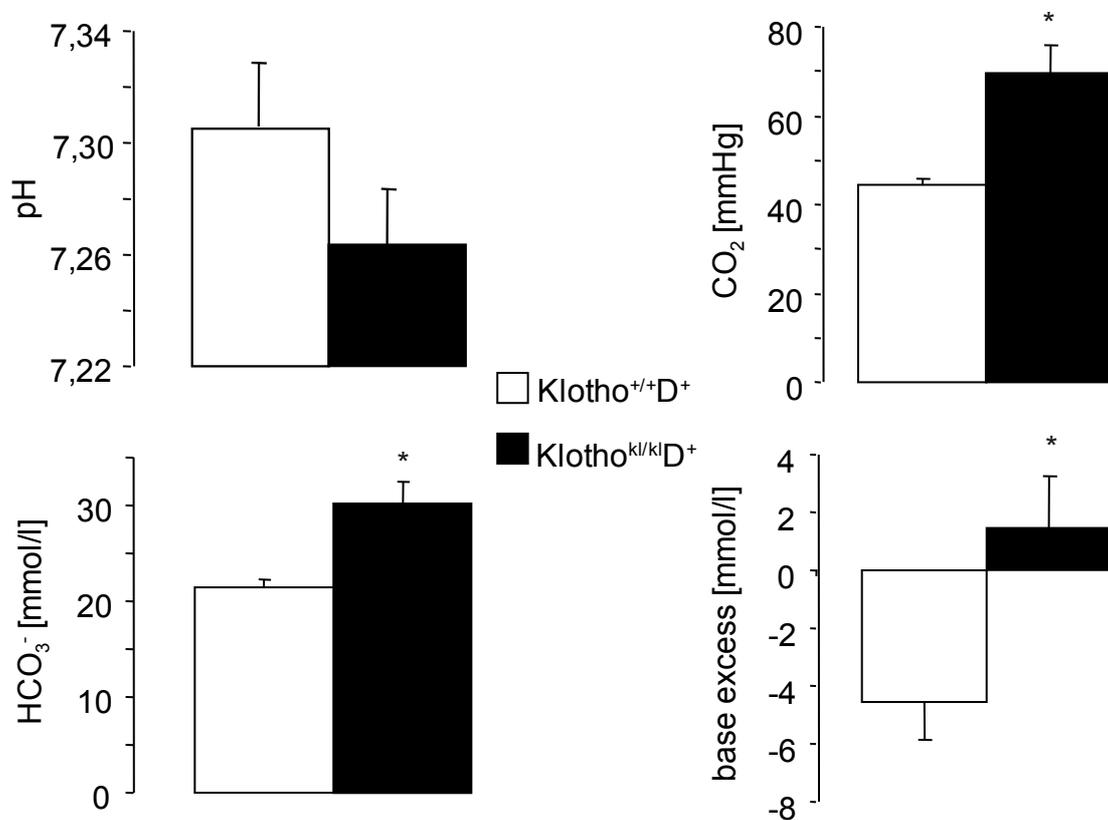
**Abbildung 26:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 6-14) der Na<sup>+</sup>- **(A)** und K<sup>+</sup>-Konzentrationen **(B)** im Plasma Klotho-defizienter Mäuse (Klotho<sup>kl/kl</sup>) und Wildtypen (Klotho<sup>+/+</sup>) unter Vitamin-D-haltiger Kontrolldiät (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup> und Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>) sowie Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäuse, die kontinuierlich (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>) oder nur in den ersten vier Lebenswochen Vitamin-D-arme Diät und anschließend Kontrolldiät erhielten (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>). “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen (ANOVA, p < 0,05).



**Abbildung 27:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 10-19) der Ca<sup>2+</sup>- (**A**) und P<sub>i</sub>-Konzentrationen (**B**) im Plasma Klotho-defizienter Mäuse (Klotho<sup>kl/kl</sup>) und Wildtypen (Klotho<sup>+/+</sup>) unter Vitamin-D-haltiger Kontrolldiät (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup> und Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>) sowie Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäuse, die kontinuierlich (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>) oder nur in den ersten vier Lebenswochen Vitamin-D-arme Diät und anschließend Kontrolldiät erhielten (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>). “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen (ANOVA, p < 0,01).

### 3.13 Säure-Basen-Haushalt

Die Analyse des Säure-Basen-Haushalts brachte bei  $Klotho^{kl/kl}D^+$ -Mäusen eine respiratorische Azidose zum Vorschein, die durch erhöhte Bikarbonatkonzentrationen teilweise kompensiert war (Abb. 28). Der pH-Wert war mit  $7,26 \pm 0,02$  tendenziell niedriger als der pH-Wert von  $Klotho^{+/+}D^+$ -Mäusen ( $7,31 \pm 0,02$ ). Damit einhergehend waren der  $CO_2$ -Partialdruck ( $69,6 \pm 6,4$  vs.  $44,3 \pm 1,5$  mmHg) und die Bikarbonatkonzentration ( $30,2 \pm 2,3$  vs.  $21,4 \pm 1,0$  mmol/l) im venösen Blut von  $Klotho^{kl/kl}D^+$ -Mäusen signifikant höher im Vergleich zu den Werten von  $Klotho^{+/+}D^+$ -Mäusen (Abb. 28).

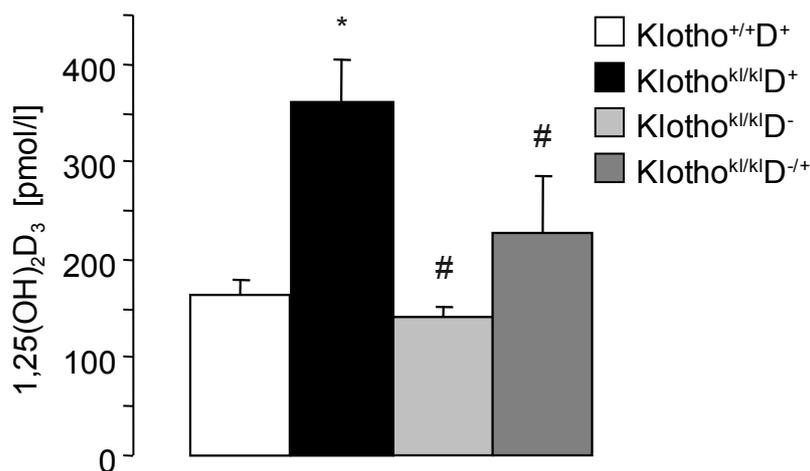


**Abbildung 28:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 4-6$ ) von pH,  $pCO_2$ , Bikarbonat ( $HCO_3^-$ ) und Basenabweichung (base excess) im venösen Blut von  $Klotho$ -defizienten Mäusen ( $Klotho^{kl/kl}D^+$ ) und Wildtypen ( $Klotho^{+/+}D^+$ ), die Vitamin-D-haltige Kontrolldiät gefüttert bekamen. “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu  $Klotho^{+/+}D^+$ -Mäusen (t-Test,  $p < 0,05$ ).

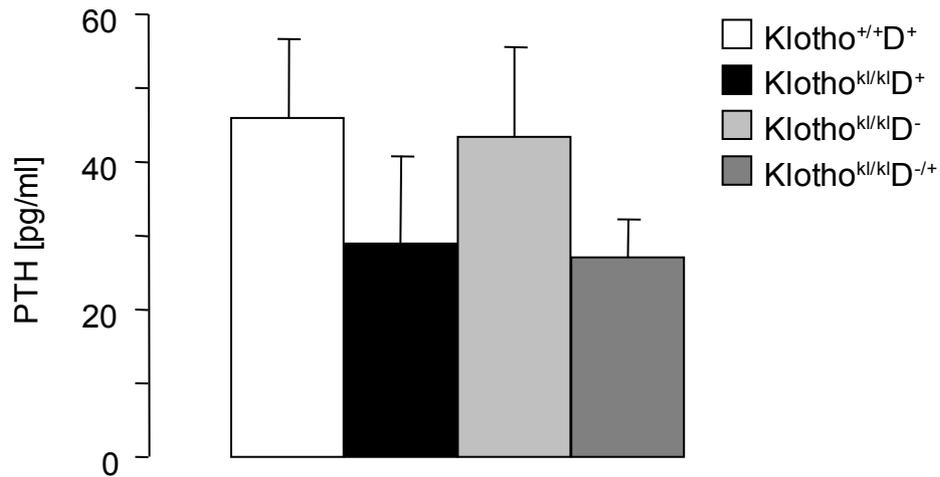
### 3.14 Plasmakonzentrationen von Calcitriol und PTH

Die Plasmakonzentration von Calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) war bei  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}\text{D}^+$ -Mäusen ( $362 \pm 43$  pmol/l) signifikant höher als bei  $\text{Klotho}^{+/+}\text{D}^+$ -Mäusen ( $163 \pm 17$  pmol/l) (Abb. 29). Vitamin-D-arme Diät senkte die Calcitriolbildung signifikant. Dementsprechend war die Plasmakonzentration von Calcitriol bei  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}\text{D}^{-/+}$ - ( $227 \pm 58$  pmol/l) und  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}\text{D}^-$ -Mäusen ( $141 \pm 10$  pmol/l) signifikant niedriger als bei  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}\text{D}^+$ -Mäusen (Abb. 29).

$\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}\text{D}^+$ -Mäuse besaßen tendenziell niedrigere PTH-Konzentrationen im Plasma als  $\text{Klotho}^{+/+}\text{D}^+$ -Mäuse ( $46 \pm 11$  pg/ml vs.  $29 \pm 12$  pg/ml). Der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abb. 30).



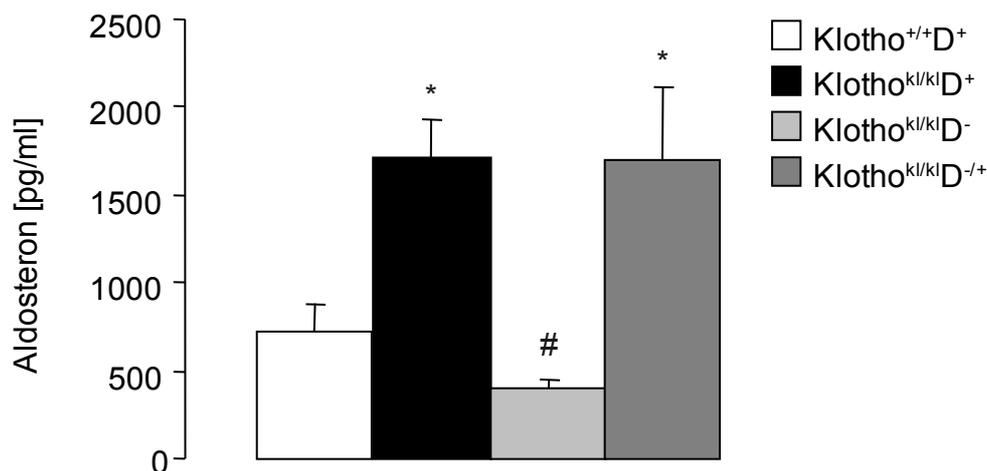
**Abbildung 29:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM der  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen ( $n = 12-20$ ) im Plasma von  $\text{Klotho}$ -defizienten Mäusen ( $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ ) und Wildtypen ( $\text{Klotho}^{+/+}$ ), die Vitamin-D-haltige Kontrolldiät bekamen ( $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}\text{D}^+$  und  $\text{Klotho}^{+/+}\text{D}^+$ ) sowie  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}$ -Mäuse, die Vitamin-D-arme Diät kontinuierlich ( $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}\text{D}^-$ ) oder nur während der ersten vier Lebenswochen und anschließend Kontrolldiät erhielten ( $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}\text{D}^{-/+}$ ). “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu  $\text{Klotho}^{+/+}\text{D}^+$ -Mäusen (ANOVA,  $p < 0,01$ ), “#” weist auf einen signifikanten Unterschied zu  $\text{Klotho}^{\text{kl/kl}}\text{D}^+$ -Mäusen hin (ANOVA,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 30:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM der PTH-Konzentration (n = 5-14) im Plasma von Klotho-defizienten Mäusen (Klotho<sup>kl/kl</sup>) und Wildtypen (Klotho<sup>+/+</sup>), die Vitamin-D-haltige Kontrolldiät bekamen (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup> und Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>) sowie von Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen, die Vitamin-D-arme Diät kontinuierlich (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>) oder nur während der ersten vier Lebenswochen und anschließend Kontrolldiät erhielten (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>).

### 3.15 Aldosteronkonzentration

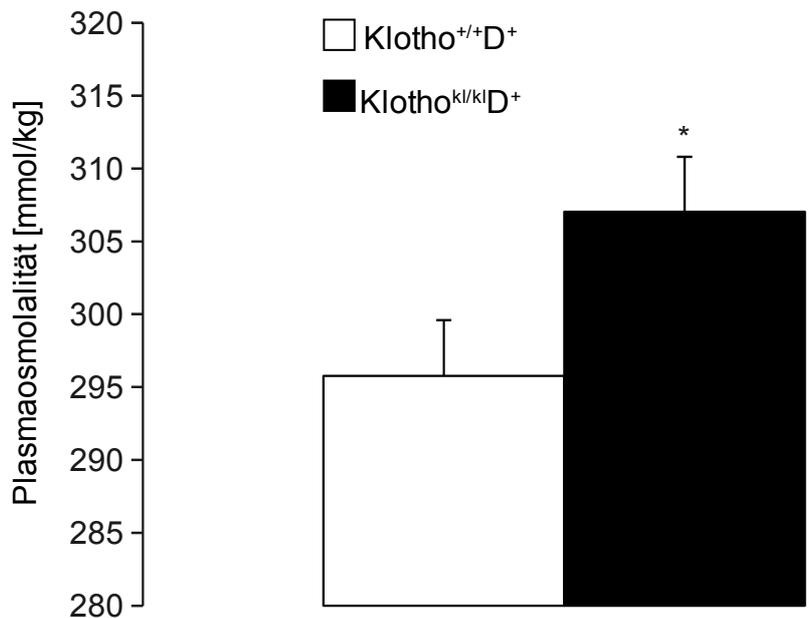
Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse wiesen im Plasma signifikant höhere Aldosteronkonzentrationen auf als Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse (1711 ± 222 pg/ml vs. 731 ± 146 pg/ml, p < 0,01, ANOVA) (Abb. 31). Kontinuierliche Vitamin-D-Restriktion konnte den Hyperaldosteronismus im Gegensatz zu vorübergehender Vitamin-D-Restriktion aufheben. Demzufolge war die Aldosteronkonzentration im Plasma von Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>-Mäusen (394 ± 49 pg/ml) signifikant niedriger als im Plasma von Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen (Abb. 31). Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>-Mäuse (1696 ± 421 pg/ml) erreichten jedoch signifikant höhere Aldosteronkonzentrationen als Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse (p < 0,05, ANOVA) (Abb. 31).



**Abbildung 31:** Arithmetische Mittelwerte ± SEM der Aldosteronkonzentrationen im Plasma (n = 10-18) von Klotho-defizienten Mäusen (Klotho<sup>kl/kl</sup>) und Wildtypen (Klotho<sup>+/+</sup>), die Vitamin-D-haltige Kontrolldiät bekamen (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup> und Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>) sowie von Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen, die Vitamin-D-arme Diät kontinuierlich (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>) oder nur während der ersten vier Lebenswochen und anschließend Kontrolldiät erhielten (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>). “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen (ANOVA, p < 0,05), “#” weist auf einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen hin (ANOVA, p < 0,01).

### 3.16 Plasmaosmolalität

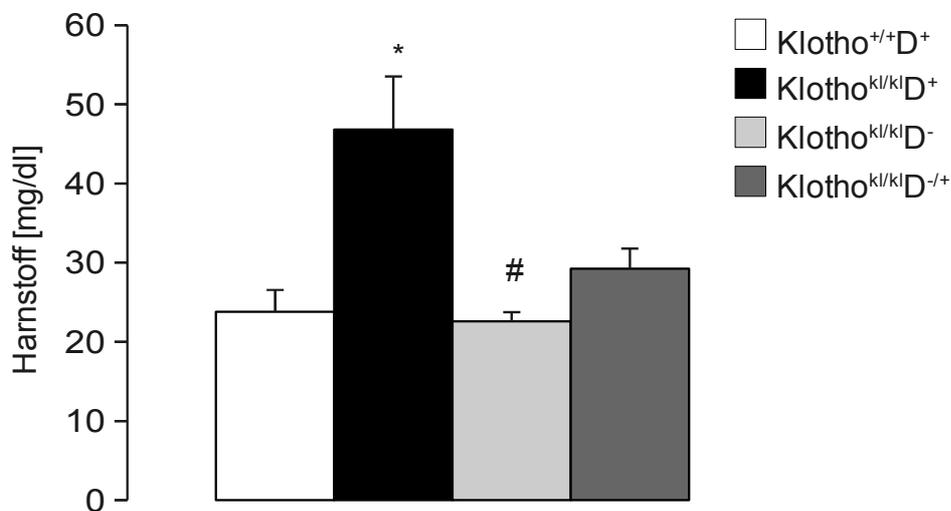
Wie Abbildung 32 zeigt, wiesen Klotho-defiziente Mäuse (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>) eine signifikant höhere Plasmaosmolalität als altersentsprechende Wildtypen (Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>) auf (295,8 ± 3,8 vs. 307,1 ± 3,8 mmol/kg H<sub>2</sub>O). Beide Gruppen erhielten Vitamin-D-haltige Kontrolldiät.



**Abbildung 32:** Arithmetische Mittelwerte ± SEM der Plasmaosmolalität (n = 22-23) von Klotho-defizienten Mäusen (Klotho<sup>kl/kl</sup>) und Wildtypen (Klotho<sup>+/+</sup>), die Vitamin-D-haltige Kontrolldiät bekamen (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup> und Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>). “\*” markiert einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen (t-Test, p < 0,05).

### 3.17 Harnstoffkonzentration

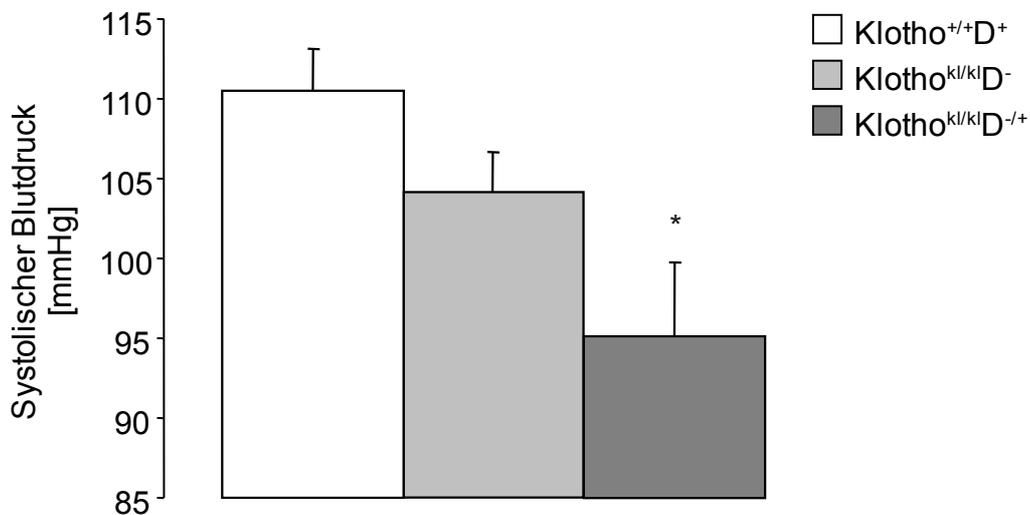
Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse (46,8 ± 6,7 mg/dl) besaßen signifikant höhere Harnstoffkonzentrationen als Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse (23,8 ± 2,7 mg/dl) (Abb. 33). Sowohl dauerhafte als auch vorübergehende Vitamin-D-arme Diät führte zu einer Normalisierung der Harnstoffkonzentration. Dementsprechend hatten Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup> (22,6 ± 1,2 mg/dl) und Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>-Mäuse (29,3 ± 2,5 mg/dl) ähnliche Harnstoffkonzentrationen im Plasma wie Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse (Abb. 33).



**Abbildung 33:** Arithmetische Mittelwerte ± SEM der Harnstoffkonzentration im Plasma von Wildtypen (Klotho<sup>+/+</sup>) und Klotho-defizienten Mäusen (Klotho<sup>kl/kl</sup>), die Vitamin-D-haltige Kontrolldiät bekamen (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup> und Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>, n = 7-8) sowie von Klotho-defizienten Mäusen, die dauerhaft Vitamin-D-arme Diät (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>, n = 3) beziehungsweise in den ersten vier Lebenswochen Vitamin-D-arme Diät und anschließend Kontrolldiät (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>, n = 5) erhielten. “\*” zeigt einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen an, “#” indiziert einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen (ANOVA, p < 0,05).

### 3.18 Blutdruck

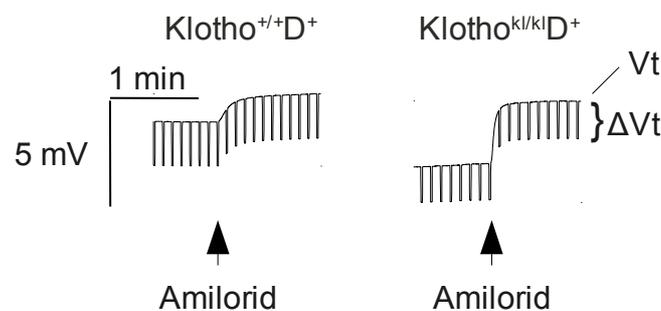
Aufgrund der geringen Größe der  $Klotho^{kl/kl}D^+$ -Mäuse war die Bestimmung des Blutdrucks bei diesen Tieren nicht möglich. Jedoch wiesen  $Klotho^{kl/kl}D^{-/+}$ -Mäuse ( $95,1 \pm 4,6$  mmHg) signifikant niedrigere Blutdruckwerte auf als  $Klotho^{+/+}D^+$ -Mäuse ( $110,5 \pm 2,6$  mmHg) (Abb. 34). Der Blutdruck von  $Klotho^{kl/kl}D^-$ -Mäusen ( $104,1 \pm 2,5$  mmHg) lag zwischen dem von  $Klotho^{kl/kl}D^{-/+}$ - und  $Klotho^{+/+}D^+$ -Mäusen (Abb. 34).



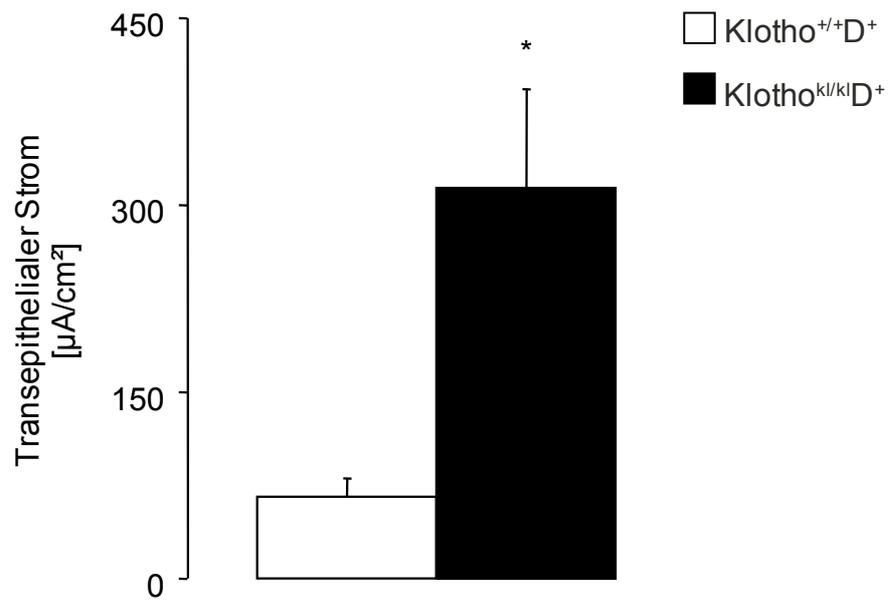
**Abbildung 34:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 12-22$ ) des systolischen Blutdrucks von Wildtypen ( $Klotho^{+/+}$ ), die mit Vitamin-D-haltiger Kontrolldiät gefüttert wurden ( $Klotho^{+/+}D^+$ ) und  $Klotho$ -defizienten Mäusen ( $Klotho^{kl/kl}$ ), die kontinuierlich Vitamin-D-arme Diät erhielten ( $Klotho^{kl/kl}D^-$ ) oder nur in den ersten vier Lebenswochen mit anschließendem Umstieg auf Kontrolldiät ( $Klotho^{kl/kl}D^{-/+}$ ). “\*” zeigt einen signifikanten Unterschied zu  $Klotho^{+/+}D^+$ -Mäusen (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

### 3.19 ENaC-Aktivität im Kolon

Um eine herabgesetzte Aldosteronsensitivität der Zielgewebe von Mineralokortikoiden auszuschließen, wurden Experimente mit der Ussing-Kammer am terminalen Kolon von  $Klotho^{kl/kl}D^+$ - und  $Klotho^{+/+}D^+$ -Mäusen durchgeführt. Wie Abbildung 35 zeigt, bewirkt die Zugabe des EnaC-Blockers Amilorid bei beiden Gruppen eine Abnahme der transepithelialen Potentialdifferenz. Die Versuche ergaben bei  $Klotho^{kl/kl}D^+$ -Mäusen ( $314,1 \pm 79,2 \mu A/cm^2$ ) einen signifikant höheren Amilorid-sensitiven Strom als bei  $Klotho^{+/+}D^+$ -Mäusen ( $65,3 \pm 15,5 \mu A/cm^2$ ) und damit eine erhöhte ENaC-Aktivität bei Klotho-defizienten Mäusen (Abb. 35 und 36).



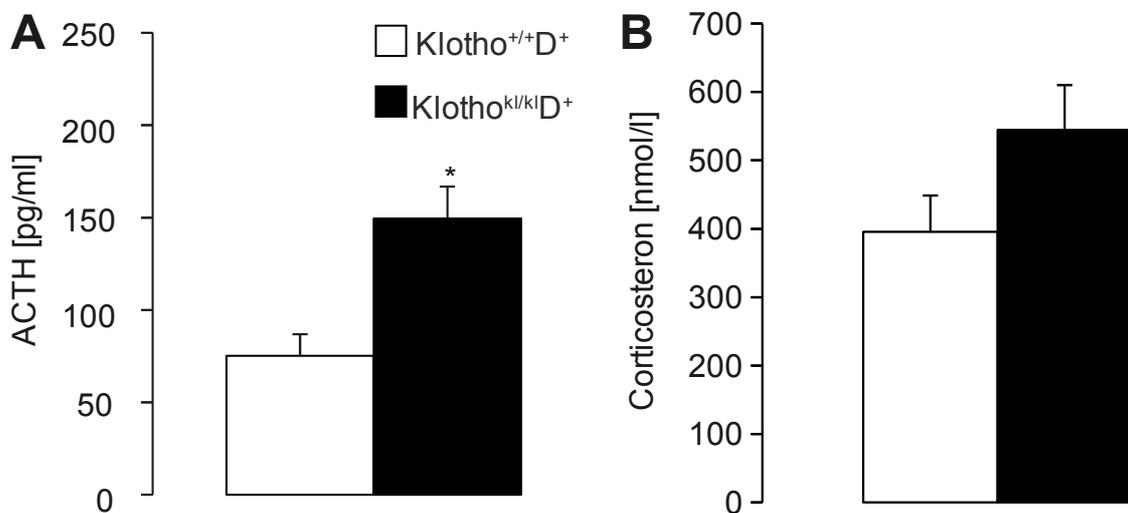
**Abbildung 35:** Repräsentative originale Aufzeichnungen der transepithelialen Potentialdifferenz im Kolon ( $V_t$ ) vor und nach Zugabe von Amilorid bei Klotho-defizienten Mäusen ( $Klotho^{kl/kl}$ ) und Wildtypen ( $Klotho^{+/+}$ ), die beide Vitamin-D-haltige Kontrolldiät erhielten ( $Klotho^{kl/kl}D^+$  und  $Klotho^{+/+}D^+$ ). Die Zugabe des EnaC-Blockers Amilorid ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.  $\Delta V_t$  gibt die durch kurze Stromimpulse induzierte Änderung der Potentialdifferenz an.



**Abbildung 36:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 4-5) der Amilorid-sensitiven transepithelialen Ströme entlang des distalen Kolonepithels von Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>- und Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen, die durch Zugabe von 50  $\mu$ M Amilorid ermittelt wurden. “\*” zeigt einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen an (t-Test, p < 0,05).

### 3.20 ACTH- und Corticosteronkonzentration im Plasma

Unter Vitamin-D-haltiger Kontrolldiät wiesen Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse (149 ± 17 pg/ml, n = 4) signifikant höhere ACTH-Konzentrationen als Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse (75 ± 12 pg/ml, n = 5) auf (Abb. 37 A). Vitamin-D-Restriktion bewirkte hier keine Besserung, so dass die Werte von Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>-Mäusen ähnlich erhöht waren (157 ± 27 pg/ml, n = 4). Auch die Corticosteronkonzentration nahm bei Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>-Mäusen tendenziell höhere Werte ein als bei Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>-</sup>-Mäusen (544 ± 66 vs. 396 ± 53 nmol/l, n = 15) (Abb. 37 B). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.



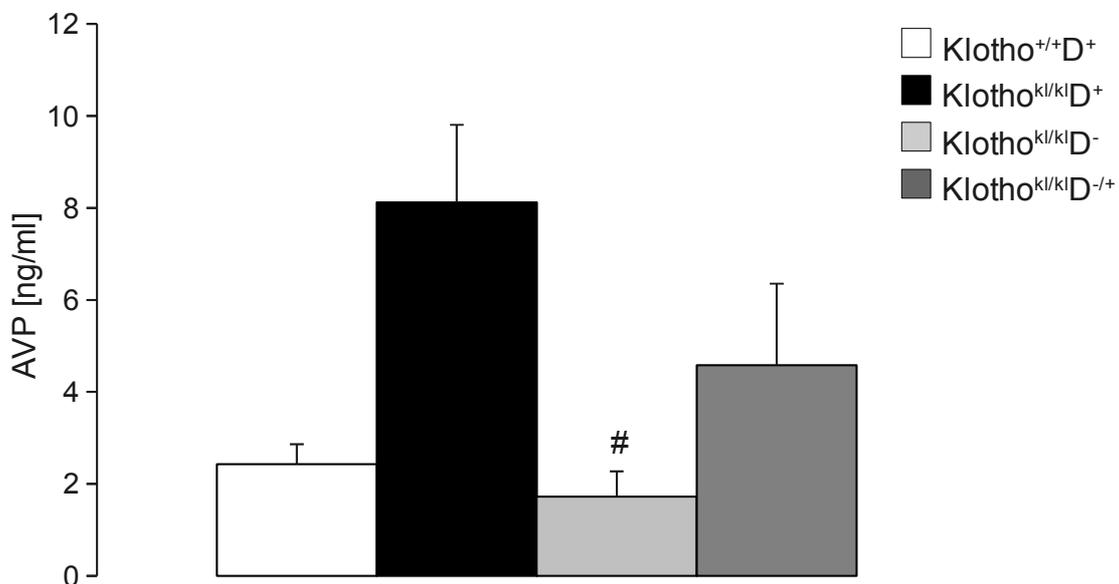
**Abbildung 37:** Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron

**A:** Arithmetische Mittelwerte ± SEM (n = 4-5) der ACTH-Konzentration im Plasma von Wildtypen und Klotho-defizienten Mäusen, die Vitamin-D-haltige Kontrolldiät bekamen (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup> und Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>). “\*” zeigt einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen an (t-Test, p < 0,01).

**B:** Arithmetische Mittelwerte ± SEM (n = 15) der Corticosteronkonzentration im Plasma Klotho-defizienter Mäuse und Wildtypen, die Vitamin-D-haltige Kontrolldiät erhielten (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup> und Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>).

### 3.21 Plasmakonzentration von AVP

Wie Abbildung 38 zeigt, lag die Plasmakonzentration von AVP bei Klotho-defizienten Mäusen mit Kontrolldiät (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>) mit  $8,1 \pm 1,7$  ng/ml tendenziell höher als bei Wildtypen (Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>), deren AVP-Konzentration  $2,4 \pm 0,4$  ng/ml betrug. Im direkten Vergleich war der Unterschied statistisch signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ). Vitamin-D-arme Diät führte zur Erniedrigung der AVP-Konzentration bei Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen (Abb. 38). Dementsprechend lagen die Werte von Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>-Mäusen bei  $1,7 \pm 0,6$  ng/ml. Bei Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>-Mäusen nahm die AVP-Konzentration mit  $4,6 \pm 1,8$  ng/ml einen mittleren Wert ein.



**Abbildung 38:** Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 5-7$ ) der AVP-Konzentration im Plasma von Wildtypen (Klotho<sup>+/+</sup>) und Klotho-defizienten Mäusen (Klotho<sup>kl/kl</sup>), die Vitamin-D-haltige Kontrolldiät bekamen (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup> und Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>) sowie von Klotho-defizienten Mäusen, die dauerhaft Vitamin-D-arme Diät (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>) beziehungsweise in den ersten vier Lebenswochen Vitamin-D-arme Diät und anschließend Kontrolldiät (Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>) erhielten. “#” markiert einen signifikanten Unterschied zu Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Überlegungen zur Bedeutsamkeit der Versuche

Klotho erfüllt nicht nur bei der Maus wichtige Funktionen, sondern auch beim Menschen konnte die enorme Bedeutsamkeit dieses Gens nachgewiesen werden (siehe Kapitel 1.3). Unter anderem sind bestimmte Genpolymorphismen von Klotho mit einem erhöhten Risiko für Arteriosklerose und Schlaganfälle sowie mit einer verkürzten Lebensspanne assoziiert (6, 41). Daher ist es erstrebenswert die genaue Funktionsweise des neu entdeckten Klotho-Gens zu erforschen und somit eine Grundlage für die Entwicklung eventuell zukünftiger Therapieoptionen zu schaffen.

Ein Mangel an Klotho lässt viele Parallelen zu menschlichen Alterungsprozessen erkennen (siehe Kapitel 1.2). Bei älteren Individuen sind vor allem Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems und Einschränkungen der Nierenfunktion häufig zu beobachten (75). Bislang konnte beispielsweise eine positive Wirkung von Klotho auf die Genese arteriosklerotischer Veränderungen und auf die Endothelfunktion gezeigt werden (siehe Kapitel 1.2.3). Eine mit zunehmendem Alter gehäuft auftretende Arteriosklerose führt zu Gefäßverschlüssen, die sich etwa in Form eines Herzinfarktes oder Schlaganfalls präsentieren können (45, 100, 122). Gefäßverschlüsse können jedoch auch von Erythrozyten, die den programmierten Zelltod durchlaufen, verursacht werden (20, 68, 150). Im Rahmen der sogenannten Eryptose kommt es zur Phosphatidylserinexposition an der Erythrozytenoberfläche (27, 68). Dies ermöglicht das Adhärenieren roter Blutkörperchen an Gefäßwände und führt schließlich zum Gefäßverschluss (20, 27, 68, 150). Daher besitzt die Feststellung eines möglichen Einflusses von Klotho auf die Alterung von Erythrozyten und deren programmierten Zelltod enorme Relevanz.

Eine eingeschränkte Funktion der Nieren, die als einer der Hauptexpressionsorte für Klotho gelten, ist nicht nur bei Ratten oder Mäusen

sondern auch beim Menschen mit einer reduzierten Klothoexpression assoziiert (2, 59, 134, 145). Folglich besitzt auch der Einfluss von Klotho und Klotho-abhängiger Calcitriolbildung auf den Mineralstoff-, Elektrolyt- und Flüssigkeits-haushalt, an deren Regulation die Nieren maßgeblich beteiligt sind (vergleiche Kapitel 1.4 und 1.5), enorme Bedeutung.

## **4.2 Fehlerdiskussion**

### **4.2.1 Vergleichbarkeit trotz unterschiedlich großer Tiere**

Die Multimorbidität der Klotho-defizienten Mäuse bringt einige Schwierigkeiten bei der Durchführung von Versuchen mit sich. So wird beispielsweise der Vergleich mit Wildtypen durch die enormen Größenunterschiede zum Teil deutlich erschwert. Um dieses Problem zu umgehen wurden die Ergebnisse falls nötig auf das Körpergewicht bezogen angegeben, so zum Beispiel die Trinkmenge und das Milzgewicht der Mäuse.

### **4.2.2 Blutdruckmessung**

Die geringe Größe der Klotho-defizienten Mäuse machte unter anderem eine Blutdruckmessung mittels Schwanzplethysmographie bei diesen Tieren unmöglich. Daher wurden für dieses Experiment Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>-Mäuse, die eine Zeit lang Vitamin-D-arme Diät erhielten, als Ersatz für die kleinen gebrechlichen Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse eingesetzt und mit Wildtypen verglichen. Da Vitamin-D-arme Diät das Auftreten der bei Klotho-defizienten Mäusen vorliegenden Pathologien unterdrückt, ist damit zu rechnen, dass bei Verwendung der Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>-Mäuse der Nachweis eines im Vergleich zu Wildtypen statistisch signifikanten Unterschiedes erschwert wird. Folglich kann angenommen werden, dass der Blutdruck von Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen noch geringere Werte einnimmt als der bereits erniedrigte Blutdruck von Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>-Mäusen.

### **4.2.3 Schwierigkeiten aufgrund der Multimorbidität von Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen**

Die gebrechlichen Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse reagieren aufgrund der schweren Auswirkungen der Klothodefizienz enorm empfindlich auf Stresssituationen (vergleiche Kapitel 1.2.3). Daher war eine Urindiagnostik über 24-Stunden nicht durchführbar. Die Mäuse mussten dafür in Einzelkäfige mit einem Gitterboden gesetzt werden, durch den der Urin abfließen und anschließend gesammelt werden kann. Bereits in der Trainingsphase verloren die Klotho-defizienten Mäuse stark an Gewicht, weshalb der Versuch abgebrochen werden musste.

### **4.3 Versuche zur Eryptose**

Die Analyse des Blutbildes Klotho-defizienter Mäuse ergab gegenüber Wildtypen einen massiv gesteigerten Retikulozytenanteil bei vergleichsweise gering erhöhter Erythrozytenzahl. Zusätzlich waren die Erythrozyten Klotho-defizienter Mäuse mikrozytär im Vergleich zu denjenigen von Wildtypen (siehe Kapitel 3.1). Retikulozyten sind unreife Vorstufen der Erythrozyten. Der erhöhte Retikulozytenanteil weist demnach auf eine gesteigerte Erythropoiese, die Neubildung von Erythrozyten hin (38, 111).

#### **4.3.1 Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und Zellvolumen**

Ein Mangel an Klotho ist mit vermehrtem oxidativem Stress assoziiert (164), der nachweislich zur Aktivierung Ca<sup>2+</sup>-permeabler Kationenkanäle führen kann (26). In den vorliegenden Experimenten wiesen die Erythrozyten Klotho-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Erythrozyten erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen auf. Dies war an einer verstärkten Fluo3-Fluoreszenz von Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten erkennbar (siehe Kapitel 3.3). Unter dem Einfluss von Ionomycin, das zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität des maximal aktivierten Färbemittels Fluo3/AM eingesetzt wurde, war dieser Unterschied aufgehoben. Folglich beruhte der beobachtete Unterschied in der Fluo3-Fluoreszenz von Klotho<sup>kl/kl</sup>- und

Klotho<sup>+/+</sup>-Erythrozyten nicht auf einer unterschiedlichen Färbung mit Fluo3/AM. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten darüber hinaus bei Klotho-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erniedrigte MCV-Werte und eine Verminderung des Forward Scatters der Erythrozyten (siehe Kapitel 3.1 und 3.4). Folglich ist das Zellvolumen von Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten reduziert. Es ist bereits erwiesen, dass eine Zunahme der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Aktivität sowohl das Scrambling der Zellmembran als auch die Zellschrumpfung stimuliert (67, 70). Ein Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt zur Aktivierung des Ca<sup>2+</sup>-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanals und damit zum Austritt von positiv geladenem Kalium aus der Zelle. Dadurch wird die Zellmembran hyperpolarisiert und zusätzlich für Cl<sup>-</sup>-Ionen durchlässig, die anschließend aus der Zelle strömen. Der zelluläre Verlust von KCl führt schließlich zu osmotisch bedingtem Wasserausstrom und daher zur Zellschrumpfung (13, 65, 68). Es ist also anzunehmen, dass die erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Aktivität der Auslöser für das bei Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten verminderte Zellvolumen ist oder zumindest dazu beiträgt.

#### **4.3.2 Phosphatidylserinexposition**

Die Schrumpfung von Zellen sowie eine Zunahme der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration fördern das Scrambling der Zellmembran, welches durch Phosphatidylserinexposition an der Erythrozytenoberfläche gekennzeichnet ist (10, 65, 125). Phosphatidylserin-exponierende Erythrozyten binden an entsprechende Rezeptoren, die sich auf Makrophagen befinden (29). Diese umströmen Phosphatidylserin-exponierende Zellen und bauen sie ab. Folglich beschleunigt eine vermehrte Phosphatidylserinexposition die Beseitigung von Erythrozyten aus dem zirkulierenden Blut (54, 68).

Der prozentuale Anteil an Annexin-V-bindenden und damit Phosphatidylserin-exponierenden Erythrozyten war in frisch gewonnenem Blut Klotho-defizienter Mäuse (0,7 %) beinahe doppelt so hoch wie in frisch gewonnenem Blut von Wildtypen (0,4 %) (siehe Kapitel 3.5). Aufgrund der raschen Beseitigung Phosphatidylserin-exponierender Erythrozyten bleibt der Anteil dieser Zellen im

zirkulierenden Blut Klotho-defizienter Mäuse gering. Dennoch bedeutet ein derartig erhöhter Anteil an Phosphatidylserin-exponierenden Erythrozyten eine erhebliche Verkürzung der mittleren Lebensspanne von Erythrozyten. Solange *in vitro* Bedingungen vorliegen, werden Phosphatidylserin-exponierende Erythrozyten nicht beseitigt, was zu einem allmählichen Anstieg des prozentualen Anteils eryptotischer Zellen führt. Folglich deckt eine Inkubation *in vitro* selbst die feinsten Änderungen der Phosphatidylserinexposition von Erythrozyten auf, so dass der Anteil Annexin-V-bindender Erythrozyten von Klotho-defizienten Mäusen nach 48 Stunden Inkubation sogar 3,5-fach höher lag als derjenige von Wildtypen (siehe Kapitel 3.5). Der Unterschied konnte durch Inkubation mit EIPA, einem Inhibitor des erythrozytären Kationenkanals aufgehoben werden (siehe Kapitel 3.6). Es ist daher anzunehmen, dass die gesteigerte Phosphatidylserinexposition der Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten durch vermehrten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom zustande kommt.

#### **4.3.3 Hinweise auf einen erhöhten Erythrozytenumsatz**

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Klotho-defiziente Erythrozyten alle charakteristischen Merkmale einer gesteigerten Eryptose erfüllen (vergleiche Kapitel 1.7): Sie weisen im Vergleich zu Wildtyp-Erythrozyten eine erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und Phosphatidylserinexposition an der Zellmembran bei gleichzeitig reduziertem Zellvolumen auf.

Eine verstärkte Eryptose kann durch vermehrte Bildung von Erythrozyten kompensiert werden, wodurch die Entstehung einer Anämie verhindert werden kann. Der erhöhte Retikulozytenanteil im Blut Klotho-defizienter Mäuse wies auf eine ausreichend gesteigerte Erythropoese hin, die den erhöhten Verlust zirkulierender Erythrozyten vollständig ausgleichen konnte. Unter Bedingungen, die mit einer zusätzlichen Stimulation der Eryptose verbunden sind, könnte die kompensatorisch gesteigerte Bildung neuer Erythrozyten jedoch nicht mehr ausreichen. Dazu gehören beispielsweise oxidativer Stress und

Energiedepression (57, 68).

Die gesteigerte Sequestrierung von Erythrozyten kann eine Splenomegalie auslösen. In G-kinase-defizienten Mäusen war eine Splenomegalie jedoch erst im Alter von zehn Wochen erkennbar, das heißt jenseits der durchschnittlichen Lebensspanne von  $Klotho^{kl/kl}$ -Mäusen (31). Vermutlich leben  $Klotho^{kl/kl}$ -Mäuse nicht lange genug, um eine Splenomegalie entwickeln zu können, denn das Milzgewicht war bezogen auf das Körpergewicht nicht signifikant verschieden zwischen Wildtypen und  $Klotho$ -defizienten Mäusen (siehe Kapitel 3.2). Eine andere Möglichkeit wäre, dass erythrotische Erythrozyten von  $Klotho^{kl/kl}$ -Mäusen nicht primär in der Milz sequestriert werden. Phosphatidylserin-exponierende Erythrozyten könnten zum Beispiel, außer dass sie Kandidaten für die Phagozytose und damit für die Beseitigung aus dem zirkulierenden Blut sind, auch an Gefäßwände adhären und dadurch zur Hämostase beitragen (5, 19, 35).

#### **4.3.4 Auswirkung von oxidativem Stress und Energiemangel**

Oxidativer Stress und Energiemangel stimulieren bekanntermaßen das Auftreten von Eryptose (65). Die bei  $Klotho$ -defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen signifikant stärkere Zunahme der Annexin-V-Bindung von Erythrozyten nach Zugabe von tert-BOOH deutete auf eine vermehrte Empfindlichkeit der  $Klotho^{kl/kl}$ -Erythrozyten gegenüber oxidativem Stress hin (siehe Kapitel 3.7). Auch gegenüber Energiemangel, der in den vorliegenden Versuchen durch Glukoseentzug erreicht wurde, schienen Erythrozyten  $Klotho$ -defizienter Mäuse weniger resistent zu sein. Denn auch hier wiesen  $Klotho^{kl/kl}$ -Erythrozyten eine gegenüber  $Klotho^{+/+}$ -Erythrozyten signifikant stärkere Zunahme der Annexin-V-Bindung auf. (siehe Kapitel 3.8).

#### 4.3.5 Einfluss von Calcitriol und Vitamin-D-armer Diät auf die Eryptose

Calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) fördert den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in verschiedene Zelltypen (18, 44, 123, 135). Exzessiver  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom stimuliert jedoch nachweislich die Apoptose kernhaltiger Zellen (105). Daher liegt die Vermutung nahe, dass ein Klothomangel, der mit massiv gesteigerter Calcitriolbildung einhergeht (145), den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und den suizidalen Tod kernhaltiger Zellen in ähnlicher Weise beeinflussen könnte. Viele Substanzen, die das Auftreten von Apoptose fördern, stimulieren auch den erythrozytären Zelltod. Dazu gehören Thrombospondin, CD95/Fas-Rezeptor-Aktivierung, osmotischer Schock, Prostaglandin  $\text{PGE}_2$ , Plättchen aktivierender Faktor (PAF), Ceramid (Acylsphingosin), Paclitaxel, Amantadin, Cyclosporin, Valinomycin, Quecksilber, Kupfer und Amyloid-Peptide (65). Vorhergehende Studien haben sowohl antiapoptotische (173) als auch proapoptotische Effekte (37, 77, 80, 90, 107, 151) von Calcitriol beschrieben.

In den vorliegenden Versuchen hob Vitamin-D-Restriktion die Auswirkungen der Klothodefizienz auf das Überleben von Erythrozyten ähnlich auf, wie es für die Beeinflussung der Lebensspanne durch Klotho und Vitamin D gezeigt wurde (145). Dementsprechend verhinderte Vitamin-D-arme Diät sowohl den beschleunigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom als auch die gesteigerte Eryptose von Erythrozyten Klotho-defizienter Mäuse (siehe Kapitel 3.9).

Die massiv erhöhten Calcitriolkonzentrationen der Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäuse könnten zu einer Hochregulation von Kationenkanälen führen. Offensichtlich ist die Aktivität der Kationenkanäle nicht hoch genug um eine signifikante Eryptose bei normalen Calcitriolkonzentrationen, wie sie bei Wildtypen vorliegen, auszulösen. Dementsprechend führte eine Vitamin-D-arme Diät bei Wildtypen nicht zu einer signifikanten Abnahme der Eryptose. Auch eine Inkubation mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bewirkte *in vitro* keine nennenswerte Änderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität oder Phosphatidylserinexposition von Wildtyp-Erythrozyten (siehe Kapitel 3.9-3.10). Möglicherweise resultiert die Calcitriol-induzierte Stimulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms mit nachfolgender Eryptose eher aus einer genomischen Hochregulation von Kationenkanälen beziehungsweise deren Regulatoren als

aus nicht-genomischer Aktivierung dieser Kanäle. Die gegenwärtigen Beobachtungen weisen jedenfalls auf eine bedeutende Rolle von Calcitriol bei der Stimulation des programmierten Zelltodes von Erythrozyten Klotho-defizienter Mäuse hin. Dennoch schließen die vorliegenden Beobachtungen nicht aus, dass Klothodefizienz nicht nur aufgrund erhöhter Calcitriolbildung, sondern zusätzlich aufgrund anderer Mechanismen wirksam sein könnte.

#### **4.4 Versuche zum Mineralstoff- und Elektrolythaushalt**

##### **4.4.1 Einfluss von Klotho und Vitamin-D-armer Diät auf den $\text{Ca}^{2+}$ - und Phosphathaushalt**

Die vorliegenden Beobachtungen bestätigen den bedeutenden Einfluss von Klotho auf die Bildung von Calcitriol und PTH (114, 145, 170) sowie auf die Plasmakonzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$  (61) und Phosphat (126) (siehe Kapitel 3.12 und 3.14). Klotho nimmt an der Inhibition der  $1\alpha$ -Hydroxylase teil und verringert dadurch die Calcitriolbildung (114, 145, 170). Da Calcitriol den intestinalen und renalen  $\text{Ca}^{2+}$ - und Phosphattransport stimuliert (123, 126), ist die bei Klotho-defizienten Mäusen ungehemmte Calcitriolsynthese vermutlich zu einem großen Teil für die Hyperkalzämie und Hyperphosphatämie dieser Tiere verantwortlich (114, 145, 170). Dementsprechend wiesen Klotho-defiziente Mäuse gegenüber Wildtypen signifikant höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -, Phosphat- und Calcitriolkonzentrationen im Plasma auf, die jedoch durch diätetische Vitamin-D-Restriktion normalisiert werden konnten. Überraschenderweise lag die Calcitriolkonzentration im Plasma der Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>-Mäuse, die nur vorübergehend Vitamin-D-arme Diät erhielten, ebenfalls signifikant niedriger als bei Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen. Die bei Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>-Mäusen gemessenen Plasmakonzentrationen von  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$  und Calcitriol ähnelten eher jenen von dauerhaft Vitamin-D-arm behandelten Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-</sup>-Mäusen. Dabei ist zu bedenken, dass die Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>-Mäuse nur während der ersten vier Lebenswochen Vitamin-D-arme Diät und anschließend bis zur Versuchsdurchführung mindestens vier Wochen Vitamin-D-haltige Kontrolldiät erhielten.

Folglich hätte man eher erwartet, dass  $Klotho^{kl/kl}D^{-/+}$ -Mäuse den  $Klotho^{kl/kl}D^{+}$ -Mäusen entsprechende Werte aufweisen. Das Körpergewicht der  $Klotho^{kl/kl}D^{+}$ -Mäuse lag ebenfalls signifikant niedriger als das von  $Klotho^{+/+}D^{-}$ ,  $Klotho^{kl/kl}D^{-}$  und  $Klotho^{kl/kl}D^{-/+}$ -Mäusen. Letztere erreichten im Durchschnitt alle ein ähnliches Körpergewicht (siehe Kapitel 3.11). Eine vorübergehende Vitamin-D-Restriktion scheint also zumindest bezüglich Körpergewicht und Mineralstoffhaushalt ähnlich wirksam zu sein wie eine dauerhafte Vitamin-D-arme Diät. Die Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass ein Klothomangel mit nachfolgend erhöhter Calcitriolsynthese vor allem in den ersten Lebenswochen und weniger im höheren Alter der Mäuse bedeutsam sein könnte. Dafür sprechen auch die Versuchsergebnisse von Tsujikawa et al. (145), die eine verminderte Calcitriolsensitivität bei älteren  $Klotho$ -defizienten Mäusen aufdeckten. Außerdem konnte beim Menschen gezeigt werden, dass die  $Klotho$ expression altersabhängig erfolgt (160).

In Anbetracht der Streuung der Daten können andere zum gestörten  $Ca^{2+}$ - und Phosphathaushalt beitragende Mechanismen als die erhöhte Calcitriolkonzentration nicht ausgeschlossen werden. Schließlich konnte auch eine direkte Wirkung von  $Klotho$  auf den renalen Phosphat- und Kalziumtransport nachgewiesen werden (92).

#### **4.4.2 Einfluss eines Klothomangels und Vitamin-D-arter Diät auf den Volumen- und Elektrolythaushalt**

Die gegenwärtigen Beobachtungen offenbaren eine bisher unbekannte Auswirkung der  $Klotho$ defizienz, nämlich einen Hyperaldosteronismus.  $Klotho^{kl/kl}D^{+}$ - und  $Klotho^{kl/kl}D^{-/+}$ -Mäuse wiesen im Vergleich zu  $Klotho^{+/+}D^{+}$ -Mäusen signifikant erhöhte Aldosteronkonzentrationen im Plasma auf. Mit kontinuierlicher Vitamin-D-arter Diät erreichten  $Klotho$ -defiziente Mäuse Werte, die jenen von Wildtypen entsprachen (siehe Kapitel 3.15).

Der Volumen- und Elektrolythaushalt kann darüber Aufschluss geben, ob es sich um einen primären oder sekundären Hyperaldosteronismus handelt. Bei einem

primären Hyperaldosteronismus wären ein erhöhter Blutdruck, eine Hypokaliämie und eine metabolische Alkalose zu erwarten (vergleiche Kapitel 1.5.4). Die Kaliumkonzentrationen im Plasma waren jedoch unauffällig (siehe Kapitel 3.12). Der Säure-Basen-Haushalt deutete bei Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen aufgrund des im Vergleich zu Wildtypen tendenziell erniedrigten pH-Wertes bei gleichzeitig erhöhtem CO<sub>2</sub>-Partialdruck, Bikarbonat und Basenüberschuss eher auf eine teilweise kompensierte respiratorische Azidose hin als auf eine metabolische Alkalose (siehe Kapitel 3.13). Diese Beobachtung ist mit dem bei Klotho-defizienten Mäusen bereits bekannten Lungenemphysem vereinbar (vergleiche Kapitel 1.2.5). Um einen primären Hyperaldosteronismus kann es sich also nicht handeln. Dem Hyperaldosteronismus könnte jedoch ein Volumenmangel zugrunde liegen (131). Dabei wäre mit einem reduzierten Blutdruck zu rechnen (131). Bei den Klotho-defizienten Mäusen scheint die vermehrte Aldosteronfreisetzung in der Tat sekundär aufgrund eines Volumenmangels zu erfolgen, da der Hyperaldosteronismus bei Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>-/+</sup>-Mäusen mit einem im Vergleich zu Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen signifikant erniedrigten Blutdruck einher geht (siehe Kapitel 3.18). Ein extrazellulärer Volumenmangel führt außerdem zu einer Reduktion der renalen Harnstoffausscheidung und folglich zu einer Zunahme der Harnstoffkonzentration im Plasma (131). Somit deutete auch die erhöhte Harnstoffkonzentration im Plasma Klotho-defizienter Mäuse auf einen Volumenmangel hin. Ebenfalls für eine Volumendepletion sprachen die bei Klotho-defizienten Mäusen signifikant erhöhte Plasmaosmolalität und Natriumkonzentration im Plasma (siehe Kapitel 3.12, 3.16 und 3.17) (38). Darüber hinaus wiesen Klotho<sup>kl/kl</sup>D<sup>+</sup>-Mäuse im Vergleich zu Klotho<sup>+/+</sup>D<sup>+</sup>-Mäusen erhöhte Plasmakonzentrationen des Hormons AVP auf, welches ebenfalls bei Volumenmangel vermehrt sezerniert wird (vergleiche Kapitel 1.5.3). Vitamin-D-arme Diät führte zu einer Normalisierung der AVP-Werte (siehe Kapitel 3.21). Folglich deuteten alle Versuchsergebnisse auf einen durch Volumenmangel bedingten Hyperaldosteronismus der Klotho-defizienten Mäuse hin. Die gleichzeitig erhöhte Trinkmenge schloss eine reduzierte Flüssigkeitsaufnahme aus und deutete somit einen Wasserverlust an (siehe Kapitel 3.11).

#### **4.4.3 Mögliche Ursachen für den Volumenmangel Klotho-defizienter Mäuse**

Zumindest in der Theorie könnte die Volumendepletion der Klotho-defizienten Mäuse durch die exzessive Calcitriolsynthese und Hyperkalzämie mit nachfolgender Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Rezeptors (CasR) hervorgerufen worden sein. Der CasR reguliert die renale tubuläre  $\text{Na}^+$ -Reabsorption, indem seine Stimulation den  $\text{Na}^+$ -Transport hemmt und folglich zu Salzverlusten führt (1, 108, 152, 156). Aufgrund des Salzverlustes geht auch Wasser verloren, wodurch letztendlich ein Volumenmangel ausgelöst werden kann (1, 58, 108, 131, 154). Des Weiteren führt Vitamin-D-induzierte Hyperkalzämie zu einer verminderten Expression der Aquaporine AQP1-3, die an der renalen Wasserresorption beteiligt sind. Daraus resultiert eine eingeschränkte Harnkonzentrierungsfähigkeit mit Volumendepletion (1, 108, 155). Eine Vitamin-D-induzierte Hyperkalzämie hat außerdem durch Inhibition der Na-K-2Cl-Kotransporter renale Salzverluste und eine Reduktion des extrazellulären Volumens zur Folge (154). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Vitamin-D<sub>3</sub>-Mangel die Aktivität des  $\text{Na}^+$ -H<sup>+</sup>-Austauschers (NHE3) steigert (36). Folglich müssten erhöhte Calcitriolkonzentrationen eine Inhibition des Austauschers bewirken. Da Klotho die Expression der Na-K-ATPase stimuliert (43), könnte ein Mangel an Klotho rein theoretisch eine verminderte renale Na-K-ATPase-Aktivität mit sich bringen und auf diese Art und Weise die renale tubuläre Salzreabsorption sogar direkt beeinträchtigen.

#### **4.4.4 Aldosteronwirkung bei Klotho-defizienten Mäusen**

Der erniedrigte Blutdruck in Gegenwart des beobachteten Hyperaldosteronismus könnte aus einer herabgesetzten Aldosteronsensitivität der Zielgewebe von Mineralokortikoiden resultieren. Hyperaldosteronismus führt unter anderem zur Zunahme des elektrogenen  $\text{Na}^+$ -Transports im terminalen Kolon, welches von einem ähnlich Mineralokortikoid-sensitiven Epithel wie das renale Sammelrohr ausgekleidet ist, und steuert somit dem Volumenmangel entgegen (8). Die

vorliegenden Ergebnisse bestätigen eine dem Hyperaldosteronismus entsprechend erhöhte Aktivität des epithelialen Natriumkanals im Kolon Klotho-defizienter Mäuse (siehe Kapitel 3.19). Folglich kann ausgeschlossen werden, dass der Volumenmangel mit nachfolgendem Hyperaldosteronismus auf eine verminderte Aldosteronsensitivität der Mineralokortikoid-Zielgewebe zurückzuführen ist. Aldosteron ist demnach bei Klotho-defizienten Mäusen wirksam. Offensichtlich wird trotz vermehrter Aldosteronfreisetzung und normaler Aldosteronwirkung kein Ausgleich des Volumendefizits und des erniedrigten Blutdrucks erreicht.

#### **4.4.5 ACTH- und Corticosteronkonzentration bei Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen**

Neben dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System nimmt ACTH an der Regulation von Aldosteron teil. ACTH beeinflusst darüber hinaus jedoch hauptsächlich die Ausschüttung von Glukokortikoiden (131). Die Versuchsergebnisse brachten bei Klotho-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen signifikant erhöhte ACTH-Konzentrationen und tendenziell höhere Corticosteronkonzentrationen im Plasma zum Vorschein (siehe Kapitel 3.20). Vitamin-D-arme Diät bewirkte jedoch keine Normalisierung der bei Klotho-defizienten Mäusen gesteigerten ACTH-Freisetzung, die folglich andere Ursachen als eine exzessive Calcitriolbildung haben muss. Dabei ist zu bedenken, dass Klotho unter anderem im Plexus choroideus exprimiert wird und im Liquor nachgewiesen werden kann (42, 140, 145). Es ist also denkbar, dass ein Klothomangel cerebrale Funktionen und die hypothalamische Regulation der Hormonfreisetzung auf direkterem Weg beeinflussen könnte.

#### **4.5 Schlussfolgerung**

Ein Mangel an Klotho stimuliert die vorzeitige Alterung und den programmierten Zelltod von Erythrozyten. Dies ist anhand einer erhöhten intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, einer vermehrten Phosphatidylserinexposition an der Zellmembran

und einer Zellschrumpfung von Erythrozyten Klotho-defizienter Mäuse erkennbar. Dafür scheint die ebenfalls gesteigerte Calcitriolbildung zumindest teilweise verantwortlich zu sein, denn Vitamin-D-arm behandelte Klotho-defiziente Mäuse weisen keine vermehrte Eryptose auf. Folglich bewirkt der Klothomangel eine indirekte Stimulation der Eryptose. Das Entstehen einer Anämie wird bei den Klotho-defizienten Mäusen durch eine gleichzeitig gesteigerte Neubildung von Erythrozyten verhindert.

Die vermehrte Phosphatidylserinexposition an der Erythrozytenoberfläche ermöglicht deren Adhäsion an Gefäßwände und kann auf diese Art und Weise einen Gefäßverschluss verursachen (20, 27, 68, 150). Somit könnte ein Klothomangel das Auftreten von Gefäßverschlüssen begünstigen.

Die vorliegenden Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse früherer Studien bezüglich des  $\text{Ca}^{2+}$ - und Phosphathaushalts Klotho-defizienter Mäuse (61, 114, 126, 145, 170): Klothomangel führt zu einer exzessiven Calcitriolsynthese sowie zu einer Hyperkalzämie und Hyperphosphatämie. Auch hier bewirkt Vitamin-D-Restriktion eine Normalisierung der Werte. Die Hyperkalzämie und die Hyperphosphatämie sind also zumindest teilweise auf die vermehrte Calcitriolsynthese zurückzuführen.

Darüber hinaus führt ein Mangel an Klotho nicht nur zu einem gestörten Mineralstoffhaushalt sondern auch zu schweren Störungen des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts, die einen offensichtlich durch Volumenmangel bedingten reduzierten Blutdruck und sekundären Hyperaldosteronismus zur Folge haben. Ähnlich wie für die Lebensspanne, das Wachstumsdefizit und das Überleben der Erythrozyten Klotho-defizienter Mäuse (siehe Kapitel 1.2.8 und 3.9) gezeigt wurde, kann Vitamin-D-Restriktion die Auswirkungen der Klothodefizienz auf den Mineralstoff- und Elektrolythaushalt sowie den Hyperaldosteronismus aufheben. Folglich ist davon auszugehen, dass die exzessive  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Bildung bedeutend zu dem bei Klothomangel beobachteten Hyperaldosteronismus beiträgt oder ihn sogar verursacht.

## 5 Zusammenfassung

Klotho ist ein Protein, das überwiegend in den Epithelkörperchen, in der Niere sowie im Plexus choroideus gebildet wird und sowohl im Blut als auch im Liquor nachweisbar ist (43). Es konnten bereits vielfältige und weitreichende Auswirkungen eines Klothomangels festgestellt werden (siehe Kapitel 1.1-1.4).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse können darüber hinaus eine gesteigerte Eryptose sowie ein Volumenmangel mit nachfolgendem Hyperaldosteronismus und erhöhter AVP-Freisetzung als Folgen einer reduzierten Klotho-Genexpression festgestellt werden. Vitamin-D-arme Diät beseitigt jeweils die Unterschiede zwischen Klotho-defizienten Mäusen und Wildtypen. Daher sind die Beobachtungen vermutlich auf die bei Klotho-defizienten Mäusen erhöhten Calcitriolkonzentrationen zurückzuführen (vergleiche Kapitel 3.14) und damit eine indirekte Folge des Klothomangels. Andere, zusätzlich beteiligte Mechanismen können bisher jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Versuchsergebnisse deuten dennoch auf eine bedeutende Funktion von Klotho bei der Regulation der Eryptose sowie des Mineralstoff-, Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalts hin.

Die bei Klotho-defizienten Mäusen gesteigerte Eryptose wird offensichtlich durch einen erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ausgelöst. Erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität führt in Erythrozyten zur Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver  $\text{K}^+$ -Kanäle (Gardos-Kanäle), die den Austritt von  $\text{KCl}$  mit nachfolgendem, osmotisch bedingtem Wasserausstrom begünstigen (65). Daher kann bei Klotho-defizienten Mäusen auch ein verringertes Erythrozytenvolumen festgestellt werden. Sowohl die erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als auch die Zellschrumpfung stimulieren das Scrambling der Erythrozytenmembran, wodurch Phosphatidylserin als charakteristisches Merkmal der Eryptose an der Zelloberfläche präsentiert wird (65). Dies schlägt sich in einem erhöhten Anteil

Annexin-V-bindender Erythrozyten nieder.

Zusätzlich zu der unter normalen Bedingungen gesteigerten Eryptose, reagieren die Erythrozyten Klotho-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Erythrozyten empfindlicher auf Eryptose-triggernde Faktoren wie oxidativer Stress oder Energiedepletion, was an einer signifikant stärkeren Zunahme der Annexin-V-Bindung unter dem Einfluss von tert-BOOH und Glukoseentzug erkennbar ist.

Vitamin-D-arme Diät normalisiert sowohl die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten als auch den Anteil der Annexin-V-bindenden Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten, weshalb eine ursächliche Beteiligung von Calcitriol an der gesteigerten Eryptose Klotho-defizienter Mäuse angenommen werden kann.

Der beschleunigte Zelltod der Klotho<sup>kl/kl</sup>-Erythrozyten wird zwar unter normalen Bedingungen durch eine verstärkte Neubildung ausgeglichen, ist aber dennoch enorm bedeutsam, da die zugrunde gehenden, Phosphatidylserin-exponierenden Erythrozyten zu Gefäßverschlüssen führen könnten.

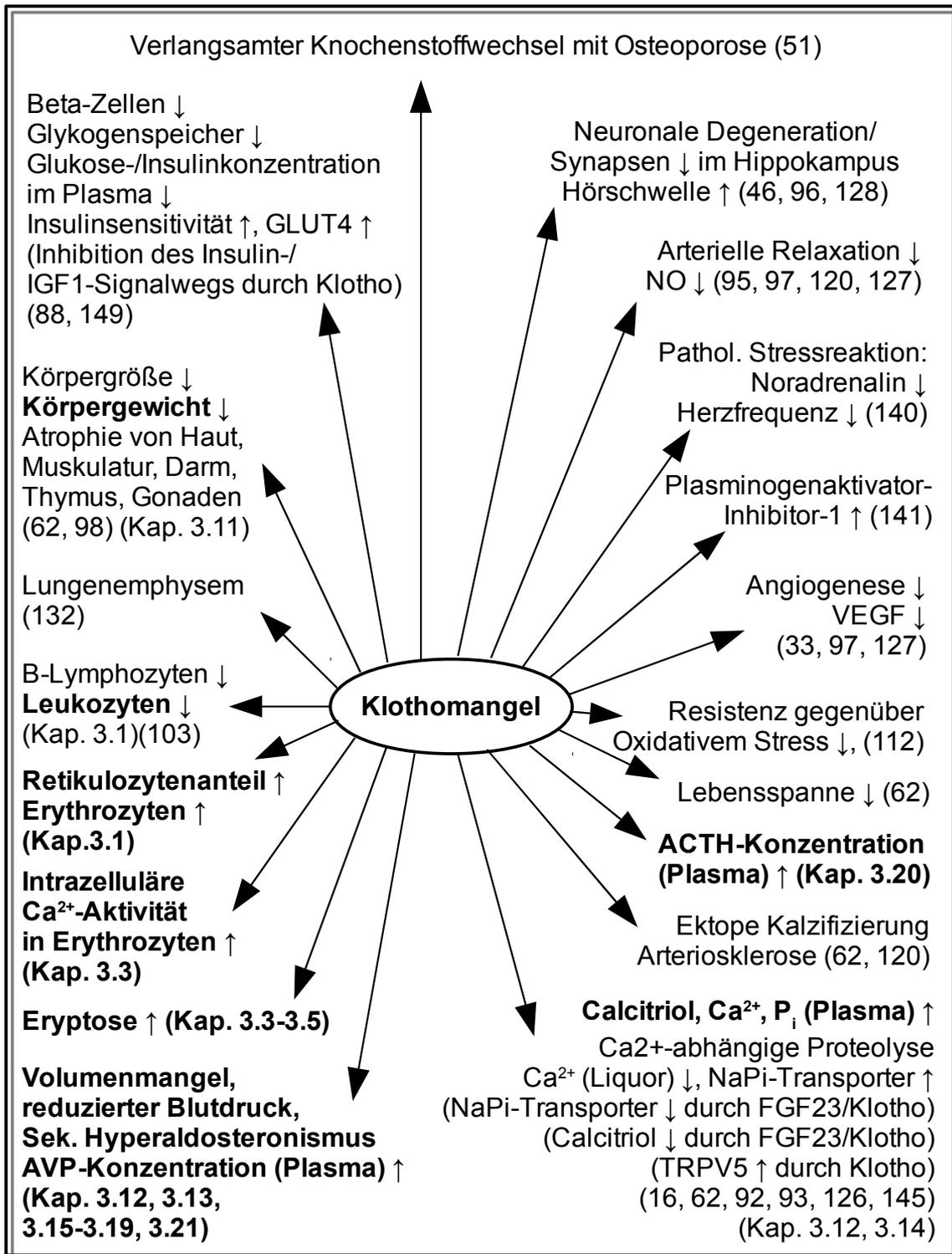
Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die bereits bekannten Auswirkungen von Klotho auf den Kalzium- und Phosphathaushalt (siehe Kapitel 1.4.1). Klotho-defiziente Mäuse besitzen massiv erhöhte Calcitriol-,  $\text{Ca}^{2+}$ - und Phosphatkonzentrationen gegenüber leicht erniedrigten PTH-Konzentrationen. Vitamin-D-arme Diät führt auch hier zu einer vollständigen Normalisierung der Werte. Neu ist jedoch, dass auch vorübergehende Vitamin-D-arme Diät zumindest teilweise wirksam ist. Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass ein Klothomangel mit massiv gesteigerter Calcitriolsynthese vor allem bei jüngeren Mäusen eine große Rolle spielt und mit zunehmendem Alter weniger bedeutsam wird.

Bisher weitgehend unerforscht waren die Auswirkungen eines Klothomangels auf den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt. Diesbezüglich lässt sich bei Klotho-defizienten Mäusen ein Volumenmangel feststellen, der vermutlich auf einen durch die erhöhten Calcitriolkonzentrationen und die Hyperkalzämie bedingten renalen Salz- und Wasserverlust zurückzuführen ist. Schließlich

konnte vielfach nachgewiesen werden, dass Hyperkalzämie und Calcitriol sowohl renale Natriumtransporter als auch Wasserkanäle inhibieren (siehe Kapitel 4.4.3). Ebenso spricht die bei dem vorliegenden Volumenmangel erhöhte Trinkmenge der Klotho-defizienten Mäuse für einen Wasserverlust und gegen eine reduzierte Flüssigkeitsaufnahme. Als Folge des Volumenmangels weisen Klotho-defiziente Mäuse einen Hyperaldosteronismus und eine erhöhte Konzentration des Antidiurese Hormons (AVP) auf.

Darüber hinaus kann bei Klotho-defizienten Mäusen auch eine tendenziell erhöhte Plasmakonzentration des Glukokortikoids Corticosteron und eine signifikant erhöhte ACTH-Konzentration festgestellt werden. Letztere kann durch Vitamin-D-arme Diät nicht normalisiert werden. Die bei Klothodefizienz gesteigerte Calcitriolbildung scheint hier also nicht ursächlich zu sein.

Vitamin-D-arme Diät führt jedoch zu einer Normalisierung des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie zu einer Beseitigung des Hyperaldosteronismus und der erhöhten AVP-Konzentration im Plasma Klotho-defizienter Mäuse. Dies deutet erneut auf eine ursächliche Beteiligung der bei Klotho<sup>kl/kl</sup>-Mäusen massiv gesteigerten Calcitriolbildung an der Entstehung des vorliegenden Volumenmangels und Hyperaldosteronismus hin. Ein Mangel an Klotho führt somit über die exzessive Calcitriolsynthese indirekt zu Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt mit daraus resultierendem Hyperaldosteronismus. Zusätzlich beteiligte Mechanismen können bislang jedoch nicht ausgeschlossen werden.



**Abbildung 39:** Auswirkungen einer reduzierten Klotho-Genexpression. Aus dieser Arbeit gewonnene Ergebnisse sind fett gedruckt.

## 6 Literatur

### 6.1 Publikationen

**Fischer SS**, Kempe DS, Leibrock CB, Rexhepaj R, Siraskar B, Boini KM, Ackermann TF, Föller M, Hocher B, Rosenblatt KP, Kuro-o M, Lang F. Hyperaldosteronism in Klotho-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; -In press.

Kempe DS, Ackermann TF, **Fischer SS**, Koka S, Boini KM, Mahmud H, Föller M, Rosenblatt KP, Kuro-O M, Lang F. Accelerated suicidal erythrocyte death in Klotho-deficient mice. *Pflugers Arch.* 2009 Jul;458(3):503-12. Epub 2009 Jan 28.

### 6.2 Literaturverzeichnis

1. Adami S, Parfitt AM. Calcium-induced natriuresis: physiologic and clinical implications. *Calcif Tissue Int.* 2000 Jun;66(6):425-9.
2. Aizawa H, Saito Y, Nakamura T, Inoue M, Imanari T, Ohyama Y, Matsumura Y, Masuda H, Oba S, Mise N, Kimura K, Hasegawa A, Kurabayashi M, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R. Downregulation of the Klotho gene in the kidney under sustained circulatory stress in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Aug 28;249(3):865-71.
3. Anamizu Y, Kawaguchi H, Seichi A, Yamaguchi S, Kawakami E, Kanda N, Matsubara S, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nakamura K, Oyanagi K. Klotho insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn cells. *Acta Neuropathol.* 2005 May;109(5):457-66.
4. Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem.* 1990 Mar 25;265(9):4923-8.
5. Andrews DA, Low PS. Role of red blood cells in thrombosis. *Curr Opin Hematol.* 1999 Mar;6(2):76-82.
6. Arking DE, Atzmon G, Arking A, Barzilai N, Dietz HC. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ Res.* 2005 Mar 4;96(4):412-8.

7. Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, Schulze-Osthoff K, Wesselborg. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ.* 2001 Dec;8(12):1197-206.
8. Berger S, Bleich M, Schmid W, Greger R, Schütz G. Mineralocorticoid receptor knockout mice: lessons on Na<sup>+</sup> metabolism. *Kidney Int.* 2000 Apr;57(4):1295-8.
9. Björklund P, Krajisnik T, Akerström G, Westin G, Larsson TE. Type I membrane klotho expression is decreased and inversely correlated to serum calcium in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Oct;93(10):4152-7.
10. Boas FE, Forman L, Beutler E. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 17;95(6):3077-81.
11. Bolanz KA, Hediger MA, Landowski CP. The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Mol Cancer Ther.* 2008 Feb;7(2):271-9.
12. Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, Ameisen JC. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ.* 2001 Dec;8(12):1143-56.
13. Brugnara C, de Franceschi L, Alper SL . Inhibition of Ca<sup>(2+)</sup>-dependent K<sup>+</sup> transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest.* 1993 Jul;92(1):520-6.
14. Brunsting A., Mullaney P.F. Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophys J.* 1974;14:439-453.
15. Cha SK, Ortega B, Kurosu H, Rosenblatt KP, Kuro-O M, Huang CL. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 Jul 15;105(28):9805-10
16. Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science.* 2005 Oct 21;310(5747):490-3.

17. Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 Dec 11;104(50):19796-801.
18. Christakos S, Dhawan P, Benn B, Porta A, Hediger M, Oh GT, Jeung EB, Zhong Y, Ajibade D, Dhawan K, Joshi S. Vitamin D: molecular mechanism of action. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Nov;1116:340-8.
19. Closse C, Dachary-Prigent J, Boisseau MR. Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium. *Br J Haematol*. 1999 Nov;107(2):300-2.
20. Covas DT, de Lucena Angulo I, Vianna Bonini Palma P, Zago MA. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica*. 2004 Mar;89(3):273-80.
21. De Oliveira RM. Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Lett*. 2006 Oct 16;580(24):5753-8.
22. Deary IJ, Harris SE, Fox HC, Hayward C, Wright AF, Starr JM, Whalley LJ. KLOTHO genotype and cognitive ability in childhood and old age in the same individuals. *Neurosci Lett*. 2005 Apr 11;378(1):22-7.
23. Dekkers DW, Comfurius P, Bevers EM, Zwaal RF. Comparison between Ca<sup>2+</sup>-induced scrambling of various fluorescently labelled lipid analogues in red blood cells. *Biochem J*. 2002 Mar 15;362(Pt 3):741-7.
24. Dumitrescu CE, Kelly MH, Khosravi A, Hart TC, Brahim J, White KE, Farrow EG, Nathan MH, Murphey MD, Collins MT. A case of familial tumoral calcinosis/hyperostosis-hyperphosphatemia syndrome due to a compound heterozygous mutation in GALNT3 demonstrating new phenotypic features. *Osteoporos Int*. 2009 Jul;20(7):1273-8.
25. Durantou C, Huber S, Tanneur V, Lang K, Brand V, Sandu C, Lang F. Electrophysiological properties of the Plasmodium Falciparum-induced cation conductance of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2003;13(4):189-98.
26. Durantou C, Huber SM, Lang F. Oxidation induces a Cl<sup>-</sup>-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol*. 2002 Mar 15;539(Pt 3):847-55.

27. Eda S., Sherman I.W. Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell Physiol Biochem.* 2002;12:373-384.
28. Erdahl WL, Chapman CJ, Taylor RW, Pfeiffer DR. Ca<sup>2+</sup> transport properties of ionophores A23187, ionomycin, and 4-BrA23187 in a well defined model system. *Biophys J.* 1994 May;66(5):1678-93.
29. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature.* 2000 May 4;405(6782):85-90.
30. Foldager N, Blomqvist CG. Repeated plasma volume determination with the Evans Blue dye dilution technique: the method and a computer program. *Comput Biol Med.* 1991;21(1-2):35-41.
31. Föllner M, Feil S, Ghoreschi K, Koka S, Gerling A, Thunemann M, Hofmann F, Schuler B, Vogel J, Pichler B, Kasinathan RS, Nicolay JP, Huber SM, Lang F, Feil R. Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 May 6;105(18):6771-6.
32. Föllner M, Huber SM, Lang F. Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life.* 2008 Oct;60(10):661-8.
33. Fukino K, Suzuki T, Saito Y, Shindo T, Amaki T, Kurabayashi M, Nagai R. Regulation of angiogenesis by the aging suppressor gene *klotho*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Apr 26;293(1):332-7.
34. Funada Y, Nishimura Y, Yokoyama M. Imbalance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 is associated with pulmonary emphysema in *Klotho* mice. *Kobe J Med Sci.* 2004;50(3-4):59-67.
35. Gallagher PG, Chang SH, Rettig MP, Neely JE, Hillery CA, Smith BD, Low PS. Altered erythrocyte endothelial adherence and membrane phospholipid asymmetry in hereditary hydrocytosis. *Blood.* 2003 Jun 1;101(11):4625-7.
36. Gill R, Nazir TM, Wali R, Sitrin M, Brasitus TA, Ramaswamy K, Dudeja PK. Regulation of rat ileal NHE3 by 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>. *Dig Dis Sci.* 2002 May;47(5):1169-74.
37. González-Sancho JM, Larriba MJ, Ordóñez-Morán P, Pálmer HG, Muñoz A. Effects of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human colon cancer cells. *Anticancer Res.* 2006 Jul-Aug;26(4A):2669-81.

38. Herold G. Innere Medizin. Gerd Herold, Köln. 2008.
39. Huber SM, Gamper N, Lang F. Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch.* 2001 Jan;441(4):551-8.
40. Imai M, Ishikawa K, Matsukawa N, Kida I, Ohta J, Ikushima M, Chihara Y, Rui X, Rakugi H, Ogihara T. Klotho protein activates the PKC pathway in the kidney and testis and suppresses 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression. *Endocrine.* 2004 Dec;25(3):229-34.
41. Imamura A, Okumura K, Ogawa Y, Murakami R, Torigoe M, Numaguchi Y, Murohara T. Klotho gene polymorphism may be a genetic risk factor for atherosclerotic coronary artery disease but not for vasospastic angina in Japanese. *Clin Chim Acta.* 2006 Sep;371(1-2):66-70
42. Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, Fujimori T, Nabeshima Y. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett.* 2004 May 7;565(1-3):143-7.
43. 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. alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science* 2007 Jun 15;316(5831):1615-8.
44. Ishizawa M, Matsunawa M, Adachi R, Uno S, Ikeda K, Masuno H, Shimizu M, Iwasaki K, Yamada S, Makishima M. Lithocholic acid derivatives act as selective vitamin D receptor modulators without inducing hypercalcemia. *J Lipid Res.* 2008 Apr;49(4):763-72.
45. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res.* 2006 Nov 10;99(10):1044-59.
46. Kamemori M, Ohyama Y, Kurabayashi M, Takahashi K, Nagai R, Furuya N. Expression of Klotho protein in the inner ear. *Hear Res.* 2002 Sep;171(1-2):103-110.

47. Kamitani A, Yamada H, Kinuta M, Watanabe M, Li SA, Matsukawa T, McNiven M, Kumon H, Takei K. Distribution of dynamins in testis and their possible relation to spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jun 7;294(2):261-7.
48. Kao JP, Harootunian AT, Tsien RY. Photochemically Generated Cytosolic Calcium Pulses and Their Detection by Fluo-3. *J Biol Chem.* 1989 May 15;264(14):8179-84.
49. Kashimada K, Yamashita T, Tsuji K, Nifuji A, Mizutani S, Nabeshima Y, Noda M. Defects in growth and bone metabolism in klotho mutant mice are resistant to GH treatment. *J Endocrinol.* 2002 Sep;174(3):403-10.
50. Kawaguchi H, Manabe N, Chikuda H, Nakamura K, Kuroo M. Cellular and molecular mechanism of low-turnover osteopenia in the klotho-deficient mouse. *Cell Mol Life Sci.* 2000 May;57(5):731-7.
51. Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C, Chikuda H, Nakamura K, Kuroo M. Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in klotho mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *J Clin Invest.* 1999 Aug;104(3):229-37.
52. Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector TD, Uchida M, Hosoi T, Suzuki T, Orimo H, Inoue S, Nabeshima Y, Nakamura K, Kuro-o M, Kawaguchi H. Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2002 Oct;17(10):1744-51.
53. Kempe DS, Ackermann TF, Fischer SS, Koka S, Boini KM, Mahmud H, Föllner M, Rosenblatt KP, Kuro-O M, Lang F. Accelerated suicidal erythrocyte death in Klotho-deficient mice. *Pflugers Arch.* 2009 Jul;458(3):503-12.
54. Kempe DS, Lang PA, Durantion C, Akel A, Lang KS, Huber SM, Wieder T, Lang F. Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J.* 2006 Feb;20(2):368-70.
55. Kienast J, Schmitz G. Flow Cytometric Analysis of Thiazole Orange Uptake by Platelets: A Diagnostic Aid in the Evaluation of Thrombocytopenic Disorders. *Blood.* 1990 Jan 1;75(1):116-21.
56. Kim Y, Kim JH, Nam YJ, Kong M, Kim YJ, Yu KH, Lee BC, Lee C. Klotho is a genetic risk factor for ischemic stroke caused by cardioembolism in Korean females. *Neurosci Lett.* 2006 Oct 30;407(3):189-94.

57. Klarl BA, Lang PA, Kempe DS, Niemoeller OM, Akel A, Sobiesiak M, Eisele K, Podolski M, Huber SM, Wieder T, Lang F. Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Jan;290:C244-C253.
58. Klinker R., Pape HC, Silbernagl S. *Physiologie*. Thieme. 5. Auflage. 2005.
59. Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, Tamori A, Shiomi S, Nakatani T, Sugimura K, Kishimoto T, Kinoshita S, Kuroki T, Nabeshima Y. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Feb 2;280(4):1015-20.
60. Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., van Oers M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994 84: 1415-1420
61. Kuro-o M. Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006 Jul;15(4):437-41.
62. Kuro-o M., Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997 Nov 6;390(6655):45-51.
63. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, Kuro-o M. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem*. 2006 Mar 10;281(10):6120-3.
64. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*. 2005 Sep 16;309(5742):1829-33.
65. Lang F, Gulbins E, Lerche H, Huber SM, Kempe DS, Föller M. Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell Physiol Biochem*. 2008;22(5-6):373-80.
66. Lang F, Lang KS, Lan, Huber SM, Wieder T. Mechanisms and Significance of Eryptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006, 8(7-8): 1183-1192.

67. Lang KS, Duranton C, Poehlmann H, Myssina S, Bauer C, Lang F, Wieder T, Huber SM. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ.* 2003 Feb;10(2):249-56.
68. Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM, Lang F. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem.* 2005;15(5):195-202.
69. Lang KS, Myssina S, Tanneur V, Wieder T, Huber SM, Lang F, Duranton C. Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003 Apr;367:391-396.
70. Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Lang F, Huber SM (2003) Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Dec;285:C1553-60.
71. Lang PA, Warskulat U, Heller-Stilb B, Huang DY, Grenz A, Myssina S, Duszenko M, Lang F, Häussinger D, Vallon V, Wieder T. Blunted Apoptosis of Erythrocytes from Taurine Transporter Deficient Mice. *Cell Physiol Biochem.* 2003;13(6):337-46.
72. Li SA, Watanabe M, Yamada H, Nagai A, Kinuta M, Takei K. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell Struct Funct.* 2004 Dec;29(4):91-9.
73. Liu C, Hermann TE. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem.* 1978 Sep 10;253(17):5892-4.
74. Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, Malide D, Rovira II, Schimel D, Kuo CJ, Gutkind JS, Hwang PM, Finkel T. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science.* 2007 Aug 10;317(5839):803-6.
75. Longhini C, Molino C, Fabbian F. Cardiorenal syndrome: still not a defined entity. *Clin Exp Nephrol.* 2010 Feb;14(1):12-21.
76. Lu P, Boros S, Chang Q, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Nov;23(11):3397-402.
77. Luong QT, Koeffler HP. Vitamin D compounds in leukemia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005 Oct;97(1-2):195-202.

78. Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H, Miyaura C, Inada M, Nagai R, Nabeshima Y, Nakamura K, Sinclair AM, Scheuermann RH, Kuro-o M. Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J Immunol.* 2001 Sep 1;167(5):2625-31.
79. Manya H, Inomata M, Fujimori T, Dohmae N, Sato Y, Takio K, Nabeshima Y, Endo T. Klotho protein deficiency leads to overactivation of mu-calpain. *J Biol Chem.* 2002 Sep 20;277(38):35503-8.
80. Martinesi M, Treves C, d'Albasio G, Bagnoli S, Bonanomi AG, Stio M. Vitamin D derivatives induce apoptosis and downregulate ICAM-1 levels in peripheral blood mononuclear cells of inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2008 May;14(5):597-604.
81. Masuda H, Chikuda H, Suga T, Kawaguchi H, Kuro-o M. Regulation of multiple ageing-like phenotypes by inducible klotho gene expression in klotho mutant mice. *Mech Ageing Dev.* 2005 Dec;126(12):1274-83.
82. Medici D, Razzaque MS, Deluca S, Rector TL, Hou B, Kang K, Goetz R, Mohammadi M, Kuro-O M, Olsen BR, Lanske B. FGF-23-Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 2008 Aug 11;182(3):459-65.
83. Min D, Panoskaltsis-Mortari A, Kuro-O M, Holländer GA, Blazar BR, Weinberg KI. Sustained thymopoiesis and improvement in functional immunity induced by exogenous KGF administration in murine models of aging. *Blood.* 2007 Mar 15;109(6):2529-37.
84. Mitani H, Ishizaka N, Aizawa T, Ohno M, Usui S, Suzuki T, Amaki T, Mori I, Nakamura Y, Sato M, Nangaku M, Hirata Y, Nagai R. In vivo klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. *Hypertension.* 2002 Apr;39(4):838-43.
85. Mitobe M, Yoshida T, Sugiura H, Shirota S, Tsuchiya K, Nihei H. Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line. *Nephron Exp. Nephrol.* 2005;101(2):e67-74.
86. Mizuno I, Takahashi Y, Okimura Y, Kaji H, Chihara K. Upregulation of the klotho gene expression by thyroid hormone and during adipose differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Life Sci.* 2001 May 18;68(26):2917-23.

87. Morgan AJ, Jacob R. Ionomycin enhances Ca<sup>2+</sup> influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem J.* 1994 Jun 15;300 ( Pt 3):665-72.
88. Mori K, Yahata K, Mukoyama M, Suganami T, Makino H, Nagae T, Masuzaki H, Ogawa Y, Sugawara A, Nabeshima Y, Nakao K. Disruption of *klotho* gene causes an abnormal energy homeostasis in mice. *Biochem Biophys Res Community.* 2000 Nov 30;278(3):665-70.
89. Morishita K, Shirai A, Kubota M, Katakura Y, Nabeshima Y, Takeshige K, Kamiya T. The progression of aging in *klotho* mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J Nutr.* 2001 Dec;131(12):3182-8.
90. Myrthue A, Rademacher BL, Pittsenbarger J, Kutyba-Brooks B, Gantner M, Qian DZ, Beer TM. The *iroquois* homeobox gene 5 is regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human prostate cancer and regulates apoptosis and the cell cycle in LNCaP prostate cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2008 Jun 1;14(11):3562-70.
91. Myssina S, Huber SM, Birka C, Lang PA, Lang KS, Friedrich B, Risler T, Wieder T, Lang F. Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Nov;14(11):2750-7.
92. Nabeshima Y. Discovery of alpha-Klotho unveiled new insights into calcium and phosphate homeostasis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2009;85(3):125-41
93. Nabeshima Y. Ectopic calcification in *Klotho* mice. *Clin. Calcium.* 2002 Aug;12(8):1114-7.
94. Nabeshima Y. Toward a better understanding of *Klotho*. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2006 May 3;2006(8):pe11.
95. Nagai R, Saito Y, Ohyama Y, Aizawa H, Suga T, Nakamura T, Kurabayashi M, Kuroo M. Endothelial dysfunction in the *klotho* mouse and downregulation of *klotho* gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2000 May;57(5):738-46.
96. Nagai T, Yamada K, Kim HC, Kim YS, Noda Y, Imura A, Nabeshima Y, Nabeshima T. Cognition impairment in the genetic model of aging *klotho* gene mutant mice: a role of oxidative stress. *FASEB J.* 2003 Jan;17(1):50-2.

97. Nakamura T, Saito Y, Ohyama Y, Masuda H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R, Kurabayashi M. Production of nitric oxide, but not prostacyclin, is reduced in klotho mice. *Jpn J Pharmacol.* 2002 Jun;89(2):149-56.
98. Nakatani T, Sarraj B, Ohnishi M, Densmore MJ, Taguchi T, Goetz R, Mohammadi M, Lanske B, Razzaque MS. In vivo genetic evidence for klotho-dependent, fibroblast growth factor 23 (Fgf23) -mediated regulation of systemic phosphate homeostasis. *FASEB J.* 2009 Feb;23(2):433-41.
99. Narumiya H, Sasaki S, Kuwahara N, Irie H, Kusaba T, Kameyama H, Tamagaki K, Hatta T, Takeda K, Matsubara H. HMG-CoA reductase inhibitors up-regulate anti-aging klotho mRNA via RhoA inactivation in IMCD3 cells. *Cardiovasc. Res.* 2004 Nov 1;64(2):331-6
100. Nicita-Mauro V, Maltese G, Nicita-Mauro C, Basile G. Vascular aging and geriatric patient. *Minerva Cardioangiol.* 2007 Aug;55(4):497-502.
101. Ogata N, Matsumura Y, Shiraki M, Kawano K, Koshizuka Y, Hosoi T, Nakamura K, Kuro-O M, Kawaguchi H. Association of klotho gene polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women. *Bone.* 2002 Jul;31(1):37-42.
102. 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, Nagail R. Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Oct 29;251(3):920-5.
103. Okada S, Yoshida T, Hong Z, Ishii G, Hatano M, Kuro-O M, Nabeshima Y, Nabeshima Y, Tokuhisa T. Impairment of B lymphopoiesis in precocious aging (klotho) mice. *Int Immunol.* 2000 Jun;12(6):861-71.
104. Ormerod M.G., *Flow Cytometry - A Basic Introduction.* 2008. Freie Online-Version. URL: <http://flowbook.denovosoftware.com>
105. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jul;4(7):552-65.
106. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical calcium indicators. *Methods.* 2008 Nov;46(3):143-51.

107. Pedersen LB, Nashold FE, Spach KM, Hayes CE. 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting chemokine synthesis and monocyte trafficking. *J Neurosci Res.* 2007 Aug 15;85(11):2480-90.
108. Pfeilschifter J. Hypercalcemic crisis. *Internist (Berl).* 2003 Oct;44(10):1231-6.
109. Pletcher SD, Stumpf MP. Population genomics: ageing by association. *Curr Biol.* 2002 Apr 30;12(9):R328-30.
110. Prié D, Torres P. U., Friedlander G. Latest findings in phosphate homeostasis. *Kidney International.* 2009; 75: 882-889.
111. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter. Berlin. 260. Auflage. 2004.
112. Rakugi H, Matsukawa N, Ishikawa K, Yang J, Imai M, Ikushima M, Maekawa Y, Kida I, Miyazaki J, Ogihara T. Anti-oxidative effect of Klotho on endothelial cells through cAMP activation. *Endocrine* 2007 Feb;31(1):82-7.
113. Razzaque MS, Lanske B. Hypervitaminosis D and premature aging: lessons learned from Fgf23 and Klotho mutant mice. *Trends Mol Med.* 2006 Jul;12(7):298-305.
114. Razzaque MS, Sitara D, Taguchi T, St-Arnaud R, Lanske B. Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. *FASEB J.* 2006 Apr;20(6):720-2.
115. Renkema KY, Alexander RT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Calcium and phosphate homeostasis: concerted interplay of new regulators. *Ann Med.* 2008;40(2):82-91.
116. Rexhepaj R, Artunc F, Grahammer F, Nasir O, Sandu C, Friedrich B, Kuhl D, Lang F. SGK1 is not required for regulation of colonic ENaC activity. *Pflugers Arch.* 2006 Oct;453(1):97-105.
117. Rhee EJ, Oh KW, Yun EJ, Jung CH, Lee WY, Kim SW, Baek KH, Kang MI, Park SW. Relationship between polymorphisms G395A in promoter and C1818T in exon 4 of the KLOTHO gene with glucose metabolism and cardiovascular risk factors in Korean women. *J Endocrinol Invest.* 2006 Jul-Aug;29(7):613-8.

118. Romero PJ, Romero EA. Effect of cell ageing on Ca<sup>2+</sup> influx into human red cells. *Cell Calcium*. 1999 Sep-Oct;26(3-4):131-7.
119. Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Sep 24;276(2):767-72.
120. 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. Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jul 20;248(2):324-9.
121. Sato A, Hirai T, Imura A, Kita N, Iwano A, Muro S, Nabeshima Y, Suki B, Mishima M. Morphological mechanism of the development of pulmonary emphysema in klotho mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Feb 13;104(7):2361-5.
122. Schäfer A, Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2008 Jan;6(1):52-60.
123. Schmidt, Lang, Thews. *Physiologie des Menschen*. Springer. 29. Auflage. 2005.
124. Schmidt, Lang, Thews. *Physiologie des Menschen*. Springer. 30. Auflage. 2007.
125. Schneider J, Nicolay JP, Foller M, Wieder T, Lang F. Suicidal erythrocyte death following cellular K<sup>+</sup> loss. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(1-4):35-44.
126. Segawa H, Yamanaka S, Ohno Y, Onitsuka A, Shiozawa K, Aranami F, Furutani J, Tomoe Y, Ito M, Kuwahata M, Imura A, Nabeshima Y, Miyamoto K. Correlation between hyperphosphatemia and type II Na-Pi cotransporter activity in klotho mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Feb;292(2):F769-79.
127. Shimada T, Takeshita Y, Murohara T, Sasaki K, Egami K, Shintani S, Katsuda Y, Ikeda H, Nabeshima Y, Imaizumi T. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse. *Circulation*. 2004 Aug 31;110(9):1148-55.

128. Shiozaki M, Yoshimura K, Shibata M, Koike M, Matsuura N, Uchiyama Y, Gotow T. Morphological and biochemical signs of age-related neurodegenerative changes in klotho mutant mice. *Neuroscience*. 2008 Apr 9;152(4):924-41.
129. Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y, Sekine S, Iida A, Anazawa H, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett*. 1998 Mar 6;424(1-2):6-10.
130. Shiraki-Iida T, Iida A, Nabeshima Y, Anazawa H, Nishikawa S, Noda M, Kuro-o M, Nabeshima Y. Improvement of multiple pathophysiological phenotypes of klotho (kl/kl) mice by adenovirus-mediated expression of the klotho gene. *J Gene Med*. 2000 Jul-Aug;2(4):233-42.
131. Silbernagl S, Despopoulos A. *Taschenatlas Physiologie*. Thieme. 7. Auflage. 2006.
132. 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. 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*. 2000 Jan;22(1):26-33.
133. Suga T. Pulmonary emphysema in klotho mutant mice (deficient in klotho gene expression): klotho gene essential in postnatal pulmonary integrity. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 2002 Mar;40(3):203-9.
134. Sugiura H, Yoshida T, Tsuchiya K, Mitobe M, Nishimura S, Shirota S, Akiba T, Nihei H. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Dec;20(12):2636-45.
135. Sun X, Zemel MB. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 modulation of adipocyte reactive oxygen species production. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Aug;15(8):1944-53.
136. Suzuki H, Amizuka N, Noda M, Amano O, Maeda T. Histological and immunohistochemical changes in the submandibular gland in klotho-deficient mice. *Arch Histol Cytol*. 2006 Jun;69(2):119-28.

137. Suzuki H, Amizuka N, Oda K, Li M, Yoshie H, Ohshima H, Noda M, Maeda T. Histological evidence of the altered distribution of osteocytes and bone matrix synthesis in klotho-deficient mice. *Arch Histol Cytol.* 2005 Dec;68(5):371-81.
138. Suzuki H, Amizuka N, Oda K, Noda M, Ohshima H, Maeda T. Histological and elemental analyses of impaired bone mineralization in klotho-deficient mice. *J Anat.* 2008 Mar;212(3):275-85.
139. Suzuki H, Amizuka N, Oda K, Noda M, Ohshima H, Maeda T. Involvement of the klotho protein in dentin formation and mineralization. *Anat Rec (Hoboken).* 2008 Feb;291(2):183-90.
140. Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K, Lee JK, Kamiya K, Kitaichi K, Yamamoto K, Ito M, Kondo T, Iino S, Inden Y, Hirai M, Murohara T, Kodama I, Nabeshima Y. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. *Circulation.* 2004 Apr 13;109(14):1776-82.
141. Takeshita K, Yamamoto K, Ito M, Kondo T, Matsushita T, Hirai M, Kojima T, Nishimura M, Nabeshima Y, Loskutoff DJ, Saito H, Murohara T. Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 with fibrin deposition in a murine model of aging, "Klotho" mouse. *Semin Throm Hemost.* 2002 Dec;28(6):545-54.
142. Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, Henrissat B, Fujimori T, Nabeshima Y. Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J Biol Chem.* 2004 Mar 12;279(11):9777-84.
143. Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. Regulation of the epithelial calcium channel TRPV5 by extracellular factors. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007 Jul;16(4):319-24.
144. Toyama R, Fujimori T, Nabeshima Y, Itoh Y, Tsuji Y, Osamura RY, Nabeshima Y. Impaired regulation of gonadotropins leads to the atrophy of the female reproductive system in klotho-deficient mice. *Endocrinology.* 2006 Jan;147(1):120-9.
145. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol.* 2003 Dec;17(12):2393-403.

146. Tsuruoka S, Nishiki K, Ioka T, Ando H, Saito Y, Kurabayashi M, Nagai R, Fujimura A. Defect in parathyroid-hormone-induced luminal calcium absorption in connecting tubules of Klotho mice. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Oct;21(10):2762-7.
147. Uchida A, Komiya Y, Tashiro T, Yorifuji H, Kishimoto T, Nabeshima Y, Hisanaga S. Neurofilaments of Klotho, the mutant mouse prematurely displaying symptoms resembling human aging. *J Neurosci Res*. 2001 May 15;64(4):364-70.
148. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006 Dec 7;444(7120):770-4.
149. 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. Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. *Metabolism*. 2000 Sep;49(9):1118-23.
150. Vallés J, Santos MT, Aznar J, Martínez M, Moscardó A, Piñón M, Broekman MJ, Marcus AJ. Platelet-erythrocyte interactions enhance alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood*. 2002 Jun 1;99(11):3978-84.
151. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005 Oct;97(1-2):93-101.
152. Vargas-Poussou R, Huang C, Hulin P, Houillier P, Jeunemaître X, Paillard M, Planelles G, Déchaux M, Miller RT, Antignac C. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Sep;13(9):2259-66.
153. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995 Jul 17;184(1):39-51.
154. Wang W, Kwon TH, Li C, Frøkiaer J, Knepper MA, Nielsen S. Reduced expression of Na-K-2Cl cotransporter in medullary TAL in vitamin D-induced hypercalcemia in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Jan;282(1):F34-44.

155. Wang W, Li C, Kwon TH, Knepper MA, Frøkiaer J, Nielsen S. AQP3, p-AQP2, and AQP2 expression is reduced in polyuric rats with hypercalcemia: prevention by cAMP-PDE inhibitors. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Dec;283(6):F1313-25.
156. Wang W, Li C, Kwon TH, Miller RT, Knepper MA, Frøkiaer J, Nielsen S. Reduced expression of renal Na<sup>+</sup> transporters in rats with PTH-induced hypercalcemia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Mar;286(3):F534-45.
157. Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, Ligumsky H, Sredni B, Kanety H, Kuro-o M, Karlan B, Kaufman B, Koeffler HP, Rubinek T. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene.* 2008 Nov 27;27(56):7094-105.
158. Woon LA, Holland JW, Kable EP, Roufogalis BD. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts. *Cell Calcium.* 1999 Apr;25(4):313-20.
159. Wu X, Lemon B, Li X, Gupte J, Weiszmann J, Stevens J, Hawkins N, Shen W, Lindberg R, Chen JL, Tian H, Li Y. C-terminal tail of FGF19 determines its specificity toward Klotho co-receptors. *J Biol Chem.* 2008 Nov 28;283(48):33304-9.
160. Xiao NM, Zhang YM, Zheng Q, Gu J. Klotho is a serum factor related to human aging. *Chin Med J (Engl).* 2004 May;117(5):742-7.
161. Xu ZL, Gao H, Ou-Yang KQ, Cai SX, Hu YH. Establishment of a cell-based assay to screen regulators for Klotho gene promoter. *Acta Pharmacol Sin.* 2004 Sep;25(9):1165-70
162. Yahata K, Mori K, Mukoyama M, Sugawara A, Suganami T, Makino H, Nagae T, Fujinaga Y, Nabeshima Y, Nakao K. Regulation of stanniocalcin 1 and 2 expression in the kidney by klotho gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 10;310(1):128-34.
163. Yamagishi T, Saito Y, Nakamura T, Takeda S, Kanai H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R. Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors. *Hypertens Res.* 2001 Nov;24(6):705-9.

164. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone Klotho. *J Biol Chem*. 2005 Nov 11;280(45):38029-34.
165. Yamashita T, Nabeshima Y, Noda M. High-resolution micro-computed tomography analyses of the abnormal trabecular bone structures in klotho gene mutant mice. *J Endocrinol*. 2000 Feb;164(2):239-45.
166. Yamashita T, Okada S, Higashio K, Nabeshima Y, Noda M. Double mutations in klotho and osteoprotegerin gene loci rescued osteopetrotic phenotype. *Endocrinology*. 2002 Dec;143(12):4711-7.
167. Yamashita T, Sekiya I, Kawaguchi N, Kashimada K, Nifuji A, Nabeshima YI, Noda M. Klotho-deficient mice are resistant to bone loss induced by unloading due to sciatic neurectomy. *J Endocrinol*. 2001 Feb;168(2):347-51.
168. Yamashita T, Yoshitake H, Tsuji K, Kawaguchi N, Nabeshima Y, Noda M. Retardation in bone resorption after bone marrow ablation in klotho mutant mice. *Endocrinology*. 2000 Jan;141(1):438-45.
169. Yang J, Matsukawa N, Rakugi H, Imai M, Kida I, Nagai M, Ohta J, Fukuo K, Nabeshima Y, Ogihara T. Upregulation of cAMP is a new functional signal pathway of Klotho in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Feb 7;301(2):424-9.
170. Yoshida T, Fujimori T, Nabeshima Y. Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1alpha-hydroxylase gene. *Endocrinology*. 2002 Feb;143(2):683-9.
171. Yuan W, Pan W, Kong J, Zheng W, Szeto FL, Wong KE, Cohen R, Klopot A, Zhang Z, Li YC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem*. 2007 Oct 12;282(41):29821-30.
172. Zhang H, Li Y, Fan Y, Wu J, Zhao B, Guan Y, Chien S, Wang N. Klotho is a target gene of PPAR-gamma. *Kidney Int*. 2008 Sep;74(6):732-9.
173. Zhang X, Zanello LP. Vitamin D receptor-dependent 1 alpha,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>-induced anti-apoptotic PI3K/AKT signaling in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2008 Aug;23(8):1238-48.

## **7 Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Florian Lang für die Ermöglichung der Promotion und die Überlassung dieses interessanten Themas bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei meiner Laborleiterin und Betreuerin Daniela Kempe, die auch die FACS-Analysen durchführte und mir bei den Vitamin-D-Messungen eine große Hilfe war.

Bei meinen Arbeitskollegen im Mäuse-Labor möchte ich mich für die kollegiale Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre bedanken. Insbesondere danke ich Rexhep Rexhepaj für die Durchführung der Ussing-Kammer-Experimente, Balasaheb Siraskar für die Blutdruckmessungen sowie Teresa Ackermann, Elfriede Faber, Krishna Boini und Christina Leibrock.

Schließlich möchte ich mich an dieser Stelle ganz besonders bei meiner Familie bedanken, auf deren Unterstützung ich mich immer verlassen kann.