



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΜΒΡΥΟΜΗΤΡΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

Διευθυντής: Καθηγητής Νικόλαος Βλάχος

Τίτλος:

«Η πρωτεΐνη Klotho και οι περιγεννητικές εκβάσεις»

Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Ονοματεπώνυμο

ΙΖΑΜΠΕΛ ΤΣΙΚΡΙΚΩΝΗ

Μαιευτήρας -Γυναικολόγος

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ :

ΜΑΚΑΡΙΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑΔΗΣ

Αναπλ. Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας

ΜΕΛΟΙ ΔΕΠ:

ΟΛΓΑ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΔΟΥ

Διδάκτωρ Πανεπιστημίου Αθηνών MD, MSc. PhD

ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΚΑΛΑΜΠΟΚΑΣ

Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας

Ιατρική Σχολή-ΕΚΠΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Klotho είναι μια αντιγηραντική πρωτεΐνη, η προστατευτική δράση της οποίας είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία πολλών οργάνων . Έχει αποδειχθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα της Klotho στη συστηματική κυκλοφορία είναι προστατευτικά για την εξέλιξη της γήρανσης και η υπερέκφραση της επεκτείνει τη διάρκεια ζωής, ενώ η απώλεια της επιταχύνει την ανάπτυξη φαινοτύπων που μοιάζουν με γήρανση.

Το όνομά της πρωτεΐνης εμπνεύστηκε από τον ελληνικό μύθο για τις τρεις Μοίρες, οι οποίες παρουσιαζόταν στην αρχαιότητα ως σοβαρές, πολυάσχολες παρθένες που κλώθουν. Η κλωστή που κρατούσαν στα χέρια τους, συμβόλιζε την ανθρώπινη ζωή , δείχνοντας ποσό μικρή και αδύναμη μπορεί να είναι. Σύμφωνα με την Ελληνική Μυθολογία οι τρεις αδελφές καθόριζαν το πεπρωμένο ενός παιδιού στην γέννηση του. Η πρώτη Μοίρα, η Κλωθώ έγενεθε την κλωστή της μελλοντικής ζωής του ανθρώπου. Η Λάχεσις μοίραζε τους κλήρους και τι θα τύχει σε κάθε θνητό και η τρίτη ,η Άτροπος επέλεγε τον θάνατο και έκοβε με ψαλίδι την κλωστή της ζωής του ανθρώπου.

Οι μηχανισμοί δράσης της Klotho στον άνθρωπο γενικά είναι ευρέως μελετώμενοι και τεκμηριωμένοι , ενώ η εμπλοκή της Klotho στην εγκυμοσύνη και στην έκβαση της παραμένει υπό διερεύνηση.

Σκοπός της εργασίας είναι η παρουσίαση των μέχρι σήμερα δεδομένων για τις πρόσφατες εξελίξεις στην κατανόηση της συμπεριφοράς της Klotho στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας , στην περιγεννητική έκβαση της κύησης και των νεογνών.

Για την ανεύρεση των μελετών ορίστηκε ο αλγόριθμος :

Klotho AND (placental OR preeclampsia OR pre-eclampsia OR "small for gestational age" OR SGA OR LGA OR "large for gestational age" OR pregnant OR pregnancy OR placenta OR perinatal OR neonate OR neonatal OR gestation OR gestational OR fetal OR foetal OR fetus OR foetus)

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ:

1. Η Klotho και το πειραματικό μοντέλο με το ποντίκι

1.1. Η δημιουργία του ποντικιού Klotho 3

1.2. Φαινότυποι του ποντικιού Klotho 5

2. Το γονίδιο της Klotho και η δομή της πρωτεΐνης

2.1 Το γονίδιο KL 9

2.2. Χαρακτηριστικά και δομή της πρωτεΐνης 13

3. Η κατανομή της Klotho στους ιστούς 16

4. Ο ρόλος και η λειτουργία της Klotho 28

4.1. Ο ρόλος της ενδοκυτταρικής Klotho 29

4.2. Ο ρόλος της διαλυτής Klotho 29

4.2.1. Επίδραση στον μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα β (TGF- β) 31

4.2.2. Καταστολή του Wnt μονοπατι 33

4.2.3. Αναστολή του πυρηνικού παράγοντα κB (NF- κB) 35

4.2.4. Η Klotho και η TWEAK 38

4.2.5. Ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού Nrf2 μονοπάτι 39

4.2.6. Σηματοδότηση του υποδοχέα IGF-1 41

4.2.7. Η Klotho ως συνυποδοχέας του FGF-23 42

4.2.8. Ρύθμιση της δραστηριότητας των διαύλων ιόντων 42

4.3. Ο ρόλος της μεμβρανικής Klotho 44

5. Αυξητικοί παράγοντες ινοβλαστών (fibroblast growth factors) 48

5.1. Ο FGF23-Klotho άξονας 48

6. Η Klotho ως βιοδείκτης της γήρανσης 57

7.Η Klotho και ο ρόλος της στην παθολογία του νεφρού και στην υπέρταση	61
8.Η Klotho και οι καρδιακές και αγγειακές παθήσεις	68
9.Η Klotho και ο σακχαρώδης διαβήτης	72
10.Η Klotho , ο εγκέφαλος και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις	75
11.Η Klotho και ο καρκίνος	78
11.1 Μηχανισμοί της επίδρασης της Klotho στον καρκίνο	80
11.2. Αντικαρκινική δράση της Klotho	88

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Η Klotho και το αναπαραγωγικό σύστημα	89
2. Η Klotho και τα περιγεννητικά αποτελέσματα	108
2.1.Η Klotho και η προεκλαμψία	
2.2.Η Klotho και οι διαταραχές στην εμβρυϊκή αύξηση	126
2.3.Η Klotho και άλλες παθολογικές καταστάσεις στην κύηση	132
4.Η Klotho και η επίπτωση στα νεογνά	136

1.Η Klotho και το πειραματικό μοντέλο με το ποντίκι Klotho

1.1 Η δημιουργία του ποντικιού Klotho

Ο άνθρωπος από καιρό αναζητούσε διάφορους τρόπους για να μειώσει τις δυσμενείς επιπτώσεις της γήρανσης στη φυσική και στη νοητική του λειτουργία. Μια προσέγγιση για τη διερεύνηση του μηχανισμού της ανθρώπινης γήρανσης ήταν να βρεθούν γονίδια που καθορίζουν τα κληρονομικά σύνδρομα πρόωρης γήρανσης και να προκαλούν ταχεία ανάπτυξη πολλαπλών ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία. Υποψήφια γονίδια για ορισμένα από αυτά τα σύνδρομα ταυτοποιήθηκαν με κλωνοποίηση θέσης (2-4) και βρέθηκε ότι αυτά κωδικοποιούν μια υποθετική ελικάση που ξετυλίγει το διπλό DNA και επηρεάζει άμεσα την αντιγραφή και την επιδιόρθωση του DNA, εξηγώντας γιατί οι ασθενείς αποκτούν διάφορες γονιδιακές μεταλλάξεις

στα σωματικά τους κύτταρα(5).Από αυτά τα ευρήματα φάνηκε ότι οι γενετικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τα σύνδρομα πρόωρης γήρανσης είναι μεταλλάξεις που προκαλούν μεταλλάξεις (6).

Το γονίδιο Klotho, ταυτοποιήθηκε το 1997 ως γονίδιο σε μεταλλαγμένο ποντίκι που παρουσίασε σύντομη διάρκεια ζωής και πολύπλοκους φαινοτύπους που μοιάζουν με το σύνδρομο πρόωρης γήρανσης στον άνθρωπο(1).

Το ποντίκι Klotho δημιουργήθηκε μετά από τυπική μικροέγχυση προπυρήνων σε μια προσπάθεια να παραχθεί ένα διαγονιδιακό ποντίκι (κουνέλι Na⁺ -H⁺ ανταλλάκτης) (7). Για να ληφθούν γονιμοποιημένα ωάρια, θηλυκά ποντίκια με πρόκληση ωορρηξίας (C3H×C57BL/6 F1) ζευγαρώθηκαν με αρσενικά C3H και οι αρσενικοί προπυρήνες υποβλήθηκαν σε μικροέγχυση με το διαγονίδιο. Τα επιζήσαντα ωάρια μεταφέρθηκαν στους αγωγούς ψευδοεγκύων θηλυκών ποντικών Swiss Albino, τα οποία στη συνέχεια ζευγαρώθηκαν με αρσενικά Swiss Albino που είχαν υποβληθεί σε αγγειεκτομή(7). Μόνο το 10% των παραγόμενων διαγονιδιακών ποντικών εξέφρασε το διαγονίδιο. Ως εκ τούτου, τα υπόλοιπα ποντίκια ανεξάρτητα ζευγαρώθηκαν για την αναζήτηση ομοζυγωτών του εξωγενούς διαγονιδίου (7).

Ένα σύνολο ομοζυγωτικών μεταλλαγμένων απογόνων από αυτές τις συζεύξεις παρουσίασε απροσδόκητα πολλαπλούς φαινότυπους που σχετίστηκαν με τη γήρανση, συμπεριλαμβανομένης της καθυστέρησης της ανάπτυξης, της διαταραχής της βάδισης, της αρτηριοσκλήρυνσης και το πιο εντυπωσιακό μια σημαντικά μειωμένη διάρκεια ζωής(1,7). Η ανάλυση του γονιδιώματος του ποντικιού Klotho αποκάλυψε ότι 10 αντίγραφα του διαγονιδίου ενσωματώθηκαν παράλληλα σε έναν μόνο τόπο στο χρωμόσωμα 5 και διέκοψαν μια περιοχή προαγωγέα ενός άγνωστου γονιδίου, το οποίο αργότερα αναγνωρίστηκε ως γονίδιο Klotho(1). Το διαγονίδιο δεν εκφράστηκε λόγω εκτεταμένης μεθυλίωσης που σημειώθηκε γύρω από τη θέση ενσωμάτωσης του διαγονιδίου(8).

Το ποντίκι Klotho, παρουσίασε φαινότυπους που έμοιαζαν με αυτούς της ανθρώπινης γήρανσης. Αυτοί οι φαινότυποι εμφανίστηκαν μόνο σε ποντίκια ομόζυγα για το διαγονίδιο και οι φαινότυποι είχαν διεισδυτικότητα 100%(1). Ωστόσο, οι φαινότυποι ήταν οι ίδιοι για τα ποντίκια των οποίων το γενετικό υπόβαθρο αντικαταστάθηκε από το υπόβαθρο του BALB/c(αλμπίνο, εργαστηριακό στέλεχος οικιακού ποντικού) μετά από επαναλαμβανόμενη αναδρομική διασταύρωση για περισσότερες από 12 γενιές(1).

Ο αθροιστικός προσδιορισμός γονότυπου ετερόζυγων διασταυρώσεων αποκάλυψε ότι ο τρόπος μετάδοσης διαγονιδίων ήταν σύμφωνος με τη Μενδελική κληρονομικότητα, αποδεικνύοντας ότι δεν είχε συμβεί ενδομήτριος ή περιγεννητικός θάνατος των ποντικών Klotho (1).

Το γονίδιο Klotho κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη μονής διέλευσης τύπου I, η οποία εκφράζεται κυρίως στα νεφρά (στα άπω εσπειραμένα σωληνάκια), στον εγκέφαλο (στο χοριοειδές πλέγμα) και στους παραθυρεοειδείς αδένες (9). Το γεγονός ότι η έκφραση της Klotho περιοριζόταν σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές και ότι τα ποντίκια με έλλειψη έκφρασης της Klotho εμφάνιζαν διαταραχές σε πολλαπλά όργανα όπου η ενδογενής έκφραση της Klotho δεν ήταν ανιχνεύσιμη, υποδηλώνει την συμμετοχή ενός ή περισσότερων χημικών παραγόντων που εμπλέκονται στην λειτουργία της πρωτεΐνης Klotho(10). Αν και η λειτουργία της πρωτεΐνης Klotho δεν ήταν σαφής, αναφέρθηκε ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν την Klotho ζούσαν περισσότερο από τα ποντίκια άγριου τύπου (10)

1.1.2. Οι φαινότυποι του ποντίκι Klotho:

Το ποντίκι KL ενώ φαινόταν φυσιολογικό στη γέννηση του, μετά από 3-4 εβδομάδες άρχισε να εμφανίζει πολλαπλές διαταραχές που σχετίζονται με την ηλικία, όπως αρτηριοσκλήρωση, οστεοπόρωση, δερματική ατροφία, υπερφωσφαταιμία, πνευμονικό εμφύσημα, ασβεστοποίηση στους πνεύμονες, την καρδιά και το δέρμα, ατροφία των κυττάρων της παρεγκεφαλίδας και στειρότητα(1). Τα περισσότερα από τα ποντίκια πέθαναν πρόωρα στην ηλικία των 8-9 εβδομάδων, με μέση διάρκεια ζωής 15 εβδομάδων και κανένα δεν επέζησε περισσότερο από 25 εβδομάδες(11). Αυτό ήταν σε πλήρη αντίθεση με τα αντίστοιχα ποντίκια άγριου τύπου, οποία είχαν μέση διάρκεια ζωής περίπου 2,5-3 έτη.(12).

Οι φαινότυποι που εξέφρασαν τα ποντίκια Klotho περιλαμβάνουν την:

Καταστολή της ανάπτυξης: Τα ποντίκια Klotho σταμάτησαν να μεγαλώνουν στην ηλικία των 4-5 εβδομάδων και μετά βίας αποκτούσαν σωματικό βάρος έως τον θάνατό τους σε ηλικία περίπου 9 εβδομάδων(1). Παρόλο που η υπόφυση τους παρήγαγε αυξητική ορμόνη (GH) τα κύτταρα της ήταν μικρά και ατροφικά. Επειδή τα ποντίκια Klotho δεν αναπτύσσονταν μετά από θεραπεία με GH, θεωρήθηκε ότι η ανεπάρκεια της GH δεν ήταν η πιθανή αιτία της καταστολής της ανάπτυξης, εφόσον τα ποντίκια Klotho δεν αναπτυσσόταν ακόμη και μετά τη θεραπεία με ανθρώπινη GH(13).

Υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός: Τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά των ποντικών Klotho ήταν στείρα(13). Οι όρχεις των ποντικών Klotho παρουσίαζαν έντονη ατροφία και δεν παρήγαγαν ώριμο σπέρμα. Οι σπερματογενείς σωληνίσκοι ήταν μικροί και η σπερματογένεση δεν προχωρούσε πέρα από το pachytene stage . Τα θηλυκά ποντίκια Klotho δεν εμφάνιζαν ποτέ κολπικό στόμιο. Οι ωothήκες και οι μήτρες τους ήταν εξαιρετικά ατροφικές και η ωοθυλακιογένεση δεν προχωρούσε πέρα από το δεύτερο στάδιο. Δεν παρατηρήθηκαν ωχρά σωμάτια ,γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι η ωορρηξία δεν συνέβαινε ποτέ(1).Φάνηκε ότι η διαταραγμένη ωρίμανση των ωοθυλακίων δεν οφειλόταν σε πρωτογενές ελάττωμα των ωοθηκών αλλά σε ατελής λειτουργία της υπόφυσης και του υποθαλάμου (υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός)(1).Η έκφραση της ορμόνης (LH) και της (FSH) στην υπόφυση μειώθηκε σημαντικά τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά ποντίκια Klotho (1). Η εξωγενής χορήγηση της FSH ή της (GnRH) αποκατέστησε εν μέρει την ωοθυλακιοτική τους ωρίμανση ,την ανάπτυξη της μήτρας και των ωοθηκών(13, 14) .Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ποντίκια Klotho παρουσίαζαν ωορρηξία και φυσιολογική ωοθηκική λειτουργία όταν οι ωοthήκες τους μεταμοσχευόταν σε θηλυκά ποντίκια άγριου τύπου(15). Αυτές οι παρατηρήσεις απέδειξαν ότι η Klotho εμπλέκεται στη λειτουργική ρύθμιση της υπόφυσης και του υποθαλάμου ,γεγονός το οποίο απαιτείται για την πρόκληση της εφηβείας(13).

Πρώωρη θυμική υποστροφή :Ο θυμός των ποντικών Klotho φαινόταν φυσιολογικός σε μέγεθος έως την ηλικία των 4 εβδομάδων και στη συνέχεια υποβαλλόταν σε ταχεία υποστροφή , με αποτέλεσμα να μην είναι ορατός πλέον στην ηλικία των 8 εβδομάδων(1). Η θυμο-ποιητική ανεπάρκεια στα ποντίκια Klotho δεν φάνηκε να οφείλεται σε εγγενές ελάττωμα των λεμφο-αιμοποιητικών προγόνων, επειδή τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα από τα ποντίκια Klotho μπορεί να διαφοροποιηθούν σε κανονικά λεμφοειδή κύτταρα όταν μεταμοσχευθούν σε ποντίκια άγριου τύπου(5) . Πιθανόν η ανεπάρκεια οφειλόταν σε ελάττωμα των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων που υποστηρίζουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των λεμφοκυττάρων. Η παθοφυσιολογία ήταν παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται στη θυμική υποστροφή η οποία σχετίζεται με τη φυσιολογική διαδικασία της γήρανσης. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι αυτή η θυμική υποστροφή μπορεί να διασωθεί με ένεση KGF (αυξητικός παράγοντας κερατινοκυττάρων, γνωστός και ως FGF7) που προκαλεί πολλαπλασιασμό των θυμικών επιθηλιακών κυττάρων σε ποντίκια Klotho καθώς και σε φυσιολογικά ηλικιωμένα ποντίκια άγριου τύπου(5).

Ατροφία ιστών :Εκτός από τα αναπαραγωγικά όργανα και τον θύμο αδέν, το δέρμα και το έντερο εμφάνιζαν έντονη ατροφία στα ποντίκια Klotho. Η ιστολογία του δέρματος τους έδειξε

ελαττωμένο αριθμό θυλάκων της τρίχας και μειωμένο πάχος του δερματικού και του επιδερμικού στρώματος και δεν παρατηρήθηκε υποδόριο λίπος (1). Η ιστολογία του εντέρου έδειξε ελάττωση του πάχους του στρώματος του βλεννογόνου και μειωμένο ύψος των εντερικών λαχνών (16). Το δέρμα και το έντερο είναι ιστοί υψηλής ροής (high-turnover tissues) που περιέχουν βλαστικά κύτταρα που αναγεννούν συνεχώς τα επιθηλιακά κύτταρα. Αυτά τα πολυπολλαπλασιαστικά κύτταρα μπορούν να επισημανθούν με νουκλεοσιδική ανάλογη βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU)(17). Φάνηκε ότι ο αριθμός των θετικών σε BrdU κυττάρων μειώνεται σημαντικά στο δέρμα και στο έντερο στα ποντίκια Klotho, υποδηλώνοντας ότι η ατροφία αυτών των ιστών μπορεί να οφείλεται σε μειωμένο αριθμό και ελαττωμένο πολλαπλασιασμό των βλαστικών κυττάρων(17).

Λεμφοκυτταροπενία: Όπως το δέρμα και το έντερο, ο μυελός των οστών είναι ένας άλλος πολυπολλαπλασιαστικός ιστός (highly proliferative tissue). Η κυτταρομετρική ανάλυση ροής των κυττάρων μυελού των οστών αποκάλυψε επιλεκτική μείωση των B-λεμφοειδών κυττάρων σε ποντίκια Klotho(18). Η B-λεμφοκυτταροπενία ήταν μια χαρακτηριστική αλλαγή στο ανοσοποιητικό σύστημα που σχετίζεται με την ηλικία και που ενδεχομένως συμβάλλει στην αύξηση της νοσηρότητας από λοιμώδη ασθένειες στο ηλικιωμένο πληθυσμό(19). Επειδή τα B-λεμφοειδή κύτταρα δημιουργούν επίσης και οστεοκλάστες(18), η μείωση αυτών των κυττάρων στο μυελό των οστών μπορεί επίσης να συμβάλει στην παθολογία των οστών στα ποντίκια Klotho.

Οστεοπενία: Η συνολική οστική πυκνότητα (BMD) των οστών των ποδιών (μηριαίου και κνήμης) στα ποντίκια Klotho ήταν χαμηλότερη από αυτήν στα ποντίκια άγριου τύπου(20). Βρέθηκε ότι αυτό οφείλεται κυρίως στο μειωμένο πάχος του φλοιώδους οστού(21). Η ιστομορφομετρική ανάλυση έδειξε σημαντική μείωση του ρυθμού σχηματισμού οστού που σχετίστηκε με μειωμένο αριθμό τόσο των οστεοκλαστών όσο και των οστεοβλαστών. Η μείωση του σχηματισμού οστού υπερέβαινε εκείνη της απορρόφηση οστού, με αποτέλεσμα καθαρή οστική απώλεια, χαρακτηριστικά τα οποία παρατηρούνται στη γεροντική οστεοπόρωση σε ηλικιωμένους ή στη μεταβολική νόσο των οστών που σχετίζεται με χρόνια νεφρική νόσο(21).

Γήρανση του πνεύμονα: Ως γήρανση του πνεύμονα έχουν οριστεί οι σχετιζόμενες με την ηλικία μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές του πνεύμονα, συμπεριλαμβανομένης της διεύρυνσης των κυψελίδων, της μειωμένης ελαστικής ανάκρουσης και του αυξημένου υπολειπόμενου όγκου(22). Τα χαρακτηριστικά αυτά παρατηρούνται επίσης στο πνευμονικό εμφύσημα, αλλά εξ ορισμού το πνευμονικό εμφύσημα πρέπει να συνοδεύεται από καταστροφή του κυψελιδικού τοιχώματος(22). Η ιστολογική ανάλυση του πνεύμονα των ποντικών Klotho

έδειξε προοδευτικές εμφυσηματικές μεταβολές, μαζί με την καταστροφή των κυψελιδικών τοιχωμάτων, την διεύρυνση των αεραγωγών και την μείωση της ελαστικής ανάκρουσης(23). Ένα μαθηματικό μοντέλο πρότεινε ότι το μοτίβο της κυψελιδικής καταστροφής στα ποντίκια Klotho είναι σύμφωνο με μια τυχαία καταστροφή που προκαλείται από συστημικούς παράγοντες(24). Ωστόσο, ορισμένοι ερευνητές δεν παρατήρησαν την καταστροφή του κυψελιδικού τοιχώματος και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο πνευμονικός φαινότυπος των ποντικών Klotho δεν ήταν πνευμονικό εμφύσημα αλλά γήρανση του πνεύμονα(25).

Εκφύλιση των νευρώνων: Η γνωστική λειτουργία των ποντικών Klotho καθορίστηκε από δοκιμαστικά τεστ αναγνώρισης νέου αντικειμένου και με τεστ φόβου(26). Οι νευρώνες του ιππόκαμπου των ποντικών Klotho παρουσίαζαν αυξημένη απόπτωση και αυξημένες οξειδωτικές βλάβες στα λιπίδια και στο DNA τους(26). Επιπλέον έχει φανεί, ότι η θεραπεία των ποντικών Klotho με αντιοξειδωτική α-τοκοφερόλη βελτίωσε τη γνωστική λειτουργία τους, εξασθένησε την οξειδωτική βλάβη και μείωσε την απόπτωση στον ιππόκαμπο(27). Τα κύτταρα πρόσθιου κέρατος (AHCs) στον νωτιαίο μυελό εκφυλίζονται σε ποντίκια Klotho. Αυτό είναι παρόμοιο με το εύρημα που παρατηρήθηκε σε ασθενείς με αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) με εκφυλισμό στους κινητικούς νευρώνες. Τα AHCs των ποντικών Klotho δείχνουν σημαντική μείωση του κυτταροπλασματικού RNA, των ριβοσωμάτων και του τραχύ ενδοπλασματικού δικτύου και συσώρευση νευροϊνιδίων όπως αυτά των ασθενών με ALS(27). Μελέτες έχουν αποδείξει ότι το αυξημένο οξειδωτικό στρες είναι ένας κοινός μηχανισμός που κρύβεται σε πολλές νευροεκφυλιστικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένου της ασθένειας του Alzheimer, του νόσου του Πάρκινσον και του ALS(28). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι η πρωτεΐνη Klotho μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες και να προστατεύει τους νευρώνες από οξειδωτική βλάβη(29).

Διαταραχή ακοής: Η έκφραση Klotho ανιχνεύεται στον αγγειακό ράβδο και τον σπειροειδή σύνδεσμο του εσωτερικού αυτιού. Αν και δεν παρατηρούνται μορφολογικές ανωμαλίες στο εσωτερικό αυτί των ποντικών Klotho, αυτά έχουν σημαντικά υψηλότερο όριο για την ακουστική απόκριση του εγκεφαλικού στελέχους από τα ποντίκια άγριου τύπου, υποδηλώνοντας την ύπαρξη διαταραχής ακοής(30).

Αγγειακή ασβεστοποίηση: Τα ποντίκια Klotho ανέπτυξαν σοβαρή αγγειακή ασβεστοποίηση στην αορτή και στις αρτηρίες των νεφρών. Η ασβεστοποίηση των αγγείων εμφανίστηκε στο μεσαίο στρώμα με μικρή ή καθόλου πάχυνση στο εσωτερικό στρώμα των αγγείων(1). Η αρτηριοσκλήρωση εντοπίστηκε για πρώτη φορά περίπου 4 εβδομάδες μετά τη γέννηση και εξελίχθηκε σταδιακά με την ηλικία. Αυτές οι αγγειακές αλλαγές παρατηρήθηκαν στην

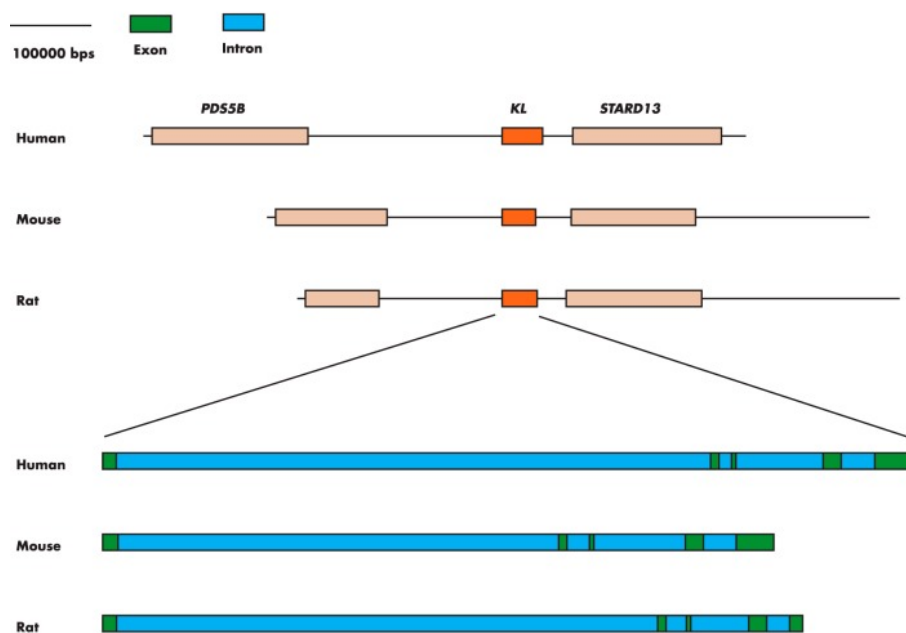
αρτηριοσκλήρωση τύπου Mönckeberg που υπάρχει συχνά στους ηλικιωμένους ασθενείς με διαβήτη και στη χρόνια νεφρική νόσο νόσο(1).

2. Το γονίδιο της Klotho και η δομή της πρωτεΐνης

2.1. Το γονίδιο Klotho

Το γονίδιο Klotho, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Klotho στο ποντίκι βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 και πλαισιώνεται από PDS5B και STARD13 (1). Ο τύπος του γονιδίου KL βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 στους αρουραίους και στο χρωμόσωμα 13 σε ανθρώπους, καθώς τα γειτονικά γονίδια τους είναι όμοια και στα δύο είδη. Το γονίδιο Klotho παρουσιάζει

ομοιότητα σε μεγάλο βαθμό σε ανθρώπους, ποντίκια και αρουραίους(31). Συγκεκριμένα, η αλληλουχία της πρωτεΐνης Klotho είναι 98% ταυτόσημη μεταξύ ανθρώπων και ποντικών (Εικόνα 1).



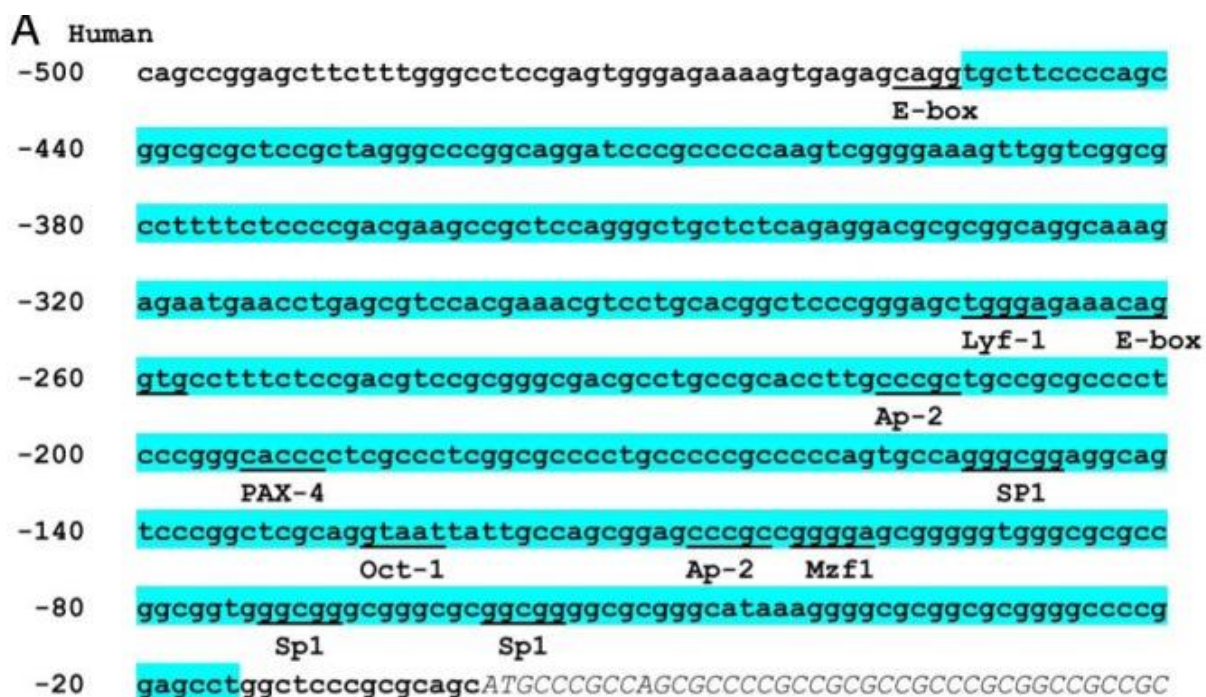
Εικόνα 1. Αρχιτεκτονική του γονιδίου και της πρωτεΐνης Klotho από τον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο. Α, Η δομή του γονιδίου Klotho από τον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο. Τα ανάντη και κατόντη γειτονικά γονίδια επισημαίνονται με ανοιχτό καφέ χρώμα. Τα ιντρόνια και τα εξώνια επισημαίνονται με μπλε και πράσινο χρώμα αντίστοιχα. (Πηγή: Xu Y, Sun Z. Molecular basis of Klotho: from

gene to function in aging. Endocr Rev. 2015 Apr;36(2):174-93. doi: 10.1210/er.2013-1079. Epub 2015)

Το γονίδιο Klotho εντοπίζεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 13q12(32), αποτελείται από πέντε εξώνια και τέσσερα ιντρόνια, μεταγράφει mRNA 3.036 νουκλεοτιδίων και κυμαίνεται πάνω από 50 kb(31).

Ομάδα μελετών ανέλυσε την περιοχή του ανθρώπινου υποκινητή Klotho και ανέφερε ότι η περιοχή των 500-bp που βρίσκεται αμέσως ανάντη της θέσης έναρξης της μεταγραφής του KL αποτελεί βασικό ρυθμιστή της μεταγραφής του Klotho(33).

Τα αρχικά 300 bp της περιοχής υποκινητή αναστέλλουν τη μεταγραφή της Klotho μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού, ενώ η υπόλοιπη περιοχή των 200 bp ενισχύει την έκφραση της Klotho (33). Οι E-box, Lyf-1 και Ap-2 βρίσκονται όλοι στην αρχική περιοχή των 300-bp, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες μπορεί να αναστέλλουν τη μεταγραφή της Klotho(33) .



Εικόνα 2. Δομή του υποκινητή Klotho(Πηγή: Xu Y, Sun Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. Endocr Rev. 2015 Apr;36(2):174-93. doi: 10.1210/er.2013-1079. Epub 2015)

Η περιοχή υποκινητή του ανθρώπινου KL είναι μια περιοχή πλούσια σε Sp1 που συνεργάζεται με τον Oct-1 (34) (Εικόνα 2). Η Ap-2 είναι σε θέση να διεγείρει τη σύνθεση του RNA (35).

Το PAX-4 είναι ένας σημαντικός παράγοντας μεταγραφής στα παγκρεατικά κύτταρα και κρίσιμος ρυθμιστής στην ανάπτυξη του παγκρέατος των θηλαστικών (36). Ο Mzf1 είναι ένας διλειτουργικός ρυθμιστής που καταστέλλει τη μεταγραφή σε μη αιμοποιητικά κύτταρα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή σε κύτταρα αιμοποιητικής προέλευσης (37). Ο E-box είναι μια θέση πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες στην οποία μια DNA αλληλουχία αναγνωρίζεται από

πρωτεΐνες όπως οι c-Myc, E47, και τα ένζυμα που σχετίζονται με το Myo, τα οποία ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων που ακολουθούν. Ο Lyf-1, ο οποίος είναι επίσης γνωστός ως πρωτεΐνη δακτύλου ψευδαργύρου 1 της οικογένειας Ikaros, είναι ένας σημαντικός παράγοντας μεταγραφής στο αιμοποιητικό σύστημα, ιδίως στην ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων (38).

Πολλαπλοί μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου Klotho, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που δεσμεύονται στις περιοχές του υποκινητή E-box, Ar-2, PAX4, Sp1 και Oct-1 (31). Ο NF-κB δεσμεύεται με τον υποκινητή της Klotho με ανασταλτική δράση (39). Πιθανολογείται κατά αυτόν τον τρόπο η εξήγηση των μειωμένων επιπέδων Klotho σε φλεγμονώδεις καταστάσεις (39). Σημειώθηκε, ότι η αγγειοτενσίνη II είναι ένας σημαντικός αναστολέας του θετικού ρυθμιστή Sp1 της μεταγραφής της Klotho (40). Το ένζυμο HMG-CoA αναγωγάση έχει επίσης ανασταλτική δράση, η οποία μπορεί να αντιστραφεί με το φάρμακο στατίνη, που είναι αναστολείς αυτού του ενζύμου (41). Έχει παρατηρηθεί ότι οι στατίνες ρυθμίζουν το mRNA της Klotho, πιθανώς μέσω της αδρανοποίησης της RhoA και της μείωσης της απόκριση της στην αγγειοτενσίνη II (42). Επιπλέον, φαίνεται ότι ο FGF23 είναι ένας ισχυρός αρνητικός ρυθμιστής της μεταγραφής της Klotho (43). Κατά συνέπεια, τα γεγονότα που αυξάνουν την παραγωγή του FGF23 μειώνουν την Klotho, όπως συμβαίνει στην χρόνια νεφρική νόσος πχ (44). Το γονίδιο Klotho συχνά απενεργοποιείται στα καρκινικά κύτταρα, μέσω διαφόρων μηχανισμών που θα αναλυθούν στα παρακάτω κεφαλαία. (45). Συγκεκριμένα, ο υποκινητής του Klotho υπόκειται στη μεθυλίωση του DNA και στους όγκους μπορεί να απενεργοποιηθεί το DNA με υπερμεθυλίωση. Η Klotho ρυθμίζεται επίσης από τα miRNAs και αυτό φαίνεται να έχει σημασία στον καρκίνο (46).

Έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις ή μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) στο ανθρώπινο γονίδιο Klotho. Οι πολυμορφισμοί συσχετίστηκαν με παθήσεις των νεφρών, με τη στεφανιαία νόσο, με εγκεφαλικά επεισοδία και τη διαταραχή στην οστική πυκνότητα (47). Η μετάλλαξη KL-VS βρέθηκε να είναι ένας πολυμορφισμός που αναφέρεται στις ανθρώπινες μεταλλάξεις της α-Klotho F352V και C370S(48). Η μετάλλαξη F352V επηρεάζει την κατανομή της εκκρινόμενης α-Klotho μειώνοντας την έκκριση της και αυξάνοντας την αφθονία της εκκρινόμενης α-Klotho στην κυτταρική μεμβράνη(48). Το μοριακό βάρος της ελεύθερα εκκρινόμενης α-Klotho είναι περίπου 5 kDa μεγαλύτερο από εκείνο της δεσμευμένης στη μεμβράνη εκκρινόμενης α-Klotho(49). Η διαφορά αυτή είναι αποτέλεσμα μετα-μεταφραστικής μετατροπής(48). Η μετάλλαξη C370S αυξάνει την εκκρινόμενη α-Klotho, αλλά δεν επηρεάζει το επίπεδο της α-Klotho που συνδέεται με τη μεμβράνη(49). Στη διπλά μεταλλαγμένη KL-VS, η κατανομή της α-Klotho είναι ισορροπημένη μεταξύ της εκκρινόμενης και της μεμβρανο-

εντοπισμένης μορφής (50). Και οι δύο αυτές μεταλλάξεις εντοπίζονται στο εξώνιο 2 του γονιδίου KL και σχετίζονται επίσης με άλλες μεταλλάξεις άνευ σημασίας. Μια ομάδα ερευνητών διαπίστωσε ότι η μετάλλαξη KL-VS είναι σημαντική για τον καθορισμό της λειτουργίας της α-Klotho στον μεταβολισμό των μετάλλων(51).

Σε μια άλλη μελέτη διατυπώθηκε ότι η ετερόζυγη μετάλλαξη KL-VS σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών μεταξύ των φορέων της μετάλλαξης BRCA1 (185delAG, 5382 in- sertC). (52)

Αναφέρθηκε ότι το KL-VS θα μπορούσε να είναι δείκτης αυξημένου κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών παθήσεων (53). Οι ερευνητές τονίζουν τη σημασία αυτού του πολυμορφισμού με την εμφάνιση πρώιμης έναρξης στεφανιαίας νόσου (CAD)(49). Επιπλέον, το KL-VS σχετίζεται με αυξημένο επίπεδο λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας ορού με αύξηση της συστολικής αρτηριακής πίεσης και αυξημένο κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου(53). Αυτό υποστηρίζει την υπόθεση της συσχέτισης της Klotho με την αθηροσκλήρωση (49). Επιπλέον, τα δεδομένα αποκάλυψαν τη σχέση μεταξύ του rs650439 (ιντρόνιο 4), του άλλου αντιπροσωπευτικού μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού του Klotho, και της αθηροσκλήρωσης των καρωτίδων σε υπερτασικούς ασθενείς (54).

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί G395A που βρίσκονται στον υποκινητή και C1818T στο εξόνιο 4 είναι άλλες, καλά μελετημένες, παραλλαγές του ανθρώπινου γονιδίου Klotho. Ερευνητές ανακάλυψαν τη συσχέτιση τους με την υπερασβεστιαμία, την υποφωσφαταιμία, την φωσφατουρία και τη χαμηλή οστική πυκνότητα (55). Έχει διαπιστωθεί ότι ο πολυμορφισμός G395A μπορεί να είναι ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου (56). Είναι ενδιαφέρον ότι πιο συχνή παρουσία του αλληλόμορφου G395A δεν εμφανίστηκε σε ασθενείς με αγγειοσυσπαστική στηθάγχη, υποδεικνύοντας ότι ο πολυμορφισμός μπορεί να σχετίζεται με στεφανιαία νοσο λόγω αθηροσκλήρωσης (56).

Ομοίως, οι Rhee et al βρήκαν συσχέτιση μεταξύ της παραλλαγής του Klotho και των παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου σε μια έρευνα υγιών κορεατικών γυναικών (57). Η ανάλυση αποκάλυψε υψηλότερη μέση συστολική αρτηριακή πίεση σε φορείς του G395A και υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα σε φορείς του αλληλόμορφου C1818T, γεγονός που συνιστά αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου (57). Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη ,διακήρυξε τη σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού G395A και των καρδιαγγειακών επιπλοκών (47). Έγινε γνωστό ότι η νεφρική νόσος τελικού σταδίου οδηγεί σε διάφορες καρδιακές διαταραχές(47). Η ερευνητική ομάδα περιελάμβανε τους παιδιατρικούς ασθενείς με χρόνια

νεφρική νόσο (XNN), στους οποίους μελετήθηκε η καρδιαγγειακή νόσος σε σχέση με τον επιπολασμό της υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας και της διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας (47). Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα αλληλόμορφου A του G395A σε ασθενή με νεφρική νόσο τελικού σταδίου με υπερτροφία της αριστερής κοιλίας (47). Ουσιαστικά, αυτά τα ευρήματα υπογράμμισαν τη σημασία των πολυμορφισμών του Klotho για την εμφάνιση της αθηροσκλήρωσης, της στεφανιαίας νόσου ή της υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας(47,56,57).

Μια ομοζυγωτική γονιδιακή μετάλλαξη, η οποία μετατρέπει την κωδική περιοχή από A σε G στη θέση 578 και αλλάζει το aa από His σε Arg, εντοπίστηκε σε ένα κορίτσι 13 ετών που είχε σοβαρή καρκινική ασβεστοποίηση με ασβεστοποιήσεις στην καρωτιδική αρτηρία (58). Αυτή η ομόλογη μετάλλαξη στο γονίδιο Klotho στο ποντίκι μειώνει την έκφραση της α-Klotho, η οποία μπορεί να ανακτηθεί με έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία(58). Αυτή η μετάλλαξη στον ποντικό καταστέλλει τη σύνδεση της μεμβρανικής α-Klotho με τον FGF23, αλλά δεν επηρεάζει τη σύνδεση της α-Klotho με τον FGFR. Η ασθενής με αυτή τη μετάλλαξη εμφάνισε ορισμένα παθολογικά φαινόμενα, όπως υπερασβεστιαϊμία, υπερφωσφαταιμία και αυξημένα επίπεδα 1,25(OH)₂ D₃ (58), συμπτώματα οποία ήταν παρόμοια με εκείνα του μεταλλαγμένου ποντικού α-Klotho(1).

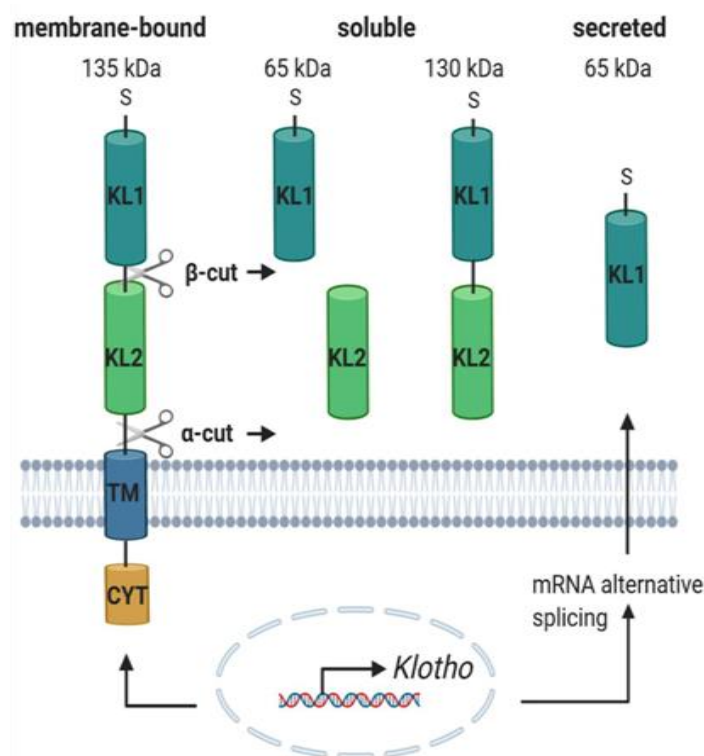
Μια άλλη ιντρονική παραλλαγή του Klotho (rs577912, C>A) συνδέθηκε με τον κίνδυνο 1 έτους θνησιμότητας από όλες τις αιτίες σε ασθενείς που υποβάλλονται σε επεισώδια χρόνιας αιμορραγίας. Η αύξηση του κινδύνου θνησιμότητας που σχετίζεται με τον γονότυπο CC δεν ανιχνεύθηκε σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με ενεργή βιταμίνη D, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτή η θεραπεία θα μπορούσε να τροποποιήσει τον κίνδυνο θανάτου(59). Μια μελέτη του γονότυπου CC σε λεμφοβλαστοειδείς κυτταρικές σειρές παρατήρησε ότι η παραλλαγή προκάλεσε μείωση 16-21% στην έκφραση Klotho σε σύγκριση με τον γονότυπο AA/AC.(59)

2.2.Χαρακτηριστικά και δομή της πρωτεΐνης Klotho

2.2.Χαρακτηριστικά και δομή της πρωτεΐνης Klotho

Το γονίδιο Klotho κωδικοποιεί μια μονής διέλευσης διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου 1(135 kDa) που αποτελείται από 1.012 αμινοξέα και βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη (60) και στα σώματα Golgi (61).Αποτελείται από μια N-τερματική αλληλουχία σήματος, ακολουθούμενη από δύο εξωκυτταρικές περιοχές γλυκοσιδάσης (KL1 και KL2), μια διαμεμβρανική έλικα και μια μικρή ενδοκυτταρική κυτοσολική περιοχή στο C-άκρο(62) (Εικόνα 3). Η ενδοκυτταρική περιοχή είναι πολύ μικρή (~10 αμινοξέα) και δεν έχει γνωστές λειτουργικές περιοχές (60).Το

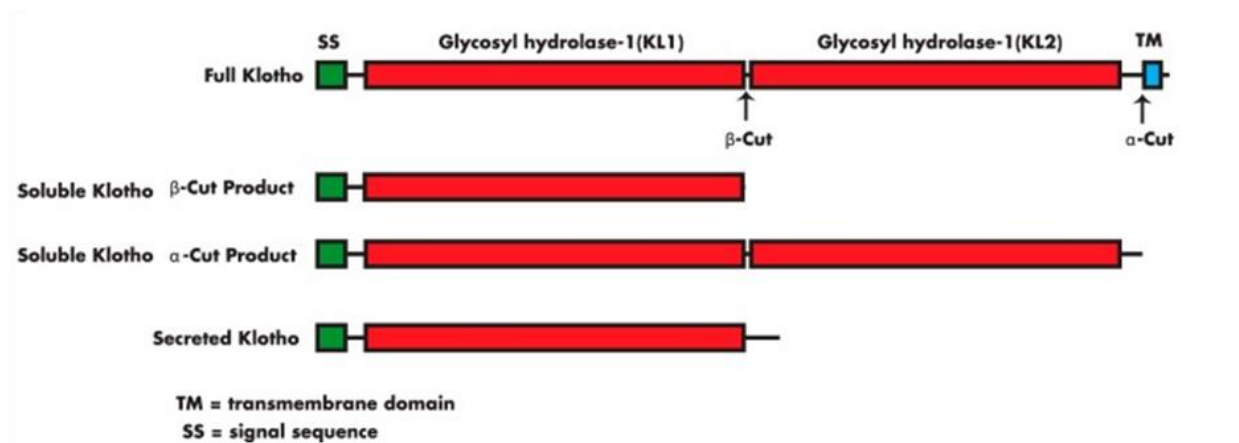
εξωκυτταρικό τμήμα έχει δύο εσωτερικές επαναλήψεις, KL1 και KL2, οι οποίες έχουν ομολογία αλληλουχίας αμινοξέων με τις γλυκοσιδάσες της οικογένειας 1 που υδρολύουν τον β-γλυκοσιδικό δεσμό σε σακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια (63). Η συνδετική περιοχή μεταξύ των δύο εσωτερικών επαναλήψεων περιέχει τέσσερα βασικά αμινοξέα (Lys-Lys-Arg-Lys) που σχηματίζουν μια πιθανή θέση για την πρωτεολυτική διάσπαση (64)



Εικόνα 3..Δομή της πρωτεΐνης Klotho (Πηγή:Ewendt F, Role of Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) and αKlotho in Cancer. Front. Cell Dev.2021)

Η εξωκυτταρική περιοχή του Klotho μπορεί να διασπαστεί από πρωτεάσες της μεμβράνης όπως η ADAM10 και η ADAM17 (μεταλλοπρωτεΐνάση 10 και 17) και να απελευθερωθεί στο αίμα, στα ούρα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (65). Η διασπασμένη Klotho λειτουργεί ως ενδοκρινή, αυτοκρινή και παρακρινή ορμόνη στα κύτταρα στόχους (10).

Τρεις πρωτογενείς ισομορφές της πρωτεΐνης α-Klotho έχουν ταυτοποιηθεί ως εξής: η πλήρους μήκους διαμεμβρανική μορφή (mKI), μια διαλυτή Klotho (sKI), και μια εκκρινόμενη περικομμένη μορφή που παράγεται με εναλλακτικό μάτισμα του mRNA Klotho και αποτελείται μόνο από το KL1 (62) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Η αρχιτεκτονική της πρωτεΐνης Klotho του ανθρώπου. (Πηγή: Xu Y, Sun Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. Endocr Rev. 2015 Apr;36(2):)

Η πρωτεΐνη α-Klotho πλήρους μήκους είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που περιέχει δύο ξεχωριστές δομές γλυκοζυλικής υδρολάσης, τις KL1 και KL2 (31). Η δραστικότητα και η λειτουργία της α-Klotho συνδέεται με αυτές τις δύο περιοχές(31).

Η διαλυτή Klotho (sKL) δημιουργείται από τη διάσπαση της α-Klotho πλήρους μήκους από τις πρωτεάσες μεμβράνης (ADAM 10 και ADAM 17) με μια α-κοπή. Το αποτέλεσμα της α-κοπής είναι μια πρωτεΐνη (130 kDa) που περιέχει και τις δύο περιοχές KL1 και KL2, αλλά στερείται το διαμεμβρανικό έλικα και το ενδοκυτταρικό τμήμα (64) (Εικόνα 1). Μετά την α-κοπή, το υπόλοιπο διαμεμβρανικό και κυτοσολικό τμήμα (5 kDa) στη συνέχεια υφίσταται πρωτεόλυση από γ-σεκρετάσες (65). Μια ισόμορφη 65 kDa πρωτεΐνη δημιουργείται μετά από μια β-κοπή(β-cut) και περιέχει την περιοχή KL1(14). Η εκκρινόμενη Klotho δημιουργείται με εναλλακτικό μάτισμα mRNA του α-Klotho (14) και η πρωτεϊνική της αλληλουχία είναι παρόμοια με την περιοχή KL1 του α-Klotho, εκτός από το C-άκρο(14). Αυτή η απελευθερωμένη εξωκυτταρική περιοχή της μεμβρανικής α-Klotho αναφέρεται ως διαλυτή ή διασπασμένη α Klotho. Αποτελεί κύρια λειτουργική μορφή στην κυκλοφορία.(66)

Άλλα μέλη της οικογένειας Klotho, είναι το β-Klotho και το γ-Klotho. Όπως και η α-Klotho, η β-Klotho και η γ-Klotho είναι διαμεμβρανικές μονής διέλευσης τύπου I πρωτεΐνες, που μοιράζονται ομολογία αλληλουχίας με τις β-γλυκοσιδάσες της οικογένειας 1 αλλά στερούνται δύο συντηρημένων καταλοίπων γλουταμινικού οξέος που είναι απαραίτητα για τις ενζυμικές δραστηριότητες γλυκοσιδάσης (67). Το β-Klotho εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και τον λευκό λιπώδη ιστό και έχει διαφορετικές λειτουργίες από το α-Klotho(67). Οι κυρίαρχες λειτουργίες

του β-Klotho περιλαμβάνουν τη σύνθεση χολικών οξέων, την πρόσληψη γλυκόζης και τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων (68).

Η γ-Klotho είναι μια βραχύτερη διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που αποτελείται από εξωκυτταρική περιοχή παρόμοια με τη γλυκοσιδάση (τομέας KL1) και περιέχει μια μικρή ενδοκυτταρική περιοχή (69). Η γ-Klotho εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στους νεφρούς και στο δέρμα (69). Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η γ-Klotho δεν είναι ανιχνεύσιμη στο δέρμα, αλλά εκφράζεται άφθονα στο μάτι (71). Ενώ η α-Klotho υπάρχει σε εκκρινόμενη (ή διαλυτή) μορφή, μέχρι τώρα έχει γίνει μόνο μία αναφορά για τη διαλυτή μορφή των β και γ-Klotho. (72) Η β-Klotho εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, στον λιπώδη ιστό και στο πάγκρεας, ενώ η γ-Klotho εκφράζεται στους νεφρούς και στο δέρμα (69).

3.Η κατανομή της Klotho στους ιστούς

Μέχρι σήμερα, το προφίλ έκφρασης της α-Klotho στους ανθρώπινους ιστούς είναι άγνωστο και η ύπαρξή της σε ορισμένους τύπους ανθρώπινου ιστού υπόκειται σε πολύ μεγάλη αντιπαράθεση(73). Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη α-Klotho εκφράζεται μόνο σε περιορισμένο αριθμό ιστών, με σημαντικότερο τον νεφρό, τον παραθυρεοειδή αδένα και το χοριοειδές πλέγμα(1). Αν και υπάρχουν διαφωνίες, ο νεφρός θεωρείται συνήθως η κύρια πηγή ιστού του κυκλοφορούντος Klotho δεδομένου ότι είναι το μεγαλύτερο όργανο που εκφράζει το Klotho σε υψηλά επίπεδα(73).

Στην αρχική μελέτη η ,οποία ταυτοποίησε το γονίδιο Klotho, αναφέρθηκαν υψηλά επίπεδα mRNA του γονιδίου στους νεφρούς, στον εγκέφαλο και στην υπόφυση και χαμηλότερα επίπεδα στον πλακούντα, στους σκελετικούς μύες, στην ουροδόχο κύστη, στην αορτή, στο πάγκρεας, στους όρχεις, στην ωοθήκη, στο κόλον και στον θυρεοειδή αδένα (1). Δεν ανιχνεύθηκε έκφραση στον πνεύμονα, στο ήπαρ, στη σπλήνα και σε έναν αριθμό άλλων ιστών(1).

Παρόμοια με τα ποντίκια, η γονιδιακή έκφραση ήταν υψηλή στους νεφρούς και επίσης στον πλακούντα, και χαμηλότερη έκφραση παρατηρήθηκε στον εγκέφαλο, στον προστάτη και στο λεπτό έντερο(74). Σε αυτό το σημείο το πρότυπο έκφρασης του Klotho είχε χαρακτηριστεί αποκλειστικά με μεθόδους βασισμένες σε RNA. Το 2000 καθιερώθηκαν τα πρώτα μονοκλωνικά αντισώματα που ανιχνεύουν ειδικά το Klotho ποντικίου και ανθρώπου, επιτρέποντας τη διερεύνηση της έκφρασης της πρωτεΐνης(74).

Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση του mRNA του Klotho και της πρωτεΐνης αλληλοεπικαλύπτονταν σε μεγάλο βαθμό, αν και η έκφραση πρωτεΐνης σε ιστούς με χαμηλή

γονιδιακή έκφραση δεν μπορούσε να επικυρωθεί με τεχνικές ανοσοχρώσης(12). Το 2004, αναπτύχθηκε ένα νέο στέλεχος ποντικίου με ένα γονίδιο αναφοράς που εκφράζεται υπό τον υποκινητή του Klotho, επιτρέποντας ακριβή διερεύνηση του εντοπισμού του Klotho κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη σε ενήλικα ποντίκια (12). Οι αναλύσεις αυτού του μοντέλου οδήγησαν τους συγγραφείς στο συμπέρασμα ότι η Klotho εκφραζόταν αποκλειστικά στα άπω σωληνάρια του νεφρού, στον παραθυρεοειδούς αδένα και στο χοριοειδούς πλέγματος. Τα επόμενα χρόνια, η έκφραση Klotho αναφέρθηκε σε πρόσθετους ιστούς που δεν συμπεριλήφθηκαν στις αρχικές εξετάσεις, όπως το εσωτερικό αυτί , τα κύτταρα που σχηματίζουν οστά , στον ιστό του μαστού και τα μονοκύτταρα (75). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν παράσχει αντικρουόμενα δεδομένα για την Klotho στο αρτηριακό τοίχωμα (76) και στο εγγύς σωληνάριο (77). Επίσης, μια μελέτη από το 2015 χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία μάζας και ανοσοϊστοχημεία, αναφέρει εκτεταμένη έκφραση της Klotho σε έναν αριθμό εξετασθέντων ανθρώπινων ιστών (73).

Έχει βρεθεί έκφραση της πρωτεΐνης α-Klotho σε ποντίκια, αρουραίους και ανθρώπους, κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα του άπω εσπειραμένου σωληναρίου στα νεφρά (1) , σε μικρότερο βαθμό στα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου (66) και στον παραθυρεοειδή αδένα (78). Η ομάδα του Lim et al αναφέρει την έκφραση της α- Klotho και στα ανθρώπινα αγγεία (76). Η ομάδα του Olauson et al πρότεινε μια ταξινόμηση για την έκφραση της Klotho στους ιστούς με βάση τα τρέχοντα στοιχεία για τα επίπεδα έκφρασης βασικού mRNA και πρωτεΐνης(Πίνακας 1)

Επίπεδα έκφρασης mRNA και πρωτεΐνης Klotho στους ιστούς	Ιστοί με παρουσία έκφρασης του mRNA και πρωτεΐνης Klotho
Υψηλή έκφραση	άπω σωληνάρια νεφρών, παραθυρεοειδής αδένας, φλεβοκομβικός κόμβος και χοριοειδές πλέγμα
Ενδιάμεση έκφραση	εγγύς σωληνάρια νεφρών, εγκέφαλος, μάτι, εσωτερικό αυτί, ενδοκρινικό σύστημα, πνεύμονας, μέρη του ουρογεννητικού και γαστρεντερικού συστήματος και πλακούντας
Χαμηλή ή απούσα έκφραση	οστά, χόνδροι, δέρμα, λιπώδης ιστός, ήπαρ, σπλήνα, καρδιά, αρτηρίες, αίμα και κύτταρα του ανοσοποιητικού, και τμήματα του γαστρεντερικού και του ουρογεννητικού συστήματος

Πίνακας 1: Ταξινόμηση της έκφρασης της Klotho στους ιστούς κατά Olauson H (Πηγή: Olauson H, Mencke R, Hillebrands JL, Larsson TE. Tissue expression and source of circulating αKlotho. Bone. 2017)

Στη συνέχεια θα αναφερθεί ποια είναι τα δεδομένα για την έκφραση της Klotho ανά συστήματα:

3.1.Ο νεφρός και η ουροδόχος κύστη

Τόσο στους ανθρώπους όσο και στα τρωκτικά, ο νεφρός φαίνεται να είναι το όργανο με τα υψηλότερα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης Klotho. Αρχικά, η Klotho αναφέρθηκε ότι εκφραζόταν αποκλειστικά στα άπω σωληνάρια (1). Αυτό ήταν παράδοξο δεδομένου του ρόλου του Klotho ως επιτρεπόμενου συν-υποδοχέα για τον FGF23, η κύρια λειτουργία του οποίου είναι να ρυθμίζει την επαναρρόφηση φωσφόρου και το μεταβολισμό της βιταμίνης D στο εγγύς σωληνάριο. Ωστόσο, μελέτες που εξέτασαν την αρχική ανταπόκριση στις ενέσεις FGF23 επιβεβαίωσαν αυτή την παρατήρηση, με την ενεργοποίηση της οδού MAPK μόνο στα απομακρυσμένα σωληνάρια (79). Για να εξηγηθούν οι επιδράσεις από το FGF23 στον μεταβολισμό του φωσφόρου και βιταμίνης D στο εγγύς σωληνάριο, προτάθηκε μια υποτιθέμενη παρακρινική αλληλεπίδραση μεταξύ του εγγύς και του περιφερικού σωληναρίου(75).

Η θεωρία αυτή τεκμηριώθηκε αργότερα από ποντίκια με ειδική για τον άπω νεφρώνα διαγραφή της Klotho, τα οποία εμφάνισαν υπερφωσφαταιμία και αυξημένα επίπεδα FGF23 (80). Σε άλλη έρευνα αναδείχτηκε η έκφραση των μεταγραφών της Klotho σε μικροδιατομές εγγύς σωληναρίων από νεφρό ποντικίου, περίπου στο ένα τρίτο των επιπέδων στο άπω σωληνάριο (66). Χρησιμοποιώντας ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία, η ίδια ομάδα αναφέρει ότι η πρωτεΐνη Klotho βρίσκεται στη βασική μεμβράνη και στο ακραίο όριο της βούρτσας, καθώς και στο κυτταρόπλασμα του εγγύς σωληναρίου. Παρομοίως, άλλοι ερευνητές έδειξαν έκφραση mRNA και πρωτεΐνης Klotho σε μικροδιατομές εγγύων σωληναριακών τμημάτων ποντικίου και ανέφεραν επίσης ότι ο FGF23 στοχεύει άμεσα το εγγύς σωληνάριο μέσω ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK1/2-SGK1 (81). Πιο πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η Klotho εκφράζεται επίσης από τα ποδοκύτταρα και βελτιώνει την πρωτεϊνουρία μέσω της στόχευσης των διαύλων TRPC6 (82).

Για να αποκτήσει μια πιο λεπτομερή κατανόηση της έκφρασης της Klotho στα διάφορα σωληναριακά τμήματα και στα ποδοκύτταρα, η ομάδα του Olauson et al συγκέντρωσε δεδομένα από ένα πρόσφατα δημοσιευμένο σύνολο δεδομένων RNA-Seq σχετικά με την έκφραση γονιδίων ειδικά για τα τμήματα σε αρουραίους (83). Η έκφραση της Klotho στο τμήμα S2 του εγγύς σωληναρίου ήταν περίπου το 30% της έκφρασης στο άπω σωληνάριο, υποστηρίζοντας την έννοια της χαμηλότερης αλλά διακριτής έκφρασης της Klotho στο εγγύς σωληνάριο(75). Σημειωτέον, η έκφρασή της στα σπειράματα που υποβλήθηκαν σε μικροδιατομή ήταν χαμηλή ή μη ανιχνεύσιμη (0-4% σε σχέση με το άπω σωληνάριο)(75).

Αρχικά έκφραση mRNA της Klotho αναφέρθηκε στην ουροδόχο κύστη στα ποντίκια (1),(84). Στη συνέχεια αυτό το εύρημα υποστηρίχτηκε από πρόσθετα δεδομένα και σε ανθρώπους (85). Δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την έκφραση της πρωτεΐνης Klotho στην ουροδόχο κύστη.

3.2.Κεφαλή και νευρικό σύστημα

Αρχικά, σημαντικά επίπεδα mRNA της Klotho βρέθηκαν στον εγκέφαλο του ποντικού και του αρουραίου (86) αλλά όχι στον ανθρώπινο εγκέφαλο (85). Το mRNA της Klotho ανιχνεύθηκε σταθερά στον εγκέφαλο ποντικίου και αρουραίου (86) στις περισσότερες μελέτες (87) αλλά όχι σε μελέτες σε πρωτεϊνικό επίπεδο (88).

Διάφορες ομάδες ανέφεραν την έκφραση της Klotho στον ιππόκαμπο (89). Πολλές ερευνητές χρησιμοποίησαν ιστούς ποντικών Klotho ως ομάδα ελέγχου και διαπίστωσαν ότι η πρωτεΐνη Klotho του εγκεφάλου και το mRNA της Klotho του νωτιαίου μυελού ήταν ανιχνεύσιμα σε ποντίκια άγριου τύπου, αλλά όχι στα ποντίκια Klotho (90). Τα περικύτταρα του εγκεφάλου έχουν επίσης αναφερθεί ότι εκφράζουν mRNA Klotho (91). Προηγούμενες αναφορές έχουν δείξει την παρουσία της α-Klotho στο χοριοειδές πλέγμα του εγκεφάλου τρωκτικών, στα κύτταρα Purkinje της παρεγκεφαλίδας (92) και οι μελέτες στον άνθρωπο επιβεβαιώνουν την παρουσία της πρωτεΐνης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό στην υγιή κατάσταση (93).

Στην αρχική μελέτη στην οποία ανακαλύφθηκε στο ποντίκι Klotho, η έκφραση της πρωτεΐνης βρέθηκε στα νευρωνικά κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού και στην παρεγκεφαλίδα (73). Η α-Klotho εκφράστηκε πρώιστα στα κύτταρα Purkinje μεταξύ του μοριακού και του κοκκώδους στρώματος (73). Στον νωτιαίο μυελό, α-Klotho ήταν παρόν στους κινητικούς νευρώνες στην γκρίζα ύλη του κοιλιακού κέρατος (73). Στο μυεντερικό πλέγμα, η πρωτεΐνη α-Klotho βρέθηκε στα γαγγλιακά νευρωνικά σώματα των κυττάρων (73).

Τα παρεγκεφαλιδικά κύτταρα Purkinje ταυτοποιήθηκαν από τα πρώτα ως κυτταρικός τύπος που εκφράζει την Klotho (73), ενώ άλλες περιοχές με αναφερόμενη έκφραση ήταν ο υποθάλαμος, ο θάλαμος, το ραβδωτό σώμα, η substantia nigra, η αμυγδαλή, η παρεγκεφαλίδα, ο εγκεφαλικός φλοιός, η οδοντωτή έλικα, ο προμήκης μυελός, το οπτικό νεύρο, το μεσολοβίο και ο νωτιαίος μυελός (73).

Η Klotho εκφράζεται ευρέως σε όλο τον εγκέφαλο σε ποντίκια και αρουραίους, με τα υψηλότερα επίπεδα στο χοριοειδές πλέγμα (80,94). Η έκφραση της Klotho στο ανθρώπινο χοριοειδές πλέγμα δεν έχει ακόμη εξεταστεί πλήρως. Οι ακριβείς λειτουργίες της Klotho στο χοριοειδές πλέγμα είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστες, αλλά πιθανόν συμμετέχει στη μεταφορά του ασβεστίου μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και έχει ρόλο ως πηγή ιστού για το διαλύτη Klotho στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) (93).

Το γονίδιο Klotho αρχικά δεν ανιχνεύθηκε με qRT-PCR στο μάτι του ποντικίου (71), ωστόσο, κάποιοι ερευνητές ανέφεραν έκφραση της Klotho στον αμφιβληστροειδή, στην στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων, στο εσωτερικό πυρηνικό στρώμα και σε χαμηλότερο επίπεδο στο εξωτερικό πυρηνικό στρώμα, χρησιμοποιώντας ένα πολυκλωνικό αντίσωμα (AF1819) (95). Αυτό το πρότυπο χρώσης δεν βρέθηκε στον αμφιβληστροειδή του ποντικίου Klotho (95). Σε μια διαφορετική μελέτη αναδείχθηκε ένα πυρηνικό μοτίβο χρώσης για την Klotho στον αμφιβληστροειδή (96). Η ομάδα της Kokkinaki et al περιέγραψε ανιχνεύσιμα επίπεδα

μεταγραφής γονιδίου και πρωτεΐνης Klotho στον ανθρώπινο μελαγχρωματικό επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς (97). Σε μια μεταγενέστερη μελέτη αναφέρθηκε έκφραση mRNA και πρωτεΐνης Klotho στο επιθήλιο του φακού, η οποία ρυθμίστηκε προς τα κάτω κατά τη διάρκεια της γήρανση και τον σχηματισμό καταρράκτη (98).

Με RT-PCR και Western blotting ανάλυση βρέθηκε ότι το εσωτερικό αυτί είναι μια περιοχή με μέτρια προς υψηλή έκφραση της Klotho(30). Πιο συγκεκριμένα, το stria vascularis (που παράγει την ενδολέμφο) βρέθηκε να είναι θετική για την πρωτεΐνη Klotho (30,99), γεγονός το οποίο υποστηρίζει την υπόθεση ότι η Klotho μπορεί να επηρεάζει την σύνθεση ενδολέμφου τροποποιώντας τις δραστηριότητες διαφόρων διαύλων ιόντων. Έκφραση της πρωτεΐνης Klotho εντοπίστηκε επίσης στο όργανο του Corti, στα εξωτερικά και εσωτερικά τριχωτά κύτταρα και σε μικρότερο βαθμό στα σπειροειδείς κύτταρα γαγγλίου (99).

3.3. Αναπνευστικό σύστημα

Η Klotho αρχικά δεν ανιχνεύθηκε με μεθόδους που βασίζονται σε RNA στον πνεύμονα αρουραίου ή ανθρώπου (1,86). Σε μεταγενέστερες αναλύσεις, οι ιστοί των πνευμόνων ποντικών και χοίρων βρέθηκαν να εκφράζουν χαμηλά επίπεδα Klotho (100), περίπου 300 φορές χαμηλότερα από ό,τι στους νεφρούς (84). Σύμφωνα με αυτά τα ευρήματα, η πρωτεΐνη Klotho δεν ανιχνεύθηκε επίσης σε προϊόντα λύσης πνευμονικού ιστού από διάφορες ομάδες, χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα KM2076 (88). Αντίθετα, μια μελέτη αναγνώρισε ανιχνεύσιμα επίπεδα πρωτεΐνης Klotho στους κυψελιδικούς μακροφάγους(101). Μια άλλη ερευνητική ομάδα περιέγραψε με ανοσοϊστοχημεία και Western blotting ότι το επιθήλιο των αεραγωγών παράγει Klotho (102), μια ιδέα που είχε αναφερθεί προηγουμένως από τον Olauson et al (103). Μεταγενέστερες αναλύσεις πνευμονικών κυττάρων και κυτταρικών σειρών απέδειξαν ότι η Klotho μπορεί πράγματι να εκφράζεται σε χαμηλό επίπεδο στο αναπνευστικό σύστημα(103,104).

3.4.Ενδοκρινικό σύστημα

Η έκφραση της Klotho στον παραθυρεοειδή αδένά αναφέρθηκε το 2004 (12) και έως το 2007 είχε εξεταστεί λεπτομερώς(61,105). Χρησιμοποιώντας πρωτογενή απομονωμένα βόεια παραθυρεοειδικά κύτταρα, αναφέρεται ότι τα παραθυρεοειδικά κύτταρα ήταν στόχος για τη

σηματοδότηση του FGF23 και ότι ο FGF23 κατέστειλε άμεσα τη σύνθεση και την έκκριση της παραθυρεοειδούς ορμόνης (PTH) (105). Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίχθηκαν και από άλλους ερευνητές σε μια μελέτη *in vivo* (9). Ένας αριθμός μεταγενέστερων μελετών σε ανθρώπους και τρωκτικά έδειξαν ότι το παραθυρεοειδές γονίδιο Klotho καταστέλλεται τόσο στον πρωτοπαθή όσο και στον δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό, έναν μηχανισμό που διαμεσολαβείται τουλάχιστον εν μέρει από την υπερμεθυλίωση της περιοχής του προαγωγέα (78). Η μείωση στην έκφραση του Klotho πίστευαν αρχικά ότι προσδίδει αντίσταση του παραθυρεοειδούς ιστού στη σηματοδότηση FGF23, εξηγώντας τα ταυτόχρονα υψηλά επίπεδα PTH και FGF23 που παρατηρούνται τόσο στον πρωτοπαθή όσο και στον δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό(78). Ωστόσο, σε μελέτη με ποντίκια αναδείχτηκε με ειδική για παραθυρεοειδή διαγραφή Klotho, ότι ο FGF23 εξακολουθεί να είναι σε θέση να καταστέλλει την PTH μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από το Klotho(106). Επομένως, η ακριβής λειτουργία της παραθυρεοειδούς Klotho παραμένει ασαφής και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες.

Η πρόσθια υπόφυση εντοπίστηκε νωρίς ως ιστός που εκφράζει την Klotho (1), κάτι που επιβεβαιώθηκε και από μεταγενέστερες μελέτες (84,107)

Η εξέταση ενδοκρινικού ιστού αποκάλυψε έκφραση της α-Klotho σε θυλακιώδη επιθηλιακά κύτταρα του θυρεοειδή αδένος, στα κύτταρα νησιδίων του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη, σε κύτταρα της μυελώδους μοίρας των επινεφριδίων, και στα κύτταρα Leydig του όρχεως (73). Στη συνέχεια εντοπίστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης Klotho στα κύτταρα της μυελώδους μοίρας των επινεφριδίων που παράγουν κατεχολαμίνες (73). Σε αντίθεση με τους περισσότερους άλλους ενδοκρινικούς ιστούς, φαίνεται τα επινεφρίδια να εκφράζουν χαμηλά ή σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα την Klotho (71). Η ομάδα του Lim et al. βρήκε ισχυρή έκφραση της α-Klotho στα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδούς αδένος (73), υποδηλώνοντας ότι μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση της παραγωγής θυρεοειδικών ορμονών. Δεδομένου ότι ο κλινικός και υποκλινικός υποθυρεοειδισμός αυξάνεται σε επιπολασμό με την αύξηση της ηλικίας, η α-Klotho μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση της σύνθεσης της θυρεοειδικής ορμόνης (108).

Οι νησίδες του ενδοκρινικού παγκρέατος φαίνεται να είναι η κύρια θέση έκφρασης του Klotho, αν και μια μελέτη ανέφερε υψηλότερη έκφραση στους εξωκρινείς παγκρεατικούς πόρους (109). Σημειώθηκε ότι οι παγκρεατικές νησίδες έχουν χαμηλή αλλά ανιχνεύσιμη έκφραση της Klotho (109), η οποία εικάζεται ότι προστατεύει από την ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 1 και τύπου 2 (110). Όπως και για άλλους ενδοκρινικούς ιστούς έχει αναφερθεί ότι η έκφρασή της πρωτεΐνης είναι χαμηλότερη στα καρκινώματα σε σύγκριση με τον υγιή ιστό (109).

3.5. Γαστρεντερική οδός (σιελογόνοι αδένες, οισοφάγος, στομάχι, ήπαρ, χοληδόχος κύστη,λεπτό και παχύ έντερο)

Οι σιελογόνοι αδένες δεν αποτελούσαν κύριο αντικείμενο της έρευνας για την Klotho και μόνο λίγες μελέτες έχουν αξιολογήσει την έκφραση της σε αυτούς. Χρησιμοποιώντας RT-PCR, δεν βρέθηκε έκφραση του mRNA της Klotho στο υπογνάθιο αδένι ποντικού (1,60). Παρομοίως, η RNA-Seq του ανθρώπινου σιελογόνου αδένι απέδωσε μια πολύ χαμηλή τιμή FPKM 0,61 (85). Η τιμή προέκυψε από μια μελέτη του Fagerberg et al όπου τα μεταγραφώματα 27 διαφορετικών ανθρώπινων οργάνων και ιστών αναλύθηκαν με τη χρήση αλληλούχισης της επόμενης γενιάς(85). Αυτοί οι ιστοί επιλέχθηκαν για να αντιπροσωπεύουν τύπους ιστών με εξειδικευμένα λειτουργίες και να περιλαμβάνουν όλα τα κύρια όργανα και ιστούς. Όλοι οι ιστοί εξετάστηκαν μικροσκοπικά για να διασφαλιστεί η αντιπροσώπευση φυσιολογικών ιστών και να εκτιμηθεί το κλάσμα των φυσιολογικών κυτταρικών τύπων σε κάθε δείγμα. Το μεταγραφόγραμμα κάθε δείγματος ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση RNA-Seq για τον προσδιορισμό της κανονικοποιημένης αφθονίας mRNA, η οποία υπολογίστηκε ως τιμές FPKM (111). Σε αυτές τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε ένα όριο FPKM 1, περίπου που αντιπροσωπεύει ένα μόριο mRNA ανά μέσο κύτταρο στο δείγμα (112). Η κατανομή των μέσων τιμών FPKM στο διάφορα δείγματα οργάνων και ιστών κυμαίνονται από 1 έως περισσότερα από 10.000, όπως για παράδειγμα 60.000 για ορισμένα από τα μεταγραφώματα που κωδικοποιούν πεπτικά ένζυμα στο πάγκρεας(85).

Ομάδα ερευνητών χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημεία έδειξε ότι δεν υπήρχε έκφραση της πρωτεΐνης Klotho στην παρωτίδα, στον υπογλώσσιο και στον υπογνάθιο αδένι ποντικού.

Η έκφραση της πρωτεΐνης Klotho ανιχνεύθηκε στο οισοφαγικό επιθήλιο και η αλληλουχία RNA έδωσε μια χαμηλή τιμή FPKM 1,45 στον οισοφάγο (85).

Η έκφραση της Klotho δεν ανιχνεύθηκε στον γαστρικό ιστό στις περισσότερες μελέτες (1,60,86,71). Μια ανάλυση RNA-Seq ανίχνευσε πολύ χαμηλά επίπεδα της Klotho (84,113), και έδωσε μια τιμή FPKM 1,39 (85). Χρησιμοποιώντας ανοσοφθορισμό ερευνητές αποκάλυψαν την έκφραση της Klotho στο επιθήλιο, στα λεία μυϊκά κύτταρα και στους εντερικούς νευρώνες(113). Εστιάζοντας στο γαστρικό επιθήλιο, άλλοι ερευνητές ανέφεραν επίσης κάποια έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης Klotho και έδειξαν περαιτέρω ότι η έκφραση ήταν μειωμένη σε κυτταρικές σειρές γαστρικού καρκινώματος σε σύγκριση με τα φυσιολογικά γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα (114).

Στο λεπτό έντερο οι πρώτες μελέτες δεν έδειξαν καθόλου (1,60) ή έδειξαν ελάχιστη mRNA της Klotho σε αρουραίους, ποντίκια και ανθρώπους (115). Μεταγενέστερες μελέτες σε ποντίκια ανέφεραν ότι δεν υπάρχει mRNA της Klotho στο λεπτό έντερο (100), στο δωδεκαδάκτυλο, ή τον ειλεό (71). Τα επίπεδα ήταν αρκετές εκατοντάδες φορές χαμηλότερα από εκείνα των νεφρών (84). Μια αναφορά περιλαμβάνει επίσης αρνητικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημείας για την Klotho στο δωδεκαδακτυλικό επιθήλιο ποντικού (116). Μια ανάλυση με RNA-Seq έδειξε μια FPKM τιμή 3,01 για το λεπτό έντερο (και 2,74 ειδικά για το δωδεκαδάκτυλο και 1,05 για την απόφυση) (85). Συγγραφείς έχουν εντοπίσει την έκφραση της πρωτεΐνης Klotho στα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου, των λείων μυϊκών κυττάρων αλλά όχι στα κύτταρα του μωεντερικού πλέγματος ή στους μυοϊνοβλάστες (117,118). Οι Lim et al χρησιμοποιώντας διαφορετικά αντισώματα, παρατήρησαν ένα επιθηλιακό πρότυπο χρώσης για την Klotho στο ανθρώπινο έντερο και στα γαγγλιακά κυτταρικά σώματα (73).

Το παχύ έντερο φαίνεται να εκφράζει την Klotho σε επίπεδα παρόμοια με το λεπτό έντερο (60,86), με ελαφρώς υψηλότερη έκφραση σε ορισμένα (86), και ελαφρώς χαμηλότερη έκφραση σε άλλες μελέτες (85). Άλλοι συγγραφείς αναφέρουν επίσης mRNA και πρωτεΐνη Klotho στο παχύ έντερο, κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα (73).

Αν και α-Klotho έχει ανιχνευθεί σε μία μεγάλη ποικιλία από όργανα και ιστούς, δεν ήταν δυνατό να αναγνωριστεί στα ηπατοκύτταρα. Μία αναφορά με ανοσοϊστοχημική ανάλυση (IHC) ανέφερε ότι το φυσιολογικό ήπαρ ήταν αρνητικό για χρώση της α-Klotho (119), όπως αναδείχτηκε και με Western blot ανάλυση σε ηπατοκύτταρα (HepG2) που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα (73). Αν και η α-Klotho φαίνεται να απουσιάζει στα ηπατοκύτταρα, το ομόλογο της α-Klotho, η β-Klotho, εκφράζεται στα ηπατοκύτταρα και τον λιπώδη ιστό, και φαίνεται να παίζει ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης.

Σε μία μελέτη με ιστό ποντικίου με RT-PCR ανάλυση δεν βρέθηκε έκφραση της Klotho στην χοληδόχο κύστη και στο επιθήλιο των χοληφόρων (71), ενώ σε μια ανθρώπινη παρατήρηση με RNA-Seq, αναφέρθηκε μια τιμή FPKM 1,86 στη χοληδόχο κύστη (85). Αυτή η τιμή ήταν ελαφρώς υψηλότερη από ότι σε ορισμένους άλλους ιστούς, αλλά η έκφραση της πρέπει να επικυρωθεί με πρόσθετες μελέτες (85).

3.6. Καρδιαγγειακό σύστημα

Σε ζωικά μοντέλα τρωκτικών έχει βρεθεί υψηλή έκφραση της Klotho στον φλεβοκομβικό κόμβο, αλλά λίγες μελέτες μέχρι στιγμής έχουν εξετάσει το πρότυπο έκφρασης και την λειτουργία της

πρωτεΐνης σε αυτόν τον ιστό (12,120). Σε μια μελέτη οι συγγραφείς κατέδειξαν έναν ουσιαστικό ρόλο του Klotho για τη λειτουργία του φλεβοκομβικού κόμβου σε συνθήκες καρδιακού στρες (12).

Μεταγενέστερες μελέτες που χρησιμοποίησαν προσεγγίσεις είτε με qRT-PCR είτε με RT-P επιβεβαίωσαν τα χαμηλά ή απύουσα επίπεδα του γονιδίου Klotho στην καρδιά ποντικού (84,100) και η καρδιακή έκφραση Klotho βρέθηκε να είναι πάνω από 10.000 φορές χαμηλότερη από τα επίπεδα έκφρασης της νεφρικής Klotho σε χοιρινές καρδιές (121). Σε μια μελέτη με μέτρηση με RNA-Seq, η ανθρώπινη καρδιά απέδωσε μια πολύ χαμηλή τιμή FPKM 1,11 (85). Σε επίπεδο πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας αντίσωμα KM2076, άλλοι ερευνητές δεν μπόρεσαν να ανιχνεύσουν την έκφραση Klotho στην καρδιά του ποντικού (88). Ένα πρόσφατο άρθρο αναφέρει ότι δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο mRNA του Klotho σε βιοψίες καρδιάς από νεκρούς παιδιατρικούς ασθενείς (122).

Η έκφραση του γονιδίου Klotho στο αρτηριακό δέντρο αποτελεί θέμα συζήτησης και η τρέχουσα βιβλιογραφία είναι αντιφατική (60,119). Στην αορτή και σε άλλες αρτηρίες, το mRNA της Klotho είτε δεν ανιχνεύεται (71) είτε ανιχνεύεται σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα (1,123). Αυτό βρέθηκε να ισχύει για τα ενδοθηλιακά (125) και τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (124). Ωστόσο, σε επίπεδο πρωτεϊνών, τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα. Πολλοί συγγραφείς δεν ανίχνευαν την πρωτεΐνη Klotho στην αορτή (119,126,127), στα λεία μυϊκά κύτταρα (128) ή στα ενδοθηλιακά κύτταρα (129), ενώ άλλοι την εντόπισαν (73,125).

3.7. Αίμα και ανοσοποιητικό σύστημα

Αναφέρθηκε ότι τα επίπεδα της Klotho στο μυελό των οστών ποντικού ήταν περίπου 1000 φορές χαμηλότερα από ό,τι στους νεφρούς (130), όπως βρέθηκε και στην ανάλυση του ανθρώπινου σπλήνα (14). Η ποσοτική ανάλυση αποκάλυψε ότι η Klotho εκφράζεται στον σπλήνα σε επίπεδο περίπου 10.000 φορές χαμηλότερο από το μέσο όρο των επιπέδων νεφρικής έκφρασης (121,130), επικυρώνοντας περαιτέρω την ιδέα ότι η έκφραση του σπληνικού Klotho είναι αμελητέα. Η έκφραση του Klotho με RNA-Seq της ανθρώπινης σειράς μυελού των οστών απέδωσε μια αμελητέα τιμή FPKM 0,11 (85) και τα φυσιολογικά δείγματα ανθρώπινου μυελού των οστών βρέθηκαν να μην εκφράζουν την πρωτεΐνη Klotho (131).

Ο θύμος αδένας δεν εξετάστηκε ιδιαίτερα παρόλο που ερευνήθηκε αρχικά στα ποντίκια Klotho (1,10). Η έκφραση της Klotho στο θύμο αδένά βρέθηκε να είναι μη ανιχνεύσιμη σε

δείγματα ανθρώπων, ποντικών και αρουραίων (10,14,60,71). Ανιχνεύθηκε σε χοίρους ηλικίας 4 έως 6 εβδομάδων περίπου 30.000 φορές χαμηλότερη από ό,τι στους νεφρούς (121).

Η έκφραση του Klotho στους λεμφαδένες έχει διερευνηθεί μόνο σε μια μεγάλη μελέτη με RNA-Seq, η οποία έδωσε μια πολύ χαμηλή τιμή FPKM 1,1 (85). Τα λεμφαγγεία και το λεμφικό ενδοθήλιο δεν έχουν ποτέ μελετηθεί σε αυτό το πλαίσιο(75). Η διερεύνηση της έκφρασης της Klotho στα κύτταρα του αίματος έχει κερδίσει μεγαλύτερη προσοχή τα τελευταία χρόνια(75). Διαπιστώθηκε ότι τα μονοπύρρηνα κύτταρα του ανθρώπινου περιφερικού αίματος δεν εκφράζουν το mRNA της Klotho(8,14), ούτε τα αιμοπετάλια (132) ή τα δενδριτικά κύτταρα (133). Υπάρχουν διάφορες αναλύσεις που έδειξαν ότι το mRNA της Klotho είναι τουλάχιστον ανιχνεύσιμο στα λεμφοκύτταρα και στο υποσύνολο των λεμφοκυττάρων (134,135). Επιπλέον αποδείχθηκε, ότι τα μακροφάγα εκφράζουν την Klotho σε ένα δυσδιάκριτο επίπεδο έκφρασης, το οποίο ήταν υψηλότερο στα M1 μακροφάγα σε σύγκριση με τα M0 και M2 μακροφάγα (136).

3.8. Σκελετικός μυς, συνδετικό ιστό και δέρμα

Ο σκελετικός μυς αρχικά αποδείχθηκε ότι εκφράζει μέτριες ποσότητες mRNA του Klotho σε ποντίκια (1), αν και τα μετέπειτα δεδομένα από σκελετικούς μύες ανθρώπου και αρουραίου αποκάλυψαν ότι η έκφραση ήταν πολύ χαμηλή ή απουσίαζε (71,86). Οι αναλύσεις έδειξαν ότι το mRNA της Klotho είναι πράγματι ανιχνεύσιμο, αλλά εκφράζεται αρκετές εκατοντάδες φορές κάτω από το επίπεδο του νεφρικού Klotho (137). Συγκεκριμένα, μια δημοσίευση ανέφερε χαμηλά επίπεδα του mRNA της Klotho και της πρωτεΐνης στους σκελετικούς μύς, τα οποία ήταν μειωμένα σε ένα μοντέλο ποντικού με μυϊκή δυστροφία Duchenne (138).

Το οστό αρχικά αναγνωρίστηκε ως ιστός χωρίς έκφραση της Klotho (1,71). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι το φλοιώδες οστό του ποντικίου και του χοίρου εκφράζει το mRNA της Klotho σε επίπεδα 400 έως 1000 φορές χαμηλότερα από αυτά στον νεφρικό φλοιό (121). Ομοίως, οι αναλύσεις της έκφρασης Klotho σε απομονωμένα οστικά κύτταρα έδειξαν ότι οι οστεοβλάστες εκφράζουν την Klotho σε επίπεδο περίπου 800 φορές κάτω από το επίπεδο του φλοιού των νεφρών (139). Η ανάλυση της πρωτεΐνης Klotho υποστηρίζει εξίσου ένα συγκεκριμένο αν και χαμηλό σήμα στα οστά (140). Είναι σημαντικό ότι η διαγραφή του Klotho στα μακριά οστά υποδηλώνει έναν λειτουργικό ρόλο του Klotho στη ρύθμιση της παραγωγής και έκκρισης FGF23 υπό ουραιμικές συνθήκες (141). Το mRNA αποδείχθηκε ότι εκφράζεται στην αυξητική πλάκα και στον αρθρικό χόνδρο σε επίπεδο περίπου 300- έως 1000 φορές χαμηλότερο από ό,τι στον νεφρικό φλοιό σε χοίρους (121).

Αρχικά, το δέρμα από ποντίκια βρέθηκε να είναι αρνητικό για το γονίδιο Klotho(1,60), εύρημα το οποίο επιβεβαιώθηκε από μεταγενέστερες μελέτες που αξιολόγησαν τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης (100). Μια μεγάλη RNA-Seq μελέτη απέδωσε μια τιμή FPKM 0,59 για το δέρμα, η οποία είναι κάτω από μία μεταγραφή ανά κύτταρο (85). Ωστόσο, η ομάδα του Kim et al σε μελέτη in vitro παρουσίασε μια διαφορετική εικόνα(144). Στη μελέτη αναφέρεται η έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης Klotho σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (144). Πανόμοια αποτελέσματα είχε και η ομάδα του Liu et al. ,η οποία ανίχνευσε την Klotho σε ανθρώπινα πρωτογενή κερατινοκύτταρα και σε μια κυτταρική σειρά κερατινοκυττάρων (145). Τέλος, οι Lim et al. ανέφεραν υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης στην επιδερμίδα, στους θύλακες των τριχών, στους σμηγματογόνους αδένες και στα καλλιεργημένα κερατινοκύτταρα, χρησιμοποιώντας τα αντισώματα ab69208 και/ή ab181373(73).

Το mRNA της Klotho αποδείχθηκε ότι εκφράζεται στην αυξητική πλάκα και στον αρθρικό χόνδρο σε επίπεδο περίπου 300- έως 1000 φορές χαμηλότερο από ό,τι στον νεφρικό φλοιό σε χοίρους(121). Μελέτες ανέφεραν επίσης πολύ χαμηλά επίπεδα του mRNA της Klotho τόσο στα πρωτογενή χονδροκύτταρα όσο και σε μια χονδρογενή κυτταρική σειρά κατά τη διάρκεια της χονδρογένεσης(107). Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ωστόσο, τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα. Υπάρχουν έρευνες, οι οποίες έδωσαν θετικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημείας με ένα απροσδιόριστο αντίσωμα (121), ενώ άλλες μελέτες δεν ανίχνευσαν την Klotho και έδειξαν επίσης ότι τα χονδροκύτταρα δεν ανταποκρίνονται στον FGF23, γεγονός που υποδηλώνει ότι η Klotho δεν υπάρχει ως λειτουργικός συνυποδοχέας (107).

Ο λιπώδης ιστός ανιχνεύτηκε ότι εκφράζει mRNA της Klotho σε χαμηλά επίπεδα(85). Μια μελέτη RNA-Seq έδειξε έκφραση σε 3,1 FPKM (85), η οποία συμφωνεί με τα χαμηλά επίπεδα που ανιχνεύθηκαν με qRT-PCR στον επιδιδυμικό λευκό λιπώδη ιστό (142). Αντίθετα, η qRT-PCR του λευκού και του καφέ λιπώδους ιστού (71) και η RT-PCR διαφόρων (βουβωνικών, σπλαχνικών, υποκνημιακών) λευκού λιπώδους ιστού (143) έχουν δώσει αρνητικά αποτελέσματα σε άλλες μελέτες. Στις κυτταρικές σειρές λιποκυττάρων, η Klotho βρέθηκε να εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, τα οποία αυξάνονται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης του (146).

3.9 Ουρογεννητικό σύστημα (όρχεις, προστάτης, ουροδόχος κύστη ωοθήκες, τράχηλος, σάλπιγγες)

Η έκφραση του mRNA του Klotho των όρχεων ταυτοποιήθηκε σε ποντίκια(1), αν και μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν χαμηλή (86) ή ακόμα και απουσία γονιδιακή έκφραση(115).Οι

ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Klotho εκφράζεται στα κύτταρα Sertoli και στις επιμήκεις σπερματίδες (119), καθώς και στα κύτταρα Leydig (73).

Ο προστάτης αρχικά θεωρήθηκε ότι είναι ένας ιστός με μέτρια έκφραση της Klotho όπως ανιχνεύθηκε το mRNA της Klotho στον ανθρώπινο προστάτη με στύπωμα Northern (14). Αυτό επιβεβαιώθηκε αργότερα χρησιμοποιώντας RT-PCR τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε καρκινωματώδεις κυτταρικές σειρές προστάτη (147). Επίσης, η ανάλυση RNA-Seq έδειξε σχετικά υψηλή έκφραση του Klotho (10,9 FPKM) στον ανθρώπινο προστάτη (85). Οι Lim et al. πρόσφατα ανέφερε ότι η πρωτεΐνη Klotho εκφράζεται στο επιθήλιο του ανθρώπινου προστάτη (73). Αντίθετα, οι μελέτες του προστάτη του ποντικού δεν μπόρεσαν να επιβεβαιώσουν την έκφραση της Klotho (71,100)

Όσον αφορά την επιδιδυμίδα, μια qRT-PCR ανάλυση έδειξε ότι το γονίδιο Klotho δεν εκφράζεται καθόλου (71), ενώ μια άλλη ερευνητική ομάδα ανέφερε ότι το Klotho εκφράζεται σε επίπεδο αρκετές εκατοντάδες φορές χαμηλότερο από αυτό του νεφρού (84). Καμία έκφραση της Klotho δεν μπορούσε να ανιχνευθεί στα σπερματοδόχα κυστίδια, στον πρόσπερματικό αδένα και στο σπερματικό αγγείο σε ποντίκια (71).

Στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, το mRNA της Klotho βρέθηκε σταθερά σε μέτρια επίπεδα στις ωοθήκες ποντικών και ανθρώπων (1,84). Παρόμοια με τον όρχι, η πρωτεΐνη Klotho εκφράζεται στα ώριμα ωάρια-στην μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα (119). Τα δεδομένα PCR υποδεικνύουν ότι το Klotho εκφράζεται στον τράχηλο και στις κυτταρικές σειρές του τραχήλου της μήτρας (147), αν και ορισμένες μελέτες δεν παρουσιάζουν τα ίδια αποτελέσματα (148). Σε επίπεδο πρωτεΐνης, τόσο ο ενδοτράχηλος όσο και ο εξωτράχηλος φαίνεται να εκφράζουν την πρωτεΐνη Klotho (148). Η σάλπιγγα έχει μελετηθεί ελάχιστα και μόνο σε επίπεδο πρωτεΐνης. Οι Lim et al αναφέρουν την έκφραση της Klotho κατά μήκος της επιθηλιακής επένδυσης της υγιούς ανθρώπινης σάλπιγγας (73).

Για τη μήτρα, μόνο αρνητικά δεδομένα έχουν αναφερθεί σε ποντίκια και σε αρουραίους (1,71). Μια ανάλυση RNA-Seq έδωσε τιμή FPKM 1,39 για το ανθρώπινο ενδομήτριο (85). Είναι ενδιαφέρον ότι οι Lim et al. αναφέρουν διακριτή θετική έκφραση της πρωτεΐνης Klotho στο ανθρώπινο ενδομήτριο, η οποία έρχεται σε έντονη αντίθεση με τα δεδομένα του mRNA (73).

Μετά το νεφρό, τους παραθυρεοειδείς και το χοριοειδές πλέγμα, ο πλακούντας είναι ένα από τα από τα όργανα που αναφέρεται ότι εκφράζουν τα υψηλότερα επίπεδα Klotho(149). Η

περιγραφή των μελετών που αναφέρονται στην έκφραση της Klotho στον πλακούντα θα αναφερθούν στο ειδικό μέρος της εργασίας(κεφάλαιο 2)

4 .Ο ρόλος και η λειτουργία της Klotho

Οι τρεις μορφές της πρωτεΐνης Klotho έχουν ξεχωριστές λειτουργίες(7,8,9).

Η μεμβράνικη Klotho σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με τους υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGF) και λειτουργεί ως υποχρεωτικός συνυποδοχέας για τον FGF23, ο οποίος εμπλέκεται στη γήρανση και την ανάπτυξη χρόνιων ασθενειών μέσω της ρύθμισης του Pi και του μεταβολισμού της βιταμίνης D3(5).

Η εκκρινόμενη Klotho λειτουργεί ως χημικός παράγοντας με πλειοτροπικές δραστηριότητες, οι οποίες περιλαμβάνουν την προστασία από το οξειδωτικό στρες (151), την αναστολή της απόπτωσης (152) και της ινωσης (153), τις αγγειοπροστατευτικές ιδιότητες (76) και ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των βλαστοκυττάρων(17), όλα εκ των οποίων μπορούν να προστατεύουν από τη γήρανση(7) . Η εκκρινόμενη Klotho εμπλέκεται επίσης στην προστασία των οργάνων και στην ομοιοστάση των ιόντων(154). Η ενδοκυτταρική μορφή της Klotho καταστέλλει την προκαλούμενη από τη φλεγμονή κυτταρική γήρανση και τον μεταβολισμό των ανόργανων στοιχείων(61).

4.1. Ο ρόλος της ενδοκυτταρικής Klotho

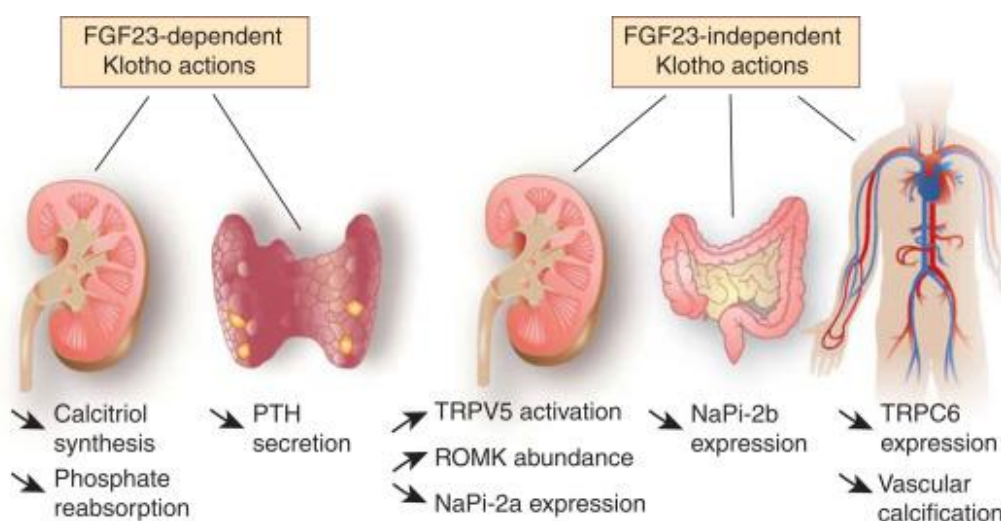
Παρόλο που η Klotho είναι παρούσα στην επιφάνεια των κυττάρων, μεγάλες ποσότητες ανοσοαντιδραστικότητας της Klotho είναι ανιχνεύσιμες στο κυτταρόπλασμα των νεφρών των ποντικών και βρίσκεται στους ανθρώπινους παραθυρεοειδείς αδένες (61). Σε αυτούς τους ιστούς, η Klotho δεσμεύει $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ -άση και διεγείρει την επιφανειακή αφθονία και δραστηριότητά της. Η Klotho αλληλεπιδρά με το $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ -άση στα ενδοκυτταρικά σωματίδια, αλλά όχι στην πλασματική μεμβράνη(61). Η ενδοκυτταρική αρνητικότητα και η χαμηλή $(\text{Na}^+)_i$ που δημιουργούνται από το $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ -άση παρέχουν κινητήρια δύναμη για τη διαθηλιακή μεταφορά Ca^{2+} στο χοριοειδές πλέγμα και στο νεφρό (61).

Έγινε γνωστό ότι η ενδοκυτταρική Klotho, δεσμεύει το επαγόμενο από το ρετινοϊκό οξύ γονίδιο-I (RIG-I) και εμποδίζει το πολυμερισμό του μέσω του άξονα μεταλλαγμένης αταξίας τελαγγειεκτασίας-ρυθμιστικού παράγοντα ιντερφερόνης 1 (ATM-IRF1) (155). Η Klotho αλληλεπιδρά με το RIG-I και η αλληλεπίδραση αυτή αναστέλλει την επαγόμενη από την RIG-I έκφραση της ιντερλευκίνης-6(IL-6) και της IL-8 ,τόσο in vitro όσο και in vivo και με αυτό τον

τρόπο λειτουργεί ως ενδοκυτταρικός αντιφλεγμονώδης και αντιγηραντικός παράγοντας (155). Αν και η πλειοψηφία της ανοσοαντιδραστικότητας της Klotho είναι ανιχνεύσιμη στο κυτταρόπλασμα σε πολλούς ιστούς, οι φυσιολογικοί ρόλοι της ενδοκυττάριας Klotho είναι ακόμα άγνωστοι.

4.2.Ο ρόλος της διαλυτής α-Klotho Η διαλυτή α-Klotho λειτουργεί ως κυκλοφορούσα ουσία που ασκεί πολλαπλές συστηματικές βιολογικές δράσεις σε απομακρυσμένα όργανα και προστατεύει άμεσα τα κύτταρα από ποικίλες προσβολές, συμπεριλαμβανομένης της υποξίας, του οξειδωτικού στρες, την απόπτωση και την αποβολή των κυτταροτοξινών(156,157).

Η εκκρινόμενη (ή διαλυτή) μορφή της Klotho λειτουργεί ως χημικός παράγοντας που στοχεύει πολλαπλούς ιστούς και όργανα εξαρτώμενα από τους υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων FGFR(158). Αν και το Klotho λειτουργεί ως συν-υποδοχέας για τον FGF23, η εκκρινόμενη Klotho φαίνεται ότι μπορεί να ασκεί την βιολογική της επίδραση ανεξάρτητα από τον FGF23



(158)(εικόνα 5).

Εικόνα 5: Συμμετοχή της ιστικής και κυκλοφοριακής Klotho στον μεταβολισμό των ανόργανων συστατικών: σχηματική απεικόνιση. Καλσιτριό 1,25-διυδροξυβιταμίνη D- PTH, παραθορμόνη- TRPV5, εξαιρετικά εκλεκτικός νεφρικός δίαυλος εισόδου Ca²⁺ β- ROMK, νεφρικός δίαυλος K β- NaPi-2a, νεφρικός δίαυλος νατρίου/ NaPi-2b, εντερικός νατρίου/φωσφορικού συνμεταφορέας- TRPC6, δίαυλος εισόδου Ca²⁺ β.(Πηγή:Drüeke TB, Massy ZA. Circulating Klotho levels: clinical relevance and relationship with tissue Klotho expression. Kidney Int. 2013)

Είναι αξιοσημείωτο ότι η Klotho αναστέλλει τέσσερις οδούς που έχουν συνδεθεί με τη γήρανση με διάφορους τρόπους- το μετασχηματιστικός αυξητικό παράγοντα β (TGF-β)(159), τον ινσουλινόμορφο αυξητικό παράγοντα 1 (IGF-1)(10), τον Wnt(17) και τον πυρηνικού παράγοντα κΒ(NF-κΒ)(125). Αυτά τα μονοπάτια μπορούν να προκαλέσουν κυτταρική γήρανση,

απόπτωση, φλεγμονή, ανοσολογική δυσλειτουργία, ίνωση και νεοπλασία(125,159). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η Klotho αυξάνει τα κυτταροπροστατευτικά αντιοξειδωτικά ένζυμα μέσω του πυρηνικού παράγοντα ερυθροειδούς 2 (Nrf2) και του FoxO(125).Μια βασική προστατευτική λειτουργία της Klotho είναι η πρόληψη της ίνωσης (π.χ. πνευμονική, νεφρική ή καρδιακή), η οποία αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητά της να αναστέλλει τον TGF-β(159).

4.2.1.Η δράση της Klotho διάμεσου του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα β(TGF-β):

Μεταξύ των εκκρινόμενων αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, η οικογένεια του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF- β) διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, συχνά σε μικρό βαθμό σε σύγκριση με τους άλλους αυξητικούς παράγοντες, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και το περιβάλλον(160). Η TGF-β είναι μια πλειοτροπική κυτταροκίνη που έχει συνδεθεί με την γήρανση μέσω της προώθησης της κυτταρικής φθοράς , της μείωσης των βλαστικών κυττάρων, της ανοσολογικής εξασθένησης , της ίνωσης και με άλλες σχετιζόμενες με την ηλικία παθολογικές καταστάσεις (161,162).Ωστόσο, ο TGF-β, αναστέλλει έντονα τον πολλαπλασιασμό διαφόρων τύπων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών, ενδοθηλιακών, αιμοποιητικών και ανοσοποιητικών κυττάρων (160).

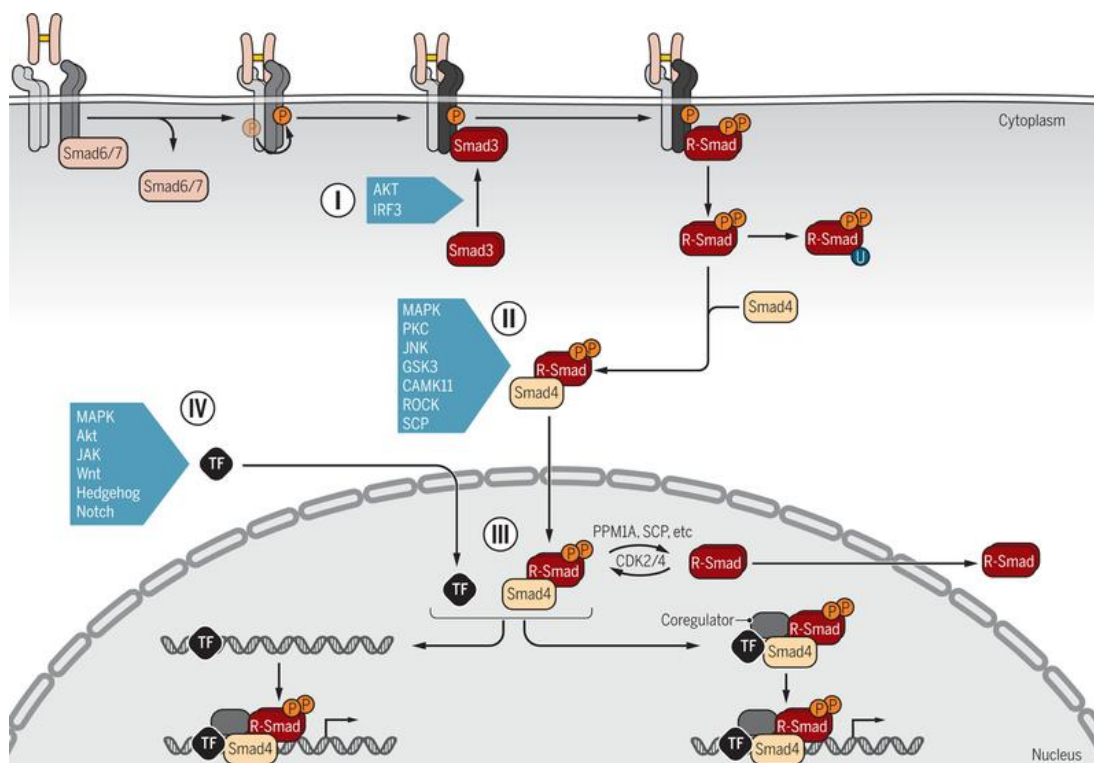
Οι πρωτεΐνες της οικογένειας TGF-β εκκρίνονται και λειτουργούν ως ομο- ή ετεροδιμερή και αναγνωρίζονται από ένα χαρακτηριστικό διάστημα επτά κυστεϊνών στο ώριμο, πλήρως επεξεργασμένο πολυπεπτίδιο (163).Οι μελέτες για την αναστολή του TGF-β από την Klotho αφορούν κυρίως τη νεφρική νόσο, αλλά είναι πιθανόν να εφαρμόζουν και στην ίνωση άλλων οργάνων, όπως στον πνεύμονα , και σε αρκετές άλλες καταστάσεις που σχετίζονται με την ηλικία (61).Ο TGF-β μπορεί να επηρεάσει έναν τεράστιο αριθμό βιολογικών διεργασιών(164). Στο ανοσοποιητικό σύστημα, παράγεται κατά βάση από τα ρυθμιστικά T κύτταρα (Treg) και καταστέλλει ή ρυθμίζει τις ανοσολογικές αποκρίσεις που περιλαμβάνουν τα μακροφάγα, τα δένδριτικά κύτταρα, τα B κύτταρα, τα T κύτταρα-ενεργοποιητές, τα κύτταρα NK και τα ουδετερόφιλα (165) και αποτελεί βασικό ρυθμιστή του ανοσοποιητικού συστήματος(166).

Οι πιο εμφανείς επιδράσεις της οικογένειας TGF-β πρωτεϊνών είναι η κυτταρική διαφοροποίηση, καθώς ελέγχουν τη διαφοροποίηση όλων των κυτταρικών σειρών σε πολλά στάδια της ανάπτυξης (163). Εκτός από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την

διαφοροποίηση, προάγουν ή προστατεύουν από τον κυτταρικό θάνατο, προάγουν την εξωκυτταρική έκφραση πρωτεϊνών, επηρεάζουν την κυτταρική κινητικότητα και την εισβολή και ελέγχουν τον κυτταρικό μεταβολισμό (163).

Η Klotho συνδέεται με τον τύπο II υποδοχέα του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα β TGF- β (T β RII), ο οποίος εμποδίζει τη δέσμευση του TGF- β και την σηματοδότηση του υποδοχέα του (153). Ομάδα ερευνητών βρήκε ότι στους νεφρούς των γηρασκόντων ποντικών τα επίπεδα της Klotho μειώνονται, ενώ ο TGF- β και τα μόρια σηματοδότησης αυξάνονται (161). Σε μια άλλη μελέτη ερευνητές χορηγώντας διαλυτή Klotho πρωτεΐνη ανακάλυψαν ότι αυτή ανέστελλε την σηματοδότηση του TGF- β και προστάτεψε το νεφρικό ιστό από ίνωση (153). Φάνηκε ότι ένα ειδικό πεπτίδιο που προέρχεται από την Klotho και αποτελείται από 30 αμινοξέα, ανέστειλε τον TGF- β μέσω της πρόσδεσής της στον υποδοχέα του (162). Αυτά τα πειράματα παρείχαν αποδείξεις ότι η Klotho μπορεί να καταστείλει τις δραστηριότητες του TGF- β in vivo (162). Επειδή σχεδόν όλοι οι τύποι κυττάρων εκφράζουν υποδοχείς του TGF- β η σημασία τους είναι σημαντική (167) και η ρύθμισή τους φαίνεται πολύπλοκη (163).

Ο TGF- β εκκρίνεται σε λανθάνουσα μορφή και ενεργοποιείται από την αλληλεπίδραση με ιντεγκρίνες με τη συμμετοχή και άλλων μηχανισμών. Τρεις ισομορφές του TGF- β υπάρχουν (ο TGF- β 1 είναι η πιο άφθονη), οι οποίες δεσμεύονται όλες με τον ίδιο σηματοδοτικό υποδοχέα (168).



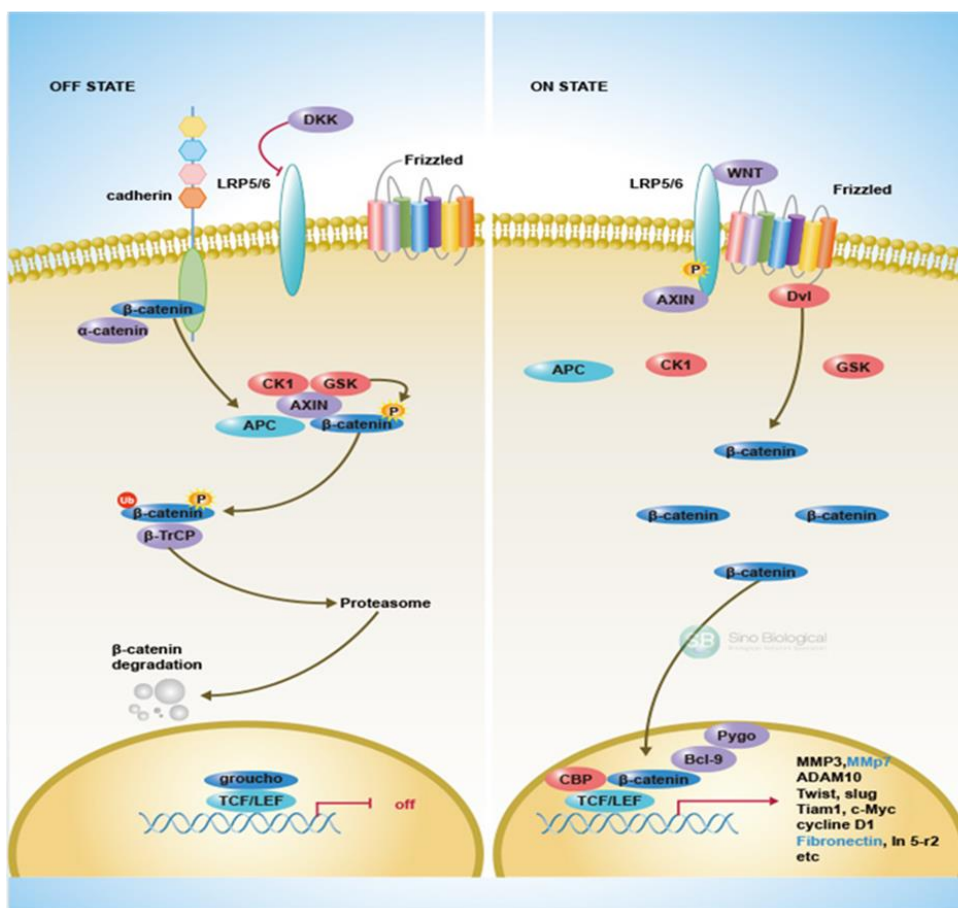
Εικόνα 6 :Διασύνδεση σηματοδότησης μέσω μεταμεταφραστικού ελέγχου της ενεργοποίησης και των λειτουργιών του Smad.(Πηγή: R.DerynckSpecificity, versatility, and control of TGF-β family signaling. Sci Signal. 2019)

Ο υποδοχέας αυτός αποτελείται από τον ΤβRI (που επίσης συμβολίζεται ως ALK5) και ΤβRII. Ο TGF-β συνδέεται με τον ΤβRII και τον ΤβRI σχηματίζοντας μια συμπλοκή κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Ο ΤβRII φωσφορυλιώνει τον ΤβRI, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τις Smad2 και Smad3 (κανονικό μονοπάτι)(εικόνα 6).Ο υποδοχέας αυτός αποτελείται από τον ΤβRI (που επίσης συμβολίζεται ALK5) και ΤβRII(163). Ο TGF-β συνδέεται με τον ΤβRII και τον ΤβRI σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Ο ΤβRII φωσφορυλιώνει τον ΤβRI,η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τα Smad2 και Smad3 (κανονικό μονοπάτι)(163). Οι Smad2 και 3 σχηματίζουν σύμπλοκο με τη Smad4 (το κοινό Smad), το οποίο μετατοπίζεται στον πυρήνα(169). Εκεί, προσδένεται στο DNA και ρυθμίζει τα μεταγραφικά γεγονότα. Πολλαπλά μόρια αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο του υποδοχέα TGF-β και μπορούν να μεταβάλλουν την δέσμευση του TGF-β ή τη σηματοδότηση του υποδοχέα, με θετικό ή αρνητικό τρόπο (166). Για παράδειγμα, η β-γλυκάνη (που συμβολίζεται επίσης ως ΤβRIII), η νευροπιλίνη-1 (Nrp1) ή η ενδογλίνη μπορούν να συνδεθούν με τον TGF-β υποδοχέα, δρώντας ως πυρηνοϋποδοχείς, και χαρακτηριστικά ενισχύουν την TGF-β απόκριση (166).Η Klotho προσδένεται επίσης στον υποδοχέα αυτό, αλλά έχει αρνητική επίδραση(169).

4.2.2.Καταστολή του Wnt μονοπάτι

Το Wnt είναι ένα άλλο σημαντικό μονοπάτι που μπλοκάρεται από την Klotho (17). Σε μια ανασκόπηση φαίνεται ότι ο Wnt είναι ένας καταρράκτης σηματοδότησης που εμπλέκεται στην εμβρυογένεση, στην βιολογία των βλαστικών κυττάρων, στον προσδιορισμό της κυτταρικής μοίρας, στην πολικότητα, στη μίτωση και στη μετανάστευση των κυττάρων (170). Η απορρύθμιση του Wnt έχει ως αποτέλεσμα ανωμαλίες της ανάπτυξης, διάφορες εκφυλιστικές καταστάσεις και ανάπτυξη καρκίνου(171). Υπάρχει ένα κανονικό μονοπάτι που εξαρτάται από τη β-κατενίνη και ένα μη κανονικό (β-κατενίνη ανεξάρτητο) μονοπάτι (170). Το μη-κανονικό μονοπάτι έχει δύο υποτύπους- την επίπεδη κυτταρική πολικότητα και το Wnt/Ca²⁺ μονοπάτι. Στην κανονική σηματοδότηση, πολλαπλοί συνδέτες Wnt είναι σε θέση να συνδεθούν με τον συγγενή υποδοχέα, που συμβολίζεται Frizzled, για να ξεκινήσει μια απόκριση(170).

Ελλείπει ενός συνδέτη Wnt το μονοπάτι είναι ανενεργό(167). Αυτό οφείλεται στη συνεχή φωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής β-κατενίνης, με τη μεσολάβηση ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου, που έχει ως αποτέλεσμα την εξάλειψή της με πρωτεασωματική αποικοδόμηση(167). Ωστόσο, μετά την δέσμευση ενός συνδέτη Wnt στην Frizzle και στον πυρηνουποδοχέα LRP, η αποικοδόμηση της β-κατενίνης τερματίζεται και αυτή μπορεί να μεταναστεύσει στον πυρήνα για να ενεργοποιήσει τα γονίδια-στόχους μέσω αλληλεπιδράσεις με τον παράγοντα T-κυττάρων/λεμφοειδή ενισχυτή-δεσμευτή (TCF/LEF) μεταγραφικούς παράγοντες(167)(εικονα 7). Αυτή η κανονική οδός ρυθμίζει κυρίως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με τη συμμετοχή της κυκλίνης D1, του c-myc και πολλές άλλες πρωτεΐνες ενώ τα μη κανονικά μονοπάτια ρυθμίζουν την κυτταρική πολικότητα και την κινητικότητα(169). Οι πτυχές του πολλαπλασιασμού είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τον καρκίνο, όπως θα αναφερθεί στο κεφάλαιο 11.



Εικόνα 7: Κανονικό Wnt μονοπάτι(Sino Biological)

Η Klotho μπλοκάρει την ενεργοποίηση του Wnt με τη δέσμευση σε διάφορες Wnt προσδετές, συμπεριλαμβανομένων των Wnt1, Wnt3, Wnt4 και Wnt5a (172). Σε ποντίκια με ανεπάρκεια της Klotho, η υπερβολική ενεργοποίηση του Wnt προάγει τη γήρανση των κυττάρων και έχει ένα αρνητικό αντίκτυπο στην επιβίωση των βλαστικών κυττάρων (173). Στο νεφρό, η υπερέκφραση του Wnt σχετίζεται με την ίνωση (174), και συνεργάζεται με τον TGF-β σε αυτή τη διαδικασία. Επίσης ο Wnt μπορεί να συνεργαστεί με τον TGF-β για την επαγωγή της επιθήλίου μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT), η οποία είναι πρόδρομος της ίνωσης (174).

Αν και η ενεργοποίηση της σηματοδότησης Wnt είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των βλαστικών κυττάρων, η συνεχής και παρατεταμένη ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού μπορεί να προκαλέσει εξάντληση των βλαστικών κυττάρων (171). Δεδομένου ότι η δυσλειτουργία των βλαστικών κυττάρων περιορίζει την αναγέννηση των ιστών και ενδεχομένως επηρεάζει τις διαδικασίες γήρανσης, η ικανότητα της εκκρινόμενης πρωτεΐνης Klotho να

αναστέλλει την σηματοδότηση Wnt μπορεί επίσης να συμβάλλει σε φαινότυπους που μοιάζουν με τη γήρανση σε ποντίκια με ανεπάρκεια Klotho(10).

4.2.3.Η Klotho αναστέλλει την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα κB(NF-κB) εμποδίζοντας την πυρηνική μετατόπιση του σε ενεργού μορφής.

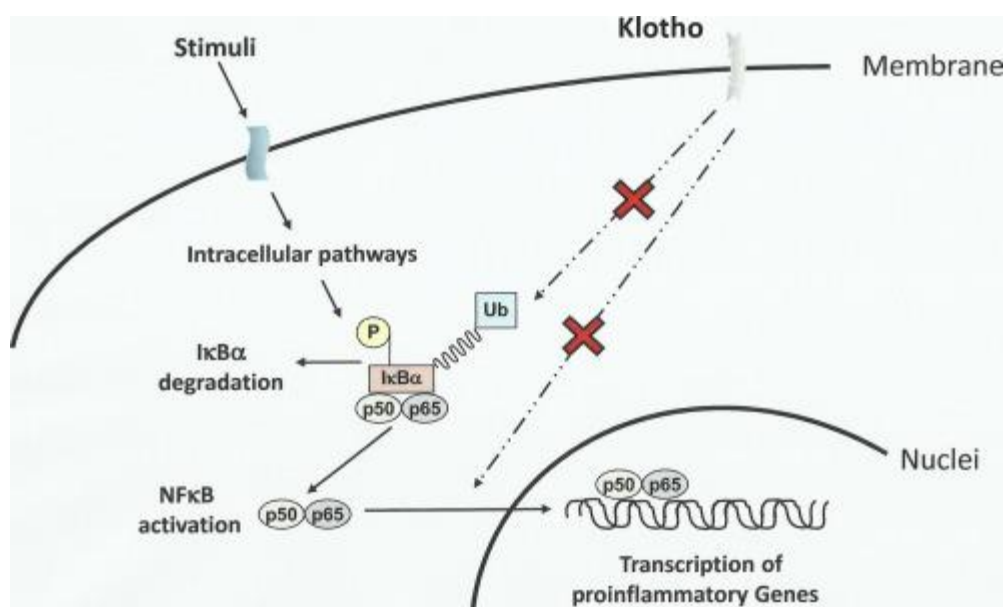
Η φλεγμονή θεωρείται ότι συμβάλλει σημαντικά στη γήρανση, με μια διαδικασία που από κάποιους συγγραφείς αναφέρεται ως φλεγμονώδης γήρανση (125). Η χρόνια χαμηλού βαθμού φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη βλάβη των ιστών(125). Για παράδειγμα, οι φλεγμονώδεις αλλαγές έχουν συνδεθεί με την αθηροσκλήρωση, την χρόνια νεφρική νόσο, τον τραυματισμό οργάνων που σχετίζεται με τον διαβήτη και την νόσο του Alzheimer(175)

Είναι σημαντικό ότι η Klotho καταστέλλει την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους οδού διαμέσου του πυρηνικού παράγοντα κB(NF-κB)(125).Ο NF-κB είναι ένας πυρηνικός παράγοντας που προσδένεται στις ρυθμιστικές περιοχές των υποκινητών στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών (176).

Ο NFκB συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές διεργασίες (177), όπως ο πολλαπλασιασμός, το οξειδωτικό στρες, οι αντι-αποπτωτικές αποκρίσεις και οι ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις, και ρυθμίζει την ενδοκυτταρική σηματοδότηση κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης στα σπονδυλωτά (178).

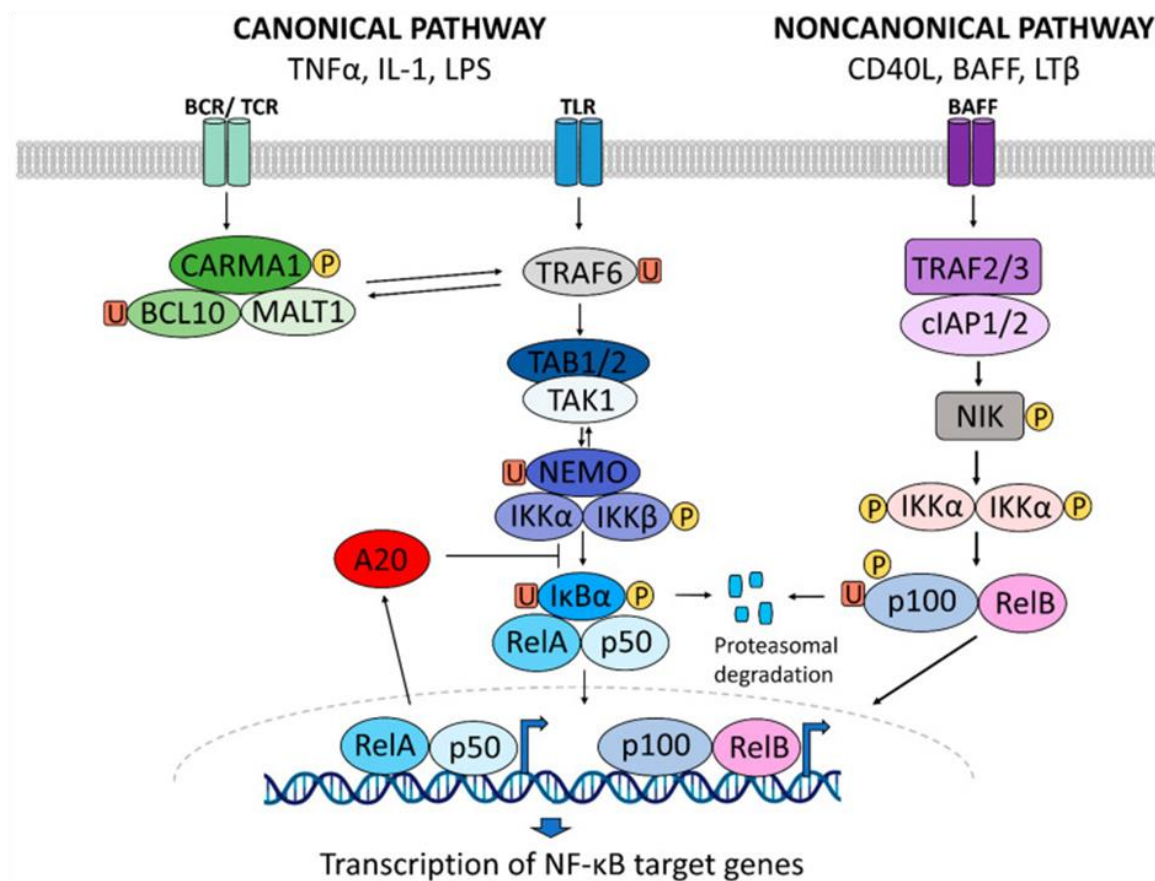
Το μονοπάτι του πυρηνικού παράγοντα κB(NF-κB) διαδραματίζει βασικό ρόλο στην έναρξη ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων που μεσολαβούνται από τα B κύτταρα, τα T κύτταρα, τα μακροφάγα και τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (179). Επίσης αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και άλλων κυτταρικών τύπων, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό(180). Ο NF-κB ενεργοποιείται από τους υποδοχείς των T και των B-κυττάρων από διάφορες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, χημειοκίνες, υποδοχείς τύπου toll (TLR), υποδοχείς τύπου NOD (NLR), τον διεγέρτη των γονιδίων της ιντερφερόνης (STING) και άλλους παράγοντες που προάγουν την ανοσία έναντι μολυσματικών παραγόντων (180). Ωστόσο, ο NF-κB εμπλέκεται επίσης στην επιβλαβή φλεγμονή που συμβάλλει στη γήρανση, σε χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις και αυτοάνοσα νοσήματα(175,179). Ο NF-κB είναι ενεργός και σε πολλούς μη ανοσολογικούς τύπους κυττάρων, όπως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε ορισμένα επιθηλιακά κύτταρα(179). Συμβάλλει επίσης στη δημιουργία αγγειακών βλαβών (πχ, αθηροσκλήρωση και αγγειίτιδα) και, το σημαντικότερο, διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο (180).

Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί πέντε πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπερικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NFκB/ Rel homology domain (Rel): RelA (p65), c-Rel, RelB, NFκB1 (p50/P105) και NFκB2 (p52/p100)(181). Όλα τα μέλη οργανώνονται σε ομοδιμερή ή ετεροδιμερή, οι πιο κοινές μορφές των οποίων είναι τα ετεροδιμερή p50/RelA και p52/RelA(181). Οι NFκB1 και NFκB2 συντίθενται ως πρόδρομες πρωτεΐνες 105 και 100 kda, αντίστοιχα, και στη συνέχεια υποβάλλονται σε επεξεργασία σε μικρότερες ενεργές πρωτεΐνες (181). Κάθε μέλος της οικογένειας NFκB διαθέτει μια συντηρημένη N-τελική περιοχή 300 αα, που ονομάζεται περιοχή ομολογίας Rel, η οποία περιέχει περιοχές για διμερισμό, αλληλεπίδραση με ανασταλτικές πρωτεΐνες ή πυρηνική μετατόπιση και δέσμευση του DNA(182). Έχει φανεί ότι ο διμερισμός των υπομονάδων του NFκB δημιουργεί σύμπλοκα με διαφορετικές ειδικότητες δέσμευσης DNA, με σημαντικές φυσιολογικές επιπτώσεις (183).



Εικόνα 8 : Η Klotho καταστέλλει την πυρηνική ενεργοποίηση του NFκB και την επακόλουθη μεταγραφή προφλεγμονωδών γονιδίων. (Πηγή: Buendía P, Klotho Prevents Translocation of NFκB. Vitam Horm. 2016)

Πρόσφατα επανεξετάστηκε η οικογένεια NF-κB, που περιλαμβάνει τους NF-κB1 (p50), NF-κB2 (p52), RelA (p65) και RelB, και οι οδοί ενεργοποίησης του NF-κB (184) (εικόνα 8). Όλες αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ομολογία Rel τομέα για την ειδική για την αλληλουχία δέσμευση DNA, καθώς και ομο- και ετερο-διμερισμό. Υπάρχουν δύο διαδρομές για τη σηματοδότηση, που συμβολίζονται η κανονική και η μη κανονική (εναλλακτική) οδός(180)(εικόνα 9).



Εικόνα 9 :Ενεργοποίηση της κανονικής και μη κανονικής οδού σηματοδότησης NF-κB(An.Roberti,NF-κB Signaling and Inflammation-Drug Repurposing to Treat Inflammatory Disorders?Biology Basel 2022)

Τα πρώιμα σηματοδοτικά συμβάντα στα μονοπάτια NF-κB περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση κινασών, όπως η TAK1 και το σύμπλεγμα NEMO. Στο κανονικό μονοπάτι σε κατάσταση ηρεμίας ο αναστολέας του κB (IκB) συνδέεται με τον τον NF-κB (p50/RelA) και αυτό εμποδίζει την απενεργοποίησή του(166). Στην απόκριση σε διεγερτική δράση, η πρωτεΐνη IκB φωσφορυλιώνεται ουμπιλικιομενη και υποβάλλεται σε πρωτεασωματική πρωτεόλυση. Αυτή επιτρέπει στον NF-κB να μεταναστεύσει στον πυρήνα και να συνδεθεί με το DNA, και να επάγει τη μεταγραφή μεγάλου αριθμού γονιδίων(184). Στην μη-κανονική οδό, το RelB συνδέεται με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται p100(184). Η ενεργοποίηση της κινάσης που επάγει τον NF-κB (NIK) οδηγεί σε φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης p100 και την επακόλουθη αποικοδόμηση προς την πρωτεΐνη p52(184). Στη συνέχεια, ένα σύμπλοκο p52/RelB μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων(184). Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα δύο μονοπάτια αλληλεπιδρούν και μπορεί να μην είναι εντελώς ανεξάρτητα(166). Οι κύριες ανασταλτικές λειτουργίες της Klotho απορρέουν από την ικανότητά της να εμποδίζει τη σηματοδότηση του NF-κB, όπως έχει καταδειχθεί σε διάφορες μελέτες(166). Σε αυτή την

περίπτωση, η Klotho φαίνεται να εμποδίζει την πυρηνική μετατόπιση του NF-κB, αν και ενδέχεται να ισχύουν και άλλοι μηχανισμοί(166).

Για παράδειγμα, η Klotho κατέστειλε την επαγόμενη από τον TNF-α ενεργοποίηση του NFκB σε ενδοθηλιακά κύτταρα (185). Η ουραιμία σχετίζεται με κυκλοφορούσες τοξίνες που προκαλούν οξειδωτικό στρες στα ενδοθηλιακά κύτταρα και επάγουν τη γήρανσή τους(186). Αυτές οι ενδοθηλιακές μεταβολές αποδοθήκαν από κάποιους ερευνητές στην ενεργοποίηση του NF-κB και αυτή ελαττώθηκε από την Klotho (187). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η Klotho εμποδίζει την πυρηνική μετατόπιση του NF-κB, η οποία αποτελεί ένα ουσιαστικό βήμα στο μονοπάτι ενεργοποίησης(186). Και άλλοι ερευνητές ανέφεραν παρόμοια ευρήματα (187). Σε ένα μοντέλο διαβητικής μυοκαρδιοπάθειας, η Klotho ανέστειλε τον NF-κB in vitro και in vivo (188). Αυτή η καταστολή φάνηκε να οφείλεται σε αύξηση της ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα 2 που σχετίζεται με τον πυρηνικό παράγοντα 2 (Nrf2), ο οποίος αντισταθμίζει την NF-κB (189).

Σε διαβητικά ποντίκια, η έκφραση της Klotho ήταν μειωμένη στους νεφρούς, εύρημα που συνδέθηκε με την αύξηση της ενεργοποίησης του NF-κB(189). Αυτό αντιστράφηκε από την εφαρμογή της Klotho, με επακόλουθη μείωση των φλεγμονωδών κυτταροκινών. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η Klotho αναστέλλει την ενεργοποίηση και την μετατόπιση του NFκB σε κλωνικά β κύτταρα (190). Στην περίπτωση αυτή, η απενεργοποίηση της Klotho με siRNA είχε ως αποτέλεσμα την αυθόρμητη πυρηνική μετατόπιση του NF-κB p65(190). Αυτό ήταν συμβατό με το ότι η Klotho εμποδίζει την αποικοδόμηση της IκB πρωτεΐνης, όπως προτάθηκε από άλλους ερευνητές (191). Επίσης έχει φανεί ότι η διαλυτή Klotho που προστίθεται σε καλλιέργειες, αντιστρέφει τις επιδράσεις της υποβάθμισης της Klotho και αποτρέπει την ενεργοποίηση του NF-κB (190,191). Σημειώθηκε ότι όταν ο NF-κB ενεργοποιείται και μετακινείται στον πυρήνα, μπορεί να συνδεθεί με τον υποκινητή της Klotho και να αναστείλει την έκφραση της (192). Έτσι, υπό ισχυρές οξείες ή χρόνιες φλεγμονώδεις συνθήκες η ενεργοποίηση του NF-κB μπορεί να είναι κυρίαρχη με αποτέλεσμα την μείωση της έκφραση της Klotho(192).

4.2.4. Η Klotho και η TWEAK

Η TWEAK είναι μια κυτταροκίνη της υπεροικογένειας TNF(186). Τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η TWEAK μεσολαβεί στην παθογένεια ανθρώπινων ασθενειών, όπως στην αθηροσκλήρωση, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και στα αυτοάνοσα νοσήματα που προσβάλλουν τους νεφρούς(193). Οι λειτουργίες της TWEAK ποικίλλουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και το μικροπεριβάλλον και περιλαμβάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη

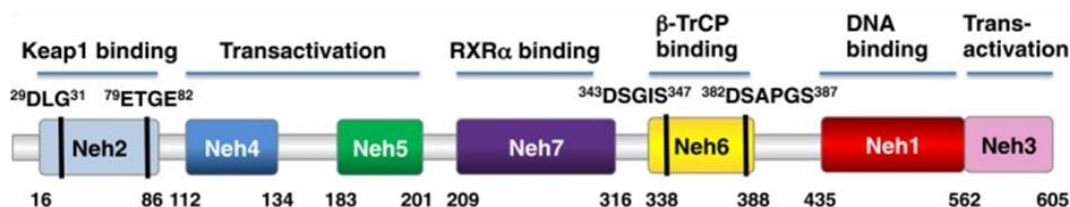
μετανάστευση και την απόπτωση(192). Η TWEAK μπορεί να προάγει ή να αναστέλλει την κυτταρική διαφοροποίηση και ρυθμίζει τα προφλεγμονώδη μόρια(193). In vivo, η TWEAK διεγείρει την αγγειογένεση και ρυθμίζει τις νευροαγγειακές διαπερατότητα(193). Η TWEAK ενεργοποιεί τον NFκB στα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα, αυξάνοντας έτσι την σύνδεση του NFκB DNA, την εξαρτώμενη από τον NFκB μεταγραφή, τη φωσφορυλίωση του IκΒα, και την πυρηνική μετατόπιση του RelA(193). Κατά συνέπεια, η TWEAK ρυθμίζει προς τα πάνω την έκφραση mRNA και την έκκριση του MCP-1 (χημειοπροσληπτικό παράγοντα των μονοκυττάρων πρωτεΐνης-1), της IL-6 (ιντερλευκίνη-6) και της RANTES (ρυθμιζόμενη κατά την ενεργοποίηση που εκφράζεται και εκκρίνεται από τα φυσιολογικά T-κύτταρα), κατά τρόπο εξαρτώμενο από την RelA(193). Οι επιδράσεις της TWEAK σε αυτές τις χημειοκίνες είναι αξιοσημείωτες όσον αφορά την επακόλουθη στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων και την αύξηση της φλεγμονής (193).

Οι επιδράσεις της TWEAK στην έκφραση της Klotho είναι ελάχιστα κατανοητές(192). Σε ζωικά μοντέλα, η εξωγενής TWEAK μειώνει την νεφρική έκφραση της Klotho(192). Σε οξείες νεφρικές βλάβες που προκαλούνται από φολικό οξύ, ο αποκλεισμός της TWEAK αναστρέφει τα επίπεδα της Klotho(192). Επιπλέον, η αναστολή του NFκB αποτρέπει τη μείωση των επιπέδων της Klotho λόγω της TWEAK(192). Έτσι, οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως οι TWEAK, ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση της Klotho μέσω ενός NFκB-εξαρτώμενο μηχανισμό, ο οποίος εξηγεί εν μέρει την σχέση μεταξύ της φλεγμονής και των ασθενειών που χαρακτηρίζονται από επιτάχυνση της γήρανση των οργάνων(192).

4.2.5. Η Klotho ενεργοποιεί το αντιοξειδωτικό Nrf2 μονοπάτι

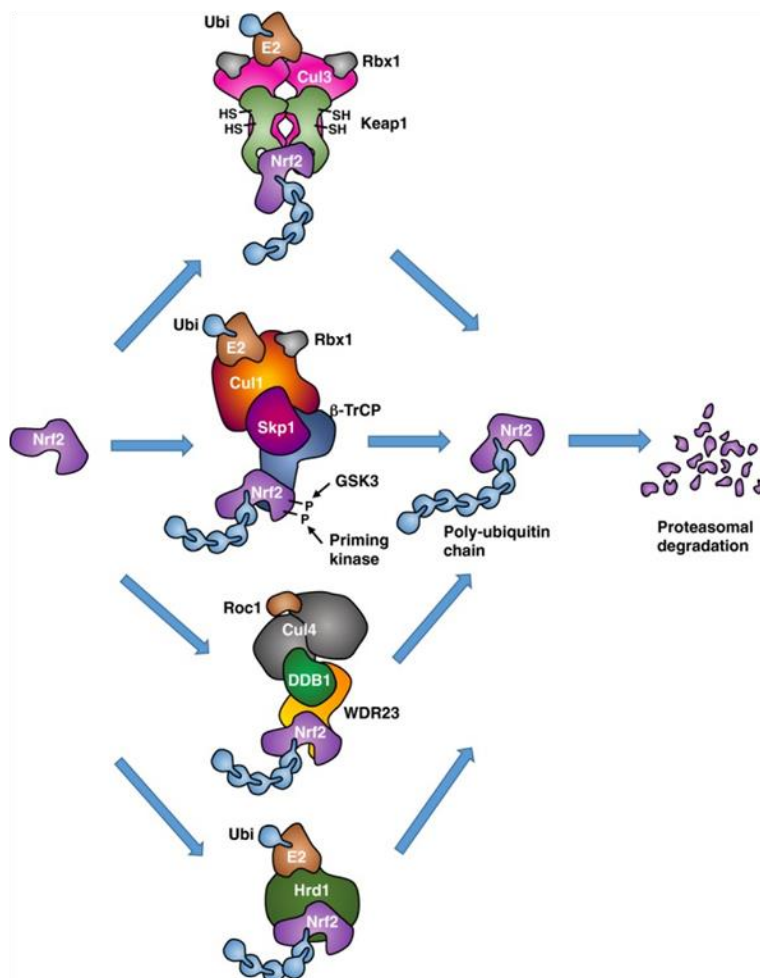
Μελέτες σε προκλινικά μοντέλα ανακάλυψαν ότι η Klotho ενεργοποίησε το Nrf2 σε νεφρικές, καρδιαγγειακές και νευρολογικές παθήσεις (194). Ο πυρηνικός παράγοντας ερυθροειδούς 2 είναι ένας παράγοντας μεταγραφής που ελέγχει τις αποκρίσεις στο οξειδωτικό στρες και στις τοξίνες(195).

Τομείς του Neh2 αλληλεπιδρούν με έναν αρνητικό ρυθμιστή που ονομάζεται Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) (196) (Εικόνα 10). Το Keap1 προσδένεται στον Nrf2, προάγοντας την ουβικουιτινότητά του και την πρωτεασωματική αποικοδόμηση(197). Υπό την επίδραση του οξειδωτικού στρες (ή άλλων ενεργοποιητών), οι ομάδεςθειού στα κατάλοιπα κυστεΐνης του Keap1 τροποποιείται και η λειτουργία του αναιρείται, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της Nrf2(196).



Εικόνα 10: Δομή του τομέα του Nrf2. Υποδεικνύονται το μοτίβο χαμηλής συγγένειας "DLG" και το μοτίβο υψηλής συγγένειας "ETGE" στην N-τελική περιοχή Neh2, μέσω των οποίων ο Nrf2 συνδέεται με τον Keap1. Απεικονίζεται επίσης το φωσφοδεγκρόνιο στην περιοχή Neh6, μέσω του οποίου, μετά από φωσφορυλίωση από την κινάση της συνθάσης του γλυκονόου 3 (GSK3), ο Nrf2 συνδέεται με την πρωτεΐνη που περιέχει επανάληψη β-τρανσδουκίνης (β-TrCP) (Dinkova-Kostova AT, The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. FEBS J. 2018)

Στη συνέχεια, ο Nrf2 μετατοπίζεται στον πυρήνα και σχηματίζει ετεροδιμερή με άλλες πρωτεΐνες και συνδέεται με έναν ενισχυτή αλληλουχία που ονομάζεται στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης (151) (Εικόνα 11). Φαίνεται ότι το στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης εμπλέκεται στην έκφραση γονιδίων κυτταρικής άμυνας που κωδικοποιούν, διάφορες αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες και το συμπλεγμένο με γλουταθειόνη συνένζυμο. Υπάρχει επίσης μια εναλλακτική οδός της Nrf2 που δεν απαιτεί το Keap1 (102). Ο Nrf2 προστατεύει από οξειδωτική βλάβη και, το σημαντικότερο, αναστέλλει το φλεγμονώδη NF-κΒ μονοπάτι (102). Η ενεργοποίηση του Nrf2 από την Klotho φαίνεται ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την προστασία από την νεφρικών, αγγειακών και άλλων ασθενειών (196).

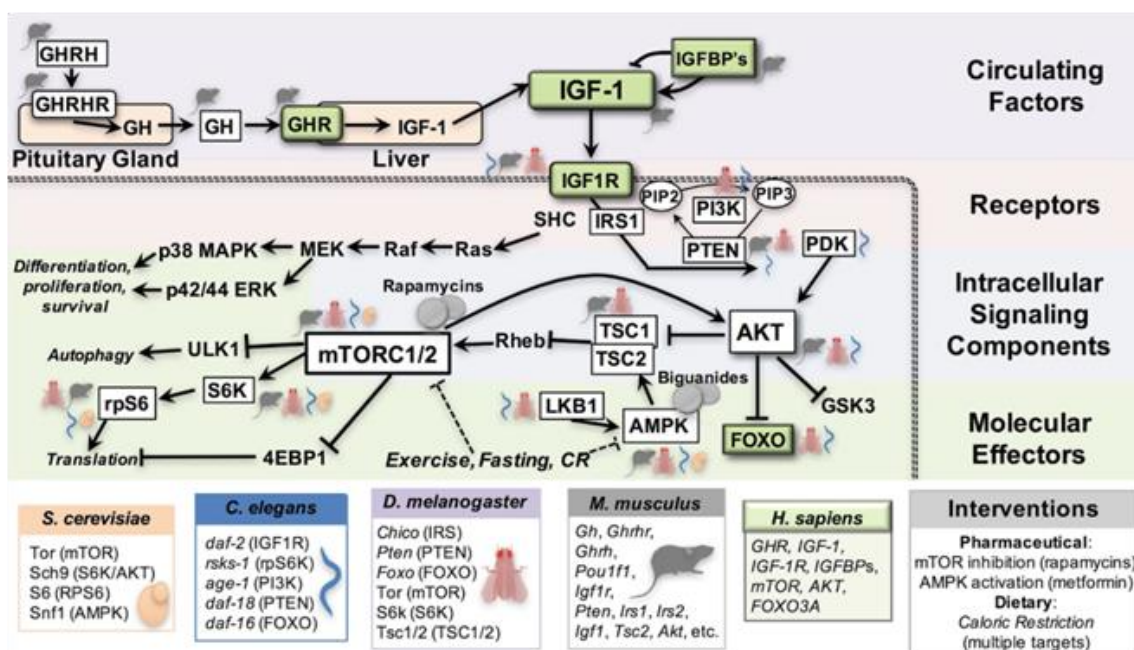


Εικόνα 11 : Ρύθμιση του Nrf2 μέσω της ουβικουιτίνωσης και της πρωτεασωμικής αποικοδόμησης. Τέσσερα γνωστά συστήματα λιγκασών ουβικουιτίνης μεσολαβούν στην αποικοδόμηση του Nrf2: Keap1, πρωτεΐνη προσαρμογέα υποστρώματος για τη λιγάση ουβικουιτίνης με βάση την Cul3/Rbx1 και αισθητήρας με βάση την κυστεΐνη για τους επαγωγείς του Nrf2- β-TrCP, προσαρμογέας υποστρώματος για τη λιγάση ουβικουιτίνης με βάση την Skp1-Cul1/Rbx1, λιγάση ουβικουιτίνης με βάση την WDR23-DDB1-Cul4/Roc1 και Hrd1. Η αποικοδόμηση με τη μεσολάβηση του Keap1 απαιτεί οι αισθητήρες κυστεΐνης

του να βρίσκονται σε μειωμένη κατάσταση. Η αποικοδόμηση με τη μεσολάβηση της β -TrCP απαιτεί το σχηματισμό ενός φωσφοδεκρονίου που καταλύεται από την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3 (GSK3), η οποία με τη σειρά της απαιτεί φωσφορυλίωση από μια κινάση εκκίνησης. Η αποικοδόμηση του Nrf2 με τη μεσολάβηση του Hrd1 λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια του ER stress (Πηγή: Dinkova-Kostova AT, The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. FEBS J. 2018)

4.2.6. Το Klotho εμποδίζει τη σηματοδότηση του υποδοχέα IGF-1

Η ομάδα του Mathew et al σύνδεσε το μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα ινσουλίνης/IGF-1 με τη γήρανση και επισήμανε την ευαισθησία του στα θρεπτικά συστατικά (198). Φάνηκε ότι όταν τα θρεπτικά συστατικά είναι άφθονα, ο μεταγενέστερος μεσολαβητής που χαρακτηρίζεται ως μηχανικός στόχος του ραπαμυκίνη (mTOR- μια πρωτεϊνική κινάση) ενεργοποιείται και εμπλέκεται σε διάφορες διαταραχές που σχετίζονται με την ηλικία (199). Βρέθηκε ότι η νηστεία και ο περιορισμός θερμίδων μπορεί να μετριάσει αυτό το αποτέλεσμα και να παρατείνει τη ζωή σε ορισμένα είδη (200) (Εικόνα 12)



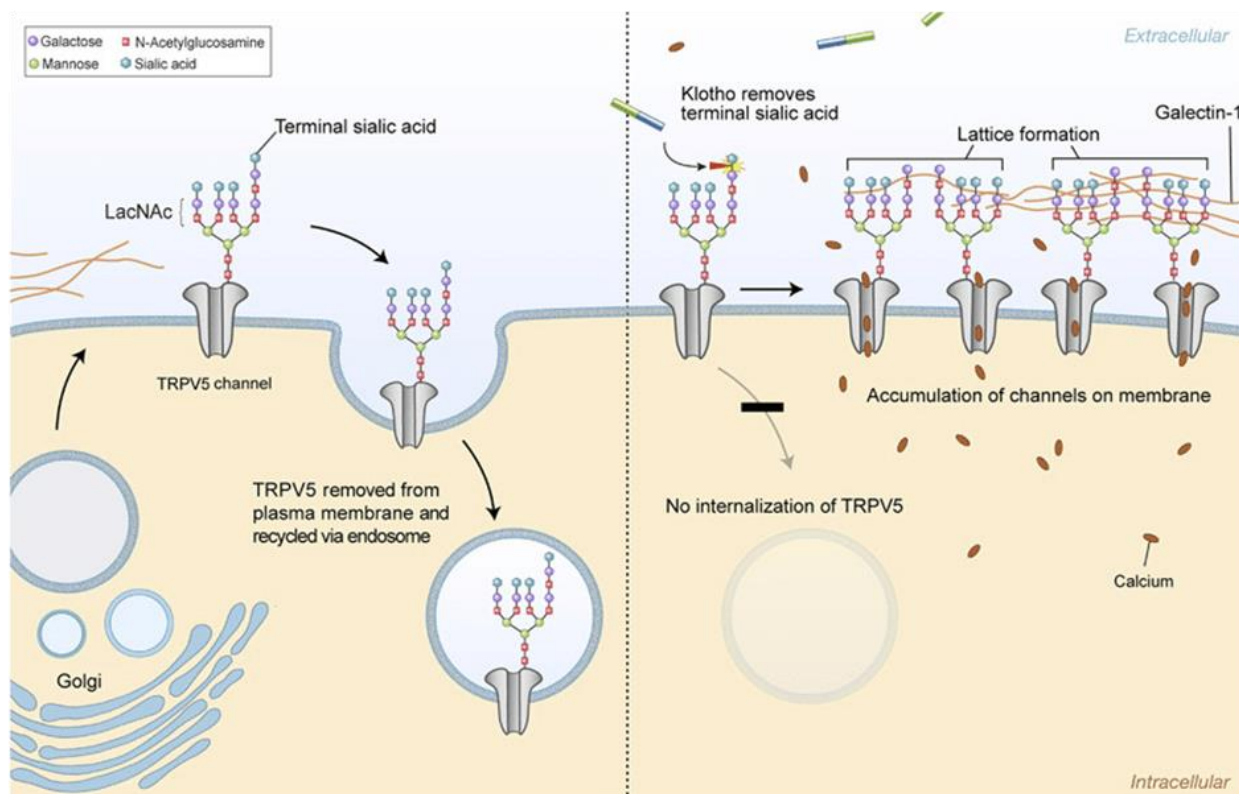
Εικόνα 12: Βασικά συστατικά της σηματοδότησης ευαισθητοποίησης θρεπτικών συστατικών που ρυθμίζουν τη γήρανση στους ευκαρυώτες. Απλοποιημένο σχήμα των βασικών σηματοδοτικών οδών ανίχνευσης θρεπτικών συστατικών που ρυθμίζουν τη γήρανση, συμπεριλαμβανομένων των ινσουλίνης/IGF-1, mTOR, AMPK και AKT. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια ανίχνευσης θρεπτικών συστατικών περιλαμβάνουν κυκλοφορούντες παράγοντες, υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας, ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά συστατικά και μοριακούς επενεργητές. Υποθετικοί ρυθμιστές της γήρανσης έχουν βρεθεί σε καθεμία από αυτές τις κατηγορίες μακρομορίων. Οι πρότυποι οργανισμοί υποδεικνύουν είδη στα οποία γενετικές μελέτες έχουν εμπλέξει συγκεκριμένους παράγοντες, ενώ τα ομόλογα ονόματα των βασικών συστατικών παρατίθενται παρακάτω. Τα γονίδια που συνδέονται με τη γήρανση του ανθρώπου μέσω μελετών γενετικής συσχέτισης σε όλο το γονιδίωμα ή μελετών γενετικής συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων γονιδιόυποδεικνύονται με πράσινο χρώμα. Οι φαρμακολογικές και διατροφικές παρεμβάσεις διαμορφώνουν τη γήρανση μέσω των δράσεων τους στις σηματοδοτικές οδούς ανίχνευσης θρεπτικών ουσιών. (Πηγή: Johnson SC. Nutrient Sensing, Signaling and Ageing: The Role of IGF-1 and mTOR in Ageing and Age-Related Disease. Subcell Biochem. 2018)

Συνεπώς, αυτό επιβεβαιώνει τη σημαντικότητα του γεγονότος ότι η Klotho αναστέλλει το IGF-1/PI3K/ Akt/mTOR μονοπάτι (114). Αυτή η αναστολή είναι ένας άλλος πιθανός μηχανισμός με τον οποίο η Klotho ασκεί την αντιγηραντική της δράση, και την προστασία έναντι εκφυλιστικών ασθενειών (202). Ερευνητές αναφέρουν ότι η διαλυτή Klotho εμποδίζει την ενεργοποίηση του υποδοχέα ινσουλίνης/IGF-1, αποτρέποντας τα μεταγενέστερα σηματοδοτικά συμβάντα, συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων του υποδοχέα ινσουλίνης (IRS) και της PI3K/ Akt/mTOR σηματοδότηση (202). Η οδός ινσουλίνης/IGF-1 συνδέεται με αντιοξειδωτικές μηχανισμούς μέσω των μεταγραφικών παραγόντων FoxO forkhead (FOXOs) (29). Ο αποκλεισμός των μονοπατιών ινσουλίνης/IGF-1 απελευθερώνει την αναστολή των FOXOs, με αποτέλεσμα την πυρηνική τους μετανάστευση και την έκφραση διαφόρων γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου του μαγγανίου (29). Σε συμφωνία με αυτό, η ενεργοποίηση των FOXO είναι καταβεβλημένη σε ποντίκια με ανεπάρκεια Klotho, αλλά αυξάνεται σε ποντίκια με υπερέκφραση Klotho (29).

Ο FGF23 προσδένεται στον υποδοχέα Klotho/FGFR1c στο νεφρικό σωληνάριο για να αυξάνει την απέκκριση φωσφορικών (φωσφατουρική δράση), να ρυθμίζει τον μεταβολισμό της βιταμίνης D3 και να αυξάνει την επαναρρόφηση του ασβεστίου. Οι νεφρικές λειτουργίες της Klotho θα αναφερθούν στα παρακάτω κεφάλαια.

4.2.7. Ρύθμιση της δραστηριότητας των διαύλων ιόντων

Η εκκρινόμενη Klotho διατηρεί την ομοιόσταση των ιόντων ρυθμίζοντας τα κανάλια ιόντων και τους μεταφορείς τους (154). Ο δίαυλος κατιόντων δυναμικού μεταβατικού υποδοχέα, υποοικογένεια V, μέλος 5 (TRPV5) είναι ένας από τους διαύλους ιόντων που ρυθμίζονται από την εκκρινόμενη πρωτεΐνη Klotho (203). Ο TRPV5 είναι ένας δίαυλος ασβεστίου που εκφράζεται στα κύτταρα των ακραίων τμημάτων των νεφρικών σωληναρίων και είναι υπεύθυνος κυρίως για την είσοδο του Ca^{2+} στην διασωληναριακή επαναρρόφηση Ca^{2+} στο νεφρό διαμεσολαβούμενη από την Klotho διατήρηση του TRPV5 στην κυτταρική επιφάνεια (204). Σύμφωνα με το γεγονός ότι η Klotho ανήκει στην οικογένεια 1 των γλυκοσιδασών που διασπούν γλυκοζιτικούς δεσμούς, η εκκρινόμενη Klotho αναφέρθηκε ότι έχει ασθενή δραστηριότητα β-γλυκουρονιδάσης *in vitro* (63). Ωστόσο, η δραστηριότητα β-γλυκουρονιδάσης της Klotho μπορεί να μην εμπλέκεται στην τροποποίηση των γλυκανών του TRPV5, επειδή οι τυπικές N συνδεδεμένες γλυκάνες των γλυκοπρωτεϊνών των θηλαστικών δεν περιέχουν γλυκουρονικά οξέα (63). Η εκκρινόμενη Klotho απομακρύνει τα τερματικά σιαλλικά οξέα μέσω της υποτιθέμενης δραστηριότητας σιαλιδάσης της (203).



.Εικόνα 13:Κατακράτηση του TRPV5 στην κυτταρική επιφάνεια με τη μεσολάβηση της Klotho(Πηγή:Pavlatou MG, Remaley AT, Gold PW. Klotho: a humeral mediator in CSF and plasma that influences longevity and susceptibility to multiple complex disorders, including depression. Transl Psychiatry. 2016)

Η αφαίρεση των σιαλικών οξέων εκθέτει την υποκείμενη γαλακτόζη ή τον δισακχαρίτη Ν-ακετυλολακτοζαμίνη στις γλυκάνες. Μόλις εκτεθούν, αυτά τα σάκχαρα μπορούν να συνδεθούν με τη γαλεκτίνη-1, μια λεκτίνη (πρωτεΐνη δέσμευσης σακχάρων) που υπάρχει σε αφθονία στην εξωκυττάρικη μητρα(matrrix)(203). Έτσι, η απομάκρυνση των τελικών σιαλικών οξέων από τις γλυκάνες του TRPV5 από την εκκρινόμενη Klotho προάγει την αλληλεπίδραση μεταξύ των γλυκανών του TRPV5 και της γαλεκτίνης-1, η οποία παγιδεύει το TRPV5 στην κυτταρική επιφάνεια και εμποδίζει την ενδοκυττάρωσή του, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του TRPV5 στην πλασματική μεμβράνη (203)(Εικόνα 13).

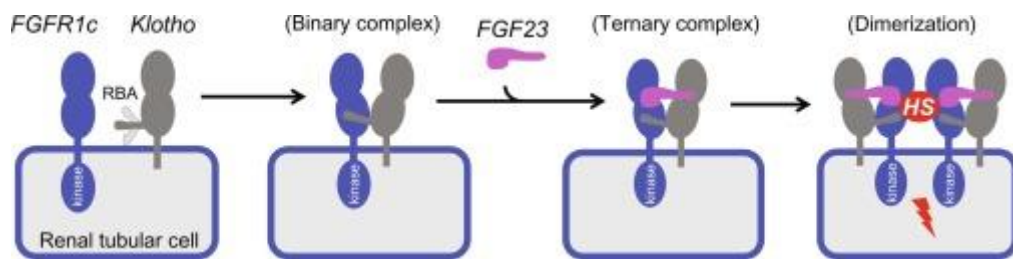
Έτσι, η εκκρινόμενη Klotho αυξάνει τον αριθμό των ROMK1 στην πλασματική μεμβράνη και αυξάνει την έκκριση καλίου στα ούρα(154). Στην απόδειξη αυτού, η έγχυση εκκρινόμενης Klotho σε ποντίκια προάγει την απέκκριση καλίου στα ούρα (154). Αυτή η δράση της εκκρινόμενης Klotho αντιπροσωπεύει έναν άλλο μηχανισμό ρύθμισης της εσωτερίκευσης των γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας.

4.3.Ο ρόλος της μεμβρανικής Klotho

Η μεμβρανική πρωτεΐνη Klotho δρα ως συνυποδοχέας για τον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών-23. Η εξωκυτάρια περιοχή της αποβάλλεται από την κυτταρική επιφάνεια και λειτουργεί ως ενδοκρινής ουσία που ασκεί πολλαπλές νεφρικές και εξωνεφρικές λειτουργίες(205). Η μεμβρανική Klotho σχηματίζει ένα τετραμερές σύμπλοκο με τους υποδοχείς FGF (FGFRs) και λειτουργεί ως συνυποδοχέας για τον FGF23, μια φωσφατονίνη που προέρχεται από τα οστά και προκαλεί αρνητική ισορροπία φωσφορικών μέσω της προώθησης της νεφρικής απέκκρισης φωσφορικών(158).

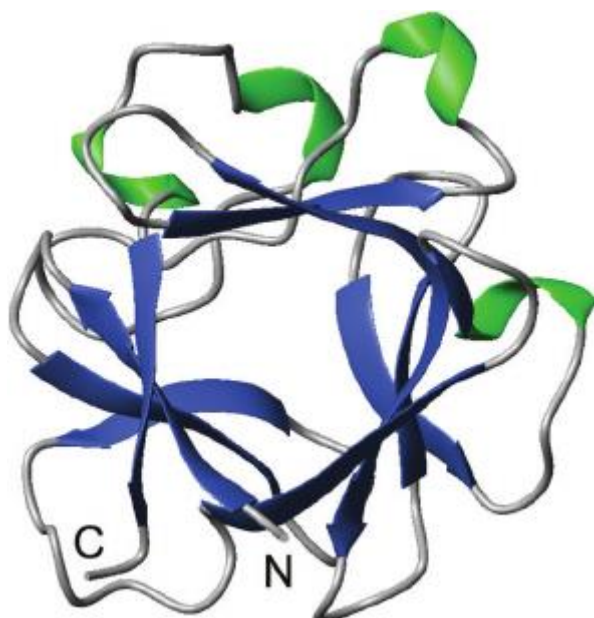
Τα κύτταρα επικοινωνούν διάμεσου πρωτεϊνών που συνδέονται με την μεμβράνη ή διαμέσου εκκρινόμενων μορίων που ορίζουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τον μεταβολισμό και τη συμπεριφορά τους(169). Εκκρινόμενες ορμόνες, κυτταροκίνες, χημειοκίνες και αυξητικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας σε μεγάλες ή κοντινές αποστάσεις(206). Πολλές εκκρινόμενες πρωτεΐνες έχουν ονομαστεί αυξητικοί παράγοντες, δεδομένου ότι ο πολλαπλασιασμός συνδέεται στενά με την κυτταρική διαφοροποίηση και το μεταβολισμό, καθώς και με την έκφραση γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό φαινότυπο και την συμπεριφορά(169). Οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (FGF) είναι πρωτεΐνες που αυξάνουν τη μιτωτική δραστηριότητα και τη σύνθεση του DNA, διευκολύνοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό διαφόρων τύπων πρόδρομων κυττάρων(207).

Οι περισσότεροι αυξητικοί παράγοντες ομαδοποιούνται σε δομικά συγγενείς οικογένειες που αντανakλούν εξελικτική διαφοροποίηση από προγονικά γονίδια(169). Η οικογένεια των αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών (FGF) αποτελείται από είκοσι δύο μέλη που μοιράζονται μια παρόμοια βασική πρωτεϊνική αλληλουχία και δομή(208). Οι μοριακές τους μάζες κυμαίνονται από 17 kDa έως 34 kDa (209). Η οικογένεια FGF ταξινομείται περαιτέρω με βάση την ομολογία της αλληλουχίας τους και τη φυλογένεσή τους σε επτά υποοικογένειες: FGF1, FGF4, FGF7, FGF8, FGF9, FGF11 και FGF19 (210). Οι επτά υποοικογένειες διαθέτουν διαφορετικούς τρόπους δράσης -αυτοκρινείς, παρακρινείς, ενδοκρινείς και ενδοκρινείς(209). Οι παρακρινείς/αυτοκρινείς FGFs (υποοικογένειες FGF1, FGF4, FGF7, FGF8 και FGF9) διεκδικούν τις λειτουργίες τους τοπικά μέσω αλληλεπίδρασης και ενεργοποίησης των υποδοχέων FGF τυροσινικής κινάσης της κυτταρικής επιφάνειας (FGFRs), μέσω αλληλεπίδρασης υψηλής συγγένειας με την ηπαρίνη ή με την θειική ηπαράνη (211)(εικόνα 14)



Εικόνα 14 : Δομή της πρωτεΐνης Klotho. Ο διμερισμός του συμπλόκου FGFR-Klotho-FGF23 διαμεσολαβείται από τη θεική ηπαράνη (HS) και απαιτείται για την ενεργοποίηση της κινάσης τυροσίνης FGFR. (Πηγή :Kuro-O M. Aging and FGF23-klotho system. Vitam Horm. 2021)

Η ανθρώπινη οικογένεια FGFR περιλαμβάνει τέσσερα μέλη: FGFR1-FGFR4. Αν και όλοι οι FGFRs κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, η αλληλουχία των τεσσάρων μελών παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα (56% έως 71%) (212). Δομικά, οι FGFRs μοιάζουν με τον υποδοχέα της κινάσης της τυροσίνης (RTKs) με μια εξωκυτταρική περιοχή πρόσδεσης συνδέσμου στο N-τελικό άκρο που ακολουθείται από μια διαμεμβρανική περιοχή μονής διέλευσης και μια διαιρεμένη κυτταροπλασματική περιοχή τυροσίνης κινάσης στο C-τελικό άκρο (209) (Εικόνα 15)

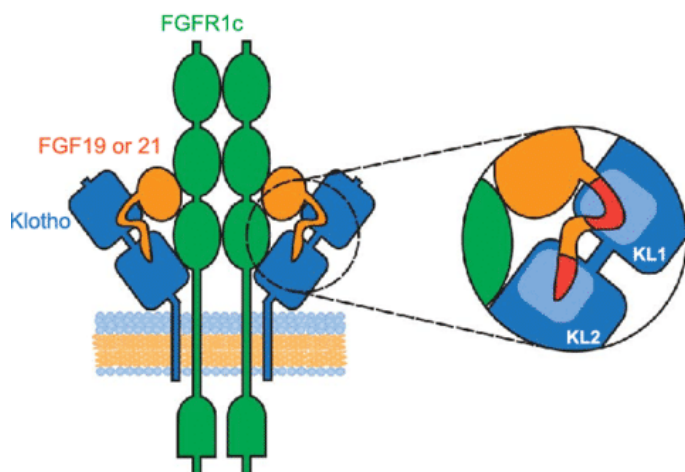


Εικόνα 15 .Κρυσταλλική δομή του ανθρώπινου FGF-1 (Πηγή:Zakrzewska M, Marcinkowska E, Wiedlocha A. FGF-1: from biology through engineering to potential medical applications. Crit Rev Clin Lab Sci. 2008)

Υπάρχουν επτά παραλλαγές του FGFR: FGFR1b, FGFR1c, FGFR2b, FGFR2c, FGFR3b, FGFR3c και FGFR4 (212). Οι παρακρινείς υποοικογένειες ρυθμίζουν μια ποικιλία κυτταρικών και αναπτυξιακών διεργασιών, όπως την διαμόρφωση του εγκεφάλου, την μορφογένεση των

διακλαδώσεων, την ανάπτυξη των άκρων, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μετανάστευση των κυττάρων(213).

Από την άλλη πλευρά, τα μέλη της ενδοκρινικής υποοικογένειας FGF (FGF19, 21 και 23) έχουν ενδοκρινικές δράσεις (212). Διαμεσολαβούν σε φυσιολογικές διεργασίες μέσω αλληλεπιδράσεων με τους FGFR, αλλά σε μεγαλύτερο εύρος, όπως οι ορμόνες και δεν απαιτούν αποκλειστικά ηπαρίνη ή θειική ηπαρίνη (211). Ωστόσο, οι ενδοκρινικοί FGFs απαιτούν την παρουσία της Klotho , για τη δέσμευση και την ενεργοποίηση των FGF υποδοχών (211). Το C-τελικό άκρο των FGF19, 21 και 23 περιέχει θέση πρόσδεσης για την Klotho(8). Το β-Klotho αυξάνει τη σηματοδότηση του FGF19 με τη σύνδεση του με τον FGFR4 και ο FGF21 διάμεσου του FGFR1c, ενώ η α-Klotho ενεργοποιεί το σηματοδοτικό σύμπλοκο με το FGF23 διάμεσου του υποδοχέα FGFR1c (212) (Εικόνα 16)



Εικόνα 16:Προτεινόμενος μηχανισμός σηματοδότησης των FGF19 και FGF21. Δύο εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές στην C-τελική ουρά των FGF19 και 21 εμπλέκονται με τις KL1 και KL2 της β-Klotho, αντίστοιχα. Η κατάληψη και των δύο θέσεων απαιτείται για την ενεργοποίηση του συμπλόκου β-Klotho/ FGFR1c. Η σφαιρική περιοχή του πυρήνα των FGF19 και FGF21 μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με τη β-Klotho(Πηγή:Shi SY, Lu YW, Richardson J, Min X, Weiszmnn J, Richards WG, Wang Z, Zhang Z, Zhang J, Li Y. A systematic dissection of sequence elements determining β-Klotho and FGF interaction and signaling. Sci Rep. 2018)

Αυτά τα σύμπλοκα έχουν εξελιχθεί ώστε να ρυθμίζουν το μεταβολισμό των χολικών οξέων, των φωσφορικών αλάτων, των υδατανθράκων και των λιπιδίων εκτός από τις κανονικές λειτουργίες των FGF (213). Τέλος, η υποοικογένεια FGF11 αποτελείται από τους FGF11-14 και λειτουργεί μόνο με ενδοκρινικό τρόπο δράσης (213). Οι ενδοκρινείς FGFs, που αποκαλούνται επίσης iFGF, εκφράζονται ενδοκυτταρικά και λειτουργούν μέσω μονοπατιών ανεξάρτητων από τον FGFR (211). Τα μέλη της υποοικογένειας FGF11 εμπλέκονται συνήθως στη ρύθμιση των διαύλων νατρίου με πύλη τάσης (211). Οι μεταλλάξεις στους FGFRs στον άνθρωπο

εμπλέκονται σε διάφορες παθολογίες που κυμαίνονται από διάφορες μορφές καρκίνου και σκελετικές διαταραχές(214).

Σε αντίθεση με τους παρακρινείς FGFs, τα μέλη της υποοικογένειας των ενδοκρινών FGFs έχουν ασυνήθιστα χαμηλή συγγένεια με τους συγγενείς υποδοχείς FGF και απαιτούν τις πρωτεΐνες α -Klotho και β -Klotho ως συνυποδοχείς (213). Από τα τρία μέλη (FGF19, FGF21 και FGF23), ο FGF 19 παρουσιάζει υψηλότερο βαθμό ηπαρινοεξαρτώμενης μεταγενέστερης σηματοδότησης (215). Οι ενδοκρινείς FGFs είναι κρίσιμοι για τη διατήρηση της ομοιόστασης ολόκληρου του οργανισμού λόγω των διαφόρων ρόλων τους στην επιβίωση, στην ανάπτυξη, στον μεταβολισμό και τις προσαρμογές του, καθώς και στη διαμόρφωση των επιπέδων της βιταμίνης D και των φωσφορικών αλάτων (216).

Ο παράγοντας FGF19 εκκρίνεται από το έντερο κατά την σίτιση και δρα στο ήπαρ για να καταστείλει την σύνθεση των χολικών οξέων(217). Τα χολικά οξέα είναι σημαντικά για την εντερική απορρόφηση των λιπιδίων και την σύνθεσή τους και αυτό αποτελεί μια σημαντική οδό για το μεταβολισμό της χοληστερόλης (218). Σε φυσιολογικές καταστάσεις, τα κυκλοφορούντα επίπεδα του FGF19 καταστέλλουν τη σύνθεση των χολικών οξέων, τα οποία είναι σηματοδοτικά μόρια που ενεργοποιούν ειδικούς υποδοχείς χολικών αλάτων (FXR) κατά την εντεροηπατική κυκλοφορία από τον ειλεό στο ήπαρ (219).

Ο FGF19 εμπλέκεται επίσης στην οργανογένεση ορισμένων οργάνων, όπως του αυτιού, του ματιού, της καρδιάς και του εγκεφάλου (220). Ο FGF19 εκφράζεται επίσης στα ανθρώπινα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα και τα επίπεδα έκφρασης συσχετίζονται με την πολυδύναμη κατάσταση τους (221).

Ο FGF21 εκκρίνεται από το ήπαρ κατά τη νηστεία και δρα στον λευκό λιπώδη ιστό για να προάγει τη λιπόλυση και να μεσολαβεί στις μεταβολικές αποκρίσεις της νηστείας (222). Ο λιπώδης ιστός ταξινομείται σε δύο μέρη: τον λευκό λιπώδη ιστό, ο οποίος έχει ρόλο στην αποθήκευση ενέργειας και λιπιδίων, και τον καφέ λιπώδη ιστό, ο οποίος λειτουργεί στην παραγωγή θερμότητας κατά τη διάρκεια της προσαρμοστικής απόκρισης στην έκθεση στο κρύο (223).

Στον λευκό λιπώδη ιστό ο FGF21 δρα ως ένας ισχυρός επαγωγέας της πρωτεΐνης αποσύζευξης 1 (UCP1), η οποία μεσολαβεί μέσω της δραστηριότητας της PGC1 α , και ενεργοποιεί ορισμένα θερμογενετικά γονίδια (224). Η έκθεση στο κρύο ενισχύει τα κυκλοφορούντα επίπεδα FGF21 στους ανθρώπους, τα οποία αντιστοιχούν σε αυξημένη ενεργειακή δαπάνη και λιπόλυση (225).

Επίσης ερευνητές έχουν βρει ότι ο FGF21 εκφράζεται και στα παγκρεατικά νησίδια, όπου αναστέλλει την έκκριση γλυκαγόνης και ενισχύει την έκφραση γονιδίων και πρωτεϊνών ινσουλίνης, με αυξημένη, επαγόμενη από γλυκόζη έκκριση ινσουλίνης σε διαβητικά ζώα (226).

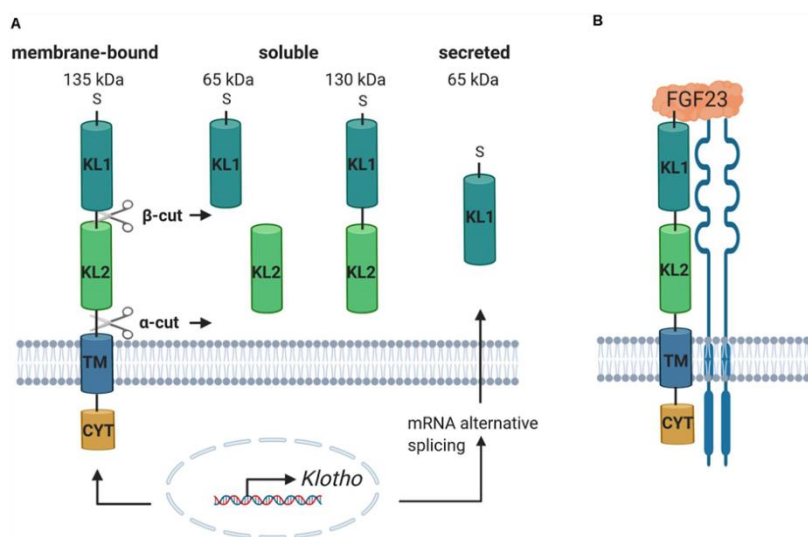
Ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών FGF19 και ο FGF21 απαιτούν την β-Klotho ως πυρηνουποδοχέα για τη δέσμευση των FGFRs και την ενεργοποίηση του FGF σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τη σύνθεση των χολικών οξέων και το μεταβολισμό (227).

Το β-Klotho σχηματίζει ένα σύμπλεγμα τόσο με το FGFR1c όσο και με το FGFR4, διευκολύνοντας έτσι την ενεργοποίηση της κατάντη σηματοδότησης (228). Ο FGF21 συνδέεται με το σύμπλεγμα β-Klotho-FGFR1c, ενεργοποιεί τη φωσφορυλίωση ERK1/2 και μειώνει τη σύνθεση των χολικών οξέων (228). Το FGF19 ενεργεί μέσω του συμπλέγματος β-Klotho-FGFR4 και καταστέλλει την σύνθεση του Cyp7a1, οδηγώντας σε μείωση την σύνθεση της χολής στο ήπαρ (229).

5.1. Klotho- FGF23 άξονας

Το τρίτο μέλος της ενδοκρινικής υποοικογένειας, ο FGF23, ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά σε έμβρυα ποντικών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με βάση την ομολογία (230). Με την προσέγγιση αναζήτησης ομολογίας, το ανθρώπινο γονίδιο FGF23 βρέθηκε να είναι εξαιρετικά παρόμοιο (72% ταυτόσημα αμινοξέα) με τον FGF23 του ποντικού (230).

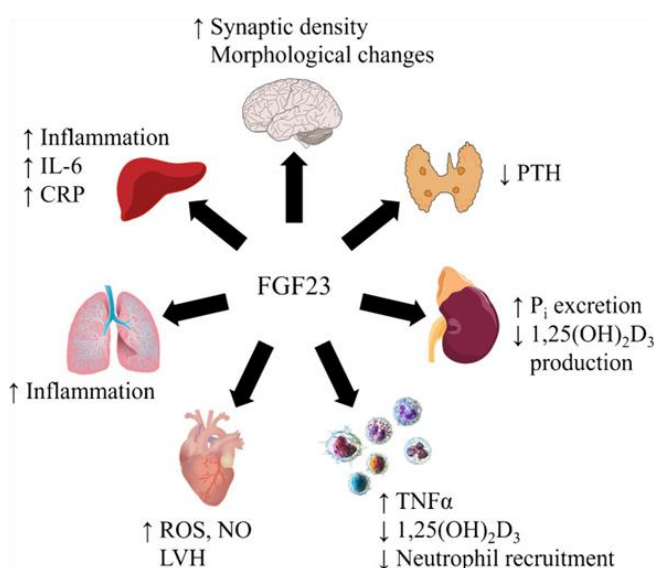
Ο FGF23 είναι μια πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από 251 αμινοξέα σε μήκος (περίπου 32 kDa), που συντίθενται και εκκρίνονται από οστικά κύτταρα (κυρίως οστεοβλάστες) (231). Όπως όλα τα μέλη της υποοικογένειας του, ο FGF23 έχει μια περιοχή σύνδεσης N-τερματικού θραύσματος για τον υποδοχέα FGF (FGFR) και μια C-τερματική περιοχή δέσμευσης για το Klotho (232) (εικόνα 17),



Εικόνα 17: Η συμπλοκοποίηση της KL με τον FGFR επιτρέπει τη δέσμευση του FGF23, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός τριμερούς συμπλόκου, το οποίο ενεργοποιεί το μεταγενέστερο μονοπάτι σηματοδότησης (Franz Ewendt, Front. Cell Dev. Biol., 14 January 2021)

Τρεις διαφορετικοί υποδοχείς του FGF23 (FGFR1c, FGFR3c και FGFR4) έχουν εντοπιστεί στην κυτταρική μεμβράνη(158). Οι FGFR3 και -4 εμπλέκονται στον μεταβολισμό της βιταμίνης D και ο FGFR1 εμπλέκεται στην επαναρρόφηση του φωσφορικού άλας (Pi)(233). Η α-Klotho πλήρους μήκους δεσμεύεται στους FGFRs για να ενισχύσει την ικανότητα δέσμευσης του FGF23 (234). Η N-τελική περιοχή του FGF23 αλληλεπιδρά με τους FGFRs και η C-τελική περιοχή του FGF23 αλληλεπιδρά με την α-Klotho (235)

Οι επιδράσεις του FGF23 σε διάφορα όργανα, ιστούς και κύτταρα εμφανίζονται στην εικόνα 18.



Εικόνα 18: Η ρύθμιση του FGF23 υπό φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές συνθήκες C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 23 (FGF23), ανόργανα φωσφορικά άλατα (Pi), ιντερλευκίνη-6 (IL-6), υπερτροφία της αριστερής κοιλίας (LVH), παραθυρεοειδής ορμόνη (PTH), δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNFα). (Πηγή: Stefan Rausch¹⁰. Gao W, Yuan C, Zhang J, Li L, Yu L, Wiegman CH, Barnes PJ, Adcock IM, Huang M, Yao X. Klotho expression is reduced in COPD airway epithelial cells: effects on inflammation and oxidant injury Clinical science. 2015)

Βιοχημικές και κυτταροβιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη Klotho λειτουργεί ως υποχρεωτικός συνυποδοχέας του FGF23 (236). Ο FGF23 έχει πολύ χαμηλή συνάφεια με τους υποδοχείς FGF (FGFRs) και δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τους συγγενείς υποδοχείς του χωρίς την Klotho υπό φυσιολογική συγκέντρωση (237).

Ο FGF23 εμφανίζει την υψηλότερη έκφραση του σε οστά (οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα), αλλά μπορεί επίσης να ανιχνευθεί σε άλλα όργανα, όπως το ήπαρ, στον εγκέφαλος, στην καρδιά, στον θυρεοειδή αδένα, στο έντερο και στους σκελετικούς μύες (137). Φάνηκε ότι η προϋπόθεση για να ασκεί τις ενδοκρινικές ιδιότητές του, στερείται του μοτίβου δέσμευσης

ηπαρانشουλφικού οξέος, το οποίο θα είχε ως αποτέλεσμα την υψηλή δέσμευση του εξωκυττάριο τομέα , επιτρέποντας την έκκρισή του στο αίμα (238).

Η λειτουργία της πρωτεΐνης Klotho δεν ήταν ξεκάθαρη έως ότου βρέθηκε ότι οι φαινότυποι των ποντικών με ανεπάρκεια Klotho ήταν σχεδόν πανομοιότυποι με εκείνους των ποντικών με έλλειψη του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών-23 (FGF23)(239). Τα ποντίκια με έλλειψη του FGF23 ανέπτυξαν φαινότυπους κατακράτησης φωσφόρου, που χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη ασβεστοποίηση των μαλακών μορίων και υπερφωσφαταιμία (239). Εκτός από αυτούς τους αναμενόμενους φαινότυπους, τα ποντίκια με έλλειψη FGF23(-) εμφάνισαν απροσδόκητους φαινότυπους, όπως καθυστέρηση της ανάπτυξης, υπογοναδισμό, πρόωρη θυμική υποστροφή, οστεοπενία, ατροφία του δέρματος και πνευμονικό εμφύσημα, που θύμιζαν το σύνδρομο πρόωρης γήρανσης στα ποντίκια με ανεπάρκεια Klotho(234). Παρομοίως, τα ποντίκια με ανεπάρκεια Klotho εμφάνισαν πρόωρη γήρανση, είχαν εκτεταμένη ασβεστοποίηση των μαλακών μορίων και υπερφωσφαταιμία -φαινότυπος που ήταν παρόμοιος με αυτόν με την κατακράτηση φωσφορικών αλάτων στα ποντίκια Fgf23(-) (239). Οι παρατηρήσεις των ερευνητών επισήμαιναν μια απροσδόκητη σύνδεση μεταξύ του FGF23 και της Klotho, υποδηλώνοντας ότι ο FGF23 και η Klotho μπορεί να λειτουργούν σε ένα κοινό ενδοκρινικό σύστημα που ρυθμίζει το μεταβολισμό των φωσφορικών αλάτων(234).

Έχει αναφερθεί ότι οι λειτουργίες του FGF23- Klotho άξονα εμπλέκονται στη ρύθμιση της vit.D3, του Pi και του ασβεστίου (240), στη φλεγμονή (π.χ. LPS και TNFα) (136), στην ομοίωση του καρδιαγγειακού (ρενίνη- αγγειοτενσίνη- αλδοστερόνη και συμπαθητικό νευρικό σύστημα) (241), στον ενεργειακό μεταβολισμό (ινσουλίνη) (242) και στην αιμοποίηση (Hif1α, σιδηροπενία και ερυθροποιητίνη) (243) (Εικόνα 18).

Σε διάφορα μοντέλα ποντικών έχει αποδειχθεί ότι η α-Klotho είναι απαραίτητη για την ρύθμιση της απορρόφησης του φωσφορικού άλας (Pi) από τον FGF23 στα εγγύς σωληνάρια(239). Τα ποντίκια Klotho παρουσιάζουν σημαντική αύξηση των επιπέδων Pi, Ca²⁺ και 1,25(OH)₂ D3 στον ορό, καθώς και εκτεταμένους φαινότυπους πρόωρης γήρανσης (239).

Το φωσφορικό άλας(Pi) είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό, το οποίο συμμετέχει σε όλες τις διαδικασίες του ενεργειακού μεταβολισμού και της σκελετικής ανοργανοποίησης (244). Αποτελεί σημαντική πηγή του οργανικού συστατικού του DNA, του RNA και των φωσφολιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη και είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό του ATP κυρίως μέσω του ενεργειακού μεταβολισμού ή των ρυθμιστών της κυτταρικής σηματοδότησης (244).

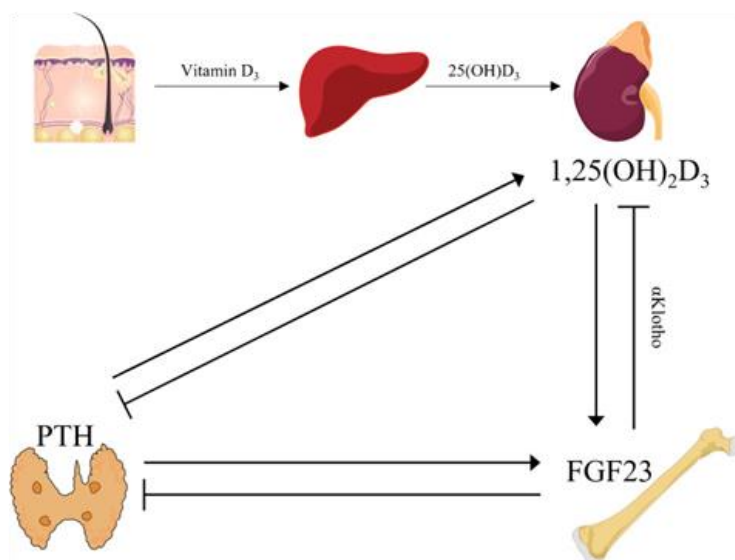
Η ισορροπία μεταξύ της απορρόφησης μέσω της διατροφής από το έντερο, της κινητοποίησης από τα οστά και της απέκκρισης από τους νεφρούς στα ούρα καθορίζει τα επίπεδα φωσφορικών στο αίμα (245) . Διάφοροι ενδοκρινικοί παράγοντες ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των φωσφορικών αλάτων. Εκτός από τον γνωστό ρόλο τους ως ρυθμιστές του μεταβολισμού του ασβεστίου, η βιταμίνη D και η παραθορμόνη (PTH) συμμετέχουν επίσης στη ρύθμιση του μεταβολισμού των φωσφορικών αλάτων (246). Η ενεργός μορφή της βιταμίνης D (1,25 διυδροξυβιταμίνη D₃), η οποία συντίθεται στο νεφρό, αυξάνει την εντερική απορρόφηση του διαιτητικού ασβεστίου και των φωσφορικών αλάτων(247). Διεγείρει επίσης την οστεοκλαστογένεση προωθώντας κατά αυτόν τον τρόπο την κινητοποίηση του ασβεστίου και του φωσφορικού άλατος από τα οστά (την κύρια δεξαμενή του οργανισμού και για τα δύο) αυξάνοντας κατά συνέπεια τα επίπεδα τους στο αίμα(247). Οι αλλαγές στα εξωκυττάρια επίπεδα ασβεστίου γίνονται αντιληπτές από τους υποδοχείς ανίχνευσης ασβεστίου του παραθυρεοειδούς αδένος ώστε να ρυθμίζεται η σύνθεση και η έκκριση της PTH(248) .

Η PTH μπορεί στη συνέχεια να δράσει στα οστά για να αυξήσει την εκροή ασβεστίου και φωσφορικών αλάτων και στους νεφρούς για να αυξήσει την σύνθεση της βιταμίνης D(247). Η βιταμίνη D με τη σειρά της καταστέλλει την παραγωγή και την έκκριση της PTH, κλείνοντας έτσι έναν βρόχο αρνητικής ανάδρασης(247). Ένα κρίσιμο χαρακτηριστικό της PTH είναι ότι, σε αντίθεση με τη βιταμίνη D, δεν προκαλεί καθαρό θετικό ισοζύγιο φωσφορικών, επειδή η PTH προκαλεί ταυτόχρονα φωσφατουρία (247).

Ο FGF23 ενεργοποιεί το γονίδιο Cyp24a1 που κωδικοποιεί την 24- υδροξυλάση, η οποία αδρανοποιεί το 1,25(OH)₂ D₃ (234) Επιπλέον, ο FGF23 είναι επίσης σε θέση να αναστέλλει την έκφραση του mRNA της παραθορμόνης (PTH)και την έκκριση της PTH στους παραθυρεοειδείς αδένες (9). Η PTH αποτελεί ενεργοποιητή της έκφρασης της Cyp27b1, η οποία προαγάγει περαιτέρω την 1,25(OH)₂ D₃ , οδηγώντας στην απορρόφηση του διαιτητικού Ca²⁺ (249). Η PTH όχι μόνο προάγει την επαναρρόφηση του Ca²⁺ αλλά μειώνει επίσης την επαναρρόφηση του Pi (9). Επιπλέον, η PTH αυξάνει τα επίπεδα FGF23 mRNA μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα PTH και της 13-κατενίνης (9). Η κυκλοφορούσα 1,25(OH)₂ D₃ ενεργοποιεί την έκφραση του FGF23 στα οστά μέσω σύνδεση με τον υποδοχέα της βιταμίνης D και τον υποδοχέα των ρετινοειδών (250) .

Η βιταμίνη D έχει αποδειχθεί ότι επάγει τον ετεροδιμερισμό του υποδοχέα των ρετινοειδών, με αποτέλεσμα την προς τα πάνω ρύθμιση των γονιδίων-στόχων του στοιχείου που ανταποκρίνονται στη βιταμίνη D, συμπεριλαμβανομένου του FGF23 (251). Η δέσμευση της PTH στον υποδοχέα της έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKA και την καταστολή της

σκληροστίνης, ανταγωνίζοντας το μονοπάτι σηματοδότησης WNT και την καταστολή της έκφρασης FGF23 (140). Τα επίπεδα της δραστικής βιταμίνης D και της PTH στον ορό μειώνονται και τα δύο από το FGF23, ενώ το FGF23 καταστέλλει τη σύνθεση της ενεργού βιταμίνης D με αυξημένη ρύθμιση του Cyp24a1, το οποίο κωδικοποιεί την 24-υδροξυλάση, υπεύθυνη για τη μετατροπή σε ανενεργή βιταμίνη D από έναν μηχανισμό που εξαρτάται από την Klotho(εικόνα 19).



Εικόνα 19 :Η αλληλεξάρτηση του FGF23, της PTH και του 1,25(OH)2D3(Πηγή:Rausch S, Föller M. The regulation of FGF23 under physiological and pathophysiological conditions. Pflugers Arch. 2022)

Cy27b1 , η οποία μετατρέπει τη μορφή D3 στην ενεργό μορφή της βιταμίνης D, ρυθμίζεται προς τα κάτω(252).Η α-Klotho εκφράζεται στον παραθυρεοειδή αδένα και ο FGF23 καταστέλλει τόσο την έκφραση όσο και την έκκριση της PTH (9).

Τα επίπεδα του FGF23 στον ορό συσχετίζονται τόσο με τα επίπεδα Pi όσο και με τα επίπεδα ασβεστίου στον ορό και τα στοιχεία δείχνουν ότι τόσο το Pi όσο και το ασβέστιο απαιτούνται για την διέγερση των επιπέδων του FGF23 από τα οστεοκύτταρα (234).

Η ρύθμιση της παραγωγής του FGF23 είναι πολύπλοκη και πραγματοποιείται τόσο υπό φυσιολογικές όσο και υπό παθοφυσιολογικές συνθήκες(253). Φυσιολογική ρυθμιστές του FGF23 περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, το 1,25(OH)2D3, την PTH, τη διαιτητική πρόσληψη φωσφόρου και περαιτέρω ενδοκυτταρικές και εξωκυτταρικούς παράγοντες, κινάσες,

κυτταροκίνες και ορμόνες(253). Επιπλέον, διάφορες οξείες και χρόνιες ασθένειες, χαρακτηρίζονται από πρώιμες αυξήσεις στα επίπεδα του FGF23 στο πλάσμα, γεγονός που υποδεικνύει περαιτέρω μηχανισμούς αποτελεσματικούς στη ρύθμιση του FGF23 υπό παθοφυσιολογικές συνθήκες.

Ο κirkάδιος ρυθμός ρυθμίζει τη συμπαθητική δραστηριότητα η οποία ενισχύει την παραγωγή του FGF23 (254). Η ομάδα του Kawai et al ανέδειξε ότι κατά τη διάρκεια της σκοτεινής φάσης, η έκφραση του FGF23 αυξάνεται στα οστά (254).

Σε μια άλλη μελέτη φάνηκε ότι η ινσουλίνη και ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1 καταστέλλουν την παραγωγή του FGF23 in vitro και in vivo (242). Αυτή η επίδραση διαμεσολάβησε από την επαγωγή της δραστηριότητας PI3K/PKB/Akt που αναστέλλει τη μεταγραφή του παράγοντα FOXO1 (242). Κατά συνέπεια φάνηκε, ότι τα ινσουλινοαρνητικά ποντίκια χαρακτηρίζονται από αυξημένες συγκεντρώσεις FGF23 στον ορό, οι οποίες μειώνονται μετά από χορήγηση ινσουλίνης (242). Σε μια ανθρώπινη μελέτη, βρέθηκε μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ινσουλίνης πλάσματος και του FGF23 (242). Ο κυτταρικός αισθητήρας ενέργειας 5'-αδενοσινομονοφωσφορική (AMP)-ενεργοποιημένη κινάση (AMPK) ενεργοποιείται σε ενεργειακή ανεπάρκεια και αναστέλλει την παραγωγή FGF23 in vivo και in vitro (255). Επιπλέον βρέθηκε ότι οι φιμπράτες, αγωνιστές του μεταγραφικού παράγοντα PPARα που σχετίζεται με τον μεταβολισμό των λιπιδίων, ρυθμίζουν προς τα κάτω τον FGF23 in vitro (256). Επίσης η αδιποκίνη λεπτίνη φάνηκε να επάγει την έκφραση του FGF23 in vivo (257) και η οξέωση σχετίστηκε με την ενίσχυση του παράγοντα FGF23 (258).

Στον άνθρωπο, η έκφραση του FGF23 τροποποιείται σε διάφορες ασθένειες. Η ομάδα του Krick et al για πρώτη φορά έδειξε ότι τα επίπεδα του FGF23 στο πλάσμα είναι αυξημένα σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια ΧΑΠ και έχουν σχετικό φλεγμονώδη φαινότυπο με υπερπλασία των βλεννογόνων κυττάρων. Φάνηκε ότι η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου σε συνδυασμό με τον FGF23 επάγει την έκκριση του IL-1β από πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων βρογχικών επιθηλιακών κυττάρων από ασθενείς με ΧΑΠ(259). Τα δεδομένα της έρευνας έδειξαν σε ένα μοντέλο ποντικού με ΧΑΠ (λόγω ανεπάρκειας της Klotho), ότι υπήρξε αυξημένη βρογχική φλεγμονή, η οποία δημιουργήθηκε στα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα από την εισροή μακροφάγων και ουδετερόφιλων(259). Η ίδια ομάδα επισήμανε την υποκείμενη νέα οδό σηματοδότησης για την επαγόμενη από τον καπνό φλεγμονώδη νόσο των αεραγωγών για την πιθανή μελλοντική θεραπευτική παρέμβαση-ενεργοποίηση του FGFR4 και την διαδοχική σηματοδότηση PLCγ/καλσινευρίνης/NFAT, η οποία συμβαίνει σε κατάσταση ανεπάρκειας Klotho και την ανοδική ρύθμιση του FGF23(259).

Μια μελέτη του Hensel et al αναφέρει ότι ο FGF23 βρέθηκε επίσης και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό(1). Στη χρόνια νεφρική νόσο, τα επίπεδα του FGF23 στον ορό βρέθηκαν υπερβολικά αυξημένα και σχετίστηκαν με ελλείμματα μάθησης και μνήμης(260). Οι ερευνητές αναφέρουν ότι η δομική πλαστικότητα του ιππόκαμπου, όπως ο σχηματισμός νέων συνάψεων και η μεταβαλλόμενη δενδριτική αραίωση αποτελεί κυτταρικό και μορφολογικό σχηματισμού της μνήμης. Ως εκ τούτου, υπέθεσαν ότι ο FGF23 μεταβάλλει τη μορφολογία των νευρώνων του ιππόκαμπου και τις συνάψεις(260). Στη συνέχεια παρασκεύασαν πρωτογενείς καλλιέργειες ιππόκαμπου ποντικού και τις επώασαν με ανασυνδυασμένο FGF23 μόνο του ή μαζί με μια διαλυτή ισομορφή του συνυποδοχέα της α -Klotho(260). Τα αποτελέσματα έδειξαν ένα ενισχυμένο αριθμό πρωτογενών νευριτών σε συνδυασμό με μειωμένη διακλάδωση, με αποτέλεσμα μια λιγότερο σύνθετη μορφολογία των νευρώνων που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με FGF23. Επιπλέον, ο FGF23 ενίσχυσε τη συναπτική πυκνότητα με τρόπο που εξαρτάται από τον υποδοχέα FGF (FGF-R). Η μελέτη απέδειξε ότι ο FGF23 επάγει την δραστηριότητα της φωσφολιπάσης Cc σε πρωτογενείς νευρώνες του ιππόκαμπου και η ταυτόχρονη εφαρμογή της διαλυτής α -Klotho οδήγησε σε ενεργοποίηση της Akt και τροποποίησε την επίδραση του FGF23 στην μορφολογία των νευρώνων και την συναπτική πυκνότητα(260) .

Μια άλλη έρευνα απέδειξε ότι η αύξηση του FGF23 σχετίζεται με υψηλότερα κυκλοφορούντα επίπεδα φλεγμονωδών κυτταροκινών στη ΧΝΝ, τα οποία μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή του FGF23 από τα οστεοκύτταρα. Η μελέτη εστίασε στο κατά πόσον ο FGF23 μπορεί να διεγείρει άμεσα την ηπατική παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών με απουσία της α -Klotho, ενός κεντρικού υποδοχέα του FGF23 στο νεφρό που δεν εκφράζεται από τα ηπατοκύτταρα(261). Ενεργοποιώντας την ισομορφή 4 του υποδοχέα FGF (FGFR4), ο FGF23 διέγειρε την σηματοδότηση της καλσινευρίνης σε καλλιεργημένα ηπατοκύτταρα, η οποία αύξησε την έκφραση και την έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένης της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης. Η αύξηση των επιπέδων του FGF23 στον ορό αύξησε τα ηπατικά και τα κυκλοφορούντα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης σε ποντίκια άγριου τύπου, αλλά όχι σε ποντίκια με έλλειψη FGFR4. Η χορήγηση ενός αντισώματος αποκλεισμού της συγκεκριμένης ισομορφής του FGFR4 μείωσε τα ηπατικά και κυκλοφορούντα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης στο μοντέλο των αρουραίων με ΧΝΝ και νεφρεκτομή(261). Έτσι, η έρευνα απέδειξε ότι ο FGF23 μπορεί να διεγείρει άμεσα την ηπατική έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών.(261)

Μια άλλη έρευνα του Wolf et al ανέφερε ότι η έλλειψη σιδήρου σε ασθενείς με ΧΝΝ μπορεί να σχετίζεται με αύξηση του FGF23 (262). Φάνηκε ότι η θεραπεία της σιδηροπενίας με ενδοφλέβιο σίδηρο μείωσε τον FGF23 , ενώ η σιδηρούχος καρβοξυμαλτόζη αύξησε τον FGF23

λόγω ανασταλτικής επίδρασης στην αποικοδόμηση του (262).Αναφέρθηκε επίσης ότι κατά τη νεφρική μεταμόσχευση, η έλλειψη σιδήρου οδήγησε επίσης σε μια αύξηση του FGF23 και συμβάλλει στη χειρότερη έκβαση της έλλειψης σιδήρου στη ΧΝΝ (263).

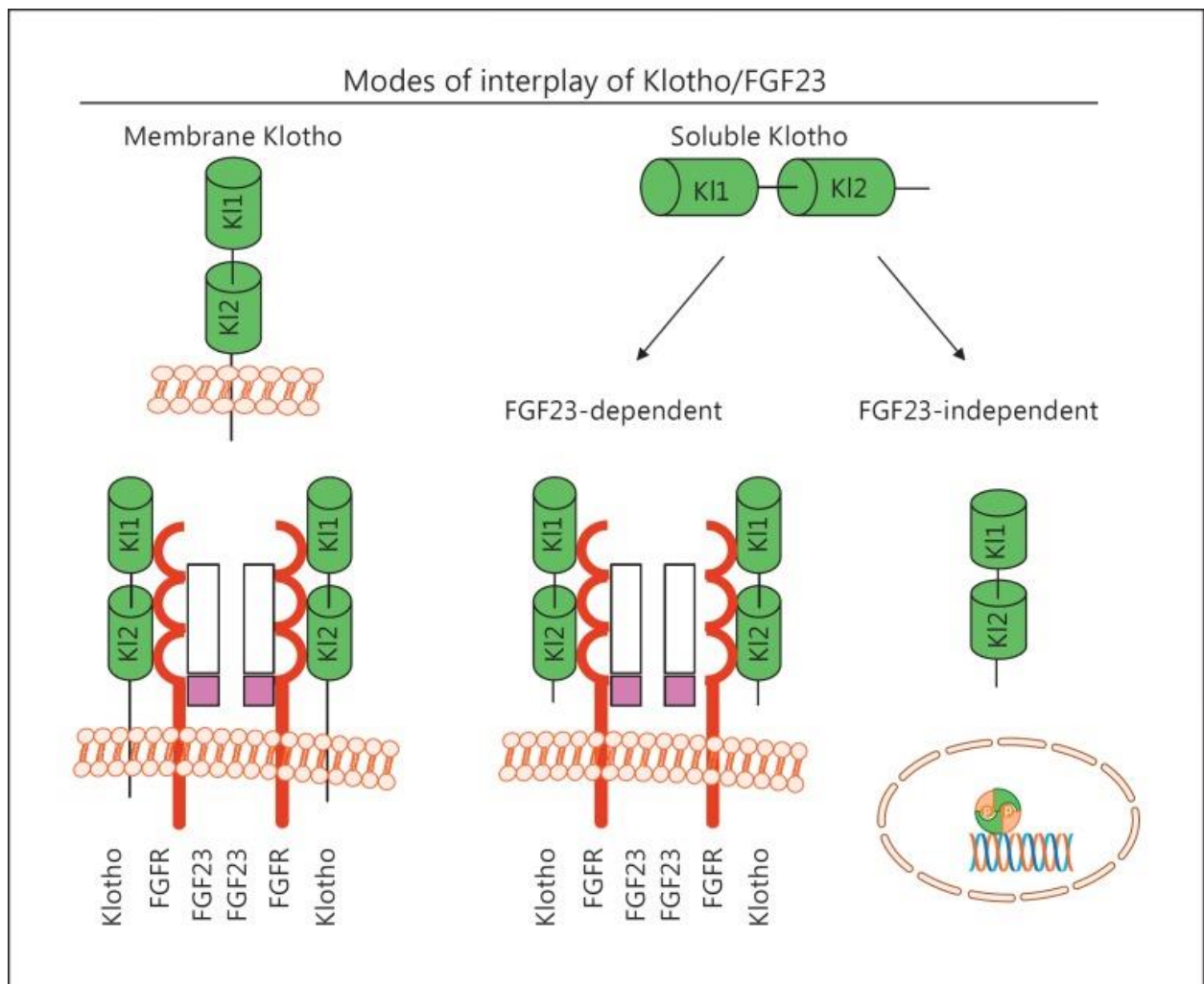
Οι ασθένειες που χαρακτηρίζονται από υπερβολικές συγκεντρώσεις στο αίμα τους με FGF23, οδηγούν σε νεφρική περίσσεια φωσφορικών αλάτων και σε χαμηλά επίπεδα 1,25(OH)2D3 στην κυκλοφορία σε ασθενείς με φυσιολογικά λειτουργικό νεφρό (264). Αυξημένα επίπεδα του FGF23 αναφέρθηκαν κυρίως στην γενετική Χ-συνδεόμενη υποφωσφαταιμία (XLH) και στην μη γενετική οστεομαλακία που προκαλείται από όγκο (ΤΙΟ-μια σπάνια κατάσταση υποφωσφαταιμίας που προκαλείται λόγω αυξημένων επιπέδων του FGF23 και σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα 1,25-(OH)2D) (265). Αυξημένα επίπεδα του FGF23 έχουν ποσοτικοποιηθεί στην πλειονότητα των ασθενών με XLH και σε ποντίκια με υποφωσφαταιμία, ένα ορθόλογο ζωικό μοντέλο της XLH (266).Η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια(ΧΝΑ) είναι μια πολύπλοκη νόσος με επιπλοκές όπως η νεφρική ανεπάρκεια και η διαταραχή των οστικών μετάλλων. Έχει προταθεί από την ομάδα του Bouksila et al ότι ο FGF23 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της οστικής απώλειας στην περιοχή της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης στα τελικά στάδια της ΧΝΑ (267). Από την άλλη πλευρά, μια άλλη ερευνά αναφέρει ότι τα χαμηλά επίπεδα του FGF23 σχετίζονται με υπερφωσφαταιμική καρκινική ασβεστοποίηση (268).

Ο FGF23 έχει αναγνωριστεί ως μεσολαβητής της υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας (122). Η αγγειοτενσίνη II αποτελεί επίσης ισχυρό εκλυτικό παράγοντα για την ανάπτυξη καρδιακής υπερτροφίας (269).Σε μια μελέτη του Mhatre et al ανέφερε ότι ο FGF23 ενίσχυσε την ενδοκυτταρική έκφραση της αγγειοτενσίνη II από τα καρδιομυοκύτταρα με αυτοκρινή τρόπο (269). Η μελέτη υπέδειξε ότι η επαγόμενη από τον FGF23 ενισχυμένη σύνθεση της αγγειοτενσίνη II μπορεί να λειτουργεί μέσω της εκκριτικής οδού του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης, αλλά ο ακριβής μηχανισμός αυτής της σχέσης παραμένει άγνωστος (269). Ωστόσο, η αυξημένη έκφραση τόσο της αγγειοτενσίνη II ,όσο και της σηματοδότησης FGF2-FGFR4 προκάλεσε την ανάπτυξη καρδιακής υπερτροφίας (269).Τόσο in vivo όσο και in vitro μελέτες έδειξαν ότι ο FGF23 προάγει την καρδιακή υπερτροφία και ίνωση μέσω της ενεργοποίησης του τοπικού συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης στην καρδιά (270).

Έχει αναφερθεί ότι ο FGF23 φυσιολογικά έχει σχετικές λειτουργίες στην οστική ανοργανοποίηση μέσω του FGFR3, με ένα μονοπάτι ανεξάρτητο από την Klotho (271)(εικόνα 20). Η μη ειδική αλκαλική φωσφατάση των ιστών (TNAP) διαδραματίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της οστικής ανοργανοποίησης διασπώντας τον παράγοντα ανοργανοποίησης, το

πυροφωσφορικό, το οποίο εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες (272). Ωστόσο, ο FGF23 αναφέρεται ότι είναι ένας ισχυρός καταστολέας της μεταγραφής του mRNA της TNAP στα οστικά κύτταρα, ο οποίος μειώνει την αποικοδόμηση του πυροφωσφορικού και μειώνει την παραγωγή ανόργανου φωσφορικού άλατος, οδηγώντας σε μειωμένη οστική ανοργανοποίηση (271).

Ο FGF23 είναι μέρος ενός πολύπλοκου δικτύου με πολύ υψηλή βαθμό αλληλεξάρτησης των συστατικών ρυθμιστικών παράγοντες. Η καλύτερη κατανόηση της ρύθμισης του FGF23 είναι υψηλού ενδιαφέροντος ενόψει των πολλών παθολογιών που επηρεάζουν την συγκέντρωση



του FGF23 στο πλάσμα.

Εικόνα 20 :Προτεινόμενοι τρόποι δράσης του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών 23 (FGF23) και της Klotho. ανεξάρτητο από την Klotho (Πηγή:Lu X, Hu MC. Klotho/FGF23 Axis in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease. *Kidney Dis (Basel)*. 2017 Jul;3(1):15-23. doi: 10.1159/000452880. Epub 2016 Nov 17. PMID: 28785560; PMCID: PMC5527179.

6.Η Klotho και η συμμετοχή της στη γήρανση

Η γήρανση ορίζεται ως ηλικιακή μείωση των φυσιολογικών λειτουργιών απαραίτητες για την επιβίωση και τη γονιμότητα(10). Η γήρανση είναι πολυπαραγοντική διαδικασία, η οποία έχει γενετικό υπόβαθρο και επηρεάζεται από το περιβαλλοντικό στρες. Αυτή η προοδευτική απώλεια της λειτουργίας, συνοδεύεται και από μειωμένη δυνατότητα των επιδιορθωτικών μηχανισμών του οργανισμού , γεγονός οποίο αυξάνει την νοσηρότητα και την θνησιμότητα με την παρόδο του χρόνου(273).

Η γήρανση οδηγεί σε τμηματική και προοδευτική απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας και της φυσικής ικανότητας με την πάροδο του χρόνου, με αποτέλεσμα τη σχετική φυσιολογική αδυναμία και την απώλεια της ανθεκτικότητας (274). Η γήρανση ρυθμίζεται ενεργά από διακριτές βιοχημικούς οδούς και έχει χαρακτηριστεί από μια σειρά μοριακών και κυτταρικών χαρακτηριστικών, τα οποία είναι κοινά μεταξύ των ταξινομικών ειδών (274).

Αυτά τα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν γονιδιωματική αστάθεια, τριβή τελομερών, επιγενετική δυσρύθμιση, απώλεια πρωτεόστασης, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, κυτταρική γήρανση, με παρόμοιο φαινότυπο που σχετίζεται με τη γήρανση (274).Στα θηλαστικά, η γήρανση έχει μια σειρά από ευδιάκριτα πρόσθετα χαρακτηριστικά στα κοινά χαρακτηριστικά της, που περιλαμβάνουν τοξικότητα φωσφορικών αλάτων, μειωμένη συνολική έκφραση του Nrf2 και μικροβιακή δυσβίωση (275).

Το γεγονός ότι το σύνδρομο πρόωρης γήρανσης σε ποντίκια με ανεπάρκεια του Klotho και του FGF23 επιδιορθώνεται με την επίλυση της υπερφωσφαταιμίας έθεσε το ενδεχόμενο ότι η διαδικασία γήρανσης μπορεί να επιταχύνεται από το ανόργανο φωσφορικό άλας που παίζει πολλαπλούς ρόλους στο μεταβολισμό της γλυκόζης, την ευαισθησία στην ινσουλίνη και στο οξειδωτικό στρες στην υγεία και στην ασθένεια.(276)

Η κυτταρική γήρανση μπορεί να οριστεί ως μια σταθερή παύση του κυτταρικού κύκλου σε συνδυασμό με στερεότυπες φαινοτυπικές αλλαγές(274).Τα κύτταρα έχουν απεριόριστη ικανότητα να διαιρούνται, αλλά μετά από αρκετούς κύκλους εισέρχονται σε αναπαραγωγική γήρανση(274).

Οι Buendía et al ανέλυσαν την έκφραση της Klotho σε ένα μοντέλο ενδοθηλιακών κυττάρων (HUVECs) και διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα των γονιδίων και των πρωτεϊνών μειώνονται με την πάροδο της ηλικίας, όπως και η μείωση των τελομερών και η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης (186). Ο Carracedo et al βρήκε με κυτταρομετρία ροής, ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα με κοντά τελομερή και υψηλή έκφραση β-γαλακτοσιδάσης είχαν χαμηλότερα επίπεδα Klotho (277). Επιπλέον, φάνηκε ότι τα κύτταρα που υποβάλλονται σε στρες μπορούν να υποστούν επαγόμενη από το στρες πρόωρη γήρανση (277). Από την άποψη αυτή, πειραματικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η διαλυτή Klotho προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από πρόωρη γήρανση (277).

Η κυκλοφορούσα μορφή του Klotho είναι ένας χημικός παράγοντας που αναστέλλει τους ενδοκυτταρικούς καταρράκτες σηματοδότησης, όπως τον ινσουλίνη/IGF-1, και άλλα μονοπάτια, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ριζών που προάγουν την κυτταρική γήρανση(274). Με αυτό τον τρόπο η Klotho μπορεί να αυξήσει τη μακροζωία ορισμένων ειδών λόγω μεγαλύτερης αντίστασης στο οξειδωτικό στρες(274).

Η αναστολή της έκφρασης του mRNA της Klotho προκαλεί πρόωρη γήρανση σε ανθρώπινα κύτταρα. Διάφοροι παράγοντες σε ορισμένες ασθένειες ρυθμίζουν την έκφραση της Klotho μέσω μεθυλίωσης του DNA, επιταχύνοντας τη διαδικασία γήρανσης(278) . Επίσης, ο NF-κB είναι ευαίσθητος στις μεταβολές της ενδοθηλιακής οξειδοαναγωγής που σχετίζεται με την ηλικία και η ενεργοποίηση του διεγείρει τη μεταγραφή προφλεγμονωδών κυτταροκινών που μπορούν να καταστείλουν περαιτέρω την ενδοθηλιακή λειτουργία, δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο φλεγμονής και οξειδωτικού στρες στο ενδοθήλιο ηλικιωμένων ατόμων (278). Η φυσιολογική γήρανση και η ΧNN συνδέονται με χαμηλά επίπεδα Klotho και φαίνεται ότι η Klotho επηρεάζει τα μονοπάτια κυτταρικού θανάτου και επιβίωσης μέσω των αντι-αναγεννητικών και αντιοξειδωτικών επιδράσεων της (279).

Η Klotho ασκεί επίσης τις αντιγηραντικές της ιδιότητες καταστέλλοντας τις φλεγμονώδεις ουσίες που εκκρίνονται από γερασμένα κύτταρα (280) Ο Zeng et al αναφέρει ότι η Klotho αλληλεπιδρά με το RIG-1 (retinoic acid-inducible gene 1), αναστέλλοντας την έκφραση των IL-6 και IL-8 in vitro και in vivo (280). Χαμηλή νεφρική έκφραση του Klotho έχει επίσης παρατηρηθεί σε γερασμένα σε σύγκριση με νεαρά ποντίκια, όπου οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα είναι διπλάσιες στα νεαρά ζώα από ότι στα ενήλικα (281).

Αναφέρθηκε επίσης , ότι η Klotho ρυθμίζει την κυτταρική γήρανση καταστέλλοντας το μονοπάτι p53/p21 και μπορεί να μετριάσει την απόπτωση και την γήρανση στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά

κύτταρα μέσω των μονοπατιών MAK και ERK (282). Με βάση αυτών των επιδράσεων, οι ερευνητές υπέθεσαν ότι η ανεπάρκεια της Klotho στην ουραιμία επιταχύνει την γήρανση, την απόπτωση των κυττάρων και μειώνει τα επίπεδα των βλαστικών κυττάρων (186). Σε καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο TNF-α επάγει τη γήρανση των κυττάρων σε συνδυασμό με το στρες, ρυθμίζοντας προς τα κάτω την Klotho, αυξάνοντας τη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης και αυξάνοντας το ποσοστό των κυττάρων με σύντομα τελομερή(277).

Όταν αυτά τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε θεραπεία με εξωγενή Klotho, το ποσοστό των κυττάρων με χαμηλά επίπεδα Klotho, η υψηλή έκφραση β-γαλακτοσιδάσης και τα σύντομα τελομερή παρέμειναν αμετάβλητα(277). Στην ίδια μελέτη αναφέρθηκε ότι η Klotho σταμάτησε την αύξηση της δραστηριότητας ROS και την απόπτωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα που υποβάλλονται σε θεραπεία με TNF -α. Επιπλέον φάνηκε ότι η έκθεση των ενδο- σε προφλεγμονώδη ερεθίσματα, όπως ο TNF, ρύθμιζε προς τα κάτω την Klotho(277). Οι ερευνητές επισήμαναν ότι η εξωγενής Klotho δεν επιβράδυνε την κυτταρική γήρανση, αλλά απέτρεψε τις κυτταρικές αλλαγές που επιταχύνουν την ανάπτυξη της κυτταρικής γήρανσης (277).

Αντίθετα, αναφέρεται ότι το οξειδωτικό στρες αυξάνεται προοδευτικά με την ηλικία(274). Η εξωκυτταρική Klotho δεν επηρεάζει τις διαδικασίες οξειδωτικού στρες που σχετίζονται με την ηλικία, αλλά προστατεύει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την επαγόμενη από τον TNF-α οξειδωτική βλάβη(34). Έτσι, ερευνητές υπέθεσαν ότι η εξωγενής Klotho μετριάσει τις προφλεγμονώδεις επιδράσεις του TNF-α(186). Η ίδια ομάδα πρότεινε ότι ο TNF και άλλες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες ρυθμίζουν την έκφραση του Klotho σε καλλιεργούμενα κύτταρα μέσω ενός εξαρτώμενου από τον NF-κΒ μηχανισμού, εμπλέκοντας άλλους ρυθμιστικούς παράγοντες που δεν σχετίζονται με τη γήρανση των κυττάρων. Οι κυτταρικές αλλαγές κατά την επαγόμενη από TNF πρόωρη γήρανση σχετίστηκαν με την επαγωγή της απόπτωσης από τον TNF με την μείωση των τελομερών να προηγεί την απόπτωση(186).

Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι διάφορες διεργασίες και ενδοκυτταρικές οδοί που εμπλέκονται στην παθογένεια της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας (π.χ. οξειδωτικό στρες, μειωμένο NO, αγγειακή αβεστοποίηση, φλεγμονή) σχετίζονται με αλλαγές στην ομοιόσταση της Klotho(125).

Έχει φανεί ότι τα επίπεδα φωσφόρου ορού (Pi) δείχνουν μια εξαιρετικά ισχυρή αρνητική συσχέτιση με τη διάρκεια ζωής στα θηλαστικά (276)Τα επίπεδα φωσφορικών στον ορό συσχετίζονται θετικά με την ολική θνησιμότητα στους ανθρώπους. Μια επιδημιολογική μελέτη που χρησιμοποίησε ασθενείς των οποίων τα επίπεδα φωσφορικών στον ορό ήταν εντός του

φυσιολογικού εύρους έδειξε ότι τα άτομα με υψηλά επίπεδα φωσφορικών στον ορό ($\geq 4,0$ mg/dL) παρουσίασαν 70% υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας από τα άτομα με χαμηλά επίπεδα φωσφορικών στον ορό ($< 2,5$ mg/dL) (283).

Τα υψηλά εξωκυτταρικά φωσφορικά άλατα είναι τοξικά για το κύτταρο. Η απόπτωση επάγεται όταν τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα εκτίθενται σε μέσο με υψηλή περιεκτικότητα σε φωσφορικά άλατα (284).

Σε μια πειραματική μελέτη του Di Marco et al βρεθηκε ότι τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα υφίστανται απόπτωση όταν καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό υψηλής περιεκτικότητας σε P_i (1,4-2,8 mM)(284). Άλλοι ερευνητές απέδειξαν ότι τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα υφίστανται φαινοτυπική μετάβαση σε οστεοβλαστικά κύτταρα σε μέσο με υψηλή περιεκτικότητα με P_i , ακολουθούμενη από εναπόθεση φωσφορικού ασβεστίου γύρω τους(285).

Ως εκ τούτου, η προσθήκη φωσφορικών στο μέσο μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό ιζημάτων φωσφορικού ασβεστίου (CaP_i) (286). Τα ιζήματα CaP_i έχουν την ικανότητα να προκαλούν κυτταρικές βλάβες και έμφυτες ανοσολογικές αποκρίσεις (287). Στο μέσο που περιέχει ορό, τα κατακρημνίσματα CaP_i απορροφώνται από την πρωτεΐνη φουτουΐνη-A του ορού και εμποδίζονται να αναπτυχθούν σε μεγάλους κρυστάλλους CaP_i (287). Αυτά τα φορτωμένα με CaP_i -μόρια φετουΐνης-A συσσωρεύονται για να σχηματίσουν νανοσωματίδια, τα οποία διασκορπίζονται στο μέσο ως κολλοειδή (287). Αυτά τα κολλοειδή σωματίδια χαρακτηρίζονται ως σωματίδια καλσιπρωτεΐνης (calciprotein particles, CPPs).

Επειδή το αίμα είναι ένα υπερκορεσμένο διάλυμα όσον αφορά τα ιόντα ασβεστίου και φωσφορικών αλάτων, ακόμη και μια μέτρια και παροδική μεταγευματική αύξηση του P_i συγκέντρωση στο αίμα μπορεί να προκαλέσει την καταβύθιση άμορφου φωσφορικού ασβεστίου(44). Αυτά τα ιζήματα προσροφώνται γρήγορα από την φετουΐνη-A, η οποία έχει τεράστια ικανότητα να δεσμεύει το φωσφορικό ασβέστιο και να εμποδίζει την ανάπτυξη μεγάλων κρυστάλλων(44). Ως αποτέλεσμα, δημιουργούνται εκκολαπτόμενα CPPs που αποτελούνται από ένα μόνο μόριο φετουΐνης-A φορτωμένο με άμορφα κατακρημνίσματα φωσφορικού ασβεστίου, τα οποία ονομάζονται μονομερή ασβεστιοπρωτεΐνης (CPMs).

Τα CPMs υφίστανται αυθόρμητα την αυτοσυσσωμάτωση και τη μετάβαση του φωσφορικού ασβεστίου από την άμορφη φάση στην κρυσταλλική φάση με την πάροδο του χρόνου και μετατρέπονται σε πρωτογενή και δευτερογενή CPPs, αντίστοιχα (44). Μεταξύ αυτών των CPPs με διαφορετικές φυσικές ιδιότητες, τα CPMs ταυτοποιήθηκαν ως ο πιο ισχυρός επαγωγέας της

έκφρασης του FGF23 (289). Από την άλλη πλευρά, τα δευτερογενή CPPs που περιείχαν κρυσταλλικό φωσφορικό ασβέστιο ήταν λιγότερο ισχυρά στην επαγωγή της έκφρασης του FGF23 σε καλλιεργημένους οστεοβλάστες, αλλά αναφέρθηκε ότι έχουν την ικανότητα να επάγουν ασβεστοποίηση σε καλλιεργημένα κύτταρα λείων μυών των αγγείων (290) και να πυροδοτούν έμφυτες ανοσολογικές αποκρίσεις σε καλλιεργημένα μακροφάγα (287).

Πρόσφατες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα των CPPs στον ορό αυξάνονται με την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και σχετίζονται με κλινικούς δείκτες αρτηριακής ακαμψίας, αγγειακής ασβεστοποίησης και χρόνιας φλεγμονής ανεξάρτητα από τη νεφρική λειτουργία (291)

Η ομάδα του Kuro-o et al αναφέρει ότι χημικές ουσίες που αναστέλλουν την καθίζηση του φωσφορικού ασβεστίου, όπως το διφωσφονικό, και το μαγνήσιο, μπορεί να αποτρέψουν το σχηματισμό των CPPs (292). Λαμβάνοντας υπόψη τη δραστηριότητα των CPPs που παρατηρείται σε καλλιεργημένα κύτταρα, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι αυτές οι συσχετίσεις που εντοπίστηκαν στις κλινικές μελέτες μπορεί στην πραγματικότητα να αποτελούν αιτιώδη συνάφεια (186).

7. Η Klotho και ο ρόλος της στην παθολογία του νεφρού και στην υπέρταση

Ο νεφρός δεν είναι ένα απλό απεκκριτικό όργανο, αλλά και μια ορμονική πηγή που παράγει διάφορα ενεργά μόρια, όπως την 1,25-(OH)₂ D₃, τη βιταμίνη D₃ (1,25 VD₃), τη ρενίνη, την ερυθροποιητίνη και την Klotho, η οποία ασκεί πολλαπλές δράσεις στο νεφρό (205).

Η χρόνια νεφρική νόσος (XNN) είναι μια προοδευτική συστηματική νόσος που μεταβάλλει ανεπανόρθωτα τη λειτουργία και τη δομή των νεφρών, σε διάστημα μηνών ή ετών (293). Δεδομένου ότι η XNN εμφανίζεται όχι μόνο ως αποτέλεσμα νεφρικών παθήσεων όπως η σπειραματονεφρίτιδα και η πολυκυστική νεφροπάθεια, αλλά και ως επιπλοκή του διαβήτη και της υπέρτασης, η XNN είναι πολύ διαδεδομένη στη γηράσκουσα κοινωνία, επηρεάζοντας περισσότερο από το 10% του συνολικού πληθυσμού (293).

Επειδή η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σχετίζεται με αρτηριοσκλήρωση, με αυξημένα καρδιαγγειακά συμβάντα και θνησιμότητα, η XNN αναφέρεται ως ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα υγείας παγκοσμίως (294). Τις τελευταίες δεκαετίες, εντατικές μελέτες σε ζώα και ανθρώπους έχουν πραγματοποιηθεί για την αποκάλυψη των παραγόντων κινδύνου και του παθοφυσιολογικού μηχανισμού αυτής της νόσου (294).

Η εξέλιξη της ΧΝΑ μπορεί να θεωρηθεί ως μια διαδικασία μείωσης του λειτουργικού αριθμού των νεφρών που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της φυσικής αιτίας της γήρανσης και επιταχύνεται από διαταραχές που επηρεάζουν τους νεφρούς (205). Η σοβαρότητα της ΧΝΑ ταξινομείται από το στάδιο 1 έως το σοβαρότερο στάδιο 5, με βάση το εκτιμώμενο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (eGFR)(205).

Η ΧΝΝ θεωρείται από πολλούς ερευνητές ως μια κατάσταση ανεπάρκειας Klotho (295). Χαμηλή έκφραση mRNA Klotho στο νεφρό βρέθηκε σε ασθενείς με ΧΝΝ και συσχετίστηκε θετικά με τον εκτιμώμενο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (eGFR) (296). Λόγω της συγκρίσιμης μεταβολής των επιπέδων της νεφρικής Klotho με εκείνα της Klotho του ορού και των ούρων, η Klotho του ορού και των ούρων μπορεί να αποτελέσει υποκατάστατο δείκτη για την νεφρική Klotho (297). Έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα της Klotho στον ορό αρχίζουν να μειώνονται σε ασθενείς με ήπια ΧΝΝ και προηγούνται της αύξησης των FGF23, PTH και Pi στον ορό, γεγονός που υποδηλώνει ότι το Klotho μπορεί να αποτελεί ευαίσθητο βιοδείκτη για την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας(295). Στη μελέτη του ο Pavik et al βρήκε ότι τα επίπεδα Klotho στον ορό ήταν προοδευτικά χαμηλότερα στα πιο προχωρημένα στάδια της ΧΝΝ (298). Η προσαρμοσμένη μείωση της Klotho στον ορό ήταν 3,2 pg/mL για κάθε 1 mL/min/ 1,73 m² μείωση του eGFR (298). Δεδομένα έχουν δείξει ότι σε παιδιά που βρίσκονται σε περιτοναϊκή κάθαρση, τα επίπεδα Klotho στον ορό ήταν επίσης σημαντικά χαμηλότερα από ό,τι στους υγιείς μάρτυρες (300).

Επιπλέον, ο eGFR συσχετίστηκε σημαντικά με την ποσότητα της Klotho στα ούρα και τα επίπεδα της Klotho στον ορό. Ωστόσο, μια ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης εντόπισε τον eGFR να είναι μια μεταβλητή που σχετίζεται ανεξάρτητα μόνο με την αποβαλλόμενη με τα ούρα Klotho και όχι με τη συγκέντρωση της Klotho στον ορό, υποδεικνύοντας ότι η Klotho στα ούρα μπορεί να είναι πιο αξιόπιστη από την Klotho στον ορό(301). Μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του τυχαίου λόγου Klotho/κρεατινίνης στα ούρα και την 24ωρης ουρικής απέκκριση πρωτεϊνών υποδηλώνει ότι η σχέση Klotho/κρεατινίνη στα ούρα αποτελεί υποκατάστατο της απέκκρισης της Klotho στα ούρα (301).

Ο ρόλος της Klotho ως προγνωστικού παράγοντα δυσμενών εκβάσεων στην ΧΝΝ επιβεβαιώθηκε σε ασθενείς με ΧΝΝ (στάδιο 1-5) μετά από προσαρμογή για τους συνυπολογιζόμενους παράγοντες(33). Μεταξύ των ασθενών με χαμηλά επίπεδα Klotho στον ορό ($\leq 396,3$ pg/mL), το 35,2% είχε κακή ή/και σοβαρή έκβαση (διπλασιασμός της κρεατινίνης ορού, τελικό στάδιο της νόσου ή θάνατος), ενώ μόνο το 15,7% των ασθενών με υψηλά επίπεδα Klotho στον ορό ($>396,3$ pg/mL) είχαν δυσμενή έκβαση (302).

Σε μια μελέτη του Park et al τα επίπεδα της Klotho στον ορό ήταν σημαντικά μειωμένα σε υπερτασικούς ασθενείς με ήπια ΧΝΝ σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες μετά από προσαρμογή για τον δείκτη eGFR (303).

Ο Shimada et al ανέφερε ότι η ανεπάρκεια της α -Klotho συμβάλλει στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ΧΝΝ διάμεσου της αυξημένης κυτταρικής γήρανσης και της μειωμένης ικανότητας αναγέννησης(84). Στην ίδια μελέτη οι ερευνητές περιέγραψαν την ιδιότητα της Klotho να προκαλεί ελαττωματική ενδοθηλιακή λειτουργία και αγγειογένεση και στην συνέχεια να προωθεί την νεφρική ίνωση(304).

Η τρέχουσα βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι η ανάπτυξη και η εξέλιξη της ΧΝΝ σχετίζεται σημαντικά με μια απορυθμισμένη οδό FGF23-Klotho, με αποτέλεσμα υπερφωσφαταιμία και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία(305). Στην προοδευτική ΧΝΝ υπάρχει κατακράτηση φωσφορικών, προοδευτική υπερφωσφαταιμία, αύξηση των επιπέδων FGF23 και χαμηλή έκφραση της Klotho, ευρήματα τα οποία σχετίζονται με καρδιαγγειακή νόσο που παρατηρείται με την ηλικία. Αντίστοιχα, πιο πρόσφατες μελέτες ενίσχυσαν αυτές τις παρατηρήσεις και έδειξαν ότι η ανάπτυξη και η εξέλιξη της ΧΝΝ σχετίζεται με μείωση της Klotho σε ζωικά μοντέλα (192). Ειδική νεφρική ανεπάρκεια της Klotho έχει παρατηρηθεί ότι αναπαράγει τον φαινότυπο των ζώων με έλλειψη Klotho, εμφανίζοντας πολύ χαμηλά επίπεδα της Klotho και υψηλά επίπεδα FGF23 στην κυκλοφορία (306).

Η ειδική διαγραφή της Klotho στα άπω σωληνάρια έχει επίσης αναφερθεί ότι αναστέλλει την αύξηση της νεφρικής απέκκρισης Pi ως απόκριση στο FGF23 (307), γεγονός που υποδηλώνει ότι η ανεπάρκεια της Klotho περιορίζει την ρύθμιση της παραγωγής του FGF23 και ότι η υπερφωσφαταιμία, η οποία συνήθως γίνεται εμφανής στο στάδιο 3 της ΧΝΝ, παραμένει ο κύριος ρυθμιστής της έκκρισης FGF23 στην ΧΝΝ (308). Φάνηκε ότι η απορρύθμιση του άξονα FGF23-Klotho εμφανίζεται ήδη σε προηγούμενα στάδια ΧΝΝ, όπου τα μη φυσιολογικά επίπεδα ασβεστίου και φωσφορικών, η φλεγμονή, η αυξημένη απόπτωση και η εξάντληση των αναστολέων ασβεστοποίησης έχουν ως αποτέλεσμα την προώθηση της διαδικασίας ασβεστοποίησης (309). Καθώς ο αριθμός των νεφρώνων μειώνεται με την ηλικία και την νεφρική βλάβη, υπάρχει αύξηση στην απέκκριση του Pi ανά νεφρώνα μέσω της αυξημένης ρύθμισης του FGF23, προκαλώντας μείωση των επιπέδων της ενεργού βιταμίνης D3 στον ορό ακολουθούμενη από αύξηση της PTH(305).

Η ομάδα του Sun et al ανέδειξε ότι στο ουραιμικό περιβάλλον, τα χαμηλά επίπεδα Klotho μπορεί να επιδεινωθούν από τη συσσώρευση πρωτεϊνικών ουραιμικών τοξινών, που

απορυθμίζουν επιγενετικά την έκφραση του γονιδίου Klotho και από την αύξηση του TNF, που βλάπτει την έκφραση της πρωτεΐνης Klotho (310). Αυτή η σχέση με τις φλεγμονώδεις διεργασίες φαίνεται να είναι αμφίδρομη. Το Klotho ρυθμίζει την αντιφλεγμονώδη απόκριση στο νεφρό μέσω μιας οδού που διαμεσολαβείται από NF-κΒ, ενώ η έκφραση της Klotho με τη σειρά της ρυθμίζεται προς τα κάτω από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως το TWEAK, και πάλι μέσω ενός εξαρτώμενου NF-κΒ μηχανισμού (186). Έτσι, ενώ το NF-κΒ αυτό καθαυτό συμβάλλει στη ρύθμιση της έκφρασης του Klotho (186), το Klotho, ωστόσο, με τη σειρά του ρυθμίζει προς τα κάτω τον NF-κΒ (185) και η αναστολή του NF-κΒ έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την έκφραση πολλών προφλεγμονωδών κυτοκίνες και την νεφρική βλάβη (311). Σε ένα προκλινικό μοντέλο ποντικού, ο Zhao et al έχει αποδείξει ότι η μείωση της Klotho συμβάλλει στην αυξημένη φλεγμονή στο νεφρό (189).

Η νεφρική ίνωση είναι ένα ιστολογικό χαρακτηριστικό της ΧΝΝ και θεωρείται ότι αποτελεί παθογενετικό ενδιάμεσο παράγοντα για την εξέλιξη της ΧΝΝ (312). Οι Sugiura et al ανέφεραν ότι τα ποντίκια Klotho παρουσίασαν μεγαλύτερο βαθμό νεφρικής ίνωσης, η οποία σχετίστηκε με την ανοδική ρύθμιση του TGF-β από την Klotho (313). Σε αυτή τη μελέτη φάνηκε ότι η νεφρική ίνωση που προκαλείται από μονομερή ουρηθρική απόφραξη (UUO) συνοδεύεται από ανοδική ρύθμιση του TGF-β και της ινωδονεκτίνης και καθοδική ρύθμιση της mRNA και της πρωτεΐνης α-Klotho. Αυτές οι μεταβολές ήταν μεγαλύτερες σε ποντίκια με ανεπάρκεια α-Klotho με UUO με σύγκριση με τα ποντίκια άγριου τύπου (313). Ο Zhou et al διαπίστωσε μεγαλύτερη νεφρική ίνωση σε ποντίκια με ανεπάρκεια α-Klotho που έλαβαν θεραπεία με ένεση με αδριαμυκίνη (51). Η διαλυτή α-Klotho μείωσε τη νεφρική ίνωση που προκαλείται από UUO και κατέσπειρε την έκφραση των δεικτών ίνωσης και των γονιδίων-στόχων του TGF-β1, αλλά δεν μείωσε την έκφραση του TGF-β1 στο νεφρό με UUO, γεγονός που υποδηλώνει ότι η α-Klotho καταστέλλει τη νεφρική ίνωση κυρίως μέσω της αναστολής της μεταγενέστερης σηματοδότησης του TGF-β1 (153).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η Klotho είναι ανταγωνιστής της σηματοδότησης Wnt και η Wnt επίσης σχετίζεται με τη νεφρική ίνωση (17). Η καταστολή της νεφρικής ίνωσης από την Klotho είναι πιθανό να οφείλεται στην αναστολή της μεταγωγής του σήματος Wnt (17). Τα ποντίκια με μονομερή ουρηθρική απόφραξη μετά από ένεση με αδριαμυκίνης είχαν υψηλά επίπεδα Wnt, β-κατενίνης και υψηλό βαθμό ενεργοποίησης των μυοϊνοβλαστών, η οποία μπορεί να κατασταλεί με τη χορήγηση φορέα έκφρασης που κωδικοποιεί την ενδοκυτταρική περιοχή της α-Klotho (51). Όταν η νεφρική ίνωση και η σηματοδότηση του Wnt συγκρίνονται μεταξύ της υπερέκφρασης της α-Klotho και της έλλειψης της α-Klotho στην μονοπλευρή

ουρητηρική απόφραξη , η σηματοδότηση Wnt ήταν εξασθενημένες σε ποντίκια που υπερέκφραζαν α- Klotho σε σύγκριση με τα ποντίκια άγριου τύπου. Αντίθετα, η σηματοδότηση του Wnt και η νεφρική ίνωση αυξήθηκαν δραματικά σε ποντίκια με ετεροζυγωτική ανεπάρκεια της Klotho σε σύγκριση με τα ποντίκια άγριου τύπου(51) . Είναι ενδιαφέρον ότι μετά τη μεταφορά πλασμιδίου υπερέκφρασης της α- Klotho στο σκελετικό μυ, τα μεταλλαγμένα ποντίκια Klotho είχαν πολύ χαμηλότερη σηματοδότηση του Wnt(314) . Επομένως, η α- Klotho φαίνεται να είναι ένας κρίσιμος αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης Wnt και ένας καταστολέας της νεφρικής ίνωσης στο μοντέλο του αποφραγμένου νεφρού (314).

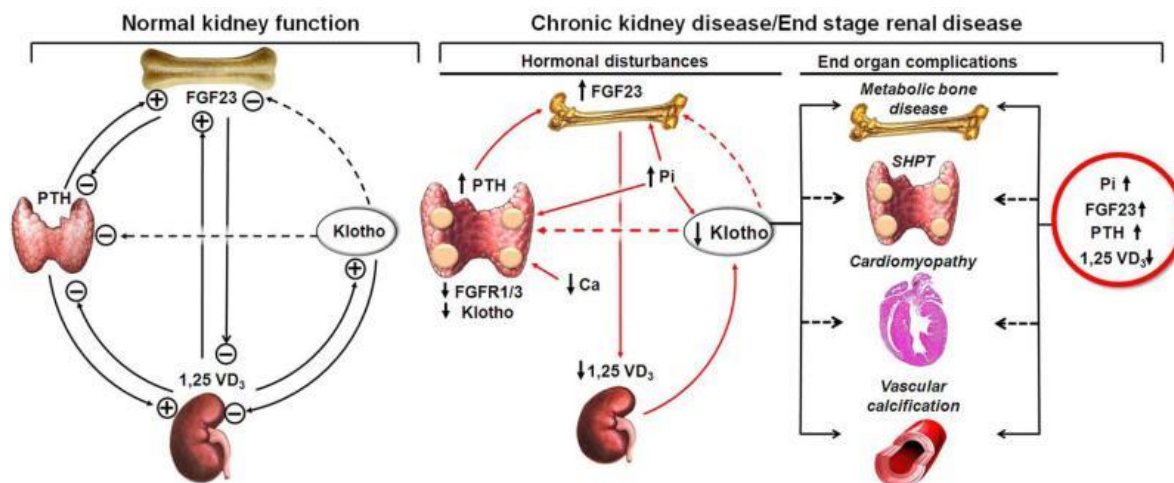
Φάνηκε επιπλέον, ότι η Klotho προάγει επίσης την κάθαρση του κολλαγόνου I μέσω της ρύθμισης της αυτοφαγίας (315). Επομένως οι ερευνητές απέδειξαν ότι , η Klotho καταστέλλει την ίνωση και ενισχύει την απομάκρυνση του κολλαγόνου (315).

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενα κεφάλαια η Klotho είναι μια αντί-αποπτωτική πρωτεΐνη. Η ανεπάρκεια της Klotho αυξάνει σημαντικά την απόπτωση σε καλλιεργημένα νεφρικά κύτταρα(316) και στο νεφρό. (317) Το οξειδωτικό στρες ρυθμίζει προς τα κάτω την έκφραση της Klotho και αυτή με την σειρά της αυξάνει την κυτταρική βλάβη όταν υπάρχει έκθεση σε H₂O₂ (318). Έχει φανεί ότι η αύξηση της Klotho με γενετική χειραγώγηση ή χορήγηση ιού μειώνει τον αριθμό των αποπτωτικών κυττάρων και βελτιώνει τη νεφρική λειτουργία και τη νεφρική μορφολογία μετά από οξεία (319) και χρόνια νεφρική βλάβη(317). Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν τη βάση για πιθανή κλινική εφαρμογή της Klotho στη θεραπεία της ΧΝΝ.

Η ανεπάρκεια της Klotho καθιστά το νεφρό πιο ευαίσθητο σε τραυματισμό .Ομάδα ερευνητών έχει δείξει αυξημένη γήρανση στα προγονικά κύτταρα σε πολλούς ιστούς των ποντικών Klotho. (17).Η μείωση της ενδογενούς Klotho προάγει την αύξηση της γήρανσης σε καλλιεργούμενα κύτταρα(17). Επιπλέον αποδείχτηκε ότι η χορήγηση εξωγενούς Klotho μειώνει σημαντικά την γήρανση σε ενδοθηλιακά κύτταρα(316) και ινοβλάστες(320). Ερευνητές επισήμαιναν ότι η επαγόμενη από την εξάντληση της Klotho γήρανση των κυττάρων μπορεί να σχετίζεται με την ανοδική ρύθμιση της σηματοδοτικής δραστηριότητας του Wnt, διότι η χορήγηση εξωγενούς Wnt επιτάχυνε τη γήρανση των κυττάρων in vivo και in vitro και η σηματοδότηση του Wnt αυξήθηκε σημαντικά σε ποντίκια Klotho και καταστέλλεται από τη γενετική υπερέκφραση της Klotho(17).

Στη μελέτη του ο Liu et al ανέδειξε ότι η διαλυτή Klotho μπορεί να συνδεθεί με διάφορα μέλη της οικογένειας Wnt και να αναστείλει την βιολογική τους δραστηριότητα(17). Έχει αποδειχθεί ότι η ενδοκυτταρική Klotho μπορεί να καταστείλει την κυτταρική γήρανση αναστέλλοντας την έκφραση του επαγόμενο από το ρετινοϊκό οξύ επαγωγίμο γονίδιο I των IL-6 και IL-8 τόσο in vitro

όσο και in vivo(155). Η ανεπάρκεια της Klotho από νεφρικές παθήσεις ενισχύει την κυτταρική γήρανση που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες(321). Η υπερβολική γήρανση ή η επακόλουθη απόπτωση και η διαγραφή βλαστικών κυττάρων μπορεί να μειώσει την ικανότητα του νεφρού να αμύνεται έναντι νεφρικών προσβολών και να βλάψει την αναγέννηση(155).



Εικόνα 21:Υποθετικό σχήμα της σύνθετης κατάστασης περίσσειας FGF23 και ανεπάρκειας Klotho στη χρόνια νεφρική νόσο. Αλληλεπίδραση με τα υψηλά επίπεδα ασβεστίου και φωσφόρου στον ορό και την ανταπόκριση στη χορήγηση ενεργού στερόλης βιταμίνης D μέσω αύξησης των επιπέδων 1,25 διυδροξυ-βιταμίνης D στον ορό.16. LVH, υπερτροφία της αριστερής κοιλίας. (Πηγή:Drüeke TB, Massy ZA. Circulating Klotho levels: clinical relevance and relationship with tissue Klotho expression. Kidney Int. 2013)

Η υπέρταση είναι μια ιδιαίτερα διαδεδομένη κατάσταση που είναι γνωστό ότι συμβάλλει στην εξέλιξη της ΧΝΝ και της καρδιαγγειακής νόσου. Η υπέρταση σχετίζεται με σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα παρά τις αποτελεσματικές αντιυπερτασικές θεραπείες.

Η διαλυτή Klotho είναι μια κυκλοφορούσα πρωτεΐνη που σε προκλινικές μελέτες είναι προστατευτική έναντι της ανάπτυξης υπέρτασης (322).

Τα ποντίκια με ανεπάρκεια Klotho από γενετικό χειρισμό παρουσίασαν αυξημένη αρτηριακή ακαμψία (323) και ανέπτυξαν υπέρταση ευαίσθητη στο αλάτι μετά από υψηλή πρόσληψη νατρίου (324). Η εξωγενής χορήγηση Klotho σε υπερτασικούς αρουραίους είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης και μείωση της ΑΠ (325).Ο Aizawa et al υπογράμμισε ότι η σχέση μεταξύ της Klotho και της υπέρτασης μπορεί να είναι αμφίδρομη, διότι διαφορετικά μοντέλα υπέρτασης σε αρουραίους εμφάνισαν συνεχή μείωση της έκφρασης του γονιδίου Klotho (326).

Σε μια τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη ασθενών με διαβήτη τύπου 2 με υπέρταση, εξετάστηκε η θεραπεία με έναν αναστολέα υποδοχέων αγγειοτενσίνης ενός θειαζιδικού διουρητικού έναντι ενός διυδροπυριδινικού αναστολέα διαύλων ασβεστίου(327). Οι ασθενείς που έλαβαν βαλσαρτάνη/υδροχλωροθειαζίδη (έναντι της αμλοδιπίνης) είχαν αύξηση των συγκεντρώσεων της διαλυτής Klotho στους 6 μήνες, σε σύγκριση με την θεραπεία με αμλοδιπίνη, παρά τον παρόμοιο έλεγχο της ΑΠ και στις δύο ομάδες (327). Αυτή η μελέτη ανέδειξε τα πιθανά οφέλη των αναστολέων των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης, ανεξάρτητα από την ΑΠ, μέσω της διαμόρφωσης της Klotho σε ασθενείς με διαβητική νεφρική νόσο και υπέρταση (327).

Μια πιο πρόσφατη μελέτη, αξιολόγησε τη σχέση πίεσης-νατρίου ενός νουκλεοτιδίου πολυμορφισμού του γονιδίου Klotho και της Klotho ορού σε ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα υπέρταση (328). Οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε οξεία φόρτιση με άλατα και περίπου το ένα τρίτο των ασθενών παρουσίασε ευαισθησία στο αλάτι αυξάνοντας την ΑΠ >4 mmHg στο τέλος της έγχυσης(328). Σε αυτή τη μελέτη ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός KL rs9536314 της Klotho συσχετίστηκε σταθερά με την υπέρταση ευαίσθητη στο αλάτι (328). Επιπλέον, υπήρξε αντίστροφη σχέση μεταξύ της Klotho ορού και των μέσων μεταβολών της ΑΠ μετά την έγχυση του αλατούχου ορού (328). Μια ερμηνεία των εξελισσόμενων προκλινικών και κλινικών δεδομένων ήταν ότι η αποκατάσταση της Klotho μπορεί να είναι ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς για την ευεργετική επίδραση του εντατικού (έναντι του τυπικού) ελέγχου της ΑΠ. Επιπλέον επισημάνθηκε ότι η Klotho ασκεί ανεξάρτητες από την ΑΠ καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσου(328).

Σε μια μεγάλη ομάδα ενηλίκων ηλικίας 70-79 ετών που ζούσαν στην κοινότητα, η υψηλότερη τιμή της Klotho στον ορό συσχετίστηκε με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης(322) . Η μελέτη έδειξε ότι υπήρχε συσχέτιση ανεξάρτητα από τα δημογραφικά στοιχεία, τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου, την επικρατούσα καρδιαγγειακή νόσο και τους δείκτες οστικής νόσου, συμπεριλαμβανομένου του ασβεστίου, του φωσφορικού άλατος, της βιταμίνης D 25(OH), της PTH και το FGF-23 (322).

Συγκεκριμένα, η διπλάσια αύξηση της Klotho στον ορό μείωσε τον κίνδυνο εμφάνισης περιστατικού υπέρτασης κατά 20% (95% CI, 7% έως 31%) κατά τη διάρκεια μιας μέσης διάρκειας παρακολούθησης 3 ετών. Τα υψηλότερα επίπεδα Klotho στον ορό σχετίστηκαν επίσης με χαμηλότερες μετρήσεις συστολικής και διαστολικής ΑΠ κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης(322). Η έρευνα αυτή υπογράμμισε την αμφίδρομη σχέση μεταξύ της Klotho και της ΑΠ στον άνθρωπο(322).

Διότι υπάρχουν περιορισμένες μελέτες της Klotho και της αρτηριακής πίεσης στον άνθρωπο ,απαιτούνται μελλοντικές κλινικές μελέτες για την επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων και την περαιτέρω αξιολόγηση του βιοδείκτη και του θεραπευτικού δυναμικού της Klotho στην νεφρική νόσο και στην υπέρτασική νόσο.

8.Η Klotho και οι καρδιακές και αγγειακές παθήσεις

Η Klotho διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων, ιδίως στη διατήρηση της καλής καρδιακής και αγγειακής λειτουργίας(329). Υπάρχουν στοιχεία ότι η Klotho εμπλέκεται σε μηχανισμούς άμυνας έναντι της ανάπτυξη υπερτροφίας και αναδιαμόρφωσης της καρδιάς, όπως της αγγειακής αβεστοποίησης(76) και της αθηρογένεσης(330).Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το Klotho εμπλέκεται στην αντίσταση στο οξειδωτικό στρες, ορισμένοι επιστήμονες επικεντρώθηκαν στον ρόλο της Klotho στην ανάπτυξη των καρδιαγγειακών παθήσεων (331).

Διερεύνηση της Klotho πλάσματος στην καρδιαγγειακή νόσου, έγινε από την ομάδα του Semba et al και περιελάμβανε τους κοινούς παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου όπως την ηλικία, το φύλο, την ολική χοληστερόλη, την HDL χοληστερόλη, τη συστολική αρτηριακή πίεση και ο διαβήτης(331). Η έρευνα ανέδειξε ότι ο κίνδυνος καρδιαγγειακής νόσου σε ενήλικες με υψηλότερη Klotho στο πλάσμα ήταν χαμηλότερος (331). Ομοίως, μια άλλη μελέτη σημείωσε τη συσχέτιση μεταξύ της Klotho πλάσματος και της καρδιαγγειακής νόσου σε υγιείς εθελοντές χωρίς γνωστούς παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακές διαταραχές (330). Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα χαμηλά επίπεδα Klotho στον ορό σχετίζονταν με μεγαλύτερο πάχος του επικαρδιακού λίπους και του μέσο χιτώνα της καρωτιδικής αρτηρίας (330).

Στην καρδιά, η Klotho εκφράζεται αποκλειστικά στον φλεβοκομβικό κόμβο(12). Τα ποντίκια Klotho παρουσίασαν ελαττώματα στην αγωγιμότητα του σινοκολπικού κόλπου(12) , τα οποία αποτέλεσαν αιτία αιφνίδιου θανάτου υπό πίεση (12). Η απουσία εκφυλιστικής δομικής αλλαγής που βρέθηκε στον φλεβοκομβικό κόμβο των ποντικών Klotho υποδηλώνει ότι τα επαρκή επίπεδα της Klotho μπορεί να είναι σημαντικά για τη διατήρηση της λειτουργίας του φλεβοκομβικού κόμβου ως βηματοδότη(12).

Μια μελέτη του Faul et al έδειξε ότι η ανεπάρκεια της Klotho σχετίζεται με την καρδιακή υπερτροφία(232). Η καρδιακή υπερτροφία είναι μια υψηλής συχνότητας παθολογική κατάσταση η οποία οδηγεί σε καρδιακή δυσλειτουργία και θάνατο(332).Τα σήματα στρες προκαλούν

ανώμαλη ανάπτυξη και αναδιαμόρφωση της καρδιάς που εξελίσσονται σε καρδιακή ανεπάρκεια(333). Τα δεδομένα αναδεικνύουν ότι η ανεπάρκειά της Klotho προκαλεί υπερβολική καρδιακή υπερτροφία, φαινόμενο το οποίο αποδείχτηκε μετά από την έγχυση ισοπρωτενερόλης σε ποντίκια(334). Στη μελέτη φάνηκε ότι η χορήγησή της Klotho βελτίωσε την επαγόμενη από την ισοπρωτενερόλης δομική μεταβολή στις καρδιές ποντικών ,αποκατέστησε τη διάταξη των μυοκαρδιακών ινών και μείωσε την ινοβλαστική υπερπλασία και την διάμεση και περιαγγειακή ίνωση(334).

Τα δεδομένα έχουν δείξει ότι η καρδιακή προστασία από την Klotho πραγματοποιείται μέσω υπορρύθμισης των διαύλων TRPC6, η υπερέκφραση των οποίων προκαλεί ανώμαλη καρδιακή ανάπτυξη και πρόωρο θάνατο(334). Φάνηκε ότι η απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων είναι μια σημαντική διαδικασία στην καρδιακή αναδιαμόρφωση και αναφέρθηκε η κατασταλτική δράση της Klotho στην μείωση του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και στην παραγωγή των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS)(335).

Μια έρευνα αποκάλυψε επίσης ότι η υπερπαραγωγή του ROS και η καρδιακή υπερτροφία προέκυψαν από την ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης της μιτογενώς ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) και της φωσφορυλίωση της MAPK (p38 και ERK1/2) (336). Φάνηκε ότι η παροχή της Klotho οδήγησε στη βελτίωση της LVH που οφείλεται στην αναστολή της MAPK και στην υπορρύθμιση της παραγωγής του ROS στα καρδιομυοκύτταρα. Για το λόγο αυτό, προτάθηκε η χρήση της πρωτεΐνης Klotho ως μια νέα προληπτική και θεραπευτική στρατηγική στην υπερτροφία της αριστερής κοιλίας (336).

Μια άλλη ερευνητική ομάδα εκτίμησε ότι η Klotho εκφράζεται στον ιστό του μυοκαρδίου και απέδειξε τη συσχέτισή της με τον επιπολασμό της καρδιαγγειακής νόσου (337). Εξετάστηκαν δείγματα βιοψίας δεξιού κόλπου ασθενών με υψηλό και χαμηλό κίνδυνο για αρτηριοσκληρωτική καρδιαγγειακή νόσο . Η έρευνα έδειξε ότι οι πρωτεΐνες α-Klotho, β-Klotho, FGF21 και FGF23 εκφράζονται στα καρδιομυοκύτταρα και τα άτομα με υψηλότερο καρδιαγγειακό κίνδυνο είχαν μειωμένη έκφραση καρδιακού Klotho και αυξημένη έκφραση καρδιακών FGF (337).

Σε μια μελέτη με τρωκτικά ο Dias et al ανέλυσε τα καρδιομυοκύτταρα από ασθενείς υψηλού κινδύνου για αθηροσκληρωτική καρδιαγγειακή νόσο και αποκάλυψε ότι η υπερβολική ενεργοποίηση του NF-κΒ και η υπερέκφραση του iNOS στα καρδιομυοκύτταρα οδηγούν σε κυτταρική δυσλειτουργία και βλάβη που έχουν ως αποτέλεσμα την μυοκαρδιοπάθεια, την βραδυκαρδια και τον αιφνίδιο καρδιακό θάνατο (338).

Αντίθετα, άλλοι ερευνητές σημείωσαν ότι η συνθάση του ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) εκφράζεται συστατικά και συμμετέχει στην αγγειοδιαστολή, στην αγγειοπροστασία και στην προστασία από αθηροσκλήρωση (339). Άλλοι συγγραφείς τόνισαν επίσης την υψηλότερη έκφραση της TGF-β1 και ειπώθηκε ότι η εξάντληση της Klotho μπορεί να προάγει την προοξειδωτική, πρωτεϊνική γεννητική και προαποπτωτική δραστηριότητα στα καρδιομυοκύτταρα, οδηγώντας σε βλάβη τους ασθενείς με υψηλότερο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων(337).

Η Klotho έχει μελετηθεί ευρέως λόγω του προστατευτικού της ρόλου στην τοξική καρδιακή βλάβη (340). Η HSP70 είναι ένα αντιφλεγμονώδες μόριο, που επάγεται κατά τη διάρκεια κυτταρικού στρες για την προστασία των ιστών από τραυματισμό και για να επηρεάσει την απόπτωση. Η HSP70 μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με τον NF-βB και να εμποδίσει την ενεργοποίησή του και μπορεί να διαμορφώσει την απόκριση στις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (340). Στη μελέτη της γηράσκουσας ενδοτοξαιμικής καρδιάς ποντικού, η καρδιακή βλάβη και η καρδιακή δυσλειτουργία δημιουργήθηκαν με τη χορήγηση λιποπολυσακχαρίτη ως προφλεγμονώδους παράγοντα. Ως αποτέλεσμα, τα ποντίκια ανέπτυξαν ενδοτοξαιμική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας.

Η ενδοτοξαιμία προκάλεσε επίσης την εξάντληση της καρδιακής Klotho και HSP70, αλλά η χορήγηση ανασυνδυασμένης Klotho διατήρησε τη μυοκαρδιακή έκφραση των HSP70 και βελτίωσε την καρδιακή λειτουργία στα γερασμένα ποντίκια(340). Φάνηκε επίσης ότι η Klotho μετρίασε την ενεργοποίηση της μυοκαρδιακής NF-βB και οδήγησε σε μειωμένη παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών(340). Οι ερευνητές τόνισαν ότι αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η φλεγμονώδης απόκριση και η διαταραγμένη καρδιακή λειτουργία συνδέονται με την ανεπάρκεια της Klotho.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναφέρει ότι η Klotho είναι κρίσιμη για την αγγειακή υγεία και έχει αγγειοπροστατευτικά αποτελέσματα. Η αγγειακή ασβεστοποίηση είναι συνηθισμένο εύρημα στην ΧΝΝ , αναπτύσσεται νωρίς στη νεφρική νόσο και σχετίζεται με μείωση της νεφρικής λειτουργίας με υψηλό κίνδυνο καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνησιμότητας(341),Σε μελέτες έχει φανεί ότι η σταθερή παροχή διαλυτού Klotho έχει αναφερθεί ότι μειώνει τη χρόνια υπερφωσφαταιμία και την αγγειακή ασβεστοποίηση in vitro και in vivo (342).

Έχει αποδειχτεί ότι η διαλυτή Klotho καταστέλλει άμεσα την πρόσληψη Pi και την ανοργανοποίηση που προκαλείται από υψηλό Pi in vivo, ενώ η χορήγηση ανασυνδυασμένου Klotho αύξησε την διαλυτή Klotho με θεραπεία με αγωνιστές του υποδοχέα της βιταμίνης D

(VDRA). Στην έρευνά του ο Hum et al υπογράμμισε ότι η σταθερή παροχή της διαλυτή Klotho μειώνει τη χρόνια υπερφωσφαταιμία και την αγγειακή ασβεστοποίηση τόσο in vitro και in vivo (342). Σε ένα ζωικό μοντέλο με χρόνιας νεφρικής νόσου σε ποντίκια όπου η διατροφική φόρτωση φωσφορικών προκάλεσε έσω ασβεστοποίηση της αορτής, η χορήγηση αγωνιστών του υποδοχέα βιταμίνης D (καλσιτριόλη ή παρικαλσιτόλη) μείωσε την ασβεστοποίηση της αορτής και αύξησε την έκφραση του παράγοντα κατά της ασβεστοποίησης οστεοποντίνη, σε αορτικά έσω κύτταρα (86).

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών κατά την τελευταία δεκαετία έχει εμπλουτίσει σημαντικά τις γνώσεις για την αντιοξειδωτική δράση της Klotho και τη συσχέτισή της με τη λειτουργία του ενδοθηλίου(329).Ερευνητές ανέλυσαν μια επίδραση της σύνθεσης του NO με τη μεσολάβηση του FGF23 και του οξειδωτικού στρες σε ανθρώπινα στεφανιαία ενδοθηλιακά κύτταρα της στεφανιαίας αρτηρίας (HCAEC) (343). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η δεσμευτικότητα του FGF23 στους υποδοχείς του, FGFR1c, 3c, και 4, ενισχύεται από την πρωτεΐνη Klotho (344). Τα δεδομένα έδειξαν μια ενισχυμένη έκφραση της μεμβρανικά συνδεδεμένης Klotho και της FGFR1, 2 και 4 στα HCAEC. Στη μελέτη του Richter et al η Klotho και η FGFR1 εκφράστηκαν στις ανθρώπινες στεφανιαίες αρτηρίες. Φάνηκε ότι η διέγερση του FGF23 στα HCAEC είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της σηματοδότησης του FGFR1, καθώς και την αποβολή της διαλυτής Klotho μέσω της ADAM17 πρωτεάσης (343). Στη συνέχεια, το σύμπλοκο FGFR1/FGF23/Klotho προκάλεσε ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Akt/eNOS στα HCAEC. Στην συνέχεια φάνηκε ότι, το eNOS ενεργοποίησε την παραγωγή του NO, το οποίο είναι ένας γνωστός αγγειοδιασταλτικός παράγοντας που βελτιώνει τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων (343).

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η δραστηριότητα της Klotho θα μπορούσε να είναι προστατευτική σε έναν κατεστραμμένο μυοκαρδιακό ιστό, γεγονός οποίο ανοίγει νέο δρόμο στη θεραπεία των καρδιαγγειακών παθήσεων.

9.Η Klotho και ο σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης, ιδίως ο διαβήτης τύπου 2, παραμένει η κυρίαρχη μεταβολική νόσος παγκοσμίως με αναμενόμενη αύξηση του επιπολασμού πάνω από 50% τα επόμενα 20 χρόνια(345).

Έχει αναδειχθεί ότι η Klotho διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης (346). Οι Utsugi et al έχουν αποδείξει ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια Klotho παρουσιάζουν ατροφία των νησιδίων του παγκρέατος με μειωμένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης, ινσουλίνης και συγκεντρώσεις ινσουλίνης στον ορό (346). Αντίθετα μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η υπερέκφραση της Klotho σε ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη κατακράτηση στην πλασματική μεμβράνη του Ca^{2+} - διαπερατού μεταβατικού καναλιού κατιόντων V2 (TRPV2), με ενίσχυση της είσοδο του ασβεστίου και την επαγόμενη από τη γλυκόζη ενδοκυτταρική απόκριση ασβεστίου και την έκκριση ινσουλίνης (110).

Μια μελέτη ζωικού μοντέλου έδειξε ότι η έκφραση της Klotho ειδικά για τα β-κύτταρα είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της λειτουργίας τους και για την προστασία από την ανάπτυξη του ΣΔ τυπου II (347). Οι προστατευτικές επιδράσεις της Klotho σχετίστηκαν με τον αυξημένο αριθμό των β-κυττάρων, τη σημαντική αύξηση του μεταγραφικού παράγοντα Pdx-1 της ινσουλίνης, την αυξημένη αποθήκευση της ινσουλίνης στα παγκρεατικά νησίδια, τη γλυκοζοεξαρτώμενη έκκριση ινσουλίνης και τη συγκέντρωση ινσουλίνης στον ορό (346).

Στη μελέτη του Lin et al η ειδική για τα β-κύτταρα έκφραση της Klotho μείωσε την υπεργλυκαιμία και ενίσχυσε την ανοχή στη γλυκόζη. Οι ευεργετικές επιδράσεις της Klotho συσχετίστηκαν με σημαντικές βελτιώσεις στην επαγόμενη από τον ΣΔ τυπου II μείωση των αριθμού των β-κυττάρων, των επιπέδων αποθήκευσης ινσουλίνης στα νησίδια του πάγκρεας και της διεγερμένης από την γλυκόζη έκκρισης ινσουλίνης από τα παγκρεατικά νησίδια, η οποία οδήγησε σε αύξηση της ινσουλίνης στο αίμα των διαβητικών ποντικών (347). Επιπλέον, η ειδική για τα β-κύτταρα έκφραση της Klotho μείωσε τα επίπεδα του ενδοκυττάριου υπεροξειδίου, την οξειδωτική βλάβη, την απόπτωση και το DNAJC3 (δείκτης για το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου) στα παγκρεατικά νησίδια. Επιπλέον φάνηκε ότι η ειδική για τα β-κύτταρα έκφραση της Klotho αύξησε τα επίπεδα έκφρασης όχι μόνο του Pdx-1 (μεταγραφικός παράγοντας ινσουλίνης) αλλά και του PCNA (δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού) και του LC3 (δείκτης αυτοφαγίας) στις παγκρεατικές νησίδες σε ποντίκια με σακχαρώδη διαβήτη. Στην μελέτη επισημάνθηκε ότι η ειδική έκφραση της Klotho στα β-κύτταρα βελτίωσε την λειτουργία των β-κυττάρων και μείωσε την ανάπτυξη του ΣΔ τυπου II στα ποντίκια (347).

Για να διαπιστωθεί εάν τα ομόζυγα ποντίκια για τη μετάλλαξη Klotho παρουσιάζουν μη φυσιολογικό μεταβολισμό της γλυκόζης, πραγματοποιήθηκε δοκιμή ανοχής στη γλυκόζη από το στόμα (OGTT) σε ηλικία 6 έως 8 εβδομάδων (347). Τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα κατά τη διάρκεια της OGTT ήταν σημαντικά χαμηλότερα στα ποντίκια Klotho σε σχέση με τα ποντίκια άγριου τύπου. Η έρευνα έδειξε ότι η περιεκτικότητα του παγκρέατος σε ινσουλίνη ήταν

σημαντικά χαμηλότερη στα ποντίκια Klotho σε σύγκριση με τα ποντίκια άγριου τύπου. Έτσι, οι Lin et al κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παραγωγή ινσουλίνης μειώνεται και η ευαισθησία στην ινσουλίνη αυξάνεται στα ποντίκια Klotho. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι η Klotho χορηγούμενη με γονιδιακή μεταφορά στα μοντέλα ποντικών απέδειξε σημαντικές προστατευτικές επιδράσεις στα β- κύτταρα σε ΣΔ τυπου Ι ή ΣΔ τυπου ΙΙ (347). Είναι σημαντικό ότι η Klotho μείωσε την απόπτωση των β-κυττάρων και αύξησε τον πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων.

Από μελέτες φάνηκε ότι ένα βασικό παθολογικό εύρημα στα ποντίκια με αυτοάνοσο διαβήτη είναι η ανάπτυξη ινσουλίτιδας. Αυτή εμφανίζεται αρχικά ως διήθηση μονοπύρηνων κυττάρων γύρω από τα νησίδια ακολουθούμενη από εστιακή εισβολή ανοσοποιητικών κυττάρων στα νησίδια, και στη συνέχεια σοβαρή διήθηση και απώλεια β-κυττάρων. Η μεταφορά του γονιδίου Klotho μείωσε την ινσουλίτιδα, γεγονός που υποδηλώνει μια ανοσοκατασταλτική και αντιφλεγμονώδη δράση του γονιδίου. Επιπλέον φάνηκε ότι η ανασυνδυασμένη Klotho βελτίωσε τη νεφρική νόσο και την υπέρταση σε ποντίκια με σακχαρώδη διαβήτη (348). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η Klotho ανέστειλε τον TGF-β και τον όγκο σηματοδότηση του παράγοντα νέκρωσης (TNF), τόσο ώστε να μειωθεί η νεφρική ίνωση.

Σε αυτές τις μελέτες φάνηκε ότι η συστηματική θεραπεία με γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) προστάτεψε από τον διαβήτη τύπου 1 στα ποντίκια (349). Οι Lin et al αποδείχτηκαν ότι το GABA επάγει την αντιγραφή και την αναγέννηση των β-κυττάρων ποντικού και ανθρώπου, μειώνοντας συγχρόνως την απόπτωση αυτών των κυττάρων (39)

Ωστόσο φάνηκε ότι, το GABA και το GLP-1RA επάγουν άμεσα την έκφραση της Klotho στα παγκρεατικά β- κύτταρα. Σε μια μελέτη του Xu et al το ενδιαφέρον στράφηκε στον υποκινητή της Klotho, όποιος φάνηκε να έχει μια θέση δέσμευσης μεταγραφής για το PAX4, ο οποίος είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας απαραίτητος για την διαφοροποίηση των β- κυττάρων στο πάγκρεας (31). Οι Brun et al ανέδειξαν ότι το GLP-1 επάγει την έκφραση του PAX4 στα ανθρώπινα νησίδια και επομένως, αυτό μαζί με άλλους παράγοντες μπορεί να επάγει την έκφραση της Klotho (350).

Σε ποντίκια με αυτοάνοσο διαβήτη οι Prud'homme et al ενίσχυσαν της δράσης της Klotho με έγχυση πρωτεΐνης και με αυτό τον τρόπο φάνηκε ότι η Klotho αύξησε τον πολλαπλασιασμό των β-κυττάρων και αύξησε τον όγκο τους (351). Σε μια μελέτη in vitro, διαπιστώθηκε ότι η Klotho διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των ανθρώπινων β-κυττάρων, αυξάνοντας συγχρόνως την έκκριση της ινσουλίνης (190). Η Klotho επίσης, ανέστειλε την ενεργοποίηση

τον NF-κB ,γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την αντι-αποπτωτική δράση της Klotho (190).

Η τρέχουσα βιβλιογραφία ανέδειξε ότι η Klotho μπορεί επίσης να προστατεύει τα β -κύτταρα μέσω αντιοξειδωτικών μηχανισμών που μπορούν να επάγονται από τον Nrf2 και το FoxO

(352).Βρέθηκε ότι τα ποντίκια με ανεπάρκεια Klotho είναι υπογλυκαιμικά παρά τα χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης (353). Μια ερμηνεία είναι ότι αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η Klotho καταστέλλει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και, ως εκ τούτου, τα κύτταρα των αρνητικών σε Klotho ποντίκια ανταποκρίνονται περισσότερο στην ινσουλίνη. Άλλοι ερευνητές υπογράμμισαν ότι η υπερέκφραση της Klotho σε διαγονιδιακά ποντίκια παρήγαγε ελαφριά αντίσταση στην ινσουλίνη και παρατεταμένη διάρκεια ζωής (10).

Η ομάδα του Landry et al ανέδειξε ότι η Klotho εκτός από τον διαβήτη έχει ρόλο και στην παχυσαρκία. Στους ανθρώπους, φάνηκε ότι τα επίπεδα της Klotho στο CSF είναι μειωμένα σε παχύσαρκα άτομα (354). Η ενδοεγκεφαλοκοιλιακή έγχυση της Klotho σε ποντίκια με διαβήτη μείωσε την πρόσληψη τροφής, βελτίωσε την ομοιόσταση της γλυκόζης και μείωσε το σωματικό τους βάρος (355).

Οι Rao et al απέδειξαν ότι η Klotho διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Στην έρευνα τους, τα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με α-Klotho παρουσίασαν μειωμένη λιποδιείσδυση, αυξημένη άλιπη μάζα και αυξημένη ενεργειακή δαπάνη, παρά το γεγονός ότι δεν υπήρχαν μεταβολές στην πρόσληψη τροφής, στο σωματικό βάρος ή στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα τους(356). Επίσης φάνηκε ότι η συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ και στον λιπώδη ιστό ήταν επίσης μειωμένη σε σύγκριση με τα ποντίκια ελέγχου. Επιπλέον, η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου έδειξε μειωμένη έκφραση βασικών λιπογενετικών γονιδίων σε ποντίκια που έλαβαν την α-Klotho .(356).

Συνολικά οι ερευνητές ανέφεραν ότι τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ενθαρρυντικές θεραπευτικές δυνατότητες της α-Klotho και υπογραμμίζουν την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα των συγκεκριμένων μηχανισμών δράσης της πρωτεΐνης(356). Ως εκ τούτου οι μελέτες έχουν δείξει ότι η ειδική για τα β-κύτταρα έκφραση της Klotho μπορεί να βρει εφαρμογές στη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 , να βελτιώσει τη λειτουργία των β-κυττάρων και να μειώσει την ανάπτυξη του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (110).

10. Η Klotho, ο εγκέφαλος και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις

Η επίδραση της Klotho στον εγκέφαλο έχει κερδίσει σημαντική προσοχή. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η Klotho παράγεται από το χοριοειδές πλέγμα και βρίσκεται στο ENY(357). Εκφράζεται επίσης ευρέως σε ολόκληρο τον εγκέφαλο, κυρίως στις περιοχές της φαιάς ουσίας, συμπεριλαμβανομένου του ιππόκαμπου (357). Η πρωτεΐνη παράγεται τόσο από τους νευρώνες όσο και από τα ολιγοδενδροκύτταρα(357).

Φαίνεται ότι η Klotho ασκεί ευεργετικές κυτταροπροστατευτικές επιδράσεις σε νευρωνικά κύτταρα H19-7. Μελέτες δείχνουν ότι η Klotho ρυθμίζει την έκφραση του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (EpoR) στα νευρωνικά κύτταρα, μεγεθύνει τον καταρράκτη σηματοδότησης που ενεργοποιείται από την ερυθροποιητίνη (Epo), και προστατεύει τα νευρωνικά κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη με τρόπο εξαρτώμενο από την EpoR(156). Η ερυθροποιητίνη (Epo) είναι μια γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη που αρχικά θεωρήθηκε ότι δρα ως κύριος ρυθμιστής της ερυθροποίησης διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλοντας την απόπτωση και την διαφοροποίηση στα πρόδρομα ερυθροειδή κύτταρα (358).

Παρ' όλα αυτά, η σηματοδότηση της Epo έχει αναγνωριστεί σε πολλούς μη ερυθροειδείς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των νευρικών, ενδοθηλιακών και μυϊκών κυττάρων(359). Πρόσφατα, η Epo έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην ανάπτυξη και την προστασία του νευρικού συστήματος (360) .

Ο υποδοχέας της ερυθροποιητίνης (EpoR) εκφράζεται στον εγκέφαλο και έχει αποδειχθεί ότι έχει νευροπροστατευτικές επιδράσεις έναντι εγκεφαλικής βλάβης σε ζωικά μοντέλα(156). Έτσι, στη μελέτη του ο Cheng et al πρότεινε ότι η Klotho μπορεί να διεγείρει την έκφραση της EpoR στα νευρωνικά κύτταρα για να ενισχύσει την προστασία με τη μεσολάβηση της Epo(156). Στην ίδια έρευνα τα νευρωνικά κύτταρα του ιππόκαμπου (H19-7) υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με ανασυνδυασμένη Klotho και η Klotho αύξησε την έκφραση τόσο της πρωτεΐνης EpoR όσο και του mRNA του EpoR . Η Klotho ενίσχυσε επίσης την μεταγραφική δραστηριότητα της EpoR στα κύτταρα H19-7 και αύξησε την φωσφορυλίωση των Jak2 και Stat5 που ενεργοποιείται από την Epo και προστάτευσε τα κύτταρα του ιππόκαμπου από την κυτταροτοξικότητα του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Φάνηκε ότι η αποσιώπηση του EpoR κατήργησε την προστατευτική επίδραση της Klotho έναντι της κυτταροτοξικότητας που προκαλείται από το υπεροξείδιο(156).

Σε μια μελέτη του Tsai et al φάνηκε ότι η γενετική διακοπή της EroR οδηγεί σε μειωμένη αγγειογένεση, επιβραδύνει την αναγέννηση των ιστών και οδηγεί σε σοβαρή ιστική βλάβη μετά από ισχαιμία σε ποντίκια. Οι Massó et al. διαπίστωσαν ότι η έκφραση του Klotho μειώνεται κατά τη διάρκεια της γήρανσης στα ποντίκια, κυρίως στον προμετωπιαίο φλοιό (361). Και άλλοι ερευνητές βρήκαν παρόμοια προς τα κάτω ρύθμιση της πρωτεΐνης Klotho στην λευκή ουσία σε εγκεφάλους πιθήκων κατά τη διάρκεια της γήρανσης (362). Η τρέχουσα βιβλιογραφία έχει αναδείξει ότι η ανεπάρκεια της Klotho στο ΚΝΣ έχει εμπλακεί σε γνωστικές δυσλειτουργίες και άνοια (363).

Ωστόσο, φάνηκε ότι η Klotho είναι κρίσιμη για την ωρίμανση των ολιγοδενδροκυττάρων, την ακεραιότητα της μυελίνης και την πρόληψη του εκφυλισμού της μυελίνης (364). Η νευρική πρωτεΐνη Klotho μπορεί να προστατεύσει τους νευρώνες του ιππόκαμπου από το σχηματισμό αμυλοειδούς και από την ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με τη γήρανση, όπως επιβεβαιώθηκε σε ποντίκια (361).

Τα χαμηλά επίπεδα της Klotho συσχετίζονται με νευροεκφυλιστικές παθήσεις και με γνωστικές διαταραχές, καθώς και με την ευθραυστότητα (365). Σε μια μελέτη, σε κατοίκους οίκων ευγηρίας, το χαμηλό επίπεδο της Klotho στον ορό συσχετίστηκε με κακή γνωστική ικανότητα, ευθραυστότητα, εξάρτηση και συχνές πτώσεις (366). Η έκφραση της Klotho στον εγκέφαλο μειώνεται σε άτομα που γερνούν και στην πρόωμη νόσο του Alzheimer (202).

Μορφολογικά, στη νόσο Alzheimer, ο εγκέφαλος χαρακτηρίζεται από περίσσεια πλακών β-αμυλοειδούς, καθώς και από την νευρωνική συσσώρευση της πρωτεΐνης Ταυ που σχηματίζει νευροϊνιδιακά NFTs (367). Έχει προταθεί ότι αυτές οι ουσίες είναι τοξικές για τους νευρώνες (368). Η Klotho προσδίδει στους νευρώνες αντίσταση στο οξειδωτικό στρες και στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και θεωρείται ότι προστατεύει από την τοξικότητα του Αβ και των NFTs (368). Το Αβ παράγεται από την πρωτεολυτική διάσπαση της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP) από τις σεκρετάσες (369). Η APP είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου 1 πρωτεΐνη, που διασπάται από μια α-σεκρετάση και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή του απελευθέρωση ενός μεγάλου εξωκυτταρικού τμήματος, το οποίο δεν σχηματίζει αμυλοειδές (369). Αυτή η διαδικασία διάσπασης επιτυγχάνεται κυρίως από το ADAM10, και είναι παρόμοια με την δημιουργία της Klotho. Ωστόσο, η επεξεργασία της APP από τη β-σεκρετάση και τη γ-σεκρετάση παράγει μικρά εκκρινόμενα πεπτίδια -Αβ που σχηματίζουν αμυλοειδές. Με αυτό τον τρόπο αποδείχτηκε ότι η διάσπαση της α-σεκρετάσης αποτρέπει την επακόλουθη δημιουργία αμυλοειδογόνων πεπτιδίων (369).

Ένας πιθανός μηχανισμός της νόσου αφορά την ανεπαρκή αυτοφαγία, η οποία είναι μια διαδικασία που κανονικά αποικοδομεί και απομακρύνει πρωτεΐνες και άλλες ουσίες, αποτρέποντας την συσσώρευση τους στο κύτταρο(202). Η Klotho βελτιώνει την αυτοφαγία και αυτό μπορεί να προστατεύει από νευροεκφυλιστικές καταστάσεις όπως την νόσο του Alzheimer (202). Η Klotho φαίνεται επίσης να συμβάλλει στην παραγωγή ολιγοδενδροκυτταρικής μυελίνης και στη διατήρηση της ακεραιότητας της λευκής ουσίας(370). Υπάρχουν ενδείξεις για μια φλεγμονώδη συνιστώσα στη νόσο του Alzheimer, καθώς και σε ορισμένες άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους, που πιθανώς περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ (370). Έτσι, όπως και σε άλλες περιοχές, η Klotho μπορεί να ασκεί ευεργετικές αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δράσεις στον εγκέφαλο. Η Klotho μπορεί να προάγει την διαφοροποίηση της μικρογλοίας προς τον αντιφλεγμονώδη τύπο (M2), αντί του φλεγμονώδους τύπου (M1) (202).

Ο ιππόκαμπος κατέχει σημαντικό ρόλο στη μνήμη. Είναι ένας από τις λίγες περιοχές του εγκεφάλου που διατηρούν τη νευρογένεση σε ενηλικίωση, και υπάρχει απώλεια νευρώνων στην περιοχή αυτή κατά την Alzheimer (371). Πρόσφατες εργασίες δείχνουν ότι η Klotho διεγείρει τη νευρογένεση στον ιππόκαμπο(372). Αυτό ήταν εμφανές, για παράδειγμα, κατά τη σύγκριση της ποντίκια με ανεπάρκεια Klotho έναντι εκείνων που υπερεκφράζουν Klotho (372). Σε συμφωνία με την απώλεια νευρώνων, η Klotho στα ποντίκια με ανεπάρκεια επιδεικνύουν σοβαρά γνωστικά ελαττώματα (372). Πρόσφατα, η διαλείπουσα νηστεία σε ποντίκια αποδείχθηκε ότι αυξάνει την έκφραση της Klotho και τη νευρογένεση στον ιππόκαμπο (373). Στην ίδια μελέτη αποδείχθηκε ότι η διαλείπουσα νηστεία είναι ανώτερη από τον θερμιδικό περιορισμό, και συσχετίστηκε με βελτίωση της μακροπρόθεσμης μνήμης.

Τα ποντίκια με ανεπάρκεια Klotho δεν ανταποκρίθηκαν στη διαλείπουσα νηστεία(373).Πιθανολογήθηκε ότι η φαρμακευτική θεραπεία μπορεί να επιτύχει παρόμοια αποτελέσματα(1). Για το παράδειγμα, σε ένα μοντέλο αρουραίου για το μεταβολικό σύνδρομο, η DPP-4 αναστολέας βιλνταγλιπτίνη (αυξάνει το GLP-1) αύξησε την KLotho στον ιπποκάμπου, μειώνοντας ταυτόχρονα τους φλεγμονώδη και αποπτωτικούς βιοδείκτες στην εν λόγω περιοχή και αυτή απέτρεψε τις νευροεκφυλιστικές αλλαγές (374).

Σε ένα μοντέλο αρουραίου με γνωστικές διαταραχές που προκαλούνται από δυσλειτουργίας της στρεπτοζοτοκίνη (STZ) , η σιμβαστατίνη αύξησε την Klotho στο υποκάμπο και βελτίωσε τη γνωστική λειτουργία (375).

Άλλοι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι η θεραπεία με ροσιγλιταζόνη βελτίωσε την εγκεφαλική έκφραση της Klotho (376). Σε πρόσφατη μελέτη, η ενδοεγκεφαλοκοιλιακή έγχυση ανασυνδυασμένης Klotho ήταν επίσης ευεργετική. Εναλλακτικά, ορισμένοι συγγραφείς έχουν χορηγήσει την Klotho με μεταφορά γονιδίων, όπως ενδοεγκεφαλοκοιλιακή έγχυση ενός λεντοϊκού φορέα που κωδικοποιεί την Klotho (377).

Σε σύγκριση με τα άτομα με χαμηλά επίπεδα Klotho, εκείνα με υψηλά επίπεδα (στο ENY ή στο πλάσμα) έχουν ανώτερες γνωστικές λειτουργίες και μια χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης άνοιας (92). Έχει θεωρηθεί ότι τα επίπεδα Klotho στο αίμα και το ENY είναι ανεξάρτητα(92). Σε αντίθεση με αυτή την άποψη, ορισμένοι ερευνητές πρόσφατα αναφέρουν ότι τα επίπεδα στον ορό και στο ENY συσχετίζονται και ότι τα υψηλά επίπεδα τους προβλέπουν καλύτερη γνωστική λειτουργία (378).

Μια παραλλαγή του γονιδίου Klotho - KL-VS φαίνεται να παρέχει κάποια προστασία έναντι της νόσου του Alzheimer, αλλά μόνο όταν υπάρχει σε ετερόζυγη κατάσταση (379). Ευεργετικές επιδράσεις παρατηρήθηκαν μόνο σε ορισμένες από τις υποομάδες που μελετήθηκαν(379). Ο τρόπος δράσης αυτής της παραλλαγής είναι ασαφής αν και, ενδιαφέρον είναι ότι έχει συσχετιστεί με μείωση της συσσώρευσης του Tau(380).

Αυτό παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για μελλοντικές κλινικές μελέτες, ιδίως σχετικά με φάρμακα ή άλλες θεραπείες που αυξάνουν την Klotho.Το ευρήματα που περιγράφονται παραπάνω σχετικά με την Klotho σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις έχουν γίνει σε τρωκτικά μοντέλα και απομένει να καθοριστεί κατά πόσον είναι εφαρμόσιμα στον άνθρωπο.

11.Η Klotho και ο καρκίνος

Οι πλειοτροπικές λειτουργίες της Klotho αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο, συμπεριλαμβανομένης της σημασίας της σε σχέση με την ογκογένεση, την εξέλιξη και την πρόγνωση του καρκίνου (62).

Η ανθρώπινη κακοήθεια προβλέπεται να είναι η κύρια αιτία θανάτου και το μοναδικό σημαντικότερο εμπόδιο στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής στον 21ο αιώνα (381).Η ανάπτυξη του καρκίνου, η εξέλιξη και η μετάστασή του είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία τα κύτταρα εκτίθενται σε επιβλαβείς γενετικές ή επιγενετικές αλλοιώσεις που έχουν ως αποτέλεσμα απορρυθμισμένους οδούς σηματοδότησης(382).

Η εξαρτώμενη από τον χρόνο συσσώρευση βλάβης του DNA είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει στη γήρανση και επίσης οδηγεί στην εξέλιξη του καρκίνου (382). Η βλάβη του DNA, μαζί με τη γονιδιωματική αστάθεια, είναι ένα καθιερωμένο χαρακτηριστικό των περισσότερων καρκίνων (385). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη συχνότητα μεταλλαξιγένεσης κατά την διαίρεση των κυττάρων (383) λόγω της δυσλειτουργίας του μηχανισμού συντήρησης του γονιδιώματος, που συνήθως οδηγούν τα κατεστραμμένα κύτταρα είτε σε γήρανση είτε σε απόπτωση(386).

Έχει αποδειχθεί ότι αυτά τα μονοπάτια επηρεάζουν έναν αριθμό δυνατοτήτων που αποκτώνται από τα καρκινικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας αποφυγής απόπτωσης, πρόκλησης εισβολής όγκου και μετάστασης, επιτρέπουν την κυτταρική αυτάρκεια, τη διατήρηση της αγγειογένεσης και τη διευκόλυνση της απεριόριστης δυνατότητας κυτταρικού πολλαπλασιασμού (383). Η α-Klotho δυνητικά επηρεάζει αυτούς τους φαινοτύπους μέσω της αναστολής μιας σειράς οδών σηματοδότησης όπως ο υποδοχέας αυξητικού παράγοντα 1 που μοιάζει με ινσουλίνη (IGF-1R), ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (TGFβ) και σχετίζεται με το WNT μονοπάτι (45)(εικόνα 22).



Εικόνα 22: Μονοπάτια σηματοδότησης που επηρεάζονται από την Klotho στα καρκινικά κύτταρα. (Πηγή: Rubinek T, Wolf I. The Role of Alpha-Klotho as a Universal Tumor Suppressor. Vitam Horm. 2016)

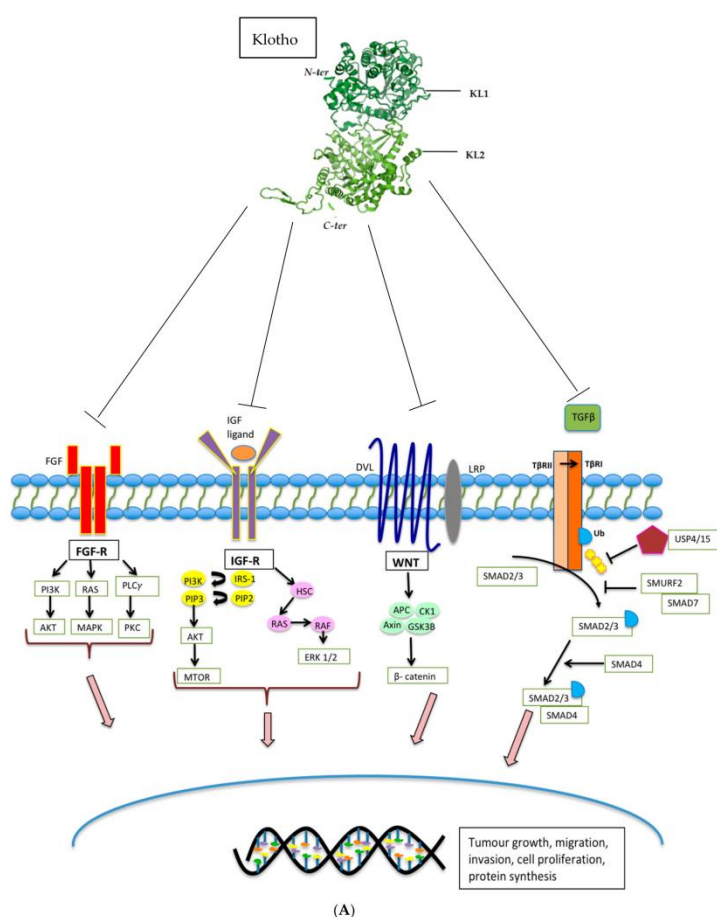
11.1 Μηχανισμοί επίδρασης της Klotho στον καρκίνο

11.1.1. Άξονας Klotho - ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα (IGF)

Η οδός IGF-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινική διαδικασία σε πολλούς τύπους καρκίνου (387). Ο άξονας του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα (IGF) διαμεσολαβεί στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τις αναπτυξιακές διαδικασίες και εμπλέκεται επίσης στον έλεγχο των μεταβολικών δραστηριοτήτων (388). Η απορρύθμιση της έκφρασης και της δράσης του άξονα IGF συνδέεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, από μεταβολικές διαταραχές έως αναπτυξιακά ελλείμματα και ανάπτυξη καρκίνου (388). Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού IGF αποτελεί κρίσιμη προϋπόθεση για τον κακοήγη μετασχηματισμό. Επιπλέον η υπερέκφραση του υποδοχέα IGF-1 (IGF-1R) αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των περισσότερων τύπων καρκίνου (389).

Ο IGF-1R είναι ένας βασικός υποδοχέας μεταγωγής σήματος του μονοπατιού του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα. Στα καρκινικά κύτταρα, ο IGF-1 υποδοχέα (IGF-1R) συχνά ενισχύεται, ρυθμίζεται ή υπερενεργοποιείται (388). Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα του κυκλοφορούντος IGF-1 θεωρήθηκαν επίσης σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την

ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του μαστού, του προστάτη, του παχέος εντέρου και του πνεύμονα (389).



Εικόνα 23: Η Klotho αναστέλλει τα σηματοδοτικά μονοπάτια FGF, IGF, WNT και TGF-β, με αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης του όγκου, της μετανάστευσης του όγκου, της εισβολής του όγκου, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της πρωτεϊνوسύνθεσης. (Πηγή: Sachdeva A, Gouge J,

Φάνηκε ότι η Klotho μπορεί να αναστείλει την οδό IGF-1 στα ηπατοκύτταρα και στα μυϊκά κύτταρα (10). Οι μεταγενέστεροι τελεστές του IGF-1 είναι η PI3K και η AKT, οι οποίοι έχουν κρίσιμο ρόλο σε πολλούς τύπους καρκίνου και θεωρούνται σημαντικοί στόχοι για την ανάπτυξη θεραπείας (383)(εικόνα 23). Σε διάφορους καρκίνους διαπιστώθηκε η στενή συσχέτιση μεταξύ των αντικαρκινικών επιδράσεων της Klotho και της αναστολής της οδού IGF-1. Σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού, των ωοθηκών, του παχέος εντέρου, του ηπατοκυτταρικού και του καρκίνου του παγκρέατος αποδείχθηκε ότι η Klotho αναστέλλει τη σηματοδότηση του IGF-1, γεγονός που αποδεικνύεται από την αναστολή της φωσφορυλίωσης του IGF-1R και της σηματοδότησης του κατάντη (109). Η Klotho κατέστρεψε επίσης τον επαγόμενο από τον IGF-1 πολλαπλασιασμό σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (390). Μια άλλη ομάδα ερευνητών υπογράμμισε ότι στον καρκίνο του παγκρέατος η έκφραση της Klotho συσχετίζεται αρνητικά με τον φωσφορυλιωμένο IGF-1R (391).

11.1.2. Ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας TGF-β1 μονοπάτι

Ο TGF-β1 έχει αναγνωριστεί ως ένας ισχυρός και καθολικός αυξητικός παράγοντας που μπορεί να επάγει ανεξάρτητα την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) σε διάφορους τύπους κυττάρων (392).

Η έρευνα των Tzavlaki et al ανέδειξε ότι η σηματοδότηση του TGF-β διαδραματίζει διφασικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη του καρκίνου (393). Στα φυσιολογικά κύτταρα και στα πρώιμα στάδια εξέλιξης του καρκίνου, ο TGF-β δρα ως κατασταλτικός παράγοντας του όγκου με την ικανότητα να επάγει την απόπτωση και να αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ενεργοποιώντας την G1 κυτταρικού κύκλου (394). Ωστόσο σε μια άλλη μελέτη φάνηκε ότι, στα όψιμα στάδια των καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων των μελανωμάτων, των γλοιωμάτων, του μαστού και του παχέος εντέρου, τα κύτταρα μπορεί να γίνουν ανθεκτικά στις ογκοκατασταλτικές επιδράσεις των TGF-β αναπτύσσοντας μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας και αποκτώντας ενεργοποιητικές μεταλλάξεις εντός των εναλλακτικών ογκογόνων οδών (395). Παρά το γεγονός αυτό, τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να ανταποκρίνονται στην σηματοδότηση του TGF-β, προωθώντας έτσι την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), την εισβολή και την μετάσταση (396). Εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, οι σχετιζόμενες με τον καρκίνο ινοβλάστες (CAFs) εκκρίνουν TGF-β και ιντερλευκίνη 11 (IL-11), έναν επαγωγέα του TGF-β που ενεργοποιεί την ογκογόνο μονοπάτι STAT3 (397). Ο TGF-β

μπορεί επίσης να επιτρέψει τη διαφοροποίηση των στρωματικών μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε μυοϊνοβλάστες που διεγείρουν την ανάπτυξη του όγκου (398).

Σε μοντέλα με ποντίκια η ομάδα του Doi et al, ανακαλύπτει ότι η εκκρινόμενη πρωτεΐνη Klotho συνδέεται άμεσα με τον υποδοχέα TGF- β τύπου II και αναστέλλει τη σύνδεση του TGF- β 1 με τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, αναστέλλοντας έτσι την σηματοδότηση του TGF- β 1. Η Klotho καταστέλλει τις επαγόμενες από τον TGF- β 1 αντιδράσεις από επιθηλιακή σε μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) σε καλλιεργούμενα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης έκφρασης επιθηλιακών δεικτών, της αυξημένης έκφρασης μεσεγχυματικών δεικτών και της αυξημένης κυτταρικής μετανάστευσης(153).

11.1.3. Η οδός FGF

Εκτός από τη ρύθμιση των φωσφορικών αλάτων, η οδός FGF εμπλέκεται επίσης σε διάφορα βιολογικά γεγονότα όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός (89).

Μελετήθηκαν οι επιδράσεις της Klotho στην ενεργοποίηση της οδού FGF με τη διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων του μαστού με φορέα έκφρασης Klotho και στη συνέχεια με έκθεση σε bFGF (390). Χρησιμοποιώντας τη φωσφορυλίωση της ERK1/2 ως δείκτη για την ενεργοποίηση του μονοπατιού του FGF, οι ερευνητές παρατήρησαν διέγερση αυτού του μονοπατιού στα διαμολυσμένα με Klotho καρκινικά κύτταρα του μαστού, με αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (390). Αντίθετα, μια μελέτη που επικεντρώθηκε σε μοντέλα καρκίνου του παγκρέατος διαπίστωσε ότι η υπερέκφραση της Klotho ή η θεραπεία με διαλυτή Klotho μείωσε την ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών και των ξеноμοσχευμάτων καρκίνου του παγκρέατος και ανέστειλε το μονοπάτι FGF, με αποτέλεσμα μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (109)..

11.1.4. Το WNT μονοπάτι

Η ανώμαλη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού WNT σχετίζεται με την ανάπτυξη πολυάριθμων ανθρώπινων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του παχέος εντέρου και του ηπατοκυτταρικού καρκίνου (171). Το WNT μονοπάτι προωθεί τις αναπτυξιακές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης, με τη β -κατενίνη να είναι ο κρίσιμος επιδρών στο κανονικό μονοπάτι (384).

Το κανονικό μονοπάτι Wnt εμπλέκεται στην ανάπτυξη πολλών κακοηθών όγκων, όπως ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, το μελάνωμα, ο καρκίνος του προστάτη, ο καρκίνος του πνεύμονα και αρκετοί άλλοι τύποι καρκίνου (389). Η δράση του Wnt οδηγεί σε

αυξημένα επίπεδα β-κατενίνης στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Η πυρηνική β-κατενίνη επάγει τη μεταγραφική δραστηριότητα του TCF/LEF, ο οποίος στη συνέχεια προωθεί τη σύνθεση γονιδίων που πυροδοτούν την ανάπτυξη, την κινητικότητα και τη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων (399). Ερευνητές απέδειξαν ότι η Klotho αναστέλλει το μονοπάτι Wnt δεσμεύοντας τους Wnt3A και Wnt5A, οδηγώντας έτσι σε μειωμένη πρόσδεση των Wnt στους μεμβρανικούς υποδοχείς τους (17). Σε καρκίνους του τραχήλου της μήτρας, του οισοφάγου, του πνεύμονα, του HCC και στο μελάνωμα φάνηκε ότι η Klotho αναστέλλει την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt-TCF/β-κατενίνη και αναστέλλει την έκφραση γονιδίων στόχων του μονοπατιού, όπως τα c-MYC και CCND1 (400).

11.2.Klotho και η έκφραση της στους διάφορους καρκίνους

Μελέτες επικεντρώθηκαν στην έκφραση του Klotho στον κακοήγη ιστό σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό, στη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του στα κακοήγη κύτταρα και της πρόγνωσης, στη θεραπευτική επίδραση του στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, στην απόπτωση και στην επιβίωση(383).

11.2.1 Καρκίνος παχέος εντέρου

Μέσω αναλύσεων βιοπληροφορικής των συνόλων δεδομένων TCGA για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, μια ομάδα ερευνητών έδειξε μειωμένα επίπεδα mRNA του Klotho σε όλα τα στάδια της νόσου σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό(401).Επιπλέον, η Klotho έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζεται προς τα κάτω μέσω της μεθυλίωσης του προαγωγέα στο 83,3% των κυτταρικών γραμμών καρκίνου του παχέος εντέρου και στο 85% των ιστών του πρωτοπαθούς καρκίνου του παχέος εντέρου (402).

Επιπρόσθετα, αποδείχτηκε ότι η έκτοπη έκφραση της Klotho οδήγησε στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των κυτταρικών σειρών καρκίνου του παχέος εντέρου μέσω της επαγωγής της κυτταρικής απόπτωσης και της αναστολής του κυτταρικού κύκλου της φάσης S (402). Συνολικά, τα αποτελέσματά της ίδιας μελέτης ανέδειξαν ότι η Klotho αδρανοποιείται μέσω υπερμεθυλίωσης του υποκινητή και ενδεχομένως λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο στο καρκίνο παχέος εντέρου. (402).

11.2.2.Καρκίνος στομάχου

Η ομάδα του Wang L et al βρήκε την έκφραση της Klotho μειωμένη στους ιστούς πρωτοπαθούς γαστρικού καρκινώματος ($p < 0,05$) και σε όλες τις εξεταζόμενες σειρές γαστρικών καρκινικών

κυττάρων. Η έκτοπη έκφραση της Klotho ανέστειλε την ανάπτυξη των γαστρικών καρκινικών κυττάρων εν μέρει μέσω της επαγωγής της απόπτωσης, καταδεικνύοντας έναν ογκοκατασταλτικό ρόλο της Klotho στον γαστρικό καρκίνο. Τα αποτελέσματα της ίδιας μελέτης έδειξαν ότι η απομεθυλίωση με 5-aza-2'-δεοξυκυτιδίνη (Aza) αύξησε την έκφραση της Klotho και ο υποκινητής της Klotho ήταν υπερμεθυλιωμένος σε κυτταρικές σειρές γαστρικού καρκίνου καθώς και σε ορισμένους από τους ιστούς πρωτοπαθούς γαστρικού καρκινώματος (403), αλλά σε κανέναν από τους φυσιολογικούς γαστρικούς ιστούς. Η μεθυλίωση του υποκινητή της Klotho συσχετίστηκε με φτωχότερη επιβίωση των ασθενών με γαστρικό καρκίνο, καθιστώντας την ανεξάρτητο παράγοντα πρόγνωσης ($p=0,025$, Log-rank test).

11.2.3 Καρκίνος παγκρέατος

Στον ιστό παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος ή σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (Panc1, MiaPaCa2, Colo357) παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση της Klotho σε σύγκριση με το φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό (109). Ωστόσο, η γενετική ανάλυση αποκάλυψε ότι το Panc1 φέρει μόνο τη λιγότερο ενεργή KL-VS παραλλαγή.

Οι Abramovitz et al παρατήρησαν δύο μηχανισμούς που μπορεί να εμπλέκονται στη μείωση της δραστηριότητας της Klotho στα καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος - η επιγενετική αποσιώπηση και η έκφραση μιας λιγότερο δραστηνής πρωτεΐνης (109).

Η υπερέκφραση της Klotho ή της ανασυνδυασμένης s-Klotho μείωσαν την επιβίωση και το μέγεθος των αποικιών των καρκινικών κυττάρων και ενίσχυσαν τα χημειοθεραπευτικά αποτελέσματα (109). Και η ομάδα του Jiang et al, ανέδειξε ότι η υψηλότερη μεθυλίωση του υποκινητή της Klotho στον παγκρεατικό πόρο του αδενοκαρκινώματος σε σύγκριση με τον φυσιολογικό παγκρεατικό ιστό επιδεινώνει την έκβαση των ασθενών (391).

11.2.4. Καρκίνος πνευμόνων

Η Klotho αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα, την ανάπτυξη, τη διεισδυτικότητα και τη μετανάστευση και προάγει την απόπτωση (404), αποτελέσματα, που εξαρτώνται από τη σηματοδότηση IGF-1R/AKT, το Wnt3a/ β -κατενίνη μονοπάτι (404) και από τη μειωμένη παραγωγή ιντερλευκίνης 6 (IL-6) και IL-8 (150).

Σε μια μελέτη του Usuda et al ασθενείς με μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα του πνεύμονα ή με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα με έκφραση της Klotho έχουν καλύτερη έκβαση από εκείνους χωρίς έκφραση της Klotho, γεγονός που υποδεικνύει ότι η Klotho μπορεί

να ένας πιθανός βιοδείκτης (405).Επιπλέον, η Klotho αυξάνει την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας, συμπεριλαμβανομένης της σισπλατίνης στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα, τροποποιώντας την οδό PI3K/AKT , υποδεικνύοντας ότι η θεραπεία με Klotho μπορεί να είναι αποτελεσματική σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες θεραπείες καρκίνου (104).

11.2.5.Καρκίνος μαστού

Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης της Klotho σε συστοιχίες ιστών του μαστού αποκάλυψε υψηλή έκφραση της Klotho σε φυσιολογικά δείγματα μαστού αλλά πολύ χαμηλή έκφραση στον καρκίνο του μαστού (390). Σε δείγματα καρκίνου, η υψηλή έκφραση της Klotho σχετιζόταν με μικρότερο μέγεθος όγκου και μειωμένη χρώση KI67 (390).

Μια ομάδα ερευνητών βρήκε υψηλή έκφραση της α- Klotho σε όλους τους φυσιολογικούς ιστούς του μαστού ,οπως και στην ήπια υπερπλασία του μαστού, αλλά η πρωτεΐνη ήταν μειωμένη στο 33% στους ιστούς με μέτρια και έντονη υπερπλασία (406).Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η ομάδα του Dallol et al η οποία κατέδειξε μειωμένο mRNA της α- Klotho σε όγκους του μαστού σε σύγκριση με τους μη καρκινικούς ιστούς (407).

Σε μια μελέτη του Ligumsky et al η ανάλυση δομής-λειτουργίας αποκάλυψε ότι οι διαφορετικοί τομείς της α- Klotho έχουν διαφορετικές ογκοκατασταλτικές δραστηριότητες στον καρκίνο του μαστού. Το KL1 και η α-KL μεμβράνης πλήρους μήκους ανέστειλαν την αποικία για σύζευξη καρκινικών κυττάρων (MCF-7 ,MDA-MB-231), καθώς επίσης αλληλεπίδρασαν με τον IGF-1R και ανέστειλαν την οδό IGF-1 (408). Ωστόσο, το KL2 δεν είχε τέτοια ογκοκατασταλτική ικανότητα. In vivo, η διαλυτή KL1 επιβράδυνε τον σχηματισμό αποικιών καρκίνου σε γυμνά ποντίκια (408) και φάνηκε ότι μόνο η KL1 ήταν επαρκής για να μεσολαβήσει για την αναστολή της ανάπτυξης του όγκου ,αλλά έδειξε μειωμένη ικανότητα για να διαμορφώσει τη σηματοδότηση του FGF23 (408).

11.2.6.Καρκίνος τραχήλου της μήτρας

Μειωμένη έκφραση της α-Klotho βρέθηκε επίσης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Δεν βρέθηκε ανιχνεύσιμη α-Klotho σε 40% των ιστών διηθητικού καρκινώματος του τραχήλου της μήτρας (147).Δεν παρατηρήθηκε έκφραση της α-Klotho στο 18,4% των ιστών αδενοκαρκινώματος και στο 4,5% των ιστών του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος, ενώ βρέθηκε υψηλή έκφραση σε όλους τους φυσιολογικούς ιστούς(409).

Φαίνεται ότι η καθοδική ρύθμιση της α- Klotho συμβαίνει στην όψιμη φάση της ογκογένεσης του τραχήλου της μήτρας. Στη μελέτη του Lee et al , όλοι οι ιστοί της χαμηλού βαθμού πλακώδους ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (LGSIL) και οι ιστοί υψηλού βαθμού πλακώδους ενδοεπιθηλιακής αλλοίωσης (HGSIL) είχαν ανιχνεύσιμη α- Klotho, ενώ στο 40% των ιστών διηθητικού καρκινώματος του τραχήλου της μήτρας δεν ανιχνεύτηκε η α- Klotho (147). Επιπλέον αναφέρθηκε ότι σε ιστούς τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας CIN III, η έκφραση της α- Klotho ήταν σχεδόν στο ήμισυ των φυσιολογικών ιστών. Εν τω μεταξύ, δεν ανιχνεύθηκε α- Klotho στους ιστούς διηθητικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (148).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η α- Klotho μεσολαβεί στην εισβολή των καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας μέσω της επίδρασης της σηματοδότησης της EMT και το Wnt μονοπάτι. Η EMT διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετάσταση και την εξέλιξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και η έκφραση της α- Klotho προκάλεσε αναστροφή της EMT στα κύτταρα του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας(410).

11.2.7.Καρκίνος ωοθηκών

Δεδομένα έδειξαν ότι η έκφραση της α- Klotho βρέθηκε επίσης μειωμένη στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών (ΕΚΩ)(45).Υψηλά επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης α- Klotho σημειώθηκαν μόνο σε 16% από τις κυτταρικές σειρές με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών(411).Δεν σημειώθηκαν ανιχνεύσιμα ή πολύ χαμηλά επίπεδα α- Klotho σε 58% από τις κυτταρικές σειρές με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών(411).

Σε μια άλλη έρευνα κύτταρα επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με διαλυτή ανθρώπινη Klotho, που κωδικοποιεί τα αμινοξέα 34-981 και έδειξαν μειωμένη βιωσιμότητα. (412)Η ομάδα της Lojkin et al βρήκε ότι τα επίπεδα mRNA της Klotho ήταν μειωμένα σε 16 από τις 19 κυτταρικές σειρές ΕΚΩ και η ανοσοϊστοχημική ανάλυση αποκάλυψε υψηλή έκφραση στις φυσιολογικές ωοθήκες και μειωμένη έκφραση σε 100 από 241 υψηλού βαθμού θηλώδεις-ορώδεις αδενοκαρκίνωμα των ωοθηκών, των σαλπίγγων και του περιτοναίου. Στην ίδια μελέτη η Klotho μείωσε την βιωσιμότητα των κυττάρων ΕΚΩ, ενίσχυσε την ευαισθησία στη σισπλατίνη και μείωσε την έκφραση των μεσεγγυματικών δεικτών.

11.2.8. Η Klotho και άλλοι καρκίνοι

Σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές μελανώματος, η ανασταλτική επίδραση των Wnt5a και της έκφρασης της Klotho φαίνεται να επηρεάζει τη μετάσταση(413).Επιπλέον, η θεραπεία των

κυττάρων μελανώματος με ανασυνδυασμένη Klotho έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την ανάπτυξη μεταστάσεων (413).

Σε μια μελέτη που αξιολόγησε τις επιδράσεις της υπερέκφρασης Klotho στον καρκίνο θυρεοειδούς, παρατηρήθηκε εξασθένηση του πολλαπλασιασμού και αυξημένη αποπτωτική δραστηριότητα (414). Χρησιμοποιώντας IHC φάνηκε ότι η ιστική έκφραση της Klotho συσχετίζεται αντιστρόφως με τον ιστολογικό βαθμό και το κλινικό στάδιο ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) (415). Οι ερευνητές υπογράμμισαν ότι η συνολική επιβίωση των ασθενών με HCC με θετική έκφραση της Klotho ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτούς με αρνητική έκφραση της Klotho (415).

Στην έρευνα του ο Zhou et al ανέδειξε ότι η υπερέκφραση της Klotho στο B -διάχυτο λέμφωμα μεγάλων κυττάρων, στις κυτταρικές σειρές, LY1 και LY8, είχαν αυξημένη απόπτωση και παρουσίασαν αναστολή του πολλαπλασιασμού τους (416). Ο Kim et al, ανακάλυψε ότι ένας πολυμορφισμός μονονουκλεοτιδίου Klotho (rs3752472) σχετίστηκε με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη (417). Παρομοίως μια άλλη έρευνα ανέδειξε ότι η μεθυλίωση στην περιοχή της νησίδας της Klotho (CpG KL-M3), που περιλαμβάνει τα 593 έως -406 bp, ευθύνεται για την καθοδική ρύθμιση του mRNA της Klotho στις κυτταρικές σειρές (DU145, PC-3) του καρκίνου του προστάτη (418).

11.3 Αντικαρκινική δράση της Klotho

Η αντικαρκινική δράση της Klotho αναδείχθηκε χρησιμοποιώντας διάφορα in vivo μοντέλα. Στο πιο διεξοδικά μελετημένο μοντέλο ξενομοσχεύματος τα καρκινικά κύτταρα μεταμοσχεύθηκαν στα πλευρά αθυμικών γυμνών ποντικών (419). Σε αυτό το μοντέλο, μετά τη μεταμόσχευση των κυττάρων, τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Klotho, όταν υπήρχε ψηλαφητός όγκος. Με τη χρήση ενδοογκικών εγχύσεων λεντοϊού με Klotho οι επιστήμονες απέδειξαν ότι η Klotho διαθέτει θεραπευτική δράση σε όγκους καρκίνου του παχέος εντέρου, σημειώνοντας τη μείωση του βάρους και του μεγέθους του όγκου (416). Παρόμοια επίδραση της Klotho καταδείχθηκε σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) (415).

Βρέθηκε ότι η Klotho παρουσιάζει επίσης προληπτική δράση στην ανάπτυξη του καρκίνου. Φάνηκε ότι το ξένο μόσχευμα με Klotho σε ποντίκια που έφεραν όγκο στο πάγκρεας (109), στο μαστό (408) και στον πνεύμονα (153), μείωσε το μέγεθος και το βάρος του όγκου. Οι όγκοι του μαστού από την ομάδα που υποβλήθηκε σε θεραπεία με Klotho εξέφρασαν λιγότερη

βιμεντίνη, Ki67 και κυτταροκερατίνη AE1/AE3, όλα ενδεικτικά μειωμένων πολλαπλασιαστικών ιδιοτήτων της Klotho στον όγκο(408).

Το δεύτερο in vivo μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού με υπερέκφραση της Klotho. Σε αυτά τα ποντίκια έγινε έγχυση καρκινικών κυττάρων και συγκρίθηκε ο σχηματισμός μεταστάσεων και το ποσοστό επιβίωσης των διαγονιδιακών ποντικών με τα ποντίκια άγριου τύπου. Διαπιστώθηκε ότι η ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά 3LL (Lewis Lung cancer) έκανε λιγότερες μεταστάσεις σε ποντίκια με υπερέκφραση Klotho και υπήρχε βελτίωση στην επιβίωση τους (153).

Έχουν γίνει επίσης έρευνες για την ανάπτυξη γονιδιακών θεραπειών με Klotho, οι οποίες είχαν ως αποτέλεσμα την μείωση του όγκου σε προ-κλινικά μοντέλα για καρκίνου στομάχου(403),παγκρέατος, εντέρου και μαστού (391).Ωστόσο, οι μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν προοπτικές στην ανεύρεση θεραπειών με την Klotho στην αντιμετώπιση του καρκίνου, όμως απαιτούνται περαιτέρω έρευνες και νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις(109).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η α-Klotho κατέχει σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγική λειτουργία των γυναικών, στην εγκυμοσύνη και στην υγεία του βρέφους.

1.Η Klotho και το αναπαραγωγικό σύστημα

Στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, η α-Klotho εκφράζεται στους ιστούς του μαστού, στις ωοθήκες, στις σάλπιγγες και στην μήτρα(73).

Λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει την έκφραση και την ρύθμιση της Klotho στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα και δεν έχουν αποσαφηνιστεί οι πραγματικές επιδράσεις της Klotho στη γυναικεία αναπαραγωγική υγεία. Όλο και περισσότερες έρευνες συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον τους στο μηχανισμό με το οποίο η Klotho εμπλέκεται στις ενδοκρινικές παθήσεις της γυναικείας αναπαραγωγικής ικανότητας. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το γονίδιο Klotho εκφράζεται στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες των γυναικών (420). Σε ζωικά μοντέλα, τα ποντίκια με ανεπάρκεια της Klotho παρουσίασαν στειρότητα και ατροφικές αλλαγές στα αναπαραγωγικά τους όργανα (1). Παρομοίως, οι γυναίκες με ενδοκρινικές παθήσεις που

εμπλέκονται στην αναπαραγωγή, παρουσιάζουν μια σειρά από σημάδια γήρανσης, όπως ατρησία των ωοθυλακίων, ανωοθυλακιόρρηξία, μειωμένη λειτουργία της ωοθηκικής εφεδρείας και πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (POF) (421). Σε μια ανασκόπηση ο Xie et al αναφέρει ότι η Klotho συσχετίζεται στενά με τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες και διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη των αναπαραγωγικών ασθενειών (422) .

Η δυσλειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση -ωοθήκες μπορεί να οδηγήσει σε μη φυσιολογική έκκριση της GnRH, της FSH ή της LH, η οποία προκαλεί την εμφάνιση ασθενειών, όπως ο συγγενής υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός (CHH), το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) και η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (POF)(422) .

Η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια είναι μια νόσος που έχει σημαντικές επιπτώσεις στην αναπαραγωγική υγεία των γυναικών και αποτελεί μια από τις βασικές αιτίες της υπογονιμότητας (423). Οι ασθενείς με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια πριν από την ηλικία των 40 ετών συχνά εκδηλώνουν μείωση της έκκρισης των ορμονών του φύλου, ανωορρηξία και περιεμμηνοπαυσιακά συμπτώματα, όπως oligομηνόρροια, αμηνόρροια και μειωμένο λίμπιντο με αποτέλεσμα τη μείωση της αναπαραγωγικής τους ικανότητας και την εμφάνιση υπογονιμότητας (424).

Η παθογένεια της πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας είναι πολύπλοκη και μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες (423).

Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι η μειωμένη έκφραση της Klotho σε ένα μοντέλο ποντικού με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια ενεργοποίησε το σηματοδοτικό μονοπάτι TGFβ/smad, το οποίο ρυθμίζει προς τα κάτω τους παράγοντες που σχετίζονται με την αυτοφαγία, όπως το Lc3 και το Beclin1 σε κοκκιοκύτταρα της ωοθήκης(425) . Στην προσπάθεια να κατανοήσει τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της επιγενετικής της πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας, η ομάδα του Liu et al επιχείρησε πείραμα με κυκλοφωσφαμίδη, το οποίο προκάλεσε σημαντική μείωση της έκφρασης της α-Klotho στα κοκκιοκύτταρα των ωοθηκών ποντικού (mOGCs)(425)

Στη μελέτη δημιουργήθηκε ένα μοντέλο πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας σε ποντίκια μέσω ενδοπεριτοναϊκής ένεσης κυκλοφωσφαμίδης (CTX)(425). Η ιστολογική εξέταση αποκάλυψε ότι τα ώριμα ωοθυλάκια εξαφανίστηκαν στον ωοθηκικό ιστό των ποντικών με POF, και υπερτέρησε ο αυξημένος αριθμός άτρητων ωοθυλακίων ($p < 0,01$). Το βάρος της ωοθήκης ήταν σημαντικά μειωμένο ($p < 0,05$) όπως μειώθηκε και η ποιότητα των κοκκιοκυττάρων των ωοθηκών ποντικού (425) . Η χρώση ανοσοφθορισμού έδειξε ότι τα κοκκιοκύτταρα των

ωοθηκών ποντίκων άγριου τύπου παρουσίαζαν υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης α-Klotho, ενώ η έκφραση της α-Klotho ήταν σημαντικά μειωμένη στα mOGCs των ποντίκων με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια . Η ίδια μελέτη ανέδειξε με qPCR και Western blot ανάλυση ότι τα επίπεδα του mRNA και τα επίπεδα πρωτεΐνης α-Klotho στα κοκκιοκυτταρα των ποντικιών με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια ήταν σημαντικά χαμηλότερα από εκείνα της ομάδας ελέγχου($p < 0,05$) . Επιπλέον, η συγκέντρωση της οιστραδιόλης (E2) στο περιφερικό αίμα των ποντικών της ομάδας POF ήταν επίσης σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη της ομάδας ελέγχου($p < 0,05$)(425) .Τα αποτελέσματα αυτά υπέδειξαν ότι η έκφραση της α-Klotho ήταν σημαντικά μειωμένη στα mOGCs των ποντικών POF(425).

Για να επικυρώσει τα αποτελέσματά της σε έναν διαφορετικό οργανισμό, η ομάδα του Liu et al επέλεξε το *C. elegans* ως ένα άλλο βιολογικό μοντέλο. Ο λόγος για τον οποίο τα *C. elegans* επιλέχθηκαν ήταν επειδή φιλοξενούν δύο γονίδια, το C50F7.10 και το E02H9.5, που είναι σε μεγάλο βαθμό ομόλογα με το γονίδιο α-Klotho στα θηλαστικά. Διαπιστώθηκε ότι η παρέμβαση του κυκλοφωσφαμίδη ανέστειλε σημαντικά διάφορες φυσιολογικές συμπεριφορές στα *C. elegans* και μείωσε τη διάρκεια ζωής τους. Ταυτόχρονα, η κυκλοφωσφαμίδη μείωσε τον ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας και τη γονιμότητα των *C. elegans*. Αυτές οι μη φυσιολογικές συνθήκες που παρατηρήθηκαν στα *C. elegans* αποδοθηκαν στην αναστολή τόσο της ενδογενούς Klotho όσο και της οδού σηματοδότησης της μακροζωίας Insulin/insulin-like growth factor-like signaling (IIS) από την κυκλοφωσφαμίδη. Η κυκλοφωσφαμίδη επιτάχυνε επίσης σημαντικά τη γήρανση και οδήγησε σε μείωση του ποσοστού εγκυμοσύνης των *C. elegans*(425).

Για να διευκρινιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο η επαγόμενη από την κυκλοφωσφαμίδη υπορρύθμιση της έκφρασης α-Klotho οδήγησε σε πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια οι ερευνητές ανέλυσαν την κατάσταση έκφρασης των πιθανών microRNAs που θα μπορούσαν να στοχεύσουν το γονίδιο Klotho (αυτά τα microRNAs ήταν δυνητικά στοχευμένα μόρια που ρυθμίζουν την έκφραση του Klotho)(425). Τα αποτελέσματα της qPCR έδειξαν ότι τρία από τα δέκα πιθανά microRNAs που στόχευαν την έκφραση του Klotho (miR-15b, miR-497-5p και miR-322) εμφάνισαν τάση αυξημένης έκφρασης στον ωοθηκικό ιστό των ποντικών με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια(425).

Τα πορίσματα της μελέτης υπέδειξαν ότι η υπερέκφραση του miR-15b επιδείνωσε την απόπτωση των κοκκιοκυτταρων των ποντικων . Η υπερέκφραση του miR-15b μείωσε το επίπεδο αυτοφαγίας στα mOGCs και μείωσε την ικανότητα απορρόφησης των αντιδρώντων ειδών οξυγόνου(ROS)(425). Τα αποτελέσματα της χρώσης ανοσοφθορισμού συμφώνησαν με εκείνα της ανάλυσης Western blot, τα οποία έδειξαν ότι το σήμα για την έκφραση της πρωτεΐνης

α- Klotho ήταν χαμηλό στα κοκκιοκύτταρα, όπως και τα σήματα για τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αυτοφαγία ήταν επίσης εξαιρετικά χαμηλά.(425).

Έτσι οι λεπτομερείς αναλύσεις αποκάλυψαν ότι η κυκλοφωσφαμίδη εξασθένησε τη λειτουργία της αυτοφαγίας των mOGCs μέσω της ρύθμισης της έκφρασης του microRNA-15b, το οποίο αποσιώπησε την ενδογενή έκφραση του mRNA της Klotho και διέγειρε τη δραστηριότητα του κατάντη μονοπατιού TGFβ1/Smad. Η μελέτη αποσαφήνισε τον υποκείμενο επιγενετικό ρυθμιστικό μηχανισμό, σύμφωνα με τον οποίο το εξαρτώμενο από την κυκλοφωσφαμίδη microRNA-15b ανέστειλε την έκφραση της Klotho. Στη συνέχεια φάνηκε ότι μειώθηκε η ικανότητα των κοκκιοκυττάρων να επάγουν την αυτοφαγία και μειώθηκε η δυνατότητα τους να καθαρίζουν τα αντιδρώντα είδη οξυγόνου (ROS), προκαλώντας έτσι πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (425).

Σε μια μελέτη του ο Ben-Aharon et al αναλύοντας συστηματικούς βιοδείκτες γήρανση στους φορείς του BRCA, διαπίστωσε ότι τα επίπεδα της Klotho ήταν χαμηλότερα στον ορό των φορέων BRCA σε σχέση με τους μη φορείς. Ωστόσο, οι διαφορές στα επίπεδα της Klotho στους φορείς δεν ήταν σημαντικές σύμφωνα με το ανεξάρτητο t-test δύο δειγμάτων που πραγματοποιήθηκε ($P>0,05$) (426).

Ο Toyama et al. αποκάλυψε τους μηχανισμούς της στειρότητας των θηλυκών ποντικών που προκαλείται από την ανεπάρκεια της α -KL και διαπίστωσε ότι ο υποδοχέας LH (LHR) και η αρωματάση P450 δεν εκφράστηκαν στην ωοθήκη, ενώ η FSH και η GnRH ήταν ικανές να αποκαταστήσουν τα ωοθυλάκια της ωοθήκης(15). Τα ποντίκια με ανεπάρκεια Klotho παρουσίασαν δυσλειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών, η οποία εκδηλώθηκε κυρίως μέσω της μείωσης της FSH και της LH, της αναστολής ωοθυλακιορρηξίας, της ατροφίας των γονάδων και της στειρότητας (15).

Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων ρυθμίζεται κυρίως από τις γοναδοτροπίνες της υπόφυσης, την FSH και την LH, οι οποίες συντίθενται στα γοναδοτρόπα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης, αποθηκεύονται σε εκκριτικά κοκκία και εκκρίνονται ως απάντηση σε σήματα GnRH από τον υποθάλαμο(427). Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων των ωοθηκών προχωρεί στο προαντρικό στάδιο ανεξάρτητα από τη ρύθμιση της γοναδοτροπίνης (427). Η περαιτέρω ανάπτυξη απαιτεί το σήμα της FSH μέσω του υποδοχέα FSH, που εκφράζεται αποκλειστικά στα κοκκιοκύτταρα (427). Το σήμα της FSH επάγει τον πολλαπλασιασμό των κοκκιοκυττάρων και την έκφραση διαφόρων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα της LH (LHR) και της αρωματάσης P450 (P450 Arom) (427). Η P450arom κωδικοποιείται από το γονίδιο Cyp19 και καταλύει στο

τελικό στάδιο της βιοσύνθεσης των οιστρογόνων από τα ανδρογόνα (15). Τα οιστρογόνα, τα οποία παράγονται από τις συνεργατικές δράσεις των κοκκώδη και στρωματικών κυττάρων, έχουν πολλές λειτουργίες που επηρεάζουν το αναπαραγωγικό σύστημα, το οστικό και το μεταλλικό μεταβολισμό (15).

Στη μελέτη του Toyama et al. διερευνήθηκαν τα θηλυκά γεννητικά όργανα των ποντικών Klotho και έγινε προσπάθεια να αποκαλυφθεί ο μηχανισμός που προκάλεσε την στειρότητα τους με ιστολογικές και μοριακές προσεγγίσεις. Τα ποντίκια Klotho παρουσίαζαν υπογοναδοτροφικό υπογοναδισμό, ο οποίος πιθανολογήθηκε ότι οφειλόταν στην έλλειψη της διέγερσης της GnRH. Για να εξετάσουν εάν οι έντονες ανωμαλίες των γονάδων στα ποντίκια Klotho οφειλόταν κυρίως σε ελαττώματα των ωοθηκών ή στην έλλειψη της GnRH απόκρισης, οι ερευνητές πραγματοποίησαν δύο τύπους πειράματα(15).

Στο πρώτο πείραμα η ομάδα του Toyama et al, εξέτασε την επίδραση της μεταμόσχευσης ωοθηκών από ομόζυγα Klotho ποντίκια και στο δεύτερο διερεύνησε τις επιδράσεις της θεραπείας με γοναδοτροπίνες. Στο πρώτο πείραμα ωοθήκες ποντικών Klotho ηλικίας 4 εβδομάδων (χρώμα agouti) μεταμοσχεύθηκαν σε ποντίκια άγριου τύπου SCID (albino). Τα ποντίκια αυτά διασταυρώθηκαν με άγριου τύπου Balb/c αρσενικά (albino). Τα ποντίκια με τις μεταμοσχευμένες ωοθήκες Klotho έδωσαν απογόνους με χρώμα τριχώματος agouti και στα έξι πειράματα. Οι απόγονοι που γεννήθηκαν από τα ποντίκια-δέκτες εξετάστηκαν για το χρώμα του τριχώματος και επιβεβαιώθηκε ο γονότυπος τους με PCR. Όλα τα μικρά Agouti έφεραν ετερόζυγη μετάλλαξη στον τόπο Klotho (-/+). Γεννήθηκαν και μικρά albino ποντίκια, οποία προερχόταν από το υπόλοιπο της ωοθήκης του δέκτη (SCID) λόγω ατελούς αφαίρεσης της(15).

Για να προσδιορίσουν τους εξωωθητικούς παράγοντες (που έλειπαν από τα ποντίκια Klotho) οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την ωρίμανση των γονάδων, οι ερευνητές εξέτασαν την απόκριση των γονάδων στις γοναδοτροπίνες. Η χορήγηση καθαρισμένης FSH και GnRH είχε επιπτώσεις στην ωρίμανση των γονάδων στα ποντίκια Klotho. Οι ωοθήκες των ποντικών Klotho που έλαβαν FSH, ανέπτυξαν ωοθυλάκια που εξέφραζαν P450arom και LHR, ενώ οι μάρτυρες που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία είχαν ελάχιστη έκφραση(15). Για να εξεταστεί κατά πόσο η πρωτεΐνη Klotho ήταν απαραίτητη για την παραγωγή ή έκκριση των γοναδοτροπίνων, η ομάδα του Toyama et al εξέτασε περαιτέρω τις επιδράσεις της GnRH στα ποντίκια Klotho. Η θεραπεία με GnRH είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω ωρίμανση των γονάδων και την ωρίμανση των ωοθυλακίων, τα οποία ήταν στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο. Οι ερευνητές παρατήρησαν ανάπτυξη της μήτρας με σημαντική αύξηση των ενδομητρικών αδένων. Οι επιδράσεις της θεραπείας με GnRH επιβεβαιώθηκαν με ανάλυση υβριδισμού in situ(15).

Τα αποτελέσματα της μελέτης απέδειξαν ότι τα θηλυκά αναπαραγωγικά όργανα των ποντικών *Klotho* ήταν λειτουργικά και ότι η ανεπάρκεια του γονιδίου *Klotho* οδήγησε στην ατροφία των αναπαραγωγικών οργάνων μέσω της εξασθένησης του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης. Συνολικά, τα ευρήματά της έρευνας αποσαφήνισαν τη συμμετοχή της *Klotho* στον ρυθμιστικό έλεγχο των ορμονών της υπόφυσης(15).

Μια μελέτη των Owen et al αποκάλυψε ότι η υπερέκφραση του FGF21 σε θηλυκά ποντίκια μπορεί να καταστείλει τον καταρράκτη σηματοδότησης αγγειοπιεστίνης-κισπεπτίνης. Η κισπεπτίνη, προϊόν του γονιδίου *Kiss1*, εκφράζεται στα τοξοειδή και στους προσθιοκοιλιακούς περικοιλιακούς (AVPV) πυρήνες του υποθαλάμου, όπου μεταδίδει τις μεταβολές της οιστραδιόλης του πλάσματος στους νευρώνες GnRH και με τη σειρά της ρυθμίζει την έκκριση γοναδοτροπινών της υπόφυσης (420). Με τον τρόπο αυτό αναστέλλεται η έκκριση της LH στον πρόδρομο, οδηγώντας σε ανωοθυλακιωρρηξία και στειρότητα (420).

Η έρευνα του Owen et al έδειξε ότι η έκθεση των θηλυκών ποντικών σε FGF21, μια ηπατοκίνη που προκαλείται από τη νηστεία, προκάλεσε στειρότητα δευτερογενώς από την πείνα. Στην μελέτη βρέθηκε ότι ο FGF21 δρα στον πυρήνα (SCN) στον υποθάλαμο για να καταστείλει τον σηματοδοτικό καταρράκτη αγγειοπιεστίνης-κισπεπτίνης, αναστέλλοντας έτσι την αύξηση της ωχρινοτρόπου ορμόνης. Φάνηκε ότι τα ποντίκια που στερούνταν του συνυποδοχέα FGF21 της β-*Klotho*, στο SCN ήταν ανθεκτικά στην ανασταλτική επίδραση του FGF21 (420).

Στη μελέτη η άμεση i.c.v. έγχυση είτε αγγειοπιεστίνης είτε κισπεπτίνης στα θηλυκά ποντίκια προκάλεσε ταχέως ένα κύμα αύξησης LH, το οποίο έδειξε ότι ο FGF21 προκαλεί υπογονιμότητα εν μέρει μέσω της εξασθένησης της παραγωγής του στο SCN, που με τη σειρά της ρυθμίζει το νευροενδοκρινικό κύκλωμα κισπεπτίνης-GnRH-LH. Οι ερευνητές ανέφεραν ότι η καταστολή της έκφρασης της αγγειοπιεστίνης στο SCN μπορεί να είναι ο μηχανισμός που ενοποιεί τις επιδράσεις του FGF21 στα κυκλοφορούντα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών, στη γυναικεία αναπαραγωγή και ενδεχομένως σε άλλες φυσιολογικές διεργασίες(420). Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι ο FGF21 μπορεί επίσης να αυξηθεί από την παχυσαρκία και πιθανώς να συμβάλλει στις αναπαραγωγικές ανωμαλίες που έχουν συσχετιστεί με το μεταβολικό σύνδρομο(420).

Έτσι, οι ερευνητές πρότειναν τον FGF21 ως ένα σημαντικό ηπατο-νευροενδοκρινικό άξονα που ρυθμίζει τη γυναικεία αναπαραγωγή ως απάντηση στη διατροφική πρόκληση, δρώντας μέσω του SCN στον υποθάλαμο και συμβάλλοντας στην καταστολή της ωοθυλακιωρρηξίας κατά τη διάρκεια της πείνας (420).

Πολλές ενδείξεις υποδηλώνουν τον ρόλο της Klotho στη ρύθμιση της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης (GH)(2). Τα ποντίκια Klotho είναι μικρότερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποντίκια άγριου τύπου και τα σωματότροπα κύτταρα τους παρουσιάζουν μειωμένο αριθμό εκκριτικών κοκκίων(1). Επιπλέον, φάνηκε ότι η Klotho είναι ένας ισχυρός αναστολέας της οδού IGF-I, ενός αρνητικού ρυθμιστή της έκκρισης της GH (428).

Στη μελέτη τους οι Shahmoon et al ανέλυσαν την επίδραση της Klotho στην έκκριση GH σε αρουραίους (GH3), σε καλλιεργημένες υποφύσεις αρουραίου και σε καλλιεργημένα ανθρώπινα αδενώματα που εκκρίνουν GH. Και στα τρία μοντέλα, η θεραπεία με Klotho αύξησε την έκκριση της GH(2). Η παρατεταμένη θεραπεία των ποντικών με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση της Klotho αύξησε τα επίπεδα του mRNA του IGF-I και του mRNA της IGF-I-δεσμευτικής πρωτεΐνης-3 στο ήπαρ, αντανakλώντας στα αυξημένα επίπεδα GH στον ορό(428).

Σε συμφωνία με την ικανότητά της να αναστέλλει την οδό IGF-I, φάνηκε ότι η Klotho αποκατέστησε εν μέρει την ανασταλτική επίδραση του IGF-I στην έκκριση της GH. Οι ερευνητές μελέτησαν καλλιέργειες βλεννογόνων αρουραίων και ανθρωπίνων αδενωμάτων και διαπίστωσαν ότι ο bFGF αύξησε την έκκριση GH και διεγείρει την φωσφορυλίωση της ERK1/2. Επιπλέον φάνηκε ότι και οι δύο επιδράσεις ενισχύθηκαν μετά από θεραπεία με Klotho (428). Συνολικά, τα δεδομένα της μελέτης απέδειξαν ότι η Klotho είναι θετικός ρυθμιστής της έκκρισης GH και υπεδείχθησαν τα μονοπάτια IGF-I και bFGF ως πιθανοί μεσολαβητές αυτής της επίδρασης. (428)

Σε μια κοόρτη του ο Xu et al συμπέρανε ότι η σηματοδότηση FGF21-β-Klotho- FGFR1 διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη βιολογία της GnRH, συνδέοντας ενδεχομένως τον μεταβολισμό με την αναπαραγωγή(429).

Ο συγγενής υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός (CHH) είναι μια σπάνια γενετική μορφή απομονωμένης ανεπάρκειας της γοναδοτροπίνης-εκλυτικής ορμόνης (GnRH) που προκαλείται από μεταλλάξεις σε πάνω από 30 γονίδια (429). Ο υποδοχέας 1 του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR1) είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στην CHH και εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την διατήρηση των νευρώνων της GnRH(429). Οι ερευνητές ανέδειξαν ότι μια μετάλλαξη του FGFR1 της CHH (p.L342S) μειώνει τη σηματοδότηση του μεταβολικού ρυθμιστή FGF21 μειώνοντας τη συσχέτιση του FGFR1 με την β-Klotho , τον υποχρεωτικό συνυποδοχέα του FGF21 (429).

Στη μελέτη πραγματοποιήθηκε γενετικός έλεγχος 334 ασθενών με CHH, ο οποίος εντόπισε επτά ετερόζυγες μεταλλάξεις με απώλεια λειτουργίας της β-Klotho σε 13 ασθενείς (4%). Οι περισσότεροι ασθενείς με μεταλλάξεις β-Klotho(9 στους 13) παρουσίασαν μεταβολικές ανωμαλίες(429). Σε ποντίκια, η έλλειψη της β-Klotho οδήγησε σε καθυστερημένη εφηβεία, τροποποιημένο οιστρογονικό κύκλο και υπογονιμότητα λόγω της υποθαλαμικής βλάβης που σχετίστηκε με την αδυναμία των νευρώνων GnRH να απελευθερώσουν GnRH σε απόκριση στον FGF21(429). Αυτό επηρέασε την δομή του συμπλόκου FGF21-β-Klotho-FGFR1 στους GnRH νευρώνες και έτσι ανέστειλε την έκκριση GnRH, με αποτέλεσμα την χαμηλή έκκριση της FSH και της LH (429). Λόγω της έλλειψης διέγερσης της FSH και της LH στην ωοθήκη, η ανάπτυξη των ωοθυλακίων καταστάληκε και αυτό οδήγησε σε ανωθυλακιορρηξία και υπογονιμότητα(429).

Στη μελέτη του ο Mao et al επικύρωσε τον ρόλο της σηματοδότησης που σχετίζεται με το Klotho στην απόπτωση των κοκκιοκυττάρων των ωοθηκών και στην ανάπτυξη του PCOS σε ζώα. Στη μελέτη μετρήθηκαν οι εκφράσεις των miR-126-5p, miR-34a, miR-199a-5p, miR-29a-5p, miR-339 και miR-556, την έκφραση της πρωτεΐνης Klotho και τα μεταγενέστερα μόρια του γονιδίου Klotho σε ανθρώπινα κοκκιοκυττάρια και σε ιστούς των ωοθηκών αρουραίων σε ένα μοντέλο με PCOS (430).

Τα microRNAs (miRNAs) είναι μια οικογένεια μονόκλωνων, μη κωδικοποιητικών μορίων RNA που έχουν μήκος περίπου 19 έως 25 νουκλεοτίδια. Τα microRNAs (miRNAs) ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε μεταμεταγραφικό επίπεδο μέσω της ειδικής πρόσδεσης σε στόχους mRNA, η οποία οδηγεί σε καταστολή της μετάφρασης ή αποικοδόμηση του mRNA¹⁰. Έχει προταθεί ότι η μη φυσιολογική έκφραση των miRNAs εμπλέκεται στην αιτιολογία του PCOS(430).

Η έρευνα του Mao et al αναφέρει ότι η έκφρασή των miR29a-5p και miR-126-5p μειώθηκε σημαντικά στα κοκκιοκυττάρια σε ασθενείς με PCOS και στους ιστούς των ωοθηκών των αρουραίων με PCOS(430). Για τον σκοπό της μελέτης συλλέχθηκαν πρωτογενή ανθρώπινα κοκκιοκύτταρα ωοθηκών από 43 ασθενείς με PCOS που είχαν ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα ανδρογόνων και από 26 υγιείς γυναίκες με αντίστοιχη ηλικία που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση. Τα κοκκιοκύτταρα συλλέχθηκαν από το ωοθυλακικό υγρό κατά τη διάρκεια της συλλογής ωαρίων (430). Η δειγματοληψία Western blot έδειξε σημαντικά υψηλότερη έκφραση της πρωτεΐνης Klotho στα κοκκιοκύτταρα από ασθενείς με PCOS σε σχέση με αυτά από τις υγιείς γυναίκες ($P < 0,001$). Η PCR πραγματικού χρόνου έδειξε ότι οι miR126-5p ($P < 0.001$) και miR-29a-5p ($P < 0.001$) ήταν σημαντικά μειωμένες σε κοκκιοκύτταρα από ασθενείς με

PCOS σε σύγκριση με τις αντίστοιχες εκφράσεις σε φυσιολογικά GCs. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις εκφράσεις των miR -199a -5p , miR -34a , miR -339 και miR -556 στα κοκκιοκύτταρα μεταξύ ασθενών με PCOS και υγιών γυναικών ($P > 0.05$) (430).

Για να εξεταστούν οι επιδράσεις της πρωτεΐνης Klotho στην κυτταρική επιβίωση και την απόπτωση, τα κοκκιοκύτταρα από 5 από υγιείς γυναίκες και 5 από ασθενείς με PCOS υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ή χωρίς 1 nM ινσουλίνης συνεπιμόλυνση με Ad-CT ή Ad-sihKlotho ¹⁰ για 48 ώρες. Οι ερευνητές για να μιμηθούν την κατάσταση αντίστασης στην ινσουλίνη στις ασθενείς με PCOS, εφαρμόσαν 1 nM ινσουλίνη, η οποία κρίθηκε ως μια υψηλή συγκέντρωση που παρομοιάζεται με αυτήν της νηστείας σε ασθενείς με PCOS (430). Η δοκιμασία έδειξε ότι η ινσουλίνη μείωσε σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων στα φυσιολογικά GC ($P < 0.01$) και στα κοκκιοκύτταρα από τις ασθενείς με PCOS ($P < .001$). Η μόλυνση με τον ¹⁰ Ad-sihKlotho αύξησε σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων στα φυσιολογικά κοκκιοκύτταρα ($P 0.01$) και σε αυτά από ασθενείς με PCOS ($P < 0.001$). Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στο ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων μεταξύ της ομάδας αποσιώπησης της Klotho σε σύγκριση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου ($P > 0.05$). (430)

Η δοκιμασία κυτταρομετρίας ροής έδειξε ότι η ινσουλίνη αύξησε σημαντικά την απόπτωση στα φυσιολογικά κοκκιοκύτταρα ($P < 0.001$) και στα κοκκιοκύτταρα από τις ασθενείς με PCOS ($P < 0.001$). Η λοίμωξη από τον ¹⁰ Ad-sihKlotho μείωσε σημαντικά την απόπτωση στα φυσιολογικά GCs ($P < .001$) και στα κοκκιοκύτταρα από ασθενείς με PCOS ($P < 0.001$). Ωστόσο, η μελέτη έδειξε ότι το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων εξακολουθούσε να είναι σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα αποσιώπησης της Klotho σε σύγκριση με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου ομάδα ($P < 0.05$). (430)

Οι συγγραφείς πρότειναν ότι οι miR-126-5p και miR-29a-5p είναι τα **ανάντη** ρυθμιστικά μόρια του γονιδίου Klotho και ότι αυτά τα 2 miRNAs μπορεί να ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου Klotho, αλλά το γονίδιο δεν έχει ανατροφοδοτικές επιδράσεις στην έκφραση των miR-126- 5p και του miR-29a-5p. Έτσι οι συγγραφείς υπογράμμισαν ότι η υπορρύθμιση του miR-126-5p και miR-29a-5p που βρέθηκε στα κοκκιοκύτταρα από ασθενείς με PCOS μπορεί να είναι η αιτία για την υψηλή έκφραση του γονιδίου Klotho σε κοκκιοκύτταρα των ωοθηκών από ασθενείς με PCOS. (430)

Η ομάδα των Mao et al δημιούργησε και ένα ζωικό μοντέλο με τρωκτικά με PCOS μετά από έγχυση δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA). Στα αποτελέσματα του ζωικού μοντέλου με PCOS, η απενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου Klotho εμπόδισε τις επιδράσεις της

DHEA στα ποσοστά εγκυμοσύνης των θηλυκών αρουραίων και στο σωματικό βάρος των νεογνών, τα οποία συνοδεύονταν από ομαλοποίηση της έκφρασης της FSH, της LH, της τεστοστερόνης και της οιστραδιόλης και του σχηματισμού κυστικών ωοθυλακίων και των ωχρού σωματίων (430).

Η απενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου Klotho μείωσε επίσης σημαντικά την απόπτωση αλλά αύξησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αντέστρεψε την αποπτωτική επίδραση της ινσουλίνης σε GCs από ασθενείς με PCOS. Έτσι, η αυξημένη έκφραση του γονιδίου Klotho στα GCs σχετίστηκε με την ανάπτυξη του PCOS. (430) Η μελέτη έδειξε επίσης ότι οι εκφράσεις των IGF- 1R, του Wnt1 και η φωσφορυλίωση Akt ήταν τα μεταγενέστερα μόρια σήματος της πρωτεΐνης Klotho. Οι συγγραφείς ανέδειξαν τη συμμετοχή της έκφρασης του γονιδίου Klotho στην απόπτωση των GCs και πρότειναν έναν καινούργιο στόχο για τη θεραπεία του PCOS (430).

Για πρώτη φορά ο Xu et al παρουσίασε μια μελέτη ασθενών -μαρτύρων , στην οποία διερεύνησε τη σχέση μεταξύ της Klotho και της μειωμένης ωοθηκικής εφεδρείας(DOR), διαπιστώνοντας ότι το χαμηλό επίπεδο της Klotho σχετίζεται με τη γήρανση τόσο στα κοκκιοκύτταρα όσο και στον ορό των γυναικών με DOR.

Η μειωμένη ωοθηκική εφεδρεία (DOR) περιγράφεται ως μια διαταραχή της ωοθηκικής λειτουργίας που χαρακτηρίζεται από μειωμένο αριθμό και ποιότητα ωαρίων, η οποία σχετίζεται με γυναικεία υπογονιμότητα, αυξημένα ποσοστά αποβολών και κακή ανταπόκριση στη διέγερση των ωοθηκών στην εξωσωματική γονιμοποίηση(431). Υπολογίζεται ότι ο επιπολασμός της DOR είναι περίπου 10% μεταξύ των νέων γυναικών και η αιτιολογία του παραμένει πολύπλοκη, περιλαμβάνοντας κυρίως ηλικιακούς, γενετικούς, ανοσολογικούς, ψυχολογικούς, περιβαλλοντικούς και ιατρογενείς παράγοντες, ωστόσο η κύρια αιτία παραμένει άγνωστη (431).

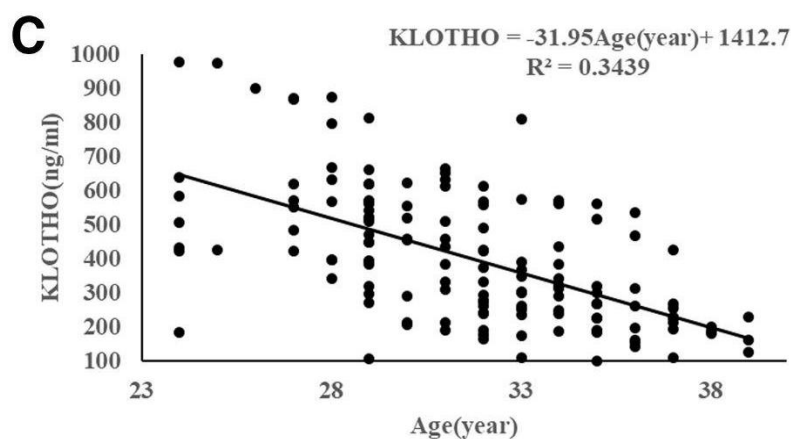
Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 157 ασθενείς κάτω των 40 ετών με διάγνωση DOR και η ομάδα ελέγχου (με φυσιολογική εφεδρεία) περιελάμβανε 159 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για IVF λόγω ανδρικού παράγοντα (431). Οι ερευνητές, διαπίστωσαν ότι οι ασθενείς με DOR ήταν μεγαλύτερες σε ηλικία, είχαν προγενέστερη ηλικία εμμηναρχής, βραχύτερους εμμηνορροϊκούς κύκλους και χαμηλότερα επίπεδα βασικής προλακτίνης, LH και ανδροστενεδιόνης τις ημέρες 2-3 του εμμηνορροϊκού κύκλου σε σύγκριση με τους μάρτυρες . Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων στον δείκτη μάζας σώματος, στην αρτηριακή πίεση, στην T ή στην P(Πίνακας 1)

Χαρακτηριστικά	DOR (n =157)	Ομάδα ελέγχου (n = 159)	P value
Ηλικία ,χρ	33 (6)	31 (5)	<0.001
ηλικία της εμμηναρχής , χρ	13 (2)	14 (1)	0.01
εμμηνορυσιακός κύκλος, ημ	28 (4)	29 (2)	<0.001
ΔΣΒ , kg/m ²	21.80 (4.14)	21.45 (3.88)	0.526
συστολική αρτηριακή πίεση., mm Hg	120 (13)	120 (16)	0.801
DBP, mm Hg	76 (11.5)	75 (12.5)	0.310
AMH, ng/mL	0.58 (0.53)	2.74 (1.73)	<0.001
PRL, mIU/L	10.89 (6.93)	12.80 (7.04)	0.028
FSH, IU/L	8.87 (4.67)	6.47 (2.05)	<0.001
LH, IU/L	3.20 (2.24)	3.95 (2.49)	0.026
Βασική E2, pmol/L	161 (110.83)	157.50 (61.50)	0.07
T, nmol/L	0 (0.00)	0 (0.00)	0.141
A, nmol/L	4.26 (2.89)	5.22 (2.98)	0.003
P, nmol/L	0.89 (1.19)	0.91 (1.32)	0.335
AFC	4.5 (3)	11 (5.25)	<0.001

Αιχμή E2, pmol/L	3,873 (3 097)	7,371 (5,878)	<0.001
------------------	---------------	---------------	--------

Πίνακας 1: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μειωμένη ωοθηκική εφεδρεία και των ασθενών ελέγχου(Xu X, Hao Y, Zhong Q, Hang J, Zhao Y, Qiao J. Low KLOTHO level related to aging is associated with diminished ovarian reserve. Fertil Steril. 2020)

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι κατά μέσο όρο, η έκφραση της Klotho μειωνόταν κατά 0,082 στα κοκκιοκύτταρα κάθε χρόνο από την ηλικία των 21 έως 39 ετών και η μείωση στον ορό ήταν κατά 31,95 pg/ml για κάθε χρόνο από την ηλικία των 24 έως 39 ετών (εικόνα 24).



Εικόνα 24: Κατανομή των έκφρασης της Klotho στον ορό ανάλογα με την ηλικία(Xu X, Hao Y, Zhong Q, Hang J, Zhao Y, Qiao J. Low KLOTHO level related to aging is associated with diminished ovarian reserve. Fertil Steril. 2020)

Οι ερευνητές διαπίστωσαν μειωμένη έκφραση της Klotho στα κοκκιοκύτταρα ($0,54 \pm 0,71$ έναντι $1,39 \pm 1,31$, $P < 0,001$) και μειωμένα επίπεδα Klotho στον ορό ($362,76 \pm 182,06$ pg/mL έναντι $442,93 \pm 206,28$ pg/mL 70 έναντι 70, $P = 0,021$) στους ασθενείς με DOR σε σύγκριση με τους μάρτυρες (431).

Με αυτή μελέτη ασθενών μαρτύρων οι συγγραφείς έδειξαν ότι η DOR μαζί με την ηλικία ήταν σημαντικοί προσδιοριστικοί παράγοντες τόσο της έκφρασης του mRNA Klotho των

κοκκιοκυττάρων (GC) όσο και των επιπέδων πρωτεΐνης Klotho στον ορό(431). Επιπλέον, το ποσοστό φυσιολογικής γονιμοποίησης ήταν σημαντικά υψηλότερο σε ασθενείς με υψηλή έναντι χαμηλής έκφρασης GC Klotho, ανεξάρτητα από την DOR (1). Ωστόσο η παρούσα μελέτη είχε αρκετές παγίδες, συμπεριλαμβανομένης της αποτυχίας να καταδειχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης Klotho στα GC και της έλλειψης επιδίωξης αιτιώδους σχέσης μεταξύ της Klotho και της DOR (431)

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι υπερβολικές ROS κατά την κρυοσυντήρηση ωθηκικού ιστού επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα των εμβρύων και το αναπτυξιακό δυναμικό λόγω της μειωμένης ποιότητας των ωθηκών και του αυξημένου κατακερματισμού του DNA (432). Ειδικότερα, τα αναπτυσσόμενα έμβρυα είναι ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες λόγω των κυτταρικών δομικών βλαβών και της έλλειψης αμυντικών μηχανισμών. Τα αντιοξειδωτικά προστατεύουν τα ωάρια από κυτταρικές βλάβες που προκαλούνται από ROS. Η Ν-ακετυλοκυστεΐνη (NAC), μια συνθετική πρόδρομη ουσία της ενδοκυτταρικής κυστεΐνης και της γλουταθειόνης, είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό (433).

Επιπλέον, η Klotho δρα ως χημικός παράγοντας μειώνοντας την απόπτωση και την κυτταρική γήρανση που προκαλείται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου στα αγγειακά κύτταρα (152).

Η ομάδα του Kim et al διερεύνησε κατά πόσο η Klotho μπορεί να αποτελέσει κρυοπροστατευτικό παράγοντα στον ωθηκικό ιστό κατά την διάρκεια διαδικασιών κατάψυξης-απόψυξης ωθηκικού ιστού(434) . Η μελέτη έδειξε ότι η Klotho προστάτευσε από μορφολογικές αλλαγές τα αρχέγονα ωθυλάκια και διατήρησε τη μορφολογία τους, γεγονός το οποίο παρατηρήθηκε μετά από εξέταση της βασικής τους στιβάδα με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης TEM. Η χρώση p16INK4a που σχετίζεται με την ηλικία έδειξε ότι η Klotho είχε αντιγηραντικές επιδράσεις στην κρυοσυντήρηση του ωθηκικού ιστού. Επιπλέον, η πρωτεΐνη Klotho ανέστειλε την επαγόμενη από την Ν-ακετυλοκυστεΐνη (NAC) απόπτωση και αυτοφαγία στον αργά κατεψυγμένο ωθηκικό ιστό (434).

Η επίδραση της πρωτεΐνης Klotho στην κρυοσυντήρηση στις κυτταρικές αλλαγές στον ωθηκικό ιστό παραμένει ασαφής. Τα δεδομένα ανοσοϊστοχημείας (IHC) και ανοσοαποτύπωσης για την αξιολόγηση των προκαλούμενων από το οξειδωτικό στρες βλαβών στο DNA και της απόπτωσης αποκάλυψαν ότι η πρωτεΐνη Klotho μπορεί να είναι ένα πολλά υποσχόμενο συντηρητικό για την κρυοσυντήρηση ωθηκικού ιστού μέσω της διαμόρφωσης του οξειδωτικού στρες(434) .

Αν και η κρυοσυντήρηση των ωοθηκών είναι μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τη διατήρηση της γονιμότητας σε γυναίκες, εξακολουθούν να υπάρχουν περιορισμοί που πρέπει να αντιμετωπιστούν(435). Οι ROS που παράγονται κατά την κρυοσυντήρηση μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και στα νουκλεϊκά οξέα (436). Οι βλάβες που προκαλούνται από τις ROS μπορούν να επηρεάσουν σοβαρά τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και να μειώσουν την αποτελεσματικότητα της κρυοσυντήρησης (436). Ωστόσο, τα κρυοπροστατευτικά μέσα στην κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στους ιστούς αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες (437). Ως εκ τούτου, όταν η κρυοσυντήρηση πραγματοποιείται με τη χρήση αντιοξειδωτικών και κρυοπροστατευτικών ουσιών, οι βλάβες στα λιπίδια, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων μειώνεται (436). Επιπλέον, οι ωσμωτικές και οι μηχανικές βλάβες που προκαλούνται από τους παγοκρυστάλλους μειώνονται επίσης, αυξάνοντας τη βιωσιμότητα, την κινητικότητα και τη γονιμότητα των κυττάρων, γεγονός που βελτιώνει την κρυοσυντήρηση (436). Ωστόσο, η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων αντιοξειδωτικών δεν έχει απαραίτητα θετικά αποτελέσματα. Οι υψηλές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών μπορεί, σύμφωνα με πληροφορίες, να επηρεάσουν αρνητικά τη δομή και τη λειτουργία των κυττάρων μετατοπίζοντας τα κύτταρα από οξειδωτικό στρες σε αναγωγικό στρες (437). Υπάρχουν δύο μέθοδοι κρυοσυντήρησης του ωοθηκικού ιστού: η αργή κατάψυξη και η υαλοποίηση.

Ωστόσο, στη μελέτη του Kim et al, πραγματοποιήθηκε αργή κατάψυξη για την κρυοσυντήρηση του ωοθηκικού ιστού για την αποφυγή βλάβης του DNA, καθώς η υαλοποίηση περιορίζεται στην κατάψυξη των ωαρίων ή των εμβρύων (434).

Διερευνήθηκαν οι επιδράσεις των αντιοξειδωτικών στην ρύθμιση του οξειδωτικού στρες, στην γήρανση, τον κατακερματισμό του DNA και την απόπτωση από την κρυοσυντήρηση του ωοθηκικού ιστού(434).

Στη μελέτη των Kim et al ο ιστός των ωοθηκών ποντικών αποψύχθηκε μετά από 4 εβδομάδες κρυοσυντήρησης. Η δόση NAC (5 mM) καθορίστηκε από μια μελέτη σχετικά με την κρυοσυντήρηση ωοθηκικού ιστού για ασθενείς με πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια που προκλήθηκε από θεραπεία καρκίνου. Η δόση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Klotho (0,4 µg/ml) προσδιορίστηκε με δοκιμή του επιπέδου ενδοτοξίνης(434). Η μορφολογία των αρχέγονων ωοθυλακίων σε κάθε ομάδα αξιολογήθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM). Η EM υψηλής ανάλυσης έδειξε ότι η δομή των μιτοχονδρίων διαταράχθηκε στον αργά κατεψυγμένο ιστό, υποδηλώνοντας ότι τα μιτοχόνδρια μπορεί να μην επιβιώνουν σε συνθήκες αργής κατάψυξης. Φάνηκε ότι η θεραπεία με NAC, πρωτεΐνη Klotho και ο

συνδυασμός τους αποκατέστησε τη μιτοχονδριακή δομή στον αργά κατεψυγμένο ωθηκικό ιστό ποντικίου. Οι ερευνητές ανέφεραν ότι η NAC και η Klotho προστάτευσαν από τις μορφολογικές αλλαγές της κρυοσυντήρησης και μείωσαν επίσης σημαντικά τη βλάβη του DNA και το οξειδωτικό στρες που προκάλεσε η μέθοδος της αργής κατάψυξης(434). Ωστόσο, η NAC αύξησε τη γήρανση του ωθηκικού ιστού και την απόπτωση, ενώ η Klotho μείωσε αυτές τις επιδράσεις. Αυτά τα δεδομένα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Klotho θα μπορούσε να προστατεύσει από το στρες που προκαλείται από την κρυοσυντήρηση ή την NAC τον ωθηκικό ιστό(434).

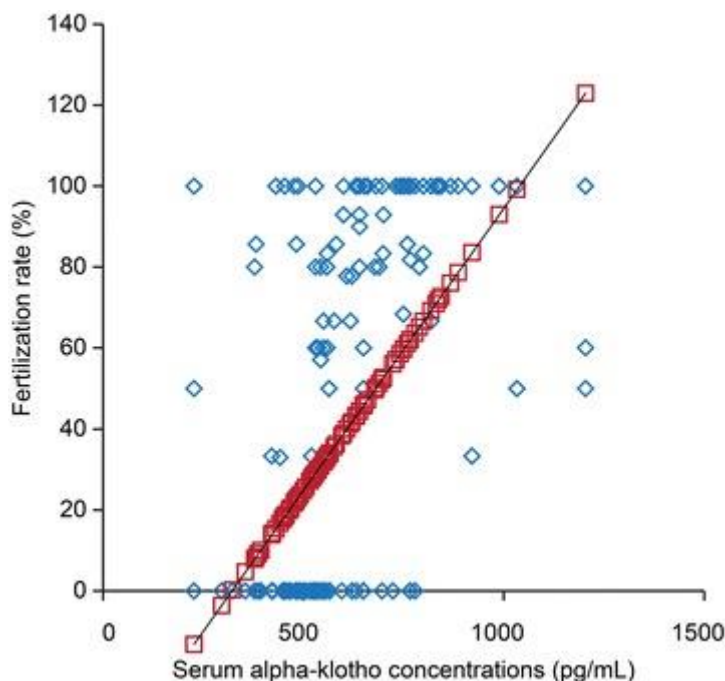
Σε μια μελέτη τους οι Shiraki-Iida et al παρατήρησαν αποκατάσταση των ωθηκών και της μήτρας, καθώς και την ωρίμανση ωθυλακίων μετά από υπερέκφραση της α-Klotho σε διαγονιδιακά ποντικά που μολύνθηκαν με αδενοϊκό φορέα (19). Τα ποντίκια Klotho που εγχύθηκαν με τον ανασυνδυασμένο αδενοϊό παρουσίασαν σημαντική παράταση της διάρκειας ζωής και αύξηση του σωματικού βάρους 1 εβδομάδα μετά τη θεραπεία. Μακροσκοπικές και ιστολογικές αναλύσεις κατέδειξαν τη βελτίωση πολλαπλών παθολογικών ευρημάτων, όπως η αποκατάσταση της ατροφίας, ο σχηματισμός και η διαφοροποίηση των κυττάρων των γονάδων, του ανοσοποιητικού ιστού και του υποδόριου λίπους (439).

Σε μια πειραματική μελέτη οι Masuda et al. τροφοδότησαν διαγονιδιακά ποντίκια Klotho με διάλυμα $ZnSO_4$ ως πόσιμο νερό αμέσως μετά τον απογαλακτισμό (3 εβδομάδων) και το σωματικό τους βάρος παρακολουθήθηκε επί 8 εβδομάδες. Στα θηλυκά ποντίκια που δεν έλαβαν αγωγή, δεν εντοπίστηκαν ώριμα γραφικά ωθυλάκια ή ωχρά σωμάτια. Τα διαγονιδιακά Klotho ποντίκια που τρέφονταν με ψευδάργυρο παρουσίασαν φυσιολογική σπερματογένεση και ώριμο σπέρμα, καθώς και ωθυλάκια σε διάφορα στάδια ωρίμανσης και ωχρά σωμάτια (86). Αντίθετα στα θηλυκά ποντίκια που δεν έλαβαν αγωγή, οι βλάβες δεν αποκαταστάθηκαν (86).

Σε μια προοπτική μελέτη κοόρτης (n=633) έδειξε ότι κατά την προεμφύτευση τόσο η ωρίμανση των ωαρίων όσο και οι ρυθμοί γονιμοποίησης μετά από κανονική ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος συσχετίστηκαν θετικά με τις συγκεντρώσεις της α-Klotho στον ορό (440).

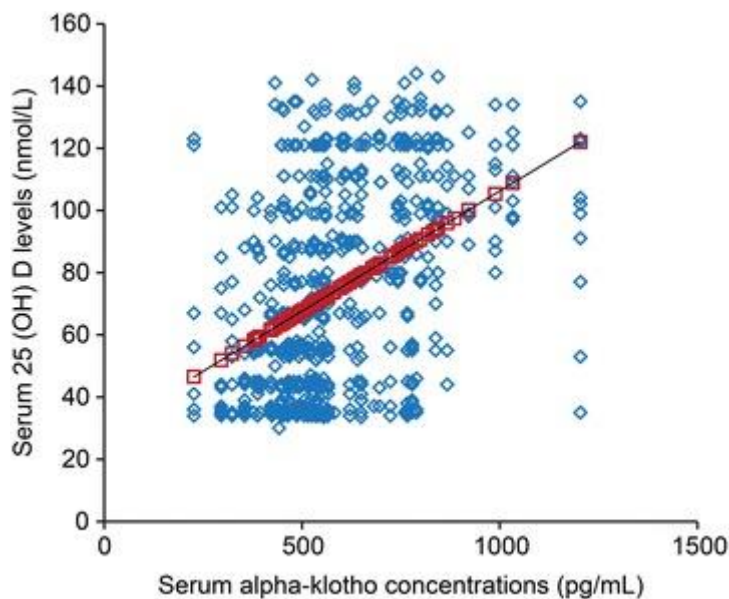
Συνολικά 633 γυναίκες υγιείς μη έγκυες γυναίκες συμμετείχαν στη μελέτη. Οι συγκεντρώσεις της α-Klotho και τα επίπεδα της vit. D3 αξιολογήθηκαν κατά τη διάρκεια της προεμφύτευσης. Οι γυναίκες υποβλήθηκαν σε πρωτόκολλο ήπιας διέγερσης με κιτρική κλομιφαίνη, συλλογή των ωθυλακίων και γονιμοποίηση με ICSI(440) .

Οι ερευνητές εκαναν συσχετίσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων α-Klotho στον ορό κατά τη διάρκεια της προεμφύτευσης, των ποσοστών γονιμοποίησης και τα ποσοστά ωρίμανσης των ωοθηλακίων. Φάνηκε ότι οι συγκεντρώσεις της α-Klotho στον ορό κατά την προεμφύτευση μειώθηκαν με τη γήρανση ($p < 0,001$), ενώ τα ποσοστά ωρίμανσης ($p < 0,001$) και τα ποσοστά γονιμοποίησης ($p < 0,001$) βελτιώθηκαν από την αύξηση των συγκεντρώσεων της α-Klotho στον ορό κατά τη διάρκεια των προεμφύτευσης(εικόνα 25)



Εικόνα 25: Συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων της α-Klotho στον ορό κατά την προεμφύτευση και το ποσοστό γονιμοποίησης. Άξονας X: συγκεντρώσεις α-Klotho στον ορό κατά την προεμφύτευση (pg/ml), άξονας Y: ποσοστά γονιμοποίησης (%). (Πηγή: Takemura T, Okabe M. Serum α-klotho concentrations during preimplantation can predict aging or quality of human oocytes and clinical pregnancy rates. Springerplus. 2016)

Η ομάδα του Takemura et al., έκανε συσχετίσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων α-Klotho στον ορό κατά τη διάρκεια της προεμφύτευσης, των κλινικών παραμέτρων (BMI) και του επιπέδου του 25 (OH)D. Ο δείκτης σωματικής μάζας συσχετίστηκε αρνητικά με τις συγκεντρώσεις της α-Klotho του ορού κατά τη διάρκεια της προεμφύτευσης ($p < 0,001$) και τα επίπεδα 25 (OH) D στον ορό σχετίστηκαν θετικά με τις συγκεντρώσεις α-Klotho στον ορό κατά τη διάρκεια της προεμφύτευσης ($p < 0,001$)(εικόνα 26).



Εικόνα 26: Συσχετίσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων της α-Klotho στον ορό κατά την προεμφύτευση και των επιπέδων 25 (OH) D στον ορό. Άξονας X: συγκεντρώσεις α-klotho στον ορό κατά την προεμφύτευση (pg/mL), άξονας Y: επίπεδα 25 (OH) D στον ορό. (Takemura T, Okabe M. Serum α-klotho concentrations during preimplantation can predict aging or quality of human oocytes and clinical pregnancy rates. Springerplus. 2016)

Στη μελέτη η μέση ηλικία της μητέρας ήταν 36,84 έτη (εύρος 30-45). Τα ποσοστά εγκυμοσύνης ήταν 33,0 % και όλες οι ασθενείς ήταν μη καπνίστριες. Επιπλέον, οι Ασιάτισσες ήταν 70,0 % (n = 443), οι λευκές γυναίκες ήταν 28,1 % (n = 178) και οι μαύρες ήταν 1,90 %. (n = 12). Οι συγκεντρώσεις της α-Klotho στον ορό κατά την προεμφύτευση μειώθηκαν με την αύξηση της ηλικίας ($p < 0,001$), ενώ οι ρυθμοί ωρίμανσης ($p < 0,001$) και τα ποσοστά γονιμοποίησης ($p < 0,001$) βελτιώθηκαν από την αύξηση των συγκεντρώσεων της α-Klotho στον ορό κατά τη διάρκεια της προεμφύτευσης.

Οι ερευνητές ανέφεραν την τιμή 593,14 pg/ml ως μέση συγκέντρωση της α-Klotho στον ορό κατά την προεμφύτευση, σύμφωνα με προηγούμενη έκθεση για την μέση τιμή στον άνθρωπο (441). Ωστόσο, όταν θεώρησαν το 550 pg/mL ως cut off για την α-Klotho που συσχετιζόταν με κλινικά ποσοστά εγκυμοσύνης, η ευαισθησία ήταν 65,0 % με 54,0 % ειδικότητα για την πρόβλεψη της επιτυχούς εγκυμοσύνης. Επιπλέον, όταν η ομάδα όρισε το cut off στα 600 pg/mL για την επίτευξη κλινικά ποσοστά εγκυμοσύνης, η ευαισθησία ήταν 81,0 % και 65,0 % ειδικότητα για την πρόβλεψη της εγκυμοσύνης.

Μέση συγκέντρωση α-Klotho για επίτευξη εγκυμοσύνης (pg/ml)	Ευαισθησία(%)	Ειδικότητα(%)
550	65	54
600	81	65
700	70	50

Πίνακας 2:Ευαισθησία και ειδικότητα για την επίτευξη εγκυμοσύνης

Όταν η ομάδα θεώρησε το όριο των 700 pg/ml για το cut off για την α-Klotho που συσχετιζόταν με τα κλινικά ποσοστά εγκυμοσύνης, η ευαισθησία ανήλθε σε 70,0 % και σε 50,0 % ειδικότητα για την πρόβλεψη της εγκυμοσύνης. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη αυτούς τους παράγοντες, οι ερευνητές πρότειναν το όριο των 600 pg/ml ως όριο για την α-Klotho που σχετίζεται με τα κλινικά ποσοστά εγκυμοσύνης στην παρούσα μελέτη(πίνακας 2).

Επιπλέον, η πολυπαραγοντική λογιστική παλινδρόμηση έδειξε ότι τα υψηλότερα επίπεδα της α-Klotho στον ορό κατά την προεμφυτευτική περίοδο συνδέονται στενά με υψηλότερα κλινικά ποσοστά εγκυμοσύνης ($P<0,001$) μετά την προσαρμογή της ηλικίας, της εθνικότητας, του δείκτη σωματικού βάρους, της ωρίμανσης των ωαρίων και του επιπέδου του $1,25(\text{OH})_2$ στον ορό (440).

Ο Guo et al πραγματοποίησαν μια πειραματική έρευνα σχετικά με την ίνωση των στρωματικών κυττάρων της μήτρας μετά από ενδομητρικό τραυματισμό και διαπίστωσαν ότι η β-Klotho διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ίνωση του ενδομητρίου και μπορεί να μεσολαβήσει την ανάπτυξη των ενδομητρίων συμφυσεων(IUA) (442).

Η ενδομήτρια προσκόλληση (IUA) αναφέρεται σε τραυματισμό της βασικής στιβάδας του ενδομητρίου, η οποία μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες και συνοδεύεται από

κλινικά συμπτώματα, όπως ανώμαλη έμμηνος ρύση, υπογονιμότητα, επαναλαμβανόμενες αποβολές και περιοδικό κοιλιακό άλγος(442).

Στη μελέτη του Guo et al ,πραγματοποιήθηκε σύγκριση με την έκφραση της β-Klotho στα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα (ESCs) από ασθενείς με ΙUA με μάρτυρες χωρίς ΙUA (442)

Ο ενδομητρικός ιστός της ομάδας μελέτης προήλθε από ασθενείς με ΙUA οι οποίες υποβλήθηκαν σε υστεροσκοπική χειρουργική επέμβαση (442). Στην ομάδα ελέγχου, ο ενδομητρικός ιστός λήφθηκε κατά τη διάρκεια της επέμβασης σε υπογόνιμες ασθενείς χωρίς νόσο της κοιλότητας της μήτρας που εξετάστηκαν με υστεροσκόπηση πριν από τη θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης(442).Για να προσδιορίσουν τη διαφορά στην έκφραση της β-Klotho στα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα των ασθενών με και χωρίς ΙUA χρησιμοποιήθηκε ανοσοφθορισμός, Western blotting και RT-qPCR ανάλυση.

Το μειονέκτημα της μελέτης ήταν η μικρή ποσότητα του ενδομητρικού ιστού που λήφθηκε από 10 ασθενείς με ΙUA και απο 10 μαρτυρες . Επειδή το δείγμα ασθενών ήταν πολύ μικρό, οι ερευνητές κατασκεύασαν ζωικά και κυτταρικά μοντέλα με ΙUA αρουραιων και διεξήγαν πειράματα επαλήθευσης της έκφρασης και λειτουργικότητας της β-Klotho.

Οι Guo et al κατασκεύασαν ένα κυτταρικό μοντέλο ΙUA χρησιμοποιώντας ανθρώπινα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα (HESCs) και χρησιμοποίησαν κολλαγόνο Ι και ινωδονεκτίνη για να επαληθεύσουν τον φαινότυπο της ίνωσης.Σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, η έκφραση του κολλαγόνου Ι και της ινωδονεκτίνης αυξήθηκε μετά τη διέγερση με TGF-β1 και παρουσίασε εξαρτώμενες από τη συγκέντρωση και διαχρονικές τάσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν τα HESC διεγείρονταν με TGF-β1 σε συγκέντρωση 10 ng/mL για 48 ώρες, η έκφραση της πρωτεΐνης β-Klotho αυξανόταν στατιστικά σημαντικά(442).

Επιπλέον φάνηκε ότι τα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα ESCs μπορούν να μετατραπούν σε μυοϊνοβλάστες υπό τη διέγερση με TGFβ1 και να συμμετάσχουν στην ενδομητρική ίνωση (443). Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η παρουσία του δείκτη ίνωσης TGF-β1, ο οποίος εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στους ιστούς του ενδομητρίου ασθενών με ΙUA ή ζωικών μοντέλων, σχετίζεται με την εμφάνιση και την ανάπτυξη της ΙUA και θεωρείται πρώιμος παράγοντας κινδύνου για υποτροπή της νόσου (443). Η υψηλή έκφραση του κολλαγόνου Ι, της ινωδονεκτίνης και της πρωτεΐνης β-Klotho ήταν εμφανής στον κυτταρικό τρόπο λειτουργίας του ΙUA που δημιουργήθηκε από τον TGFβ1 (442)

Στην παρούσα έρευνα δημιουργήθηκε και ένα ζωικό μοντέλο ΙΥΑ σε αρουραίους μετά από μηχανικό τραυματισμό. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η έκφραση της β-Klotho ήταν σημαντικά αυξημένη στα ενδομητρικά στρωματικά κύτταρα των ασθενών με ΙΥΑ των μοντέλων αρουραίων σε σύγκριση με τους ελέγχους(442). Στη μελέτη διαπίστωθηκε ότι η β-Klotho μπορεί να συμμετέχει στην ενδομητρική ίνωση και να προάγει την ΙΥΑ ενεργοποιώντας το μονοπάτι PI3K/AKT. Οπότε οι ερευνητές προτείνουν την ιδέα εύρεσης θεραπείας που μειώνει την ενεργοποίηση της β-Klotho και του μονοπατιού PI3K/AKT, για να αναστείλει τον μετασχηματισμό του ενδομητρικού στρωματικού ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες, μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την ίνωση και τον σχηματισμό ουλώδη ιστού(442)

2.Η Klotho και τα περιγεννητικά αποτελέσματα

Μελέτες αποδεικνύουν την α-Klotho ως ένα νέο ρυθμιστή στα γυναικεία αναπαραγωγικά αποτελέσματα . Η έκφραση και η επίδρασή της α-Klotho στον πλακούντα και στην εγκυμοσύνη ακόμη δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως.

Στην κύηση η α-Klotho εκφράζεται κυρίως στον πλακούντα -στην μικρολάχνη των συγκυτιοτροφοβλαστών (443), η οποία αναφέρεται ως κύρια πηγή της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (444) .Εκτός από τον συγκυτιοτροφοβλαστη οι Ohata et al με ανοσοϊστοχημική χρώση κατέδειξαν ότι η α-Klotho εκφράζεται επίσης στο ενδοθήλιο των εμβρυϊκών αγγείων και στον συνδετικό ιστό των λαχνών (445).

Η έκφραση και η σύνθεση της πρωτεΐνης α-Klotho στον πλακούντα παρουσιάζει συνεχόμενο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι η α-Klotho εμπλέκεται στην αγγειογένεση (304), στον μεταβολισμό του ασβεστίου (446), στις αντιοξειδωτικές επιδράσεις (29), στον μεταβολισμό της γλυκόζης (353), στην σηματοδότηση της ινσουλίνης (10) και στον μεταβολισμό του φωσφορικού (16).

Μια μελέτη των Miranda et al έδειξε ότι οι έγκυες γυναίκες έχουν υψηλότερο επίπεδο α-Klotho στο πλάσμα από τις μη έγκυες γυναίκες (443) και μια άλλη ερευνητική ομάδα ανέδειξε ότι το επίπεδο της α-Klotho στο πλάσμα μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας κύησης (443).

Οι αλλαγές στην έκφραση της α-Klotho κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης εγκυμοσύνης θα μπορούσαν να εξηγηθούν από δύο μηχανισμούς: με τροποποιήσεις στην έκφραση του γονιδίου της α-Klotho στη μητέρα και με την αποβολή της πρωτεΐνης από την ADAM17(που αναφέρεται

ότι υπάρχει στη συγκυτιοτροφοβλάστη)(447) και όποια ευνοήσει την απελευθέρωση της πρωτεΐνης απευθείας στη μητρική κυκλοφορία .

Οι Godang et al ανέφεραν υψηλότερη συγκέντρωση της α-Klotho στο πλάσμα του ομφάλιου λώρου των νεογνών σε σύγκριση με το πλάσμα της μητέρας στις 32-34 εβδομάδες κύησης και επιβεβαίωσαν την έκφραση της α-Klotho στον συγκυτιοτροφοβλάστη (149).

Οι Ohata et al ανακάλυψαν ότι τα επίπεδα της διαλυτής α-Klotho είναι σημαντικά αυξημένα στο αίμα του ομφάλιου λώρου στα έμβρυα σε σύγκρισή με εκείνα των νεογνών, των μητέρων και των ενηλίκων(444) .

Οι ερευνητές μέτρησαν τα επίπεδα στον ορό του ομφάλιου λώρου της διαλυτής α-Klotho και του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών 23 (FGF23) κατά τη γέννηση και τα σύγκριναν με τα αντίστοιχα επίπεδα σε νεογνά, μητέρες και ενήλικες. Στην μελέτη συμμετείχαν 21 υγιείς έγκυες γυναίκες και τα μωρά τους (n=23, συμπεριλαμβανομένων δύο ζευγαριών διδύμων) .Για σύγκριση στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν 25 υγιείς ενήλικες ηλικίας μεταξύ 27 έως 48 ετών - 11 άνδρες και 14 γυναίκες(444).

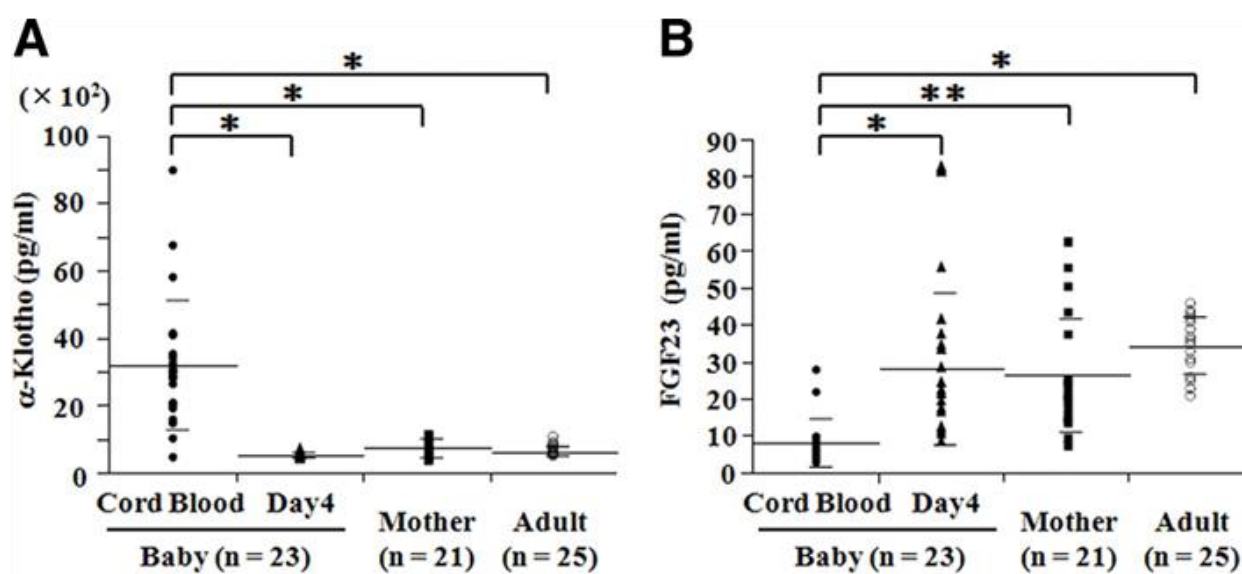
Τα επίπεδα της διαλυτής α-Klotho στο αίμα του ομφάλιου λώρου ήταν σημαντικά υψηλότερα από εκείνα των άλλων ομάδων ($P < 0,0001$)(εικονα 27Α) . Η μέση τιμή για τη διαλυτή α-Klotho στο αίμα του ομφάλιου λώρου ήταν 3243 ± 1899 pg/ml, ενώ εκείνες στο στους ορούς των νεογνών κατά την 4η ημέρα, των μητέρων και των ενηλίκων εθελοντών ήταν 582 ± 90 , 768 ± 261 και 681 ± 140 pg/ml, αντίστοιχα. Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων από νεογνά στην 4η ημέρα, μητέρες και ενήλικες(πίνακας 3) (444).

Μέση τιμή	Εμβρυα	Νεογνα	Μητερες	Εθελοντες	p value
Επιπεδο α-Klotho pg/ml	3243 ± 1899	582 ± 90	768 ± 261	681 ± 140	$P < 0,0001$
Επιπεδο FGF23 pg/ml	$8,61 \pm 6,48$	$28,4 \pm 20,5$	$26,7 \pm 15,1$	$34,6 \pm 7,69$	$P < 0,0001$

Πίνακας 3 :Τα επίπεδα της διαλυτής α-Klotho και του FGF23 στο αίμα του ομφάλιου λώρου,στα νεογνα,στις μητερες και στους εθελοντες

Στη μελέτη τους οι Miranda et al βρήκαν ότι η διάμεση συγκέντρωση της α-Klotho στο πλάσμα σε μη έγκυες γυναίκες μετρήθηκε σε 930 (660-1258) pg/ml και όταν παρόμοια με εκείνη που αναφέρεται σε γυναίκες 24 ώρες μετά τον τοκετό (768 ± 261 pg/ml) , υποδεικνύοντας ότι μετά την εξαγωγή του πλακούντα, η συγκέντρωση της α-Klotho στο πλάσμα της μητέρας επιστρέφει στα επίπεδα της πριν από την εγκυμοσύνη (448).

Από την άλλη πλευρά, στη μελέτη του Ohata et al τα επίπεδα του FGF23 στο αίμα του ομφάλιου λώρου ήταν σημαντικά χαμηλότερα από εκείνα των άλλων ομάδων - $P < 0,0001$, έναντι νεογνού και ενήλικα- $P < 0,0005$, έναντι μητέρας(εικονα 27B). Η μέση τιμή για τον FGF23 στο αίμα του ομφάλιου λώρου ήταν $8,61 \pm 6,48$ pg/ml, ενώ εκείνες στα νεογνά, στις μητέρες και στους ενήλικες εθελοντές ήταν $28,4 \pm 20,5$, $26,7 \pm 15,1$ και $34,6 \pm 7,69$ pg/ml, αντίστοιχα (πινακας 3)(444).



Εικονα 27:Α και Β, Σύγκριση των επιπέδων διαλυτής α-Klotho (Α) και FGF23 (Β) στον ορό μεταξύ των ομάδων αίματος ομφάλιου λώρου, νεογνού στην 4η ημέρα, μητέρας και ενήλικων εθελοντών με ANOVA. *, $P < 0,0001$ - **, $P < 0,0005$. Οι κλειστοί κύκλοι, τα τρίγωνα, τα τετράγωνα και οι ανοιχτοί κύκλοι υποδηλώνουν τις τιμές για τις ομάδες αίματος ομφάλιου λώρου, νεογνού, μητέρας και ενήλικων εθελοντών, αντίστοιχα. Οι μακριές και οι κοντές ράβδοι αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή και την SD, αντίστοιχα(Πηγη:Ohata Y, Arahori H Circulating levels of soluble alpha-Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood. J Clin Endocrinol Metab 2011)

Οι ερευνητές συμπεράναν ότι το χαμηλότερο επίπεδο διαλυτής α-Klotho στα νεογνά (στην 4η ημέρα) σε σύγκριση με αυτό στο αίμα του ομφάλιου λώρου υποστηρίζει την ιδέα ότι η πρωτεΐνη προέρχεται από το πλακούντα (444).

Σε αντίθεση με τα υψηλά επίπεδα της διαλυτής α -Klotho, η μελέτη ανέδειξε ότι τα επίπεδα του FGF23 στο αίμα του ομφάλιου λώρου ήταν χαμηλότερα από εκείνα των άλλων δειγμάτων, γεγονός οποίο υποδηλώνει ότι ο FGF23 στο αίμα της μητέρας πιθανώς δεν μεταφέρεται στο

έμβρυο μέσω του πλακούντα. Οι Ohata et al διαπίστωσαν αρνητική συσχέτιση μεταξύ της α-Klotho και των επιπέδων του FGF23 στα δείγματα ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Μετά από ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης οι ερευνητές επιβεβαίωσαν ότι η διαλυτή α-Klotho ήταν ένας από τους καθοριστικούς παράγοντες των επιπέδων των φωσφορικών αλάτων. Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι το επίπεδο ασβεστίου μπορεί επίσης να σχετίζεται με εκείνο της α-Klotho, αν και η τιμή του P value ήταν $< 0,07$ (444)

Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα αποτελέσματα των Ohata et al επισημαίνει ότι η διαλυτή α-Klotho μπορεί να συμβάλλει επίσης και στον μεταβολισμό του ασβεστίου της εμβρυομητρικής μονάδας. Στον άνθρωπο, μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα έκφρασης της α-Klotho σχετίζονται με την ηλικία και αρχίζουν να μειώνονται όταν το άτομο φτάσει τα 40 έτη της ηλικίας του (449) Μια πειραματική μελέτη του Chen et al αναφέρει την συμμετοχή της α-Klotho στην γήρανση του πλακούντα που σχετίζεται με την προχωρημένη ηλικία της μητέρας (450). Η ηλικία των 35 ετών και άνω κατά τη στιγμή του τοκετού έχει οριστεί ως προχωρημένη ηλικία της μητέρας (AMA) (451).

Τις τελευταίες δεκαετίες, η επίπτωση των κυήσεων με (AMA) έχει αυξηθεί ραγδαία λόγω κοινωνικοοικονομικών παραγόντων και βελτιωμένων τεχνολογιών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (452). Οι εγκυμοσύνες των γυναικών με προχωρημένη ηλικία έχουν υψηλότερο κίνδυνο δυσμενών περιγεννητικών αποτελεσμάτων, όπως την απώλεια εμβρύων, πρόωρο τοκετό, χαμηλό βάρος γέννησης και προεκλαμψία, τα οποία πιστεύεται ότι οφείλονται στην πρόωρη γήρανση του πλακούντα και τη συνακόλουθη δυσλειτουργία του (453).

Ο πλακούντας γερνάει καθώς προχωρά η εγκυμοσύνη, ωστόσο η συνεχής λειτουργία του απαιτείται για μια επιτυχή έκβαση της εγκυμοσύνης. Η γήρανση του πλακούντα είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο, ωστόσο υπάρχουν ορισμένοι πλακούντες που εμφανίζουν σημάδια γήρανσης νωρίτερα από άλλους. Η πρόωρη γήρανση του πλακούντα εμπλέκεται σε μια σειρά από δυσμενείς εκβάσεις της εγκυμοσύνης, συμπεριλαμβανομένου του περιορισμού της εμβρυϊκής αύξησης, της προεκλαμψίας, του αυτόματου πρόωρου τοκετού, και τον ενδομήτριο εμβρυϊκό θάνατο (453). Έχουν γίνει έρευνες για τον ρόλο της φυσιολογικής γήρανσης του πλακούντα και πώς η ανώμαλη γήρανση του πλακούντα μεταβάλλει τη λειτουργία του πλακούντα, συμβάλλοντας στην παθοφυσιολογία του περιορισμού της εμβρυϊκής ανάπτυξης, της προεκλαμψίας (454), του αυτόματου πρόωρου τοκετού και του ανεξήγητου εμβρυϊκού θανάτου (455).

Στοιχεία μελετών υποστηρίζουν ότι η γήρανση είναι παρούσα στον φυσιολογικό συγκυτιοτροφοβλάστη και περιλαμβάνει την υψηλή λυσοσωμική πυκνότητα, δραστηριότητα που υποδεικνύεται από την χρώση με β-γαλακτοσιδάση, την αυξημένη έκφραση της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης, p53, p21, και p16- και την παρουσία συγκιτιακών κόμβων(456). Ερευνητές κατέδειξαν ότι οι δείκτες γήρανσης αυξάνονται σε φυσιολογικούς πλακούντες ως συνάρτηση της πρόοδο της ηλικίας κύησης και του πρόωρου τοκετού (457).Οι πλακούντες ασθενών με προεκλαμψία παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση της p53, p21 και p16, μικρότερα τελομερή, και μειωμένη δραστηριότητα τελομεράσης(457).

Στη μελέτη τους οι Chen et al δημιούργησαν ποντίκια με ανεπάρκεια α-Klotho με την έγχυση αδενοϊού παρεμβολής της Klotho (AdKlotho) και διερεύνησαν κατά πόσον η α-Klotho είναι καθοριστικός παράγοντας της γήρανσης στους πλακουντιακούς τροφοβλάστες ,δημιουργώντας ανθρώπινη κυτταρική σειρά χοριοκαρκινώματος (JAR) και πραγματοποιώντας δοκιμασίες transwell για την αξιολόγηση της εισβολής των τροφοβλαστών.(450)

Η αφαίρεση της α-Klotho είχε ως αποτέλεσμα όχι μόνο φαινότυπο γήρανσης και απώλεια της διεισδυτικότητας στα κύτταρα JAR, αλλά και μείωση της μεταγραφής των γονιδίων των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης . Η υπερέκφραση της α-Klotho βελτίωσε σημαντικά την εισβολή αλλά δεν άλλαξε την έκφραση των βιοδεικτών γήρανσης(450).

Τα ποντίκια με ανεπάρκεια α-Klotho παρουσίασαν δυσμορφία του πλακούντα και, κατά συνέπεια, χαμηλότερο βάρος πλακούντα και εμβρύου(450).

Οι άνθρωποι πλακούντες από εγκυμοσύνες με AMA παρουσίασαν σημαντικά αυξημένη έκφραση πολλαπλών γνωστών βιοδεικτών γήρανσης, συμπεριλαμβανομένων των p53($p < 0.05$), p21($p < 0.01$) και p16($p < 0.01$), σε σύγκριση με τους πλακούντες ελέγχου(450)Συνεπώς η προχωρημένη ηλικία της μητέρας οδήγησε σε μειωμένη έκφραση της α-Klotho στους πλακουντιακούς τροφοβλάστες, οδηγώντας έτσι σε πρόωρη γήρανση και απώλεια της εισβολής .Η διαδικασία της υπορρύθμισης των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης τελικά προκάλεσαν δυσμενή προγεννητικά αποτελέσματα, διάμεσου της δυσμορφίας του πλακούντα(450).

Οι Chen et al διαπίστωσαν ότι η έλλειψη της α-Klotho προάγει την πρόωρη γήρανση, όπως φάνηκε από την αυξημένη έκφραση των p53 και p21.(450) Είναι ενδιαφέρον ότι η έκφραση της p16 στα κύτταρα Sh-KL JAR δεν παρουσίασε την ανύψωση που παρατηρήθηκε στον πλακούντα των γυναικών με AMA, πιθανώς επειδή η p21 είναι **κατάντη** της p53 και επομένως εκφράζεται αντίστοιχα για να μεσολαβήσει στη μη αναστρέψιμη βλάβη του DNA και την

συντόμευση των τελομερών και να συμβάλει επιπλέον στην σταθερότητα και την διατήρηση της κυτταρικής γήρανσης..

Παρ' όλα αυτά, η χρήση μόνο των κυττάρων JAR ,αντί βλαστοκυττάρων αποτέλεσε περιορισμό στη μελέτη.

2.1.Η Klotho και η προεκλαμψία

Ανώμαλη έκφραση της α-Klotho παρατηρήθηκε σε ορισμένες επιπλοκές της εγκυμοσύνης, όπως στην προεκλαμψία (458).

Η υπερτασική διαταραχή της μητέρας είναι μια ομάδα ασθενειών που περιλαμβάνει την προεκλαμψία (ΠΕ), την εκλαμψία, την υπέρταση της κύησης και την χρόνια υπέρταση (459). Η προεκλαμψία είναι η πιο συχνή υπερτασική διαταραχή της εγκυμοσύνης, η οποία επιπλέκει περίπου το 2-8% των κυήσεων, ανάλογα με τους πληθυσμούς που μελετώνται και είναι μία από τις κύριες αιτίες μητρικής και περιγεννητικής νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως (460).

Στην ανασκόπηση του ο Jung et al , αναφέρει την προεκλαμψία ως ένα από τα "μεγάλα μαιευτικά σύνδρομα" στα οποία πολλαπλές και ενίοτε αλληλεπικαλυπτόμενες παθολογικές διεργασίες ενεργοποιούν ένα κοινό μονοπάτι που αποτελείται από την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, την ενδοαγγειακή φλεγμονή και το στρες των συγκυτιοτροφοβλαστών(461). Στην πειραματική μελέτη των Sunakov et al αναφέρθηκαν νέες ενδείξεις ότι οι επιγενετικοί δείκτες και οι δείκτες γήρανσης υποδεικνύουν μια επιταχυνόμενη κατάσταση γήρανσης σε γυναίκες με προεκλαμψία(462)

Η κυτταρική γήρανση, οφείλεται σε ένα μη αναστρέψιμο μηχανισμό διακοπής του κυτταρικού κύκλου (463). Έχει αποδεχτεί ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες, αυτός ο μηχανισμός αποτρέπει τη ζωή των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη του DNA και οξειδωτικό ή μεταβολικό στρες. Κάτω από παθολογικές συνθήκες, το φορτίο των γερασμένων κυττάρων συσχετίστηκε με μεταβολικές διαταραχές και λειτουργική έκπτωση σε διάφορα όργανα και ιστούς με τη μεσολάβηση του p16 INK4A και p21, CIP1 καθώς και με απελευθέρωση προφλεγμονωδών δεικτών όπως Ιντερλευκίνη (IL)-6, IL -8, μονοκυτταρική χημειοελκυστική πρωτεΐνη 1 (MCP-1) και αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου 1 (PAI-1)], που σχετίζονται με τη γήρανση (SASP) (463).

Για τον σκοπό της μελέτης οι ερευνητές πραγματοποίησαν μια σειρά πειραμάτων συγκρίνοντας γυναίκες με ΠΕ έναντι εγκυμοσύνες με φυσιολογική πίεση σε σχέση με επιγενετικούς δείκτες γήρανσης και δείκτες γήρανσης σε ιστούς και όργανα που επηρεάζονται από την ΠΕ. Έγιναν αναλύσεις αίματος και ούρων, πραγματοποιήθηκαν βιοψίες λιπώδους ιστού και εξετάστηκαν ιστολογικά νεφρικές τομές αυτοψίας (462).

Τρεις ξεχωριστές κοορτές ασθενών χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση των υποθέσεων .

Στην μια κοόρτη για να εξετάσουν την επιγενετική γήρανση σε σχέση με την ΠΕ, οι ερευνητές ανέλυσαν το προφίλ αίματος από δείγματα γυναικών με ΠΕ ($n = 11$) και νορμοτασικές γυναίκες ($n = 33$) κατά τη διάρκεια πρώτου και δεύτερου τριμήνου της εγκυμοσύνης, καθώς και κατά τη στιγμή της τοκετού. Πρέπει να σημειωθεί ότι όλες οι γυναίκες αυτής της διαχρονικής κοόρτης εμφάνισαν όψιμη ΠΕ(462).

Σε μια άλλη συγχρονική μελέτη στρατολογήθηκαν γυναίκες με ΠΕ ($n = 8$) και γυναίκες με ανεπίπλοκες εγκυμοσύνες($n = 8$) και στην καισαρική τομή ελήφθησαν δείγματα κοιλιακού λιπώδους ιστού, από τα οποία απομονώθηκαν μεσεγχυματικά βλαστοκυττάρια(MSC). Στην τρίτη κοόρτη εξετάστηκαν νεφρικοί ιστοί αυτοψίας από έγκυες γυναίκες που πέθαναν από ΠΕ ή από τις επιπλοκές της ($n = 5$) ,όπως και από γυναίκες που απεβίωσαν από τυχαία αίτια κατά τη διάρκεια ανεπιπλεκτής εγκυμοσύνης ($n = 3$)(462).

Για να εξεταστεί η επιταχυνόμενη κατάσταση γήρανσης που παρατηρείται στην ΠΕ, οι ερευνητές ανέλυσαν τους κυκλοφορούντες δείκτες κυτταρικής γήρανσης, p16INK4A και p21CIP1,οποιοι μετρήθηκαν στην ΠΕ και σε ένα υποσύνολο νορμοτασικών γυναικών ($n = 13$) από την παραπάνω ομάδα. Οι γυναίκες με ΠΕ είχαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις των p16INK4A στο πλάσμα σε σύγκριση με τις αντίστοιχες νορμοτασικές γυναίκες ($P = 0,026$). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των p21CIP1 στις γυναίκες με ΠΕ ($P = 0,167$)(462).

Στη μελέτη μετρήθηκε η α-Klotho στα ούρα τόσο σε γυναίκες με ΠΕ όσο και σε γυναίκες με φυσιολογική πίεση και παρατηρήθηκε ότι οι γυναίκες με ΠΕ είχαν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις της α-Klotho ($P = 0,029$) συγκριτικά με τις φυσιολογικές κυήσεις. Σημαντικές αυξήσεις των παραγόντων γήρανσης βρέθηκαν στις κυήσεις με ΠΕ, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα νευρωνικής ανάπτυξης (NGF) ($P = 0,034$), του MCP-1 ($P = 0,047$) και του PAI-1 ($P = 0,023$)(462).

Σημαντικές αυξήσεις στους δείκτες γήρανσης στον λιπώδη ιστό βρέθηκαν στις κυήσεις με ΠΕ για τους παράγοντες SASP, MCP-1 και TNF- α ($P = 0,023$ και $P = 0,015$) υποδηλώνοντας αυξημένη φλεγμονή του λιπώδους ιστού(462).

Στη μελέτη των Suvakov et al αναδείχτηκε ότι η επιταχυνόμενη γήρανση επηρεάζει τους νεφρούς των εγκύων γυναικών με ΠΕ. Οι ερευνητές πραγματοποίησαν p16 INK4A χρώση τμημάτων νεφρού και λιπώδους ιστού, με αυξημένη χρώση πυρήνων και στους δύο τύπους ιστών και φάνηκε ότι η έκφραση P16 INK4A+ αυξήθηκε σημαντικά στις γυναίκες με προεκλαμψία σε σύγκριση με τα αντίστοιχες νορμοτασικές κυήσεις, τόσο στον λιπώδη ιστό ($P = 0,043$) όσο και στις νεφρικές τομές ($P = 0,034$)(462).

Η μελέτη απέδειξε ότι η νεφρική βλάβη (ένα από τα βασικά κλινικά ευρήματα στην ΠΕ) σχετίζεται με την κυτταρική γήρανση, όπως τεκμηριώνεται από την αύξηση της ρύθμισης του p16 INK4A σε νεφρικές τομές από γυναίκες που πέθαναν από ΠΕ και από την μείωση της ρύθμισης της α -Klotho στα ούρα κατά την στιγμή του τοκετού σε γυναίκες με ΠΕ σε σύγκριση με εκείνες στις νορμοτασικές εγκυμοσύνες(462).

Το επίπεδο της α -Klotho στο πλάσμα της μητέρας είναι επίσης διαφορετικό σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες από τις κυήσεις που εμπλέκονται με προεκλαμψία. Ωστόσο, τα υπάρχοντα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα.

Οι Fan et al πραγματοποίησαν μια διατομεακή μελέτη για να μετρήσουν την έκφραση της α -Klotho στον πλακούντα, την έκκρισή της στον ορό της μητέρας και του ομφάλιου λώρου αναλύοντας συγχρόνως τις συσχετίσεις μεταξύ του επιπέδου της α -Klotho και άλλων παραμέτρων στην φυσιολογική εγκυμοσύνη και στην εγκυμοσύνη με προεκλαμψία.

Οι ερευνητές έλεγξαν τον ΔΜΣ της μητέρας πριν από την εγκυμοσύνη και μέτρησαν την έκφραση της α -Klotho στον πλακούντα, τον ορό της μητέρας και του ομφάλιου λώρου και διερεύνησαν τις συσχετίσεις μεταξύ της α -Klotho και του βάρους γέννησης του εμβρύου καθώς και της νεφρικής λειτουργίας της μητέρας και προσδιόρισαν εάν το επίπεδο της α -KL συσχετίζεται με το οξειδωτικό στρες στην ΠΕ(464). Για τον σκοπό της μελέτης στρατολογήθηκαν 42 έγκυες γυναίκες, οι οποίες χωρίστηκαν σε δυο ομάδες-στην πρώτη ομάδα συμπεριλήφθηκαν 23 γυναίκες με ανεπíπλεκτη εγκυμοσύνη και στη δεύτερη -19 γυναίκες με ΠΕ (464).

Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν η ηλικία, το βάρος, το ύψος, η ηλικία κύησης, η αύξηση του βάρους στην κύηση, το βάρος γέννησης του εμβρύου και το σκορ Apgar. Οι βιοχημικές

παράμετροι, όπως η ολική πρωτεΐνη , η αλβουμίνη , η κρεατινίνη ορού και το ουρικό οξύ , συλλέχθηκαν από το αρχείο κλινικών εξετάσεων των γυναικών και πραγματοποιήθηκε λήψη περιφερικού αίματος της μητέρας και ομφαλοπλακουντιακού αίματος από τον ομφάλιο λώρο αμέσως μετά τον τοκετό για τον προσδιορισμό της α-Klotho.(464).

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η ηλικία, ο ΔΜΣ πριν από την εγκυμοσύνη και ο τόκος ήταν συγκρίσιμα μεταξύ των δύο ομάδων. Η μέση ηλικία κύησης των γυναικών με ΠΕ ήταν χαμηλότερη από αυτήν της φυσιολογικής εγκυμοσύνης ($P=0,008$) και τα νεογνά στην ομάδα με την ΠΕ είχαν χαμηλότερο βάρος γέννησης ($P=0,0002$)(πίνακας 4).

Παράμετροι	Φυσιολογικές κυήσεις (n=19)	Κυήσεις με ΠΕ (n=23)	P value
Ηλικία(γ)	28.3±3.0	28.6±5.6	0.66
Τόκος	1.2±0.56	1.2±0.60	0.86
ΔΜΣ προ εγκυμοσύνης (kg/m ²)	21.3±3.0	21.7±4.0	0.76
Αύξηση βάρους κατά την κύηση (kg)	16.97±7.33	16.65±5.58	0.19
Ηλικία κύησης (εβδομάδες)	39.1±1.6	36.6±2.8	0.008

Βάρος γέννησης του εμβρύου (g)	3439±505	36.6±2.8	0.0002
Apgar score	8.95±0.23	8.09±1.12	0.0000

Πίνακας 4. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των υποκειμένων (Πηγή: Fan C, Wang Y, Wang J, Lei D, Sun Y, Lei S, Hu M, Tian Y, Li R, Wang S. Clinic significance of markedly decreased α-klotho in women with preeclampsia. Am J Transl Res. 2016)

Η PCR πραγματικού χρόνου έδειξε σημαντικά χαμηλότερο επίπεδο του mRNA του Klotho στον ιστό του πλακούντα των γυναικών με ΠΕ (($p < 0.05$) σε σύγκριση με τις μη επιπλεγμένες εγκυμοσύνες και η ανάλυση Western blot έδειξε ότι το επίπεδο έκφρασής της α-Klotho ήταν επίσης σημαντικά μειωμένο στις κυήσεις με ΠΕ($p < 0.05$)(444).

Οι εξερευνητές διαπίστωσαν ότι το επίπεδο της α-Klotho στον ορό του ομφάλιου λώρου ήταν σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με εκείνο στον μητρικό ορό , ενώ η συγκέντρωση της α-Klotho στον ομφάλιου λώρου και στον μητρικό ορό είχαν θετική συσχέτιση ($r^2=0,145$, $p=0,0098$) . Στην ομάδα με την ΠΕ, τα επίπεδα της α-Klotho ήταν χαμηλότερα στον ορό της μητέρας και στον ομφάλιο λώρο και τα νεογνά είχαν χαμηλότερη βαθμολογία Apgar ($P=0,000$) σε σύγκριση με αυτά των φυσιολογικών κυήσεων(464)(πίνακας 4).

Στη μελέτη, οι ερευνητές έλεγξαν τον ΔΜΣ της μητέρας πριν από την εγκυμοσύνη και διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση της α-Klotho (συμπεριλαμβανομένου του ορού της μητέρας και του ορού του ομφάλιου λώρου) συσχετίστηκε θετικά με το βάρος γέννησης των εμβρύων, τόσο στην ομάδα φυσιολογικών όσο και στην ομάδα της ΠΕ(464)

Τύπος Δείγματος	Παράμετροι	NC(n=23)	PE(n=19)	PValue
Μητρικός ορός α-KL (pg/ml)		951.2±323.9	579.0±228.4	0.0000
	Ολική πρωτεΐνη	63.3±4.4	59.9±7.6	0.126
	Αλβουμίνη	33.5±3.2	28.9±5.3	0.011

	Ουρία	3.1±0.6	3.8±1.5	0.038
	Κρεατινίνη ορού	46.7±9.1	55.4±11.2	0.016
	Ουρικό οξύ	320.6±68.6	368.5±104.9	0.1234
	Ca	2.6±0.1	2.1±0.1	0.049
	Διορθωμένο Ca	3.0±0.4	2.8±0.2	0.071
Ορός ομφαλίου λώρου	α-KL (pg/ml)	1949±328.3	1617±428.7	0.0000

Πίνακας 5 :Οι πρωταρχικές βιοχημικές παράμετροι στην εργασία του Fan C, Wang Y, Wang J, Lei D, Sun Y, Lei S, Hu M, Tian Y, Li R, Wang S. Clinic significance of markedly decreased α-klotho in women with preeclampsia. Am J Transl Res. 2016

Η συγκέντρωση της α-Klotho στον ορό της μητέρας και η κρεατινίνη ορού συσχετίστηκαν αρνητικά. Οι αναλύσεις των Fan et al αποκάλυψαν ότι η συγκέντρωση της α-Klotho στον ορό της μητέρας συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με την κρεατινίνη τόσο στην φυσιολογική εγκυμοσύνη ($r^2=0,192$) όσο και στην ΠΕ ($r^2=0,233$) . Παρόμοια συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ του επιπέδου της α-Klotho και της ουρίας στην ομάδα με την ΠΕ ($r^2=0,163$) αλλά όχι στις φυσιολογικές κυήσεις ($r^2=0,003$) .Έτσι, η α-Klotho προτάθηκε ως ένας προγνωστικός δείκτης της νεφρικής λειτουργίας στην εγκυμοσύνη με ΠΕ, διότι η κρεατινίνη και η ουρία είναι δύο βιοδείκτες της νεφρικής λειτουργίας (464)(πίνακας 5).

Οι Fan et al διαπίστωσαν ότι η α-KL ορού συσχετίστηκε σημαντικά με την κρεατινίνη και με την ουρία και τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η ανίχνευση της νεφρικής λειτουργίας θα μπορούσε να αναφέρεται στη συγκέντρωση της α-Klotho. Αν και ο μηχανισμός που διέπει τον τρόπο με τον οποίο η α-Klotho επηρεάζει τη νεφρική λειτουργία δεν είναι πλήρως κατανοητός, μια πιθανή εξήγηση ήταν ότι η αυξημένη νεφρική έκφραση της α-Klotho μπορεί να επηρεάσει το νεφρικό οξειδωτικό στρες και να οδηγήσει σε νεφρική δυσλειτουργία (465).

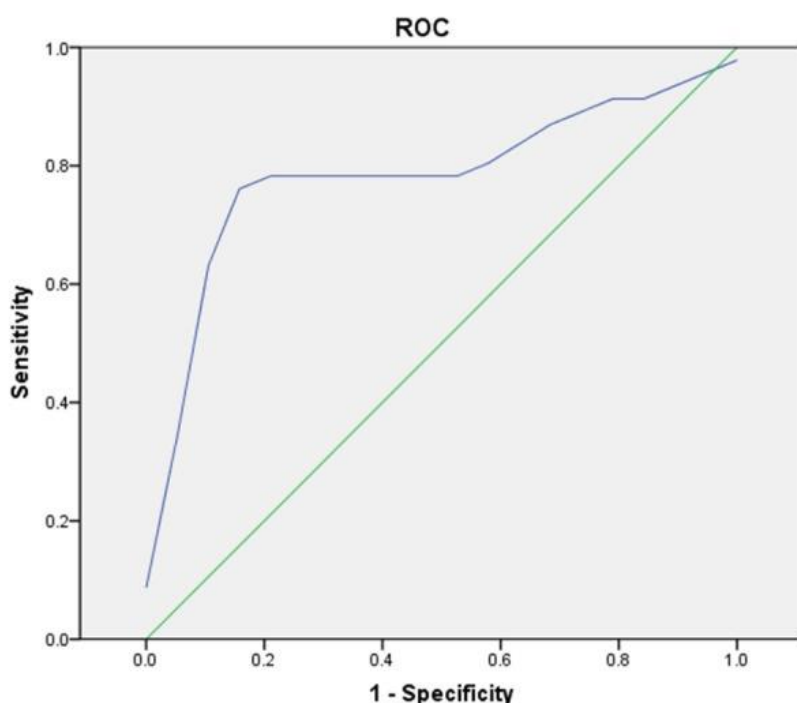
Είναι τεκμηριωμένο ότι το αυξημένο οξειδωτικό στρες έχει μεγάλο αντίκτυπο στην ανάπτυξη της ΠΕ και ότι η εμφάνιση της ΠΕ επιδεινώνει επίσης το οξειδωτικό στρες .Η συγκέντρωση του υπεροξειδίου των λιπιδίων στη μικροκυτταρική μεμβράνη μπορεί να ποσοτικοποιηθεί ως μαλονδιαλδεϋδη (MDA) (464).

Η α-Klotho μπορεί να διαδραματίσει ρόλο κατά τη διάρκεια των επιπλοκών της εγκυμοσύνης λόγω της λειτουργίας της στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου και της προστασίας έναντι της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και του οξειδωτικού στρες.

Όσον αφορά το ενδεχόμενο ότι η α-Klotho ρυθμίζει το οξειδωτικό στρες και συνεπώς με αυτό τον τρόπο να συμβάλλει στην ΠΕ, οι ερευνητές διερεύνησαν τη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της α-Klotho και της μαλονδιαλδεΐδης (MDA). Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση SOD, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) καταλύουν τη μείωση των αντιδραστικών ενδιάμεσων προϊόντων οξυγόνου. Συγκεκριμένα, η SOD μετατρέπει το υπεροξείδιο σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο μετατρέπεται σε νερό από την καταλάση ή την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) (466)

Τα ευρήματά της μελέτης του Fan et al έδειξαν υψηλότερη οξειδωτική (συγκέντρωση μαλονδιαλδεΐδης MDA) και χαμηλότερη αντιοξειδωτική (συγκέντρωση υπεροξειδική δισμουτάση SOD) ικανότητα στην ομάδα της ΠΕ σε σύγκριση με τις φυσιολογικές έγκυες γυναίκες(464). Επιπλέον, η MDA ήταν σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα με την ΠΕ και συσχετίστηκε αντιστρόφως ανάλογα με το επίπεδο της α-Klotho στον ορό της μητέρας και η συσχέτιση αυτή ήταν ασθενέστερη στην ομάδα με την ΠΕ σε σύγκριση με την ομάδα φυσιολογικών ($r^2=0,13$ στην ομάδα φυσιολογικών- $r^2=0,006$ στην ΠΕ) κυήσεων (464).

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι οι γυναίκες με ΠΕ μπορεί να έχουν κίνδυνο υπεροξειδωσής των λιπιδίων και μεταβολικών διαταραχών λόγω της χαμηλής έκφρασης της α-Klotho. Οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι η α-Klotho ορού θα μπορούσε να αποτελέσει προγνωστικό παράγοντα της ΠΕ (464).



Εικόνα 27 : Καμπύλη ROC (Πηγή: Fan C, Wang Y, Wang J, Lei D, Sun Y, Lei S, Hu M, Tian Y, Li R, Wang S. Clinic significance of markedly decreased α-Klotho in women with preeclampsia. Am J Transl Res. 2016)

Η ανάλυση καμπύλης ROC έδειξε ότι η α-Klotho ορού μπορεί να προβλέψει την ΠΕ με καλή ακρίβεια. Στο βέλτιστο cut of -830 pg/ml, η πρόβλεψη της ΠΕ από την α-Klotho ορού έφτασε το 89,5% της ευαισθησίας (95% CI: 66,9-98,7) και το 73,1% της ειδικότητας (95% CI: 52,2-88,4). Το μοντέλο οδήγησε σε καλή διάκριση με ROC-AUC 0,796, με 98,9% αρνητική προγνωστική αξία (NPV), 20,3% θετική προγνωστική αξία (PPV) και δείκτη Youden 0,63(εικόνα). Η ανάλυση ROC με AUC 0,796 υπέδειξε ότι η α-Klotho μπορεί να είναι ένας πιθανός νέος δείκτης της ΠΕ (464).

Οι ερευνητές υποστήριξαν ότι η παρακολούθηση της συγκέντρωσης της α- Kotho στο αίμα της μητέρας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να βοηθήσει στην ανίχνευση της ΠΕ. Ωστόσο, η χαμηλή θετική τιμή πρόβλεψης μπορεί να οφείλεται στον χαμηλό επιπολασμό της ΠΕ (464).

Στη μελέτη βρέθηκε η έκφραση της α- Kotho να είναι σημαντικά μειωμένη στον πλακούντα των ασθενών με ΠΕ. Τόσο η α-Kotho στον ορό της μητέρας όσο και στον ομφάλιο λώρο ήταν αισθητά χαμηλότερη στις γυναίκες με ΠΕ. Η α-Kotho ρύθμισε το βάρος γέννησης του εμβρύου καθώς και τη νεφρική λειτουργία της μητέρας μέσω της διαμόρφωσης του οξειδωτικού στρες στην ΠΕ (464).

Ωστόσο, η τρέχουσα μελέτη είχε αρκετούς περιορισμούς διότι, έγινε μια συγχρονική μελέτη και η περιστασιακή συμπερασματολογία και το μέγεθος του δείγματος ήταν περιορισμένο .

Οι Cecati et al. ανέφεραν τις πρώτες ενδείξεις ότι ο πολυμορφισμός του γονιδίου 744delA της Klotho είναι συχνότερος σε πλακούντες από προεκλαμπτικές εγκυμοσύνες(n=34) σε σύγκριση με εκείνους που προέρχονται από ανεπιπλεκτες κυήσεις(n=34). Δεδομένου ότι το μέγεθος της ομάδας ήταν πολύ μικρό για μια γενετική μελέτη ασθενών μαρτύρων , είναι δύσκολο να αποδεχθεί εάν μια συγκεκριμένη γενετική κατάσταση σχετίζεται στενά με την παθογένεια της προεκλαμψίας(458).

Σε μια μελέτη ασθενών- μαρτύρων οι Wang et al διερεύνησαν την συσχέτιση άλλων πολυμορφισμών της Klotho και την ευαισθησία στην ΠΕ σε κινέζες γυναίκες Han. Για τον σκοπό

της έρευνας γονοτυποήθηκαν 1002 ασθενείς με προεκλαμψία και 1384 φυσιολογικές κυήσεις για δύο πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου- το rs1207568 και το rs564481 της Klotho .Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις γονοτυπικές ή αλληλόμορφες συχνότητες στις δύο πολυμορφικές θέσεις μεταξύ τις ασθενείς με την ΠΕ και των ελέγχων (rs1207568: $\chi^2 = 2,386$, $p = 0.303$ από το γονότυπο, $\chi^2 = 2,357$, $p = 0,125$, OR = 1,127, 95%CI 0,968-1,312 από το αλληλόμορφο- rs564481: $\chi^2 = 1,195$, $p = 0,550$ από το γονότυπο, $\chi^2 = 0,018$, $p = 0,894$, OR = 1,010, 95%CI 0,875-1,165 από το αλληλόμορφο).(467)

Στη μελέτη έγινε σύγκριση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών μεταξύ των περιπτώσεων και των ελέγχων. Η ηλικία των περιπτώσεων και των ελέγχων ταυτίστηκε ($30,86 \pm 3,50$ και $30,31 \pm 3,87$ ετών αντίστοιχα, $P = 0,453$) και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη βαρύτητα της προεκλαμψιας ($P = 0,103$), στον αριθμό των αποβολών ($P = 0,069$) και στην ηλικία εμμηναρχής ($P = 0,066$) μεταξύ των δύο ομάδων.(467)

Ωστόσο, οι ασθενείς με ΠΕ γέννησαν νωρίτερα ,είχαν υψηλότερη αρτηριακή πίεση και χαμηλότερο βάρος γέννησης των νεογνών από τις ασθενείς της ομάδας ελέγχου ($P < 0,001$). Επιπλέον, οι ερευνητές χώρισαν τις περιπτώσεις με ΠΕ σε υποομάδες ήπιας έναντι σοβαρής ΠΕ και πρώιμης έναντι όψιμης εμφάνισης της ΠΕ και στη συνέχεια ανέλυσαν τις σχέσεις μεταξύ αυτών των υποομάδων. Κατά συνέπεια, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές για τα δύο SNPs σε κάθε περίπτωση. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξε ότι οι γενετικές παραλλαγές rs1207568 και rs564481 στην Klotho ενδέχεται να μην διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της ΠΕ στις κινέζες γυναίκες Han (467).

Οι Giannubilo et al. αξιολόγησαν την έκφραση του mRNA της Klotho στους πλακούντες από εγκυμοσύνες που είχαν προσβληθεί από σοβαρή προεκλαμψία. Στη μελέτη συλλέχθηκαν πλακούντες από φυσιολογικές εγκυμοσύνες ($n=12$) και εγκυμοσύνες που επιπλέκονταν με ΠΕ ($n = 12$).Οι αναλύσεις PCR πραγματικού χρόνου κατέδειξαν σημαντική 83%($p = 0,005$) μείωση της ρύθμισης της Klotho σε ασθενείς με προεκλαμψία σε σχέση με τους μάρτυρες. Τα αποτελέσματα με Western Blot συμφώνησαν με εκείνα της Real-Time PCR(458) .

Οι Loichinger et al ανέφεραν υψηλά επίπεδα α-Klotho στο πλάσμα σε ασθενείς με ΠΕ σε σύγκριση με τις φυσιολογικές εγκυμοσύνες .Στη μελέτη εξετάστηκαν μητρικό αίμα, πλακούντες και εμβρυϊκές μεμβράνες από 61 γυναίκες (31 με ΠΕ και 30 από μάρτυρες) μεταξύ 32 και 40 εβδομάδων κύησης .Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι από τις ασθενείς με την προεκλαμψία 29%($n=9$) είχαν HELLP, 58,1%($n=18$)γέννησαν πρόωρα και 41,9%($n=13$) από τα μωρά ήταν

τελειόμηναι. Στην ομάδα ελέγχου 50%(n= 15) γέννησαν πρόωρα και 50%(n=15) τελειόμηναι (443)

Τα επίπεδα της α -Klotho στο πλάσμα της μητέρας ήταν σημαντικά υψηλότερα ($p = 0,01$) σε ασθενείς με ΠΕ σε σύγκριση με τους μάρτυρες (2019 ± 1320 pg/mL έναντι 1277 ± 909 pg/mL αντίστοιχα) και οι ασθενείς με τα υψηλότερα επίπεδα είχαν σημαντικά μειωμένη επιταχυνόμενη ωρίμανση των λαχνών (accelerated villous maturation (AVM) ($p = 0,03$), η οποία είναι δείκτης οξειδωτικής βλάβης στον πλακούντα (443).

Η πλακουντιακή α -Klotho είχε την ίδια κατανομή ανοσοεντοπισμού στην προεκλαμψία σε σύγκριση με τους ελέγχους και η ποσοτικοποίηση του συγκυτιοτροφοβλαστη δεν έδειξε σημαντική διαφορά. Ωστόσο, η μελέτη φανέρωσε ότι σε συνάρτηση με την ηλικία κύησης, τα επίπεδα της α -Klotho στην ΠΕ απέτυχαν να μειωθούν όπως συνέβαινε στους ελέγχους. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στη χοριακή κυτταροτροφοβλάστη ή στην decidua στην ΠΕ σε σύγκριση με τους ελέγχους. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις ηλικίες της μητέρας, της κύησης ή της χρόνιας υπέρτασης στις γυναίκες με ΠΕ και στις γυναίκες ελέγχου. Στη μελέτη οι γυναίκες με ΠΕ είχαν σημαντικά λιγότερες εγκυμοσύνες, λιγότερους προηγούμενους τοκετούς, προγενέστερη ηλικία κύησης, χαμηλότερο βάρος γέννησης, υψηλότερη αρτηριακή πίεση και ποσοστά τοκετού και υψηλότερα ποσοστά μικρών για την ηλικία κύησης νεογνά σε σύγκριση με τους μάρτυρες (443).

Ωστόσο, οι Loichinger et al ανέδειξαν ότι η σημαντική μείωση της α -Klotho στον πλακούντα, μπορεί να υποδηλώνει είτε μικρότερη παραγωγή καθώς προχωρούσε η κύηση, είτε ταχύτερη αποβολή στο μητρικό ή στο αίμα του ομφάλιου λώρου. Ταυτόχρονα, οι ερευνητές παρατήρησαν σημαντική μείωση της ADAM17 και του FGFR1. Έτσι, στους ελέγχους, φάνηκε να υπάρχει μια συντονισμένη μείωση του πλακουντιακού συστήματος της α -Klotho, γεγονός που υποδηλώνει τόσο λιγότερη αποβολή της α -Klotho όσο και παράλληλη μείωση ως συνυποδοχέα με τον FGF23 για την ενεργοποίηση του FGFR1 στον συγκυτιοτροφοβλάστη (443).

Οι μεταβολές στην πλακουντιακή α -Klotho, του ADAM17 και του FGFR υποδηλώνουν την πιθανή συμμετοχή τους στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας.

Σε μια πρόσφατη μελέτη οι Cilingir et al βρήκαν παρόμοια αποτελέσματα με σημαντικά αυξημένη την Klotho στον ορό και στον πλακούντα στις γυναίκες με προεκλαμψία, αλλά η έκφραση του γονιδίου Klotho δεν ήταν διαφορετική στις προεκλαμπτικές γυναίκες σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Συνολικά 74 ασθενείς συμπεριλήφθησαν στη μελέτη, από τις οποίες

36 γυναίκες είχαν σοβαρή ΠΕ, 10 ήταν με χρόνια υπέρταση και συμμετείχαν 28 υγιείς μάρτυρες.(468)

Το επίπεδο της Klotho του πλακούντα ήταν σημαντικά υψηλότερο στις ασθενείς με ΠΕ από ότι στους υγιείς μάρτυρες ή σε γυναίκες με χρόνια υπέρταση ($p = 0,049$, $p = 0,029$). Επίσης παρατηρήθηκε ασθενής συσχέτιση μεταξύ των εβδομάδων κύησης και των επιπέδων της Klotho ορού ($r = -0,273$, $p = 0,021$). Η έρευνα ανέδειξε ότι το επίπεδο της Klotho στον ορό μειώθηκε με την ηλικία κύησης. Στην ομαδική ανάλυση, οι ερευνητές βρήκαν αυτή τη συσχέτιση ως σημαντική μεταβλητή μόνο στις γυναίκες με χρόνια υπέρταση ($r = -0,645$, $p = 0,044$, $p < 0,05$). Φάνηκε ότι στις προεκλαμπτικές γυναίκες και στους υγιείς μάρτυρες, η ηλικία κύησης δεν ήταν μια σημαντική μεταβλητή που επηρέαζε τα επίπεδα της Klotho ($p > 0,05$). Επίσης, δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ του ΔΜΣ και των επιπέδων της Klotho ($p > 0,05$). Η έκφραση του γονιδίου Klotho στο μητρικό αίμα ήταν παρόμοια σε όλες τις ομάδες. Η ηλικία κύησης και ο ΔΜΣ δεν είχαν καμία επίδραση στα επίπεδα Klotho της μητέρας. Το cutt off για την ανθρώπινη Klotho για την αναγνώριση της παρουσίας ΠΕ υπολογίστηκε σε 12,48 pg/ml με ευαισθησία 100% και ειδικότητα 96%.

Ωστόσο, τα υπάρχοντα αποτελέσματα για το επίπεδο της Klotho στην προεκλαμψία είναι αντικρουόμενα(Πίνακας 6)

Είδος της μελέτης	Περιστατικά με ΠΕ/μάρτυρες	Ηλικία κύησης(ω)	Ηλικία της μητέρας(γ)	Επίπεδο της Klotho (ng/ml)	Επίπεδα Klotho σε σχέση με το φυσιολογικό	Ιστός η σύστημα μελέτης	Μέθοδος μέτρησης της Klotho	Παράγοντες /μεταβλητές	Συγγραφείς /χρονιά
Ασθενών-μαρτύρων	12/12	Δεν αναγράφεται	Δεν αναγράφεται	Δεν αναγράφεται	μειωμένο	πλακούντας	RT PCR, Western blot	ηλικία κύησης	Giannubilo et al 2012
Συγχρονική μελέτη	58 /130	35.1 (30.1-38.7)	24 (19-30)	1177.3 (762.4-2013.4)	χωρίς διαφορά	πλάσμα μητέρας	ELISA	κάπνισμα, τόκος ,φυλή, παρουσία η απουσία FGR	Miranda et al.2014
Συγχρονική μελέτη	19 /23	36.6±2.8	28.6±5.6	579.0±228.4	μειωμένο μειωμένο	ορός μητέρας πλακούντας	ELISA, RT-PCR, Western blot, IHC	Τόκος,BMI πριν την εγκυμοσύνη, Apgar score	Fan et al,2016
Ασθενών-μαρτύρων	34/34	31.2±1.1	30.2±1.3	Μη εξακριβωμένο	μειωμένο	πλακούντας	RT-PCR, Western Blot	βάρος του πλακούντα, Single-nucleotide polymorphism 744delA	Cecati et al.2016
Ασθενών-μαρτύρων	31/30	36.2±2.0	28.0±6.9	2019±1320	αυξημένο	πλάσμα μητέρας	ELISA	τόκος ,είδος τοκετού	Loginger et al ,2016

Ασθενών-μαρτύρων	1002/ 1384	35.80 ± 3.14	30.86 ± 3.50	δεν μετρήθηκε	δεν μετρήθηκε	πλακούντας	real-time PCR	ηλικία εμμηναρχής , αριθμός αποβολών, ηλικία της εμμηναρχής, πολυμορφισμοί των rs1207568 και rs564481	Wang et al ,2018
Συγχρονική μελέτη	36/74	35 (28– 38	28 (18– 40)	112.42 ± 172.78	αυξημένο αυξημένο	πλακούντας ορός μητέρας	ELISA	Προγενέστερες αποβολές,FGR	Cilingir,2019

Πίνακας 6:Μελέτες σχετικά με το επίπεδο της α-Klotho στην προεκλαμψια

Πρέπει να σημειωθεί, ότι η πιθανή διαφορά των αποτελεσμάτων των μελετών μπορεί να οφείλεται στην ετερογένεια του συνόλου των δειγμάτων, όπως και στις διαφορετικές μεταβλητές που εξετάστηκαν. Επιπλέον, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν διαφορετικά δείγματα αίματος -ορός (464) έναντι πλάσματος (443) για τις μελέτες, όπως διαφορετικός ήταν και ο τρόπος τοκετού.

Είναι άγνωστο ότι τα επίπεδα στο αίμα της α-Klotho μπορεί να μεταβληθούν από το μητρικό ή το εμβρυϊκό στρες κατά τη διάρκεια του τοκετού, οπότε και το είδος του τοκετού πρέπει να συμπεριληφθεί ως μια σημαντική μεταβλητή. Το κάπνισμα, το οποίο έχει αποδεχτεί ότι επιδρά στην Klotho δεν συμπεριλήφθηκε στα κριτήρια αποκλεισμού στις πιο πολλές μελέτες (464). Οι μητέρες που κάπνιζαν αποκλείστηκαν στη μελέτη του Loichinger (443), ενώ οι Cillingir et al απέκλεισαν τις γυναίκες οποίες κάπνιζαν πολύ, χωρίς να διευκρινίζονται ποια ήταν τα κριτήρια για την επιλογή των βαρέων καπνιστών ή ποια ήταν η ημερησία κατανάλωση των τσιγάρων (468). Επιπλέον, οι Miranda et al. σύγκρινε ασθενείς με ΠΕ χωρίς επιπλοκές από FGR με φυσιολογικές έγκυες γυναίκες (448). Το FGR είναι μια κοινή επιπλοκή της ΠΕ και ο κίνδυνος για FGR σε ασθενείς με ΠΕ είναι σχεδόν τέσσερις φορές υψηλότερος από τις φυσιολογικές κυήσεις. Επομένως, η αντιπροσωπευτικότητα των ασθενών με ΠΕ που δεν περιπλέκει το FGR του πληθυσμού της ΠΕ είναι αμφισβητήσιμη.

2.2.Η Klotho και οι διαταραχές στην αύξηση του εμβρύου

Δεδομένα έχουν δείξει ότι οι αυξητικοί παράγοντες που μοιάζουν με την ινσουλίνη (IGF) εκφράζονται στη μητέρα, στο έμβρυο και στον πλακούντα και φαίνεται να είναι κύριοι καθοριστικοί παράγοντες της εμβρυϊκής ανάπτυξης (469). Σε μια έρευνα τους οι Iñiguez et al έχουν δείξει ότι ο IGF1 και το IGF1R mRNA είναι υψηλότερες σε πλακούντες από FGR σε σύγκριση με πλακούντες από παιδιά που γεννήθηκαν με φυσιολογικό βάρος για την ηλικία κύησης (470).

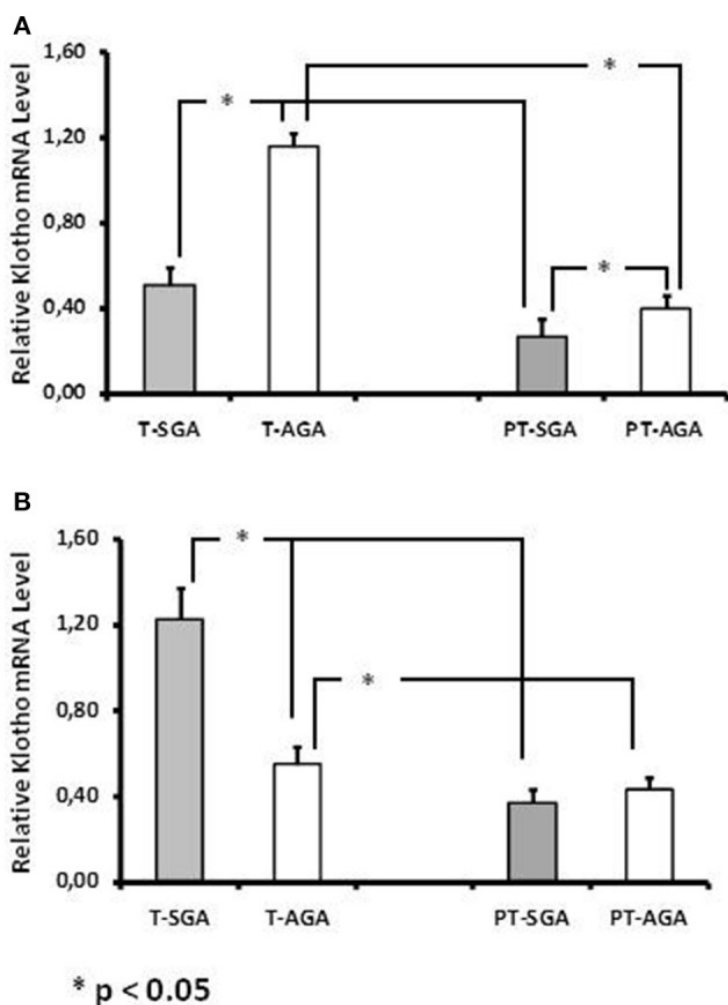
Σε μια μεταγενέστερη μελέτη τους οι Iñiguez et al περιέγραψαν για πρώτη φορά ότι η Klotho ρυθμίζει προς τα κάτω την ενεργοποίηση που επάγεται από τον IGF-I στον IGF-IR και τον AKT, γεγονός που υποδηλώνει ότι η Klotho μπορεί να ρυθμίζει τη δραστηριότητα του IGF-I στον ανθρώπινο πλακούντα. Επιπλέον, δεδομένα αναφέρουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες του πλακούντα και απόκριση στον IGF-I των IGF-IR, IRS-1 και AKT στους

πλακούντες με FGR, οι οποίοι μπορεί να αντιπροσωπεύουν έναν αντισταθμιστικό μηχανισμό ως απάντηση στο περιορισμό της εμβρυϊκής αύξησης (471).

Οι Iñiguez et al ανέλυσαν τις διαφορές στην γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση της Klotho στους ανθρώπινους πλακούντες πρόωρων και τελειόμηνων νεογνών με FGR και με φυσιολογικό βάρος γέννησης και μελέτησαν τα επίπεδα της Klotho στον ορό του ομφάλιου λώρου και την επίδραση της πρωτεΐνης στην ενεργοποίηση της μεταγωγής σήματος του IGF-IR σε αυτούς τους πλακούντες.(472)

Οι συγκεντρώσεις της Klotho στο αίμα του ομφάλιου λώρου στη μελέτη ήταν σημαντικά χαμηλότερες στα τελειόμηνα νεογνά με FGR σε σύγκριση με τα επίπεδα της πρωτεΐνης στα τελειόμηνα νεογνένητα με φυσιολογικό βάρος($p < 0.05$). Δεν διαπιστώθηκαν διαφορές μεταξύ

των πρόωρων νεογνών με FGR και των πρόωρων με φυσιολογικό βάρος γέννησης (472).



Εικόνα 28: Έκφραση του mRNA Klotho σε πλακούντες από τη χοριακή πλάκα (A) και τη βασική πλάκα (B) τελειόμηνων [T-SGA (n = 37) και T-AGA (n = 32)] και πρόωρων [PT-SGA (n = 20) και PT-AGA (n = 28)] κυήσεων. Iñiguez G., Klotho Gene and Protein in Human Placentas According to Birth Weight and Gestational Age. Front Endocrinol (Lausanne). 2019

Η μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του mRNA της Klotho ήταν χαμηλότερη στη χοριακή πλάκα των πλακούντων των τελειόμηνων νεογνών με FGR ($0,51 \pm 0,08$) σε σύγκριση με την έκφραση της

Klotho στους πλακούντες των τελειόμηνων νεογνένητων με φυσιολογικό βάρος ($1,16 \pm 0,06$)

($p < 0.05$). Ωστόσο, η έκφραση της πρωτεΐνης ήταν υψηλότερη στο βασικό στρώμα του πλακούντα των τελειόμηνων νεογνών με FGR($1,23 \pm 0,14$) σε σύγκριση με των τελειόμηνων με το φυσιολογικό βάρος γέννησης ($0,55 \pm 0,08$) ($p < 0,05$)(εικόνα 28). Στους πρόωρους πλακούντες παρατηρήθηκε χαμηλότερη έκφραση του mRNA της Klotho στη χοριακή πλάκα των νεογνών με FGR ($0,27 \pm 0,08$) σε σύγκριση με των νεογνών με φυσιολογικό βάρος ($0,40 \pm 0,06$) ($p < 0,05$), αλλά δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο βασικό στρώμα του πλακούντα των πρόωρων νεογνών με FGR έναντι των πρόωρων με φυσιολογικό βάρος (472).

Η μελέτη ανέδειξε επίσης ότι το mRNA της Klotho ήταν υψηλότερη στη χοριακή πλάκα των τελειόμηνων νεογνών με FGR, των τελειόμηνων νεογέννητων με φυσιολογικό βάρος, και στη βασική πλάκα του πλακούντα των τελειόμηνων νεογέννητων με FGR($p < 0,05$) σε σύγκριση με τους αντίστοιχους πρόωρους πλακούντες, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη βασική πλάκα των τελειόμηνων με φυσιολογικό βάρος σε σύγκριση με τον πρόωρον με φυσιολογικό βάρος γέννησης. (472)

Τα αποτελέσματά των Iñiguez et al έδειξαν ότι η υψηλότερη έκφραση και η περιεκτικότητα της πρωτεΐνης της Klotho που παρατηρήθηκε στη μητρική πλευρά του πλακούντα των νεογνών με FGR μπορεί να ευνοεί την μείωση του οξειδωτικού στρες σε αυτό το τμήμα του πλακούντα, μειώνοντας ενδεχομένως την απόπτωση και την ανάπτυξη της ασβεστοποίησης(7). Επιπλέον, η χαμηλότερη έκφραση και η περιεκτικότητα της πρωτεΐνης Klotho που παρατηρήθηκε στην εμβρυϊκή πλευρά των FGR πλακούντων μπορεί να ευνοεί τη μεταφορά αμινοξέων στον πλακούντα που ρυθμίζεται από τον IGF-I. Μελετώντας την επίδραση της Klotho στην AKT και την ERK οι ερευνητές παρατήρησαν την μείωση τους κατά 70% και 50% αντίστοιχα, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η Klotho μπορεί να ρυθμίζει την IGF-I δραστηριότητα στον ανθρώπινο πλακούντα ανάλογα με την ανάπτυξη του εμβρύου(472).

Οι διαταραχές της εμβρυϊκής αύξησης αποτελούν σημαντική αιτία περιγεννητικής νοσηρότητας και θνησιμότητας με μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην υγεία των παιδιών με ποσοστό επιπολασμού 6-15% όλων των κυήσεων. Η ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης είναι πολυπαραγοντική και πολύπλοκη και ποικίλοι παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων ενδογενών συνθηκών του εμβρύου καθώς και μητρικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, μπορούν να οδηγήσουν σε ενδομήτριο περιορισμό της αύξησης (FGR).

Ο αντίκτυπος της γήρανσης του πλακούντα στο αναπτυσσόμενο έμβρυο είναι ελάχιστα κατανοητός, αλλά η πρόωρη κυτταρική γήρανση και η απόπτωση των λαχνών θα μπορούσε να εξηγήσει την δυσρυθμισμένη αγγειογένεση που οδηγεί σε FGR και άλλες συννοσηρότητες.

Στη μελέτη τους οι Franklin et al αποκάλυψαν ότι η α- Klotho μπορεί να παίζει ρόλο στην αγγειακά μεσολαβούμενη επιταχυνόμενη γήρανση του πλακούντα που οδηγεί σε ενδομήτριο περιορισμό της αύξησης του εμβρύου(FGR)(473).Η έρευνα έδειξε ότι η α -Klotho στο αίμα του ομφάλιου λώρου ήταν χαμηλότερη στην ομάδα των FGR (διάμεση τιμή -1200 [859, 2083] pg/mL έναντι 3193 (1703, 3963) pg/mL, $p<0,01$) σε σύγκριση με την ομάδα με φυσιολογική ανάπτυξη. Επιπλέον, η α -Klotho στο αίμα του ομφάλιου λώρου ήταν σημαντικά υψηλότερη στον πρόωρο τοκετό και χαμηλότερη στην καισαρική τομή και στην προεκλαμψία. Η α -Klotho στο αίμα του ομφάλιου λώρου δεν διέφερε σημαντικά σε σχέση με το φύλο, την πρόωρη ρήξη μεμβρανών, την παρατεταμένη ρήξη μεμβρανών και το Apgar score (473).

Η α- Klotho μειώθηκε με τις υποδιαστολές μητρικής αγγειακής δυσλειτουργίας που σηματοδότησαν επιταχυνόμενη ωρίμανση των λαχνών, συμπεριλαμβανομένων των αυξημένων συγκυριακών κόμβων (1230 (805, 3606) pg/mL, $p<0,05$) και την απομακρυσμένη υποπλασία των λαχνών (1170 (770, 3390) pg/mL; $p<0,05$). Μεταξύ των 15 αγγειογενετικών δεικτών και αυξητικών παραγόντων, που εξεταστήκαν βρέθηκε άμεση συσχέτιση μεταξύ της Ang-2 και της α- Klotho(συντελεστής $\beta=2,6$, $p=0,01$), υποδηλώνοντας έναν διαδραστικό ρόλο της πρωτεΐνης στην υποστήριξη της πλακουντιακής και εμβρυϊκής αγγειογένεσης(473).

Στη μελέτη φάνηκε ότι η α- Klotho μειώθηκε περαιτέρω όταν υπήρχαν αλλοιώσεις γήρανσης του πλακούντα ή όταν συνυπήρχε FGR. Η διάμεση τιμή της α- Klotho στην υποομάδα των βρεφών με FGR και υποπλασία των άπω λαχνών ή αυξημένους συγκυτιακούς κόμβους ήταν σημαντικά χαμηλότερη από την υποομάδα με FGR χωρίς υποπλασία των λαχνών και χωρίς συγκυτιακούς κόμβους (διάμεση τιμή της α- Klotho -870 (638, 1166) έναντι το 1895 (1316, 3394), $p<0.002$)(8). Τα ευρήματά της μελέτης για το αίμα του ομφάλιου λώρου και τον πλακούντα υποστηρίζαν μια συσχέτιση μεταξύ της α- Klotho και της επιταχυνόμενης γήρανσης, καθώς η προχωρημένη ωρίμανση των λαχνών για την ηλικία κύησης κατά τη γέννηση συνοδευόταν από χαμηλή κυκλοφορούσα συγκέντρωση της α- Klotho(473) .

Περαιτέρω ανάλυση των σύνολο των μεταβλητών του βρέφους με τη χρήση γραμμικής παλινδρόμησης με προσαρμογή για τον τρόπο τοκετού και τον πρόωρο τοκετό έδειξε ότι η α -Klotho στο αίμα του ομφάλιου λώρου σχετίστηκε άμεσα με το σωματικό βάρος BW ($p<0,001$) και το BW-for-GA ($p=0,001$), αλλά όχι με την ηλικία κύησης κατά τον τοκετό ($p=0,43$) (473).

Η μελέτη των Franklin et al ανέδειξε ότι η α- Klotho μπορεί να παίζει ρόλο στην αγγειακά μεσολαβούμενη επιταχυνόμενη γήρανση του πλακούντα που οδηγεί σε ενδομήτριο περιορισμό της αύξησης. (473)

Ο περιορισμός τη μελέτης ήταν το μικρό μέγεθος του δείγματος και η εξέταση μόνο των αγγειογενετικών παραγόντων, που συμβάλλουν στην ανθρώπινη αγγειογένεση, χωρίς να συμπεριληφθούν οι επιγενετικές και οι πρωτεομικές αναλύσεις που μπορεί να είναι σε θέση να αξιολογήσουν την αλληλεπίδραση και την πολυπλοκότητα της αγγειογένεσης που σχετίζεται με τη γήρανση του πλακούντα και την FGR.

Σε μια διατομεακή μελέτη οι Miranda et al. ανέφεραν ότι η διάμεση συγκέντρωση της α-Klotho στο πλάσμα της μητέρας ήταν χαμηλότερη σε γυναίκες με FGR (με ή χωρίς ΠΕ), σε σύγκριση με εκείνες που γέννησαν φυσιολογικά μωρά (448). Οι ερευνητές ανέφεραν ότι οι έγκυες γυναίκες είχαν υψηλότερη συγκέντρωση της α-Klotho στο πλάσμα και αυτή αυξάνεται σε συνάρτηση με την ηλικία κύησης(448).

Σε σύγκριση με τις γυναίκες με μη επιπλεγμένη εγκυμοσύνη, οι γυναίκες με ΠΕ και FGR ($p=0,005$) και εκείνες με μεμονωμένη FGR ($p=0,02$) είχαν διάμεσες συγκεντρώσεις α-Klotho στο πλάσμα κατά 21% και 17% χαμηλότερες αντίστοιχα. Η ανάλυση δεν βρήκε σημαντική διαφορά στις διάμεσες συγκεντρώσεις της α-Klotho στο πλάσμα των μητέρων μεταξύ των γυναικών με ΠΕ που γέννησαν νεογνό με FGR και εκείνων με ανεπιπλεκτή κύηση ($p=0,47$)(448).

Διατηρώντας σταθερή την επίδραση των δυνητικά συγχυτικών μεταβλητών (ηλικία κύησης κατά τη φλεβοκέντηση, ηλικία της μητέρας, μητρότητα, φυλή και χρήση καπνού), ο προβλεπόμενος γεωμετρικός μέσος όρος της συγκέντρωσης α-Klotho ήταν 25% και 30% χαμηλότερος στην ομάδα με την μεμονωμένη FGR($p<0,01$) και στις ομάδα με την ΠΕ και FGR ($p<0,01$), σε σύγκριση με τις μη επιπλεγμένες κυήσεις(448). Η μελέτη δεν έδειξε σημαντική διαφορά στον προβλεπόμενο γεωμετρικό μέσο όρο της συγκέντρωσης α-Klotho μεταξύ των γυναικών με ΠΕ που δεν γέννησαν νεογνό FGR και της ομάδας της μη επιπλεγμένης εγκυμοσύνης ($p=0,15$)(448).

Η υποκατηγοριοποίηση των γυναικών με ΠΕ(ήπια έναντι σοβαρής) και την FGR κατά βαρύτητα της FGR (ήπια έναντι σοβαρής) ανέδειξε ότι η διάμεση συγκέντρωση της α-Klotho στο πλάσμα ήταν ανεξάρτητη από την σοβαρότητα της προεκλαμψίας(448).

Η τρέχουσα βιβλιογραφία έχει δείξει ότι οι εγκυμοσύνες με περιορισμό της εμβρυϊκής αύξησης έχουν ενδείξεις αυξημένου οξειδωτικού στρες στον πλακουντιακό ιστό σε σύγκριση με εκείνες που εμπλέκονται μόνο με προεκλαμψία και χωρίς FGR (474)

Ερευνητές έχουν προτείνει ότι το στρες ενεργοποιεί ενδοκυτταρικούς αγγελιοφόρους, ,οποίοι μεταβάλλουν την παραγωγή πρωτεϊνών που σχετίζονται με την λειτουργία του πλακούντα,

όπως ο αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (475), η αυξητική ορμόνη του πλακούντα και το λακτογόνο του πλακούντα (476). Με τον ίδιο μηχανισμό υποτίθεται ότι το στρες μπορεί να εμπλέκεται στον περιορισμό της εμβρυϊκής αύξησης μεταβάλλοντας την έκφραση και την παραγωγή της α -Klotho στο συγκυτιοτροφοβλάστη.

Εκτός από την υπολειπόμενη εμβρυϊκή αύξηση η Klotho φαίνεται να εμπλέκεται και στη μακροσωμία του εμβρύου(477).

Οι Shao et al. παρατήρησαν αυξημένα mRNA της α -KL και πρωτεΐνης στους πλακούντες των γυναικών με μακροσωμία, σε σύγκριση με εκείνες που γέννησαν μωρά φυσιολογικού βάρους (477). Στη μελέτη για να διερευνηθεί η έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης Klotho στον πλακούντα της μακροσωμίας σε σχέση με το βάρος γέννησης των νεογνών αναλύθηκαν τέσσερις ομάδες ασθενών: Η μια ομάδα συμπεριλάμβανε γυναίκες με ΣΔ κύησης και μακροσωμία (GM), η δεύτερη ομάδα αποτελούσε από έγκυες με ΣΔ κύησης και φυσιολογικό βάρος γέννησης των εμβρύων (GN), στην τρίτη ομάδα συμμετείχαν φυσιολογικές εγκυμοσύνες με μακροσωμία (NM) και στην τέταρτη ομάδα μετείχαν φυσιολογικής εγκυμοσύνης με φυσιολογικό βάρος γέννησης (NN)(477).

Τα αποτελέσματα της μελέτης με ανοσοϊστοχημική ανίχνευση έδειξε ότι το ποσοστό της πρωτεΐνης Klotho ήταν σημαντικά υψηλότερο στον πλακούντα των κυήσεων με ΣΔ κύησης και μακροσωμία κατά 93% 93% (28/30) από ότι στην ομάδα με ΣΔ κύησης και φυσιολογικό βάρος γέννησης -73% (22/30; $P < 0,05$). (477) Το ποσοστό της πρωτεΐνης Klotho ήταν σημαντικά υψηλότερο στον πλακούντα των φυσιολογικών κυήσεων με μακροσωμία -97% (29/30) από ότι στον πλακούντα φυσιολογικής εγκυμοσύνης με φυσιολογικό βάρος γέννησης (0%, 24/30; $P < 0,05$). Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου έδειξε ότι η έκφραση του mRNA της Klotho ήταν σημαντικά υψηλότερη στον πλακούντα του GM ($4,3 \pm 3,1$) από ότι στο NN ($2,1 \pm 2,4$; $P < 0,05$). Η έκφραση του mRNA της Klotho ήταν επίσης σημαντικά υψηλότερη στον πλακούντα του NM ($4,8 \pm 3,4$) από ότι στον NN ($2,6 \pm 3,3$; $P < 0,05$) (477).

Η Western blot ανάλυση έδειξε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Klotho ήταν σημαντικά υψηλότερη στον πλακούντα με ΣΔ κύησης και μακροσωμία ($1,27 \pm 0,90$) από ό, τι της φυσιολογικής εγκυμοσύνης με φυσιολογικό βάρος γέννησης ($0,64 \pm 0,24$; $P < 0,05$). Ήταν επίσης σημαντικά υψηλότερη στον πλακούντα των φυσιολογικών κυήσεων με μακροσωμία ($2,51 \pm 3,52$) από ότι στον φυσιολογικής εγκυμοσύνης με φυσιολογικό βάρος γέννησης ($0,77 \pm 0,37$; $P < 0,05$). Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης Klotho μεταξύ GM και NM, GN και NN ($P > 0,05$). (477)

Η μελέτη του Shao et al ανέδειξε ότι η ανοδική ρύθμιση του γονιδίου Klotho μπορεί να σχετίζεται με μακροσωμία και η σχέση αυτή δεν αλλοιώθηκε από τον διαβήτη κύησης , ο οποίος αποτελούσε παράγοντα κινδύνου για μακροσωμία (477)

2.2.Η Klotho και άλλες επιπλοκές της κύησης

Εκτός από τις υπερτασικές διαταραχές κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η μελέτη του Lam-Rachlin et al. έδειξε ότι η α-Klotho σχετίζεται επίσης με τη λοίμωξη κατά τη διάρκεια των πρώων κυήσεων. Οι ερευνητές σημείωσαν ότι μεταξύ των ασθενών με πρόωρο τοκετό ή πρόωρη προγεννητική ρήξη των μεμβρανών (pPROM), εκείνες με μικροβιακή διείσδυση στην ενδοαμνιακή κοιλότητα (MIAC) είχαν χαμηλότερα επίπεδα της α-Klotho στο πλάσμα, ακόμη και μετά την προσαρμογή για την ηλικία της μητέρας, την χρήση καπνού ,την ηλικία κύησης κατά την φλεβοκέντηση (478)

Οι Lam-Rachlin et al πραγματοποίησαν μια διατομεακή μελέτη γυναικών με μονήρεις κυήσεις μεταξύ 20 και 34 εβδομάδων ,όπου οι έγκυες γυναίκες διαχωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες-κυήσεις με αυτόματο πρόωρο τοκετό (PTL) και MIAC, εγκυμοσύνες με αυτόματο πρόωρο τοκετό χωρίς MIAC, κυήσεις με πρόωρη ρήξη των εμβρυικών μεμβρανών(pPROM) με MIAC και κυήσεις με pPROM χωρίς MIAC(478).Η διάμεση συγκέντρωση (pg/ml) της διαλυτής α-Klotho στο πλάσμα ήταν σημαντικά χαμηλότερη στις ασθενείς με μικροβιακή εισβολή στην ενδοαμνιακή κοιλότητα (MIAC) από ότι σε εκείνες χωρίς MIAC (787,0 έναντι 1117,8, $p < 0,001$) (478).

	Εγκυες με MIAC	Εγκυες χωρίς MIAC	P value
Επίπεδα Klotho (ng/ml)	787,0	1117,8	$p < 0,001$

Η διάμεση συγκέντρωση (pg/ml) της διαλυτής α-Klotho στο πλάσμα στις εγκυες με MIAC και χωρίς MIAC

Η έρευνα ανέδειξε ότι μεταξύ των ασθενών με αυτόματο πρόωρο τοκετό (PTL), εκείνοι με MIAC είχαν χαμηλότερη διάμεση συγκέντρωση της διαλυτής α-Klotho στο πλάσμα από εκείνους χωρίς MIAC (787.0 pg/ml έναντι 1138,9; $p=0,007$).⁽⁸⁾

	<u>Έγκυες με αυτόματο πρόωρο τοκετό</u>		<u>P value</u>
	<u>με MIAC</u>	<u>χωρίς MIAC</u>	
Επίπεδα Klotho (ng/ml)	787.0	1138,9	$p=0,007$

Η διάμεση συγκέντρωση (pg/ml) της διαλυτής α-Klotho στο πλάσμα στις εγκυες με αυτοματο προωρο τοκετο

Μεταξύ των ασθενών με pPROM, εκείνοι με MIAC είχαν χαμηλότερη διάμεση συγκέντρωση πλάσματος της διαλύτης α-Klotho από εκείνους χωρίς MIAC (766,4 pg/ml έναντι 1001,6, $p=0.045$)⁽⁴⁷⁸⁾.

	<u>Εγκυες με pPROM</u>		<u>P value</u>
	<u>με MIAC</u>	<u>χωρίς MIAC</u>	
Επίπεδα Klotho (ng/ml)	766,4	1001,6	$p=0.045$

Στη μελέτη δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στη διάμεση συγκέντρωση πλάσματος της διαλυτής α-Klotho μεταξύ των PPRM χωρίς MIAC και τον αυτόματο πρόωρο τοκετό PTL χωρίς MIAC (1001,6 pg/mL έναντι 1138,9 pg/mL, αντίστοιχα- $p=0,5$). Μετά από προσαρμογή για πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες (ηλικία της μητέρας, χρήση καπνού, ηλικία κύησης κατά τη φλεβοκέντηση), η διαλυτή α-Klotho παρέμεινε σημαντικά συνδεδεμένη με τη μικροβιακή εισβολή στην ενδοαμνιακή κοιλότητα (MIAC) ($p=0.02$) (478)

Μεταξύ των ασθενών χωρίς MIAC, το κάπνισμα συσχετίστηκε σημαντικά με χαμηλότερη διάμεση συγκέντρωση της διαλυτής α-Klotho στο πλάσμα σε σχέση με τους μη καπνιστές (794,2 pg/mL έναντι 1382,0 pg/mL, αντίστοιχα, $p<0,001$)- ωστόσο, η διαφορά αυτή δεν παρατηρήθηκε στις κύσεις με μικροβιακή διείσδυση στην ενδοαμνιακή κοιλότητα (478)Τα δεδομένα της μελέτης ανέδειξαν ότι η ενδοαμνιακή λοίμωξη που εμφανίζεται σε πρόωρες κύσεις (ανεξάρτητα από την κατάσταση της μεμβράνης) σχετίστηκε με μείωση των συγκεντρώσεων της διαλυτής α-Klotho στο πλάσμα της μητέρας.(478)Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν τον προστατευτικό ρόλο της α-Klotho έναντι της λοίμωξης κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης.(478)

Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχει μια αναφορά περίπτωσης ότι τα ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα της α-Klotho στον ορό συσχετίστηκαν με δυσμενή έκβαση της εγκυμοσύνης (479). Στην αναφορά του ο Taguchi et al. περιγράφει μια γυναίκα 41 ετών , οποία υποβλήθηκε σε επιτυχημένη εξωσωματική γονιμοποίηση με την μεθοδο ICSI (480)

Η γυναίκα δεν είχε προβλήματα υγείας, συμπεριλαμβανομένων γενετικών διαταραχών, οι οποίες αποκλείστηκαν από τον σύζυγό της και από τους γονείς της. Τα επίπεδα της α-Klotho στον ορό της ασθενούς εκτιμήθηκαν στην ωοθυλακική φάση της προεμφύτευσης και ήταν $1.971,12 \pm 201,11$ pg/ml (μέσος όρος $\pm$ SD), το οποίο ήταν αρκετά υψηλότερο σε σύγκριση με το $951,2 \pm 323,9$ pg/ml (μέση τιμή $\pm$ SD) στην μη επιπλεγμένη κύηση. Ωστόσο, το έμβρυο στην 17η εβδομάδα μετα απο αμνιοπαρακέντηση διαγνώστηκε με σύνδρομο Klinefelter (καρυότυπος 47, XXY) και η γυναίκα προχώρησε σε άμβλωση (479).

Επίσης , σε μια προοπτική μελέτη κοόρτης οι Funabiki et al βρήκαν ότι τα ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα της α-Klotho στον ορό μπορεί να οδηγήσουν σε κακή έκβαση της κλινικής εγκυμοσύνης. Οι ερευνητές στρατολόγησαν 42 ασθενείς (με διάμεση ηλικία 37,4 έτη) και εξέτασαν τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων α-Klotho στον ορό κατά τη διάρκεια της

ωοθυλακικής φάσης της προεμφύτευσης και των δεδομένων κλινικής έκβασης της μετακλινικής εγκυμοσύνης(479).

Το ποσοστό κλινικής εγκυμοσύνης ήταν 38,1% και το ποσοστό χρωμοσωμικών ανωμαλιών βρέθηκε σε 9,5%(4 παιδιά με σύνδρομο Down κ.λπ.) Ο μέσος όρος του επιπέδου α-Klotho κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης της προεμφύτευσης για τις μη έγκυες γυναίκες ήταν 544,31 pg/ml και τα επίπεδα της α-Klotho στην ομάδα των χρωμοσωμικών ανωμαλιών ήταν υψηλότερα από ότι στην ομάδα χωρίς χρωμοσωμικές ανωμαλίες ($P=0,029$, ομάδα ανωμαλιών 659,26 pg/ml έναντι του ελέγχου 530,23 pg/ml).(479)

Μια ανάλυση πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης έδειξε ότι τα ποσοστά χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα αγέννητα παιδιά επηρεάστηκαν θετικά από τα επίπεδα της α-Klotho στον ορό κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης της προεμφύτευσης ($p=0,0008$) ,όπως και από την ηλικία της ασθενούς ($p=0,008$). (479)

Τα επίπεδα της α-Klotho στον ορό κατά την προεμφύτευση ($P<0,01$) και τα ποσοστά εγκυμοσύνης ($P<0,01$) μειώθηκαν με την αύξηση της ηλικίας , ενώ τα ποσοστά εγκυμοσύνης βελτιώθηκαν με την αύξηση των επιπέδων α-Klotho στον ορό κατά την προεμφύτευση. Ωστόσο, τα ποσοστά χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα αγέννητα παιδιά παρατηρήθηκαν με την αύξηση των επιπέδων α-Klotho στον ορό κατά την προεμφύτευση ($P<0,01$)(479).

Η αναφορά μεμονωμένων περιστατικών δεν επαρκεί για επιστημονικά συμπεράσματα, αξίζει να σημειωθεί όμως ότι οι γυναίκες με ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα της α-Klotho κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης της προεμφύτευσης είναι σκόπιμο να παρακολουθούνται με αυστηρά πρωτόκολλα.

Σε μια κλινική μελέτη οι Tayyar et al διερεύνησαν τα επίπεδα των κυκλοφορούντων FGF-19 και της β-Klotho σε περιπτώσεις ενδοηπατικής χολόστασης της εγκυμοσύνης (480)

Ωστόσο η ερευνά δεν εντόπισε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων με χολόσταση και την ομάδα ελέγχου όσον αφορά τα επίπεδα του FGF-19($p = 0,341$) και την β -Klotho ($p = 0,086$). Αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντικό, οι ερευνητές ανίχνευσαν χαμηλότερο επίπεδο της β-Klotho στις γυναίκες με χολόσταση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (439,51 (398,79) pg/ml έναντι 528,74 (826,09) pg/ml). Στην ανάλυση των υποομάδων, το επίπεδο της β-Klotho ήταν σημαντικά χαμηλότερο στους ασθενείς με προηγούμενο ιστορικό ενδοηπατικής χολόστασης της εγκυμοσύνης ($p = 0,017$).

Ωστόσο, τα παρόμοια επίπεδα στις δύο ομάδες μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι ο έντερο-ηπατικός μηχανισμός ανατροφοδότησης, μέσω του συστήματος σηματοδότησης FGF-19, β-Klotho και FGFR4, δεν παίζει πρωταρχικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ενδοηπατικής χολόστασης της εγκυμοσύνης και ότι μπορεί να ενεργοποιούνται διαφορετικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί στην πάθηση.

3.Η Klotho και η επίπτωση στα νεογνά

Υπάρχουν δεδομένα ότι η Klotho μπορεί επίσης να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη μεταγεννητική εξέλιξη και ανάπτυξη των νεογνών.

Οι Gkentzi et al δημοσίευσαν δεδομένα, τα οποία αναφέρουν τους παραμέτρους που επηρεάζουν τα επίπεδα του FGF23 και της Klotho σε υγιή παιδιά (9). Σε 159 υγιή παιδιά (82 αγόρια και 77 κορίτσια) με μέση ηλικία $8,78 \pm 3,47 \pm SD$ ετών, μετρήθηκαν τα επίπεδα του FGF23 (το άθικτο πλήρες μήκος FGF23-iFGF23 και ανενεργή μορφή που λαμβάνεται μετά πρωτεολυτική διάσπαση του FGF23-cFGF23) και της διαλύτης α-Klotho στον ορό(481).

Η μέση τιμή για τον cFGF23, ήταν $51,14 \pm 12,79 \pm SD$ RU/ml ενώ οι διάμεσες (εύρος) τιμές για τον iFGF23 ήταν (8,8, 120) pg/ml και για την Klotho ήταν 1945 (372, 5866) pg/ml. Η έρευνα δεν έδειξε σημαντική συσχέτιση ούτε του FGF23 ούτε της Klotho με την ηλικία(9). Τα παιδιά στην εφηβεία είχαν υψηλότερα επίπεδα Klotho από τα παιδιά στην προεφηβεία ($p < 0,05$) και τα κορίτσια είχαν υψηλότερα επίπεδα cFGF23 ($p < 0,05$) και Klotho ($p < 0,001$) από τα αγόρια(9). Δεδομένου ότι η Klotho ήταν χαμηλότερη στα παιδιά προεφηβικής ηλικίας και τα κορίτσια είχαν υψηλότερη Klotho στον ορό από τα αγόρια, μια ερμηνεία θα ήταν ότι τα υψηλότερα επίπεδα της Klotho στα κορίτσια οφειλόταν στο γεγονός ότι η εφηβεία επέρχεται νωρίτερα στα κορίτσια από ότι στα αγόρια και όχι ως σαφής επίδραση του γυναικείου φύλου στην Klotho(9). Μετά από ξεχωριστή ανάλυση μεταξύ αγοριών και κοριτσιών και την κατάσταση της εφηβείας τους, η έρευνα αποκάλυψε ότι τα κορίτσια στην προεφηβεία είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα Klotho σε σύγκριση με τα αγόρια στην προεφηβεία, καθώς και τα κορίτσια στην εφηβεία σε σύγκριση με τα αγόρια στην εφηβεία (481).

Τα φωσφορικά άλατα ορού και η μέγιστη σωληναριακή επαναρρόφηση φωσφορικών TmP/GFR συσχετίστηκαν θετικά με την cFGF23 ($p < 0,01$ και $p < 0,001$), την iFGF23 ($p < 0,05$ και $p < 0,001$) και την Klotho ($p < 0,05$ και $p < 0,01$)(9). Η θετική συσχέτιση του φωσφορικού ορού και την μέγιστη σωληναριακή επαναρρόφηση φωσφορικών -TmP/GFR με την FGF23 και την Klotho

επιβεβαίωσε την αντιρρυθμιστική επίδραση της Klotho στην ομοιόσταση των φωσφορικών αλάτων(481).

Η Klotho συσχετίστηκε θετικά με τον IGF-I ($p < 0,0001$) και με τη βιταμίνη D $1,25(\text{OH})_2$ ($p < 0,05$). Η ισχυρή συσχέτιση της Klotho με τον IGF-I θα μπορούσε να υποδηλώνει έναν ρόλο της Klotho στη γραμμική ανάπτυξη μέσω της ρύθμισης του φωσφορικού άλατος ,γεγονός οποίο απαιτεί και άλλες αποδείξεις(481).

Σε μια προοπτική μελέτη οι Siahnidou et al ανακάλυψαν ότι η αύξηση της α-Klotho με την πρόοδο της μεταγεννητικής ηλικίας μπορεί να σχετίζεται με τον ρόλο της στη ρύθμιση του μεταβολισμού των νεογνών .Η ανάλυση των δεδομένων της μελέτης έδειξε ότι η συγκέντρωση της α-Klotho στο πλάσμα των νεογνών αυξήθηκε από την ηλικία των 14 και 28 ημερών, ανεξαρτήτως από την προωρότητα και αυξάνονταν κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα της ζωής τους (449).

Μια σημαντική επίδραση στα επίπεδα της διαλυτής πρωτεΐνης α-Klotho φάνηκε να έχει ο πρόωρος τοκετός ($F=6,0$, $P=0,01$) και η μεταγεννητική ηλικία - 14η ημέρα έναντι 28ης ημέρας ζωής - ($F=27,7$, $P<0,001$) (449). Η μέση τιμή του επιπέδου της διαλυτής πρωτεΐνης α-Klotho ήταν σημαντικά υψηλότερη στα τελειόμηνα από ότι στα πρόωρα βρέφη τόσο την 14η ημέρα (1099 (480) pg/ml έναντι 884 (239) pg/ml αντίστοιχα, $P<0,05$) όσο και την 28η ημέρα της ζωής (1277 (444) pg/ml έναντι 983 (264) pg/ml αντίστοιχα($P<0,05$).

Τόσο στα πρόωρα όσο και στα τελειόμηνα βρέφη, τα επίπεδα α-Klotho αυξήθηκαν σημαντικά από την 14η έως την 28η ημέρα της ζωής ($P<0,001$). Τα επίπεδα α-Klotho στο πλάσμα δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των νεογνών με SGA και των νεογνών με φυσιολογικό βάρος . Οι μέσες συγκεντρώσεις της διαλυτής πρωτεΐνης α-Klotho στο πλάσμα την 14η ημέρα της ζωής ήταν 794 (112) pg/ml στα SGA πρόωρα νεογνά και 963 (286) pg/ml στα SGA τελειόμηνα νεογνά ενώ, την 28η ημέρα της ζωής, τα επίπεδα της διαλυτής πρωτεΐνης α-KL ήταν 921 (182) pg/ml και 1196 (103) pg/ml στα SGA πρόωρα και τελειόμηνα νεογνά αντίστοιχα(36). Η έρευνα έδειξε ότι συγχρόνως με την αύξηση των επιπέδων της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ μαζί με την αύξηση των συγκεντρώσεων της α-Klotho από την 14η έως την 28η ημέρα της ζωής, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων FGF23 και φωσφορικών τόσο στα πρόωρα όσο και στα τελειόμηνα βρέφη. (449)

Στη μελέτη η Siahnidou et al βρήκαν ότι τα επίπεδα της α-Klotho συσχετίστηκαν θετικά με την ηλικία κύησης ($\beta=0,32$, $P=0,001$), με το σωματικό βάρος ($\beta=0,34$, $P=0,001$,) και το μήκος των νεογνών ($\beta=0,33$, $P=0,001$) .Παρόμοια συσχέτιση υπήρχε με την $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ($\beta=0,24$,

$P<0,05$) και στο MDA ($\beta=0,20$, $P<0,05$), αλλά όχι με το ασβέστιο, το φωσφορικό άλας, το FGF23, την PTH, την SOD, την γλυκόζη, την ινσουλίνη ή τις τιμές του HOMA index (449)

Έχει φανεί ότι τα υψηλότερα επίπεδα της α-Klotho στα τελειόμηνα νεογνά πιθανόν οφείλονται στην αυξημένη παραγωγή ή απελευθέρωση της πρωτεΐνης α-Klotho καθώς και στην ωριμότητα των νεφρώνων, η οποία σχηματίζεται κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου της εγκυμοσύνης και ολοκληρώνεται κατά τη στιγμή της γέννησης τους. Στον πρόωρο τοκετό ο νεφρικός κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η ωρίμανση των νεφρώνων συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της μεταγεννητικής ανάπτυξης (449).

Επιπλέον, η ερευνά ανέδειξε ότι συγκέντρωση της α-Klotho στο πλάσμα των νεογνών στην ηλικία των 14 ημερών (1099 ± 480 pg/ml) και των 28 ημερών (1277 ± 444 pg/ml (449) ήταν υψηλότερη από το επίπεδο ορού της 4ης ημέρα (582 ± 90 pg/ml), όπως ανέδειξε η μελέτη των Ohata et al (444).

Ωστόσο, η μελέτη της Siahianidou et al απέρριψε την υπόθεση ότι οι συγκεντρώσεις της α-Klotho στο τέλος της 2ης και 4ης εβδομάδας της ζωής αντανakλούν την πλακούντιακή προέλευση της πρωτεΐνης, επειδή οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ο χρόνος ημιζωής της διαλυτής α-Klotho in vivo ήταν σύντομος –μόνο 20-30 λεπτά(449). Δεδομένου ότι οι νεφροί αποτελούν κύρια πηγή της κυκλοφορούσας α-Klotho μια εξήγηση για τα αυξημένα επίπεδα της α-Klotho στη μελέτη της Siahianidou et al μπορεί να είναι το γεγονός ότι υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ του βάρους γέννησης των νεογνών και το αριθμό των νεφρώνων. Εκτός αυτό έχει φανεί ότι στα νεογνά, το σωματικό βάρος αντιπροσωπεύει σχεδόν το 80% της λιπώδους μάζας τους (482), επομένως η θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της α-Klotho και του σωματικού βάρους στον πληθυσμό της μελέτης δεν αντανakλά μόνο τη νεφρική προέλευση της α-Klotho, αλλά μπορεί επίσης να υποδηλώνει και την παραγωγή της α-Klotho από τον λιπώδη ιστό (449).

Η μείωση των επιπέδων φωσφορικών στη μελέτη σχετίστηκε με τη βελτίωση της νεφρικής ωριμότητας, καθώς η μεταγεννητική ηλικία έχει αρνητική επίδραση στα επίπεδα φωσφορικών στον ορό πιθανώς με την βελτίωση της ευαισθησίας των νεφρικών κυττάρων στη σηματοδότηση του FGF23 (449).

Η μελέτη της Siahianidou et al ανέδειξε έναν ενεργό ρόλο της α-Klotho στη ρύθμιση της νεογνικής ανάπτυξης, αν και οι έρευνες πρέπει να συνεχιστούν για να διευκρινιστεί ο μηχανισμός της επίδραση της πρωτεΐνης στα νεογνά(449).

Οι Mutsaers et al ανέφεραν μια περίπτωση ενός νέου ασθενή με σύνδρομο Sotos με μικροέλλειψη του 5q35 και παροδική παιδική υπερασβεσταιμία, στον οποίο η ετερόζυγη διαγραφή του FGFR4, οδήγησε σε μειωμένη σηματοδότηση του FGF23 κατά τη βρεφική ηλικία(483). Επιπλέον, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ο FGFR4 εκφράστηκε σε μεγάλο βαθμό στους εμβρυϊκούς και στους νεογνικούς νεφρούς, ενώ η έκφραση του FGFR3 ήταν υψηλότερη στους ενήλικους. Αυτή η διαπίστωση των Mutsaers et al υπογράμμισε ότι υπήρχε μια αλλαγή στη συμβολή και των δύο FGFRs στη σηματοδότηση του FGF23 κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την παροδική υπερασβεσταιμία(483). Επιπλέον, το προφίλ έκφρασης του mRNA της Klotho συσχετίστηκε σημαντικά τόσο με τον FGFR3 ($P=0.008$) όσο και με τον FGFR4 ($P=0.0002$), γεγονός που συνάδει με τον βασικό ρόλο του Klotho που δρα ως νεφρικός πυρηνούποδοχέας για τον FGF23(483).

Σε μια κοόρτη οι Wojcicki et al διερεύνησαν τη σχέση μεταξύ της Klotho του ομφαλοπλακουντιακού αίματος, της λεπτίνης, των λιποκυττάρων ορμονών και των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών του βρέφους, του παιδιού και της μητέρας σε μια ομάδα Λατίνο νεογνών(484).

Ο ρόλος της Klotho στον ενεργειακό μεταβολισμό και στην αύξηση του μεταγεννητικού βάρους δεν είναι πλήρως κατανοητός. Μελέτες ενηλίκων με παχυσαρκία και νευρική ανορεξία έχουν διαπιστώσει ότι οι διατροφικές διαταραχές σχετίζονται με χαμηλότερα επίπεδα της Klotho, γεγονός που υποδηλώνει τον πιθανό ρόλο της στην διατροφική ομοιόσταση.

Στη μελέτη διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ των επιπέδων Klotho στο αίμα του ομφάλιου λώρου και την έκθεσης στο στρες κατά την εγκυμοσύνη, συμπεριλαμβανομένων των καταθλιπτικών συμπτωμάτων της μητέρας, της κλινικής κατάθλιψης και των δεικτών ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένων των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών της γέννησης, του βάρους και των ορμονών κορεσμού (484).

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 72 Λατίνο-νεογνά με τις μητέρες τους και η μέση τιμή της Klotho στο αίμα του ομφάλιου λώρου κατά τη γέννηση των νεογνών μετρήθηκε στα $2864,9 \pm 1409,7$ pg/mL, επίπεδα τα οποία είναι συγκρίσιμα με άλλες μελέτες που αξιολόγησαν την Klotho στο αίμα του ομφάλιου λώρου(149).

Στην έρευνα δεν βρέθηκαν συσχετίσεις μεταξύ της κατάστασης της υγείας της μητέρας πριν από την εγκυμοσύνη ή κατά την εγκυμοσύνη και των αποτελεσμάτων του παιδιού, συμπεριλαμβανομένης της κατηγορίας BMI πριν από την εγκυμοσύνη($p=0,31$), της

προεκλαμψίας ($p=0,34$) ή της υπέρτασης($p=0,34$) , την υπερβολική αύξηση βάρους κατά την εγκυμοσύνη($p=0,74$) ή της ψυχική υγεία της μητέρας κατά την εγκυμοσύνη συμπεριλαμβανομένης της αυτοαναφερόμενης χρήσης αντικαταθλιπτικών ($p=0,51$) (484) .

Επίσης η μελέτη δεν έδειξε σημαντική διαφορά στα επίπεδα της Klotho ανάλογα με το φύλο του βρέφους($p =0,51$), την ηλικία κύησης($p=0,23$) ή τις βαθμολογίες Apgar στα 5 λεπτά($p=0,21$) (484). Οι ερευνητές δεν διαπίστωσαν καμία συσχέτιση της Klotho με τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά της γέννησης συμπεριλαμβανομένου του βάρους γέννησης($p=0,55$), της μακροσωμίας($p=0,97$) και του εκατοστιαίου βάρους γέννησης($p =0,74$). Τα βρέφη που ήταν λιποβαρή (<2500 g) ή πρόωρα (<37 εβδομάδων) είχαν χαμηλότερα επίπεδα Klotho ($1858,6 \pm 674,1$ έναντι. $2898,6 \pm 1417,2$ pg/mL), αν και τα αποτελέσματα έτειναν προς τη στατιστική σημαντικότητα ($p = 0,07$) λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος (μόνο $n = 4$ με χαμηλό βάρος γέννησης ή πρόωρο τοκετό)(484). Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα της Klotho είχαν αντίστροφη συσχέτιση τόσο με τη λεπτίνη ($p < 0,01$) όσο και με την ινσουλίνη ($p < 0,03$) (484). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της λεπτίνης και του βάρους γέννησης καθώς και άλλων γεννητικών χαρακτηριστικών, όπως το μήκος γέννησης και το ponderal index (485). Σε αντίθεση με άλλες μελέτες, η μελέτη των Wojcicki et al δεν διαπίστωσε καμία συσχέτιση μεταξύ το επίπεδο της Klotho με το βάρους γέννησης και άλλων χαρακτηριστικών της γέννησης (449).

Επίσης, οι ερευνητές δεν διαπίστωσαν καμία συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της Klotho κατά τη γέννηση στην πρώιμη παιδική παχυσαρκία στην ηλικία των 6 ($p=0,46$), 12($p=0,85$) και 24 ($p=0,81$) μηνών . Παρά των πολλαπλών παραμέτρων που εξετάστηκαν στην μελέτη απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για την καλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτής της ορμόνης και των βασικών ρυθμιστών της ανάπτυξης και της παχυσαρκίας.(486)

Σε μια πειραματική μελέτη με τρωκτικά οι Ali et al ανέδειξαν ότι η έκθεση σε H_2O_2 κατά τη διάρκεια της μεταγεννητικής νεφρογένεσης οδηγεί σε μείωση της έκφρασης της νεφρικής Klotho (487).

Δεδομένα έχουν δείξει ότι η έκθεση σε υψηλά επίπεδα οξυγόνου, ενώ η νεφρογένεση βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη, ασκεί επίδραση την ανάπτυξη των νεφρών και το αυξημένο οξειδωτικό στρες επηρεάζει δυσμενώς τη σπειραματική και σωληναριακή ωρίμανση.(488)

Οι Ali et al ανέφεραν ότι η έκθεση σε H_2O_2 σε αρουραίους λίγο μετά τη γέννηση θα μπορούσε να έχει συγκρίσιμες συνέπειες στην μεταγεννητική νεφρογένεση με εκείνες που προκαλούνται

από την έκθεση σε O₂ σε εξαιρετικά πρόωρα βρέφη που γεννιούνται στις 24-25 εβδομάδες κύησης(487). Στο πείραμα τους νεογέννητοι αρουραίοι χωρίστηκαν σε δύο ομάδες παροχή O₂ - σε παροχή με 21%O₂ ή σε παροχή με 85%HO- από την 1 έως 21 μεταγεννητική ημέρα και έλαβαν τυχαία ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις ανασυνδυασμένου Klotho ή placebo για 3 εβδομάδες. Για να αξιολογηθεί η επίδραση της υπεροξυγοναιμίας ,αναλύθηκαν οι δείκτες αντίστασης και παλμικότητας της νεφρικής αρτηρίας, οι βαθμολογίες σωληναριακής βλάβης, η σπειραματική επιφάνεια και η νεφρική αντιοξειδωτική ικανότητα. (487).

Η μελέτη επιβεβαίωσε τις επιβλαβείς επιδράσεις του HO στη νεφρική σωληναριακή ακεραιότητα, όπως αποδείχθηκε από τις υψηλότερες βαθμολογίες νεφρικής σωληναριακής βλάβης που βρέθηκε στους αρουραίους που εκτράφηκαν σε περιβάλλον εμπλουτισμένο με 85% οξυγόνο.(487).

Η έκθεση σε νεογνική HO για 21 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά μειωμένη έκφραση του γονιδίου και της πρωτεΐνης Klotho στους νεφρούς(P<0,05) και η χορήγηση εξωγενούς Klotho οδήγησε σε διπλάσια αύξηση της έκφρασης της MnSOD στους νεφρούς τόσο σε συνθήκες νορμοξίας όσο και σε συνθήκες αυξημένου HO.(487)

Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η εξωγενής χορήγηση της Klotho απέτρεψε τη σπειραματομεγαλία και μετρίασε τη σωληναριακή βλάβη σε επίπεδα παρόμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν στα ζώα με εικονικό φάρμακο που μεγάλωσαν σε συνθήκες φυσιολογικού οξυγόνου.(487).

Η μελέτη των Ali et al ανέδειξε μια άλλη πιθανή κλινική εφαρμογή της Klotho σε πρόωρα βρέφη με νεφρική ανεπάρκεια που σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες και άνοιξε δρόμο για καινούργιες μελέτες για την κατανόηση των μηχανισμών δράσης της πρωτεΐνης.

Η θεραπευτική υποθερμία είναι μια σωτήρια για τη ζωή παρέμβαση που αποτελεί πρότυπο περίθαλψης για την αντιμετώπιση νευρολογικών βλαβών σε τελειόμηνα νεογνά με υποξική ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια(489). Οι κλινικές δοκιμές υποδεικνύουν ότι τα νευρολογικά οφέλη της ολικής ψύξης του σώματος μετά από υποξία-ισχαιμία είναι μεγαλύτερη για τα νεογνά από ότι για τους ενήλικες, αλλά οι μοριακές βάσεις για την εξήγηση της εξαρτώμενης από την ηλικία αποκλίσεις στην αποτελεσματικότητα της υποθερμίας στους ανθρώπους δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως (489).

Λίγες εργασίες έχουν γίνει για τη διερεύνηση της παρουσίας ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται με τη θερμογένεση στον εγκέφαλο τα οποία μπορεί να επηρεαστούν από την ολική ψύξη του σώματος.

Στην προσπάθεια να διαπιστωθεί αν η νευροαναπτυξιακή ηλικία μεταβάλλει τη βασική έκφραση των νευροπροστατευτικών πρωτεϊνών ψυχρού σοκ (CSP) στον ανθρώπινο εγκέφαλο, οι Jackson et al διεξήγαγαν έρευνα μετρώντας τα επίπεδα των CSP σε ιππόκαμπους και σε πρόσθιους προμετωπιαίους φλοιούς (aPFC) σε βρέφη <1 έτους (n=8), σε νήπια ηλικίας 1-2 ετών (n=8), σε παιδιά ηλικίας 3-5 ετών (n = 7), σε εφήβους 18 ετών (n = 8), και σε ενήλικες ηλικίας 31-34 ετών (n = 8).(490)

Τα θερμογενετικά μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης έχουν πλειοτροπικές επιδράσεις πέραν της παραγωγής θερμότητας και μπορεί να είναι επιβλαβείς ή ευεργετικά για τον τραυματισμένο εγκέφαλο. Στα ανθρώπινα νεογέννητα, η θερμοκρασία σώματος ρυθμίζεται από τη θερμογένεση χωρίς ρίγος μέσω της ενεργοποίησης της BAT (491). Μετά την ηλικία του 1 έτους, οι θερμορυθμιστικοί μηχανισμοί αλλάζουν σε μυϊκή ανατριχίλα και μια ξεχωριστή μορφή θερμογένεσης χωρίς ρίγος στο σκελετικό μυ (492). Είναι γνωστό ότι ο FGF21 είναι μια ενδοκρινική ορμόνη που ενεργοποιεί το καφέ λιπώδη ιστό (BAT) και αυξάνει τη θερμοκρασία του σώματος στα νεογέννητα ποντίκια. Επιπλέον έχει φανεί ότι στα ανθρώπινα νεογέννητα, τα ενδογενή κυκλοφορούντα επίπεδα FGF21 αυξάνονται κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδα της ζωής και παραμένουν σε υψηλές συγκεντρώσεις για τουλάχιστον ένα έτος (493).

Η έρευνα του Jackson et al ανέλυσε αν η β-Klotho εκφράζεται στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο διότι η β-Klotho λειτουργεί ως βασικός υποδοχέας που ελέγχει την ειδική πρόσδεση με τον FGF21 και εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, στο πάγκρεας και στα λιπώδη κύτταρα.(490)

Η μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα της β-Klotho στον ιππόκαμπο ήταν αυξημένα στα βρέφη έναντι των παιδιών, των εφήβων και των ενηλίκων ($P < 0,0001$). Τα επίπεδα της β-Klotho στον ιππόκαμπο ήταν επίσης αυξημένα στα νήπια σε σύγκριση με τους εφήβους ($P < 0,0001$)(490). Στον πρόσθιο προμετωπιαίο φλοιό τα επίπεδα της β-Klotho ήταν αυξημένα στα βρέφη έναντι των εφήβων και των ενηλίκων ($P = < 0,0001$)(490). Τα επίπεδα της β-Klotho στο πρόσθιου προμετωπιαίου φλοιού (aPFC) βρέθηκαν επίσης αυξημένα στα νήπια έναντι των ενηλίκων ($P = < 0,0001$). Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων (19 άνδρες έναντι 20 γυναικών) στους ιππόκαμπους ή στο πρόσθιου προμετωπιαίο φλοιό για τα επίπεδα των CSPs(RBM3,RTN3) και της β-Klotho(στον ιππόκαμπο: RBM3, $p = 0,5741$, RTN3, $p =$

0,866, $p = 0,2216$ - β -Klotho, $p = 0,4072$, στον πρόσθιου προμετωπιαίο φλοιό: RBM3, $p = 0,8994$ - RTN3, $p = 0,9776$ - CIRBP, $p = 0,5458$; LB, $p = 0,7044$)(490).

Μέχρι τώρα τα δεδομένα έχουν δείξει ότι η έκφραση της β -Klotho περιορίζεται σε λίγους μόνο νευρωνικούς πληθυσμούς εντός του υποθαλάμου και στον οπίσθιο εγκέφαλο (420).

Η μελέτη των Jackson et al βρήκε ότι η β -Klotho στον ιππόκαμπο και στον aPFC ήταν άφθονη στα βρέφη, μέτρια στα νήπια και χαμηλή ή απύσχα σε όλες τις άλλες ηλικίες(490). Τα υψηλά επίπεδα της β -Klotho στον ιππόκαμπο και του aPFC των βρεφών και των νηπίων τόνισε ότι τα μονοπάτια σηματοδότησης FGF21 μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη νευροανάπτυξη και πιθανόν επηρεάζονται από τη θεραπευτική υποθερμία σε μεγαλύτερο βαθμό στα βρέφη(490).

Άλλη μια μελέτη η οποία αναδεικνύει τη σημασία του FGF21 και του β -Klotho στα νεογνά, είναι η έρευνα των Gavalda-Navarro et al ,που έδειξε ότι η β -Klotho εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο λεπτό έντερο των νεογνών ποντικών, γεγονός που υποδηλώνει ότι το νεογνικό λεπτό έντερο μπορεί να ανταποκρίνεται σε μεγάλο βαθμό στον FGF21(494). Τα τελευταία χρόνια, ο FGF21 έχει αναδειχθεί ως ένας σημαντικός ορμονικός παράγοντας που έχει πλειοτροπικές επιδράσεις στη ρύθμιση του μεταβολισμού και είναι σημαντικός στη νεογνική ζωή, όπως αποδεικνύεται από την επαγωγή της έκφρασης και των επιπέδων του FGF21 στα νεογνικά ποντίκια που προκαλείται από την πρόσληψη γάλακτος (494). Η μελέτη των Gavalda-Navarro et al αποκάλυψε ότι ο FGF21 είναι παρών στο μητρικό γάλα και φαίνεται να δρα τοπικά στο νεογνικό έντερο των ποντικών, όπου ρυθμίζει την έκφραση και τη δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων και τη σύνθεση και απελευθέρωση των εντερικών ορμονικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των ινκρετινών GLP-1 και GIP(494)

Τα στοιχεία της μελέτης δείχνουν ότι η β -Klotho εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στην αυλική περιοχή του λεπτού εντέρου στα νεογνά αλλά όχι στους ενήλικες. Στους ενήλικες, τα επίπεδα mRNA της β -Klotho ήταν πολύ χαμηλότερα στο στομάχι και το έντερο σε σύγκριση με το καφέ λιπώδη ιστό BAT($P < 0.001$) ή με το ήπαρ ($P < 0.01$), γεγονός οποίο συνάδει με την τρέχουσα πεποίθηση ότι το γαστρεντερικό σύστημα των ενηλίκων δεν αποτελεί σημαντικό στόχο του FGF21(494). Ωστόσο, η έκφραση του mRNA της β -Klotho ήταν σημαντικά υψηλή στο λεπτό έντερο των νεογνών τόσο την 2η($P < 0.05$,) όσο και την 8η($P < 0.05$) ημέρα της ηλικίας τους(494). Ήταν επίσης υψηλή και στις τρεις τομές του λεπτού εντέρου και ήταν περίπου 50-60 φορές υψηλότερη στο νεογνικό ιγμόρειο και στο ειλέο σε σύγκριση με τους αντίστοιχους ιστούς των ενηλίκων(494).

Έτσι οι ερευνητές υπογράμμισαν έναν νέο βιολογικό ρόλο του Klotho ως συνυποδοχέα του FGF21, ο οποίος δρα ως ορμονικός παράγοντας που υπάρχει στο γάλα και εμπλέκεται στον έλεγχο της λειτουργίας και της ωρίμανσης του νεογνικού εντέρου(494).

Οι Batlahally et al δημοσίευσαν στοιχεία από μια μελέτη ασθενών μαρτύρων με πρόωρα νεογνά σε ηλικία τοκετού <29 εβδομάδων που παρακολουθήθηκαν προοπτικά και βρέθηκε ότι η μειωμένη συγκέντρωση της Klotho στο αίμα του ομφάλιου λώρου τους σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο για σοβαρή βρογχοπνευμονική δυσπλασία και πνευμονική υπέρταση (495).

Η βρογχοπνευμονική δυσπλασία είναι μια πολυπαραγοντική νόσος που προσβάλλει τα πρόωρα βρέφη και χαρακτηρίζεται από μεταβολές στην ανάπτυξη των πνευμόνων, στην αγγειακή αναδιαμόρφωση και στην πνευμονική δυσλειτουργία. Τα πρόωρα βρέφη με βρογχοπνευμονική δυσπλασία(BPD) στις πιο σοβαρές περιπτώσεις αναπτύσσουν πνευμονική υπέρταση(PH) και δυσλειτουργία του μυοκαρδίου.

Στη μελέτη κατατάχθηκαν 40 βρέφη, συμπεριλαμβανομένων 11 νεογνά με βρογχοπνευμονική δυσπλασία, 14 με βρογχοπνευμονική δυσπλασία και πνευμονική υπέρταση και 15 χωρίς βρογχοπνευμονική δυσπλασία ή πνευμονική υπέρταση(495). Τα βρέφη που εμφάνισαν βρογχοπνευμονική δυσπλασία είχαν σημαντικά χαμηλότερη ηλικία κύησης κατά τη γέννηση($p<0,02$). Τα παιδιά που δεν ανέπτυξαν βρογχοπνευμονική δυσπλασία ή BPD-PH είχαν σημαντικά υψηλότερο βάρος γέννησης($p<0,02$), αν και δεν υπήρχε διαφορά στο βάρος γέννησης για την ηλικία κύησης(495). Δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς το φύλο ή τα μητρικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας της μητέρας, την φυλή, τον πρόωρο τοκετό, την προεκλαμψία, τον τρόπο τοκετού ή τα ποσοστά χοριοαμνιονίτιδας. Βρέφη που ανέπτυξαν BPD και BPD-PH είχαν σημαντικά χαμηλότερες βαθμολογίες Apgar 1($p<0,02$) και 5 λεπτών($p<0,005$)(495). Η Klotho ήταν σημαντικά μειωμένη($P<0,05$) στο αίμα του ομφάλιου λώρου των πρόωρων βρεφών που εμφάνισαν BPD(1.306 (967, 2585) pg/ml και BPD-PH(1529 (1126, 3153) pg/ml) σε σύγκριση με τους ελέγχους(2.726 (1784, 3435) pg/ml) (495).

Δεδομένης της πολυπαραγοντικής αιτιολογίας της BPD και της PH στα πρόωρα βρέφη και της σημαντικής συμβολής της υπεροξίας στην παθογένεια αυτών των ασθενειών, οι Batlahally et al αξιολόγησαν την επίδραση της νεογνικής υπεροξίας στους πνεύμονες και στα επίπεδα της Klotho στην κυκλοφορία σε ένα πειραματικό μοντέλο με τρωκτικά με BPD-PH(9). Στην μελέτη νεογνών αρουραίων εκτέθηκαν σε αέρα δωματίου ή σε υπεροξία (85% O₂) για 3, 5, 14 και 21 ημέρες και αξιολογήθηκε η έκφραση του γονιδίου και της πρωτεΐνης Klotho στους

πνεύμονες τους μαζί με τα επίπεδα διαλυτής Klotho στην κυκλοφορία(9). Η έκφραση του γονιδίου του mRNA της Klotho στον πνευμονικό ιστό των νεογνών αρουραίων που εκτέθηκαν σε υπεροξία για 3 ημέρες ήταν συγκρίσιμη με εκείνη της ομάδας που εκτέθηκε σε νορμοξία(9). Πρέπει να σημειωθεί ότι η πιο παρατεταμένη έκθεση σε 14 και 21 ημέρες υπεροξίας είχε σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου($P<0.05$) και της πρωτεΐνης Klotho στους πνεύμονες ($P<0.001$). Η ταυτόχρονη δειγματοληψία αίματος σε αυτές τις δύο χρονικές στιγμές, αποκάλυψε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα Klotho στον ορό των νεογνών που εκτέθηκαν σε υπεροξία σε σύγκριση με τα επίπεδα Klotho στην ομάδα της νορμοξίας(495).

Χρησιμοποιώντας ένα προκλινικό *in vivo* μοντέλο σοβαρής BPD-PH, οι Batlahally et al έδειξαν ότι η πρόωμη χορήγηση της διαλυτής Klotho βελτίωσε την αγγειακή ανάπτυξη των πνευμόνων, μετριάσει την πνευμονική υπέρταση και μείωσε τη δυσλειτουργία του μυοκαρδίου. Η μελέτη ανέδειξε *in vitro* ότι η θεραπεία με Klotho των εκτεθειμένων στην υπεροξία ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων της πνευμονικής αρτηρίας (HPAECs) αύξησε την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και το σχηματισμό των πνευμονικών τριχοειδών σωλήνων(495).

Τα ευρήματα της μελέτης υπογράμμισαν ότι η περιγεννητική ανεπάρκεια της Klotho μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία σε BPD και PH σε πρόωρα βρέφη και ανέδειξε ότι οι στρατηγικές που αυξάνουν τα διαλυτά επίπεδα Klotho, μπορούν να βελτιώσουν τα καρδιοπνευμονικά αποτελέσματα στα πρόωρα νεογνά.

Οι South et al πρώτοι περιέγραψαν τη συσχέτιση μεταξύ των χαμηλών επιπέδων διαλυτής α-Klotho στα ούρα και της υψηλότερης αρτηριακής πίεσης σε νεαρούς ενήλικες που γεννήθηκαν πρόωρα με πολύ χαμηλό βάρος γέννησης(VLBW)(496). Σε προγενέστερες μελέτες οι ερευνητές έχουν δείξει ότι ο πρόωρος τοκετός σχετίζεται με χαμηλότερες συγκεντρώσεις του Ang-(1-7) στο πλάσμα και στα ούρα με υψηλότερη Ang II/Ang-(1-7)] και με υψηλότερη ΑΠ (496)

Οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι τόσο οι συμμετέχοντες που γεννήθηκαν πρόωρα όσο και οι συμμετέχοντες που γεννήθηκαν τελειόμηνια έδειξαν μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της α-Klotho και του Ang II/Ang-(1-7), γεγονός όποιο αποδόθηκε στην ομάδα των πρόωρων στην χαμηλότερη Ang-(1-7)/κρεατινίνη, ενώ στη συνομοταξία των τελειόμηνων τοκετών, αυτό οφειλόταν κυρίως στην υψηλότερη Ang II/κρεατινίνη(496). Αυτά τα δεδομένα υποστήριξαν τη θεωρία των ερευνητών ότι τα άτομα που γεννήθηκαν πρόωρα με VLBW μπορεί να έχουν χάσει την δυνητικά συνεργιστική ευεργετική σχέση μεταξύ της α-Klotho και την Ang-(1-7) στους νεφρούς(496). Η κατασταλαμένη νεφρική α-Klotho σε συνδυασμό με την κατασταλαμένη νεφρική

Ang-(1-7) μπορεί να εξηγήσει τον πιθανό μηχανισμό για την ανάπτυξη της υπέρτασης, γεγονός το οποίο απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση με μεγαλύτερα μεγέθη δείγματος και πειραματικές μελέτες για την ανάλυση και των αιτιωδών επιδράσεων των παραμέτρων (496).

Από την στιγμή της ανακάλυψης του γονιδίου και της πρωτεΐνης Klotho το 1997 από τον Kuro et al ερευνητές έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον τους στην διερεύνηση της πλειοτροπικής δράσης της Klotho σε όλα τα όργανα και συστήματα του ανθρώπου. Ωστόσο, η γνώση των μοριακών και φυσιολογικών πτυχών της Klotho έχει σημειώσει σημαντική πρόοδο τα τελευταία χρόνια, όπως περιγράφεται στην παρούσα ανασκόπηση.

Η πρωτεΐνη Klotho φαίνεται να συντίθεται κυρίως στους νεφρούς και στον εγκέφαλο, μπορεί να ανιχνευθεί στο αίμα, στα ούρα, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (29,157,344) ,όπως και σε διάφορα όργανα αναπαραγωγής , συμπεριλαμβανομένων τις ωοθήκες, τους όρχεις και τον πλακούντα (1). Δεδομένα αναφέρουν ότι η πρωτεΐνη Klotho μπορεί να ρυθμίζει τα ενδογενή αντιοξειδωτικά για να αυξάνει την αντίσταση των κυττάρων στην οξειδωτική βλάβη, να αναστέλλει την απόπτωση, να διατηρεί τα βλαστικά κύτταρα, να προάγει την αγγειογένεση και ενδοθηλιακή λειτουργία, και να καταστείλει την ινογένεση, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει τις συσχετίσεις μεταξύ της πρωτεΐνης και πολλών ασθενειών στον άνθρωπο, όπως η στεφανιαία νόσος, η αθηροσκλήρωση, οι οξείες και χρόνιες νεφρικές παθήσεις, οι καρκίνοι και η υπέρταση (157,344). Ισχυρές ενδείξεις υπογραμμίζουν ότι η πρωτεΐνη Klotho μπορεί να αυξήσει την αντίσταση στο οξειδωτικό στρες επάγοντας την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων και μειώνοντας τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (157).

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ποντίκια με ανεπάρκεια Klotho παρουσίασαν δυσλειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών, η οποία εκδηλώνεται κυρίως μέσω της μείωσης της FSH και της LH, της αναστολής ωοθυλακιορρηξίας, της ατροφίας των γονάδων και της στειρότητας (15). Η Klotho συσχετίζεται στενά με τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-ωοθήκες και διαδραματίζει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη των αναπαραγωγικών ασθενειών (422). Επιπλέον έχει φανεί ότι η Klotho μπορεί να συμμετέχει στην απόπτωση των κοκκιοκυττάρων των ωοθηκών και στην ανάπτυξη του PCOS σε ζώα(430) και μπορεί να αποτελεί κρυοπροστατευτικός παράγοντας στον ωοθηκικό ιστό κατά τη διάρκεια διαδικασίας της κατάψυξης και απόψυξης του (434) .

Ωστόσο υπάρχουν περιορισμένες μελέτες στον άνθρωπο για τον ρόλο της Klotho στη φυσιολογική εξέλιξη της κύησης , όπως και στην εμπλοκή της στην παθολογία της κύησης.

Υπάρχουν δεδομένα , τα οποία αναφέρουν τη διαλυτή α-Klotho στο αίμα του ομφάλιου λώρου ως ένας χρήσιμος βιοδείκτης για τον μεταβολισμό του ασβεστίου και των φωσφορικών αλάτων στο έμβρυο(444).

Επίσης η α-Klotho μπορεί να διαδραματίσει ρόλο κατά τη διάρκεια των επιπλοκών της εγκυμοσύνης λόγω της λειτουργίας της στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου και την προστασίας της έναντι της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας και του οξειδωτικού στρες(464).

Τα δεδομένα μέχρι τώρα σχετικά με τα αποτελέσματα των επιπέδων της Klotho στην προεκλαμψία έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Ορισμένες μελέτες αναδεικνύουν ότι τόσο η έκφραση του mRNA όσο και της πρωτεΐνης Klotho μειώνεται σημαντικά σε ασθενείς με ΠΕ σε σύγκριση με τις φυσιολογικές έγκυες πιθανώς λόγω της σημαντικής ιδιότητα της πρωτεΐνης να μειώνει το οξειδωτικό στρες (444 ,464).

Αντίθετα πρόσφατες έρευνες έχουν διαπιστώσει υψηλότερα συστηματικά και πλακουντιακά επίπεδα της Klotho στις προεκλαμπτικές γυναίκες σε σύγκριση με τις φυσιολογικές κυήσεις(443,468) . Σύμφωνα με τα ευρήματα των μελετών , η Klotho αναδεικνύεται ως ένας υποψήφιος προγνωστικός βιοδείκτης λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της ειδικότητας του στην παρουσία της ΠΕ .Ωστόσο η προγνωστική αξία και η διαφορική διαγνωστική αξία της πρωτεΐνης στην μαιευτική μένει να ερευνηθεί εις βάθος (468).

Άλλοι ερευνητές έχουν προτείνει την α- Klotho ως προγνωστικό δείκτη της νεφρικής λειτουργίας στην εγκυμοσύνη με ΠΕ. Αν και η μηχανισμός που διέπει τον τρόπο με τον οποίο η α-Klotho επηρεάζει την νεφρική λειτουργία δεν είναι πλήρως κατανοητός, μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η αυξημένη νεφρική έκφραση της α-Klotho μπορεί να επηρεάζει το νεφρικό οξειδωτικό στρες και να οδηγήσει σε νεφρική δυσλειτουργία (465). Επιπλέον, αναλύσεις έχουν δείξει ότι η α-Klotho του ορού συσχετίζεται θετικά με το βάρος γέννησης του εμβρύου , γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη μπορεί να επηρεάζει τον περιορισμό της αύξησης του εμβρύου που προκαλείται από την ΠΕ (448 ,473). Έρευνες με αρουραίους έδειξαν ότι η α-Klotho μπορεί να είναι απαραίτητη για την επιβίωση μετά τη γέννηση, αλλά όχι για την εμβρυϊκή ανάπτυξη (115). Παρόλο που υπάρχουν λίγες έρευνες που έχουν διερευνήσει τον ρόλο της α-Klotho στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, μια πιθανή εξήγηση ήταν ότι η α-Klotho επηρεάζει την εμβρυϊκή την ανάπτυξη του εμβρύου μέσω της επίδρασης στον πλακούντα (448 ,449).

Ωστόσο , οι Ohata et al. υπέδειξαν ότι η πρωτεΐνη α-Klotho στα βρέφη προερχόταν από τον πλακούντα και η πλακουντιακή συγκυτιοτροφοβλάστη ήταν μία από τις κύριες πηγές της α-Klotho που κυκλοφορεί σε αφθονία στο έμβρυο (15) .

Ο ρόλος της Klotho στις διαταραχές της εγκυμοσύνης δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη ωστόσο έχει φανεί ότι το επίπεδο της πρωτεΐνης σχετίζεται με το βάρος γέννησης του βρέφους, αν και δεν είναι σαφές αν η συσχέτιση αυτή αποδίδεται στην αυξημένη έκφραση της Klotho μαζί με την ωρίμανση των σχετικών οργάνων ή στις παρακρινικές επιδράσεις της πρωτεΐνης στα λιποκύτταρα και στον μεταβολισμό(449).

Η εξωγενής συμπλήρωση της Klotho και η ρύθμιση της ενδογενούς παραγωγής της πρωτεΐνης μπορεί να παρέχει νέα θεραπεία για τα πρόωρα βρέφη με νεφρική ανεπάρκεια(487) , όπως αναφέρθηκε και στην αντιμετώπιση των νευρολογικών βλαβών σε τελειόμηνα νεογνά με υποξική ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια(489).Αυτά τα ευρήματα παρέχουν ελπίδες για ανεύρεση νέων θεραπειών με την συμμετοχή της Klotho για την καθυστέρηση ή την παρεμπόδιση της εξέλιξής, καθώς και στην πρόληψη και στην αναστροφή των επιπλοκών της προωρότητας (487,489).

Απαιτούνται μελλοντικές μελέτες για την επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων και την περαιτέρω αξιολόγηση του βιοδείκτη Klotho και του θεραπευτικού δυναμικού της πρωτεΐνης στην εξέλιξη του γυναικείου γεννητικού συστήματος, στην ανάπτυξη των υπερτασικών διαταραχών της εγκυμοσύνης και στην προγεννητική και μεταγεννητική ανάπτυξη των βρεφών. Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον να βρεθούν εφαρμογές στους ανθρώπους για την χρήση της Klotho στην προώθηση της μητρικής και της παιδικής υγείας ,γεγονός οποίο αποτελεί ύψιστο ενδιαφέρον για πολλές κλινικές μελέτες στο μέλλον.

Βιβλιογραφία:

- 1.** 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. doi: 10.1038/36285. PMID: 9363890.
- 2.** Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science*. 1996 Apr 12;272(5259):258-62. doi: 10.1126/science.272.5259.258. PMID: 8602509.
- 3.** Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocchi S, Proytcheva M, German J. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*. 1995 Nov 17;83(4):655-66. doi: 10.1016/0092-8674(95)90105-1. PMID: 7585968.
- 4.** Weeda G, van Ham RC, Vermeulen W, Bootsma D, van der Eb AJ, Hoeijmakers JH. A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Cell*. 1990 Aug 24;62(4):777-91. doi: 10.1016/0092-8674(90)90122-u. PMID: 2167179.
- 5.** Salk D, Au K, Hoehn H, Martin GM. Cytogenetics of Werner's syndrome cultured skin fibroblasts: variegated translocation mosaicism. *Cytogenet Cell Genet*. 1981;30(2):92-107. doi: 10.1159/000131596. PMID: 7273860.
- 6.** Ellis NA. Mutation-causing mutations. *Nature*. 1996 May 9;381(6578):110-1. doi: 10.1038/381110a0. PMID: 8610002.
- 7.** Kuro-o M, Hanaoka K, Hiroi Y, Noguchi T, Fujimori Y, Takewaki S, Hayasaka M, Katoh H, Miyagishi A, Nagai R, et al. Salt-sensitive hypertension in transgenic mice overexpressing Na(+)-proton exchanger. *Circ Res*. 1995 Jan;76(1):148-53. doi: 10.1161/01.res.76.1.148. PMID: 8001273.
- 8.** Azuma M, Koyama D, Kikuchi J, Yoshizawa H, Thasinas D, Shiizaki K, Kuro-o M, Furukawa Y, Kusano E. Promoter methylation confers kidney-specific expression of the Klotho gene. *FASEB J*. 2012 Oct;26(10):4264-74. doi: 10.1096/fj.12-211631. Epub 2012 Jul 10. PMID: 22782974; PMCID: PMC3448772.
- 9.** Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, Sirkis R, Naveh-Many T, Silver J. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest*. 2007 Dec;117(12):4003-8. doi: 10.1172/JCI32409. PMID: 17992255; PMCID: PMC2066196.
- 10.** 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. doi: 10.1126/science.1112766. Epub 2005 Aug 25. PMID: 16123266; PMCID: PMC2536606.
- 11.** 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. doi: 10.1096/fj.02-0448fje. Epub 2002 Nov 15. PMID: 12475907.
- 12.** 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. doi: 10.1161/01.CIR.0000124224.48962.32. Epub 2004 Mar 22. PMID: 15037532.

- 13.** 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. doi: 10.1677/joe.0.1740403. PMID: 12208660.
- 14.** Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Identification of the human *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted *klotho* protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jan 26;242(3):626-30. doi: 10.1006/bbrc.1997.8019. PMID: 9464267.
- 15.** 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. doi: 10.1210/en.2005-0429. Epub 2005 Sep 22. PMID: 16179415.
- 16.** 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. doi: 10.1096/fj.08-114397. Epub 2008 Oct 3. PMID: 18835926; PMCID: PMC2630784.
- 17.** 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. doi: 10.1126/science.1143578. PMID: 17690294.
- 18.** 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. doi: 10.4049/jimmunol.167.5.2625. PMID: 11509604.
- 19.** Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 2004 Feb;5(2):133-9. doi: 10.1038/ni1033. PMID: 14749784.
- 20.** Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C, Chikuda H, Nakamura K, Kuro-o M. Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in *klotho* mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *J Clin Invest.* 1999 Aug;104(3):229-37. doi: 10.1172/JCI5705. PMID: 10430604; PMCID: PMC408412.
- 21.** Yamashita T, Nifuji A, Furuya K, Nabeshima Y, Noda M. Elongation of the epiphyseal trabecular bone in transgenic mice carrying a *klotho* gene locus mutation that leads to a syndrome resembling aging. *J Endocrinol.* 1998 Oct;159(1):1-8. doi: 10.1677/joe.0.1590001. PMID: 9795335.
- 22.** Fukuchi Y. The aging lung and chronic obstructive pulmonary disease: similarity and difference. *Proc Am Thorac Soc.* 2009 Dec 1;6(7):570-2. doi: 10.1513/pats.200909-099RM. PMID: 19934351.
- 23.** 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. doi: 10.1165/ajrcmb.22.1.3554. PMID: 10615062.
- 24.** 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 U S A.* 2007 Feb 13;104(7):2361-5. doi: 10.1073/pnas.0607882104. Epub 2007 Feb 6. PMID: 17284608; PMCID: PMC1892918.
- 25.** Ishii M, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Hanaoka Y, Ouchi Y. Airspace enlargement with airway cell apoptosis in *klotho* mice: a model of aging lung. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008 Dec;63(12):1289-98. doi: 10.1093/gerona/63.12.1289. PMID: 19126841.
- 26.** Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006 Oct 19;443(7113):787-95. doi: 10.1038/nature05292. PMID: 17051205.

27. Anamizu Y, Kawaguchi H, Seichi A et al. Klotho insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn cells. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005; 109(5):457-466.
28. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006 Oct 19;443(7113):787-95. doi: 10.1038/nature05292. PMID: 17051205.
29. 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. doi: 10.1074/jbc.M509039200. Epub 2005 Sep 26. PMID: 16186101; PMCID: PMC2515369.
30. 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. doi: 10.1016/s0378-5955(02)00483-5. PMID: 12204354.
31. Xu Y, Sun Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. *Endocr Rev*. 2015 Apr;36(2):174-93. doi: 10.1210/er.2013-1079. Epub 2015 Feb 19. PMID: 25695404; PMCID: PMC4399270.
32. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Jan 26;242(3):626-30. doi: 10.1006/bbrc.1997.8019. PMID: 9464267.
33. Turan K, Ata P. Effects of intra- and extracellular factors on anti-aging klotho gene expression. *Genet Mol Res*. 2011 Sep 9;10(3):2009-23. doi: 10.4238/vol10-3gmr1261. PMID: 21948763.
34. Janson L, Pettersson U. Cooperative interactions between transcription factors Sp1 and OTF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jun;87(12):4732-6. doi: 10.1073/pnas.87.12.4732. PMID: 2191301; PMCID: PMC54191.
35. Snape AM, Winning RS, Sargent TD. Transcription factor AP-2 is tissue-specific in *Xenopus* and is closely related or identical to keratin transcription factor 1 (KTF-1). *Development*. 1991 Sep;113(1):283-93. doi: 10.1242/dev.113.1.283. PMID: 1722450.
36. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature*. 1997 Mar 27;386(6623):399-402. doi: 10.1038/386399a0. PMID: 9121556.
37. Perrotti D, Melotti P, Skorski T, Casella I, Peschle C, Calabretta B. Overexpression of the zinc finger protein MZF1 inhibits hematopoietic development from embryonic stem cells: correlation with negative regulation of CD34 and c-myc promoter activity. *Mol Cell Biol*. 1995;15:6075–6087
38. Kastner P, Chan S. Role of Ikaros in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *World J Biol Chem*. 2011 Jun 26;2(6):108-14. doi: 10.4331/wjbc.v2.i6.108. PMID: 21765975; PMCID: PMC3135856.
39. Lin W, Wu X, Wen J, Fei Y, Wu J, Li X, Zhang Q, Dong Y, Xu T, Fan Y, Wang N. Nicotinamide retains Klotho expression and ameliorates rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Nutrition*. 2021 Nov-Dec;91-92:111376. doi: 10.1016/j.nut.2021.111376. Epub 2021 Jun 2. PMID: 34274652.
40. Zhou, Q., Lin, S., Tang, R., Veeraragoo, P., Peng, W., and Wu, R. (2010). Role of Fosinopril and Valsartan on Klotho Gene Expression Induced by Angiotensin II in Rat Renal Tubular Epithelial Cells. *Kidney Blood Press Res*. 33 (3), 186–192. doi:10.1159/000316703
41. Kuwahara, N., Sasaki, S., Kobara, M., Nakata, T., Tatsumi, T., Irie, H., et al. (2008). HMG-CoA reductase inhibition improves anti-aging klotho protein expression and arteriosclerosis in rats with chronic

- inhibition of nitric oxide synthesis. *Int. J. Cardiol.* 123 (2), 84–90. PMID: 17434618]. doi:10.1016/j.ijcard.2007.02.029
42. Narumiya, H., Sasaki, S., Kuwahara, N., Irie, H., Kusaba, T., Kameyama, H., et al. (2004). HMG-CoA reductase inhibitors up-regulate anti-aging klotho mRNA via RhoA inactivation in IMCD3 cells. *Cardiovasc. Res.* 64 (2), 331–336. doi:10.1016/j.cardiores.2004.07.011
43. Marsell, R., Krajisnik, T., Goransson, H., Ohlsson, C., Ljunggren, O., Larsson, T. E., et al. (2008). Gene expression analysis of kidneys from transgenic mice expressing fibroblast growth factor-23. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23 (3), 827–833. doi:10.1093/ndt/gfm67
44. Kuro-O M. The Klotho proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019 Jan;15(1):27-44. doi: 10.1038/s41581-018-0078-3. PMID: 30455427.
45. Ruoslahti E. Tumor penetrating peptides for improved drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017 Feb;110-111:3-12. doi: 10.1016/j.addr.2016.03.008. Epub 2016 Apr 1. PMID: 27040947; PMCID: PMC5045823.
46. Abolghasemi M, Yousefi T, Maniati M, Quej D. The interplay of Klotho with signaling pathway and microRNAs in cancers. *J Cell Biochem.* 2019 Sep;120(9):14306-14317. doi: 10.1002/jcb.29022. Epub 2019 May 24. PMID: 31127658.
47. Elghoroury EA, Fadel FI, Elshamaa MF, Kandil D, Salah DM, El-Sonbaty MM, Farouk H, Raafat M, Nasr S. Klotho G-395A gene polymorphism: impact on progression of end-stage renal disease and development of cardiovascular complications in children on dialysis. *Pediatr Nephrol.* 2018 Jun;33(6):1019-1027. doi: 10.1007/s00467-017-3877-z. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29313136.
48. Arking DE, Krebsova A, Macek M Sr, Macek M Jr, Arking A, Mian IS, Fried L, Hamosh A, Dey S, McIntosh I, Dietz HC. Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 22;99(2):856-61. doi: 10.1073/pnas.022484299. Epub 2002 Jan 15. PMID: 11792841; PMCID: PMC117395.
49. 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. doi: 10.1161/01.RES.0000157171.04054.30. Epub 2005 Jan 27. PMID: 15677572.
50. 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. doi: 10.1016/j.neulet.2004.12.005. Epub 2005 Jan 22. PMID: 15763166.
51. Zhou L, Li Y, Zhou D, Tan RJ, Liu Y. Loss of Klotho contributes to kidney injury by derepression of Wnt/ β -catenin signaling. *J Am Soc Nephrol.* 2013 Apr;24(5):771-85. doi: 10.1681/ASN.2012080865. Epub 2013 Apr 4. PMID: 23559584; PMCID: PMC3636797.
52. Wolf I, Laitman Y, Rubinek T, Abramovitz L, Novikov I, Beer R, Kuro-O M, Koeffler HP, Catane R, Freedman LS, Levy-Lahad E, Karlan BY, Friedman E, Kaufman B. Functional variant of KLOTHO: a breast cancer risk modifier among BRCA1 mutation carriers of Ashkenazi origin. *Oncogene.* 2010 Jan 7;29(1):26-33. doi: 10.1038/onc.2009.301. Epub 2009 Oct 5. PMID: 19802015.
53. D. E. Arking, D. M. Becker, L. R. Yanek et al., “KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease,” *American Journal of Human Genetics*, vol. 72, no. 5, pp. 1154– 1161, 2003. [
54. Oguro R, Kamide K, Kokubo Y, Shimaoka I, Congrains A, Horio T, Hanada H, Ohishi M, Katsuya T, Okamura T, Miyata T, Kawano Y, Rakugi H. Association of carotid atherosclerosis with genetic

polymorphisms of the klotho gene in patients with hypertension. *Geriatr Gerontol Int*. 2010 Oct;10(4):311-8. doi: 10.1111/j.1447-0594.2010.00612.x. Epub 2010 Mar 17. PMID: 20345435.

55. Mengel-From J, Soerensen M, Nygaard M, McGue M, Christensen K, Christiansen L. Genetic Variants in KLOTHO Associate With Cognitive Function in the Oldest Old Group. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016 Sep;71(9):1151-9. doi: 10.1093/gerona/glv163. Epub 2015 Sep 24. PMID: 26405063; PMCID: PMC4978356.

56 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. doi: 10.1016/j.cca.2006.02.021. Epub 2006 Mar 6. PMID: 16579981.

57. 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. doi: 10.1007/BF03344160. PMID: 16957409.

58. Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML, Yu X, Mackenzie DS, Sorenson AH, Goetz R, Mohammadi M, White KE, Econs MJ. A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis. *J Clin Invest*. 2007 Sep;117(9):2684-91. doi: 10.1172/JCI31330. PMID: 17710231; PMCID: PMC1940239.

59. Friedman DJ, Afkarian M, Tamez H, Bhan I, Isakova T, Wolf M, Ankers E, Ye J, Tonelli M, Zoccali C, Kuro-o M, Moe O, Karumanchi SA, Thadhani R. Klotho variants and chronic hemodialysis mortality. *J Bone Miner Res*. 2009 Nov;24(11):1847-55. doi: 10.1359/jbmr.090516. PMID: 19419323; PMCID: PMC2765930.

60. 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. doi: 10.1016/s0014-5793(98)00127-6. PMID: 9537505.

61. 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, et al. alpha-klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science* 2007;316:1615-8.

62. Dalton GD, Xie J, An SW, Huang CL. New Insights into the Mechanism of Action of Soluble Klotho. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 Nov 17;8:323. doi: 10.3389/fendo.2017.00323. PMID: 29250031; PMCID: PMC5715364.

63. 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. doi: 10.1074/jbc.M312392200. Epub 2003 Dec 29. PMID: 14701853.

64. Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19796-801.

65. Bloch L, Sineshchekova O, Reichenbach D, Reiss K, Saftig P, Kuro-o M, Kaether C. Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase. *FEBS Lett*. 2009 Oct 6;583(19):3221-4. doi: 10.1016/j.febslet.2009.09.009. Epub 2009 Sep 6. PMID: 19737556; PMCID: PMC2757472.

66. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, et al. Klotho: A novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *The FASEB Journal*. 2010a; 24(9): 3438–3450. [PubMed: 20466874].

67. Ito S, Kinoshita S, Shiraishi N, Nakagawa S, Sekine S, Fujimori T, et al. Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel klotho family protein. *Mech Dev* (2000) 98:115–9. doi:10.1016/S0925-4773(00)00439-.
68. Kuro-o M. Klotho and β Klotho. *Adv Exp Med Biol*. 2012;728:25-40. doi: 10.1007/978-1-4614-0887-1_2. PMID: 22396160.
69. Ito S, Fujimori T, Hayashizaki Y, Nabeshima Y. Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Jul 19;1576(3):341-5. doi: 10.1016/s0167-4781(02)00281-6. PMID: 12084582.
70. Yahata K, Mori K, Arai H, Koide S, Ogawa Y, Mukoyama M, Sugawara A, Ozaki S, Tanaka I, Nabeshima Y, Nakao K. Molecular cloning and expression of a novel klotho-related protein. *J Mol Med (Berl)*. 2000;78(7):389-94. doi: 10.1007/s001090000131. PMID: 11043382.
71. Tacer KF, Bookout AL, Ding XS, Kurosu H, John GB, Wang L, Goetz R, Mohammadi M, Kuro-o M, Mangelsdorf DJ, Klier SA. Research resource: comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol* 2010;24: 2050-64
72. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:503-33. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183727. PMID: 23398153; PMCID: PMC3770142.
- 73 .Lim K, Groen A, Molostvov G, Lu T, Lilley KS, Snead D, James S, Wilkinson IB, Ting S, Hsiao LL, Hiemstra TF, Zehnder D. α -Klotho Expression in Human Tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Oct;100(10):E1308-18. doi: 10.1210/jc.2015-1800. Epub 2015 Aug 17. PMID: 26280509; PMCID: PMC4596032.
- 74 Y. Kato, E. Arakawa, S. Kinoshita, A. Shirai, A. Furuya, K. Yamano, K. Nakamura, A. Iida, H. Anazawa, N. Koh, A. Iwano, A. Imura, T. Fujimori, M. Kuro-o, N. Hanai, K. Takeshige, Y. Nabeshima, Establishment of the anti-klotho monoclonal antibodies and detection of klotho protein in kidneys, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 267 (2000) 597–602.
75. Olauson H, Mencke R, Hillebrands JL, Larsson TE. Tissue expression and source of circulating α Klotho. *Bone*. 2017 Jul;100:19-35. doi: 10.1016/j.bone.2017.03.043. Epub 2017 Mar 18. PMID: 28323144.
76. Lim K, Lu TS, Molostvov G, Lee C, Lam FT, Zehnder D, Hsiao LL. Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation*. 2012 May 8;125(18):2243-55. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.053405. Epub 2012 Apr 5. PMID: 22492635.
77. Andrukhova O, Zeitz U, Goetz R, Mohammadi M, Lanske B, Erben RG. FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2-SGK1 signaling pathway. *Bone*. 2012 Sep;51(3):621-8. doi: 10.1016/j.bone.2012.05.015. Epub 2012 May 27. PMID: 22647968; PMCID: PMC3419258.
78. Krajisnik T, Olauson H, Mirza MA, Hellman P, Akerström G, Westin G, Larsson TE, Björklund P. Parathyroid Klotho and FGF-receptor 1 expression decline with renal function in hyperparathyroid patients with chronic kidney disease and kidney transplant recipients. *Kidney Int*. 2010 Nov;78(10):1024-32. doi: 10.1038/ki.2010.260. Epub 2010 Aug 4. PMID: 20686451.
- 79.Farrow EG, Davis SI, Summers LJ, White KE. Initial FGF23-mediated signaling occurs in the distal convoluted tubule. *J Am Soc Nephrol*. 2009 May;20(5):955-60. doi: 10.1681/ASN.2008070783. Epub 2009 Apr 8. PMID: 19357251; PMCID: PMC3060419.

- 80.** Lindberg K, Amin R, Moe OW, Hu MC, Erben RG, Östman Wernerson A, Lanske B, Olauson H, Larsson TE. The kidney is the principal organ mediating klotho effects. *J Am Soc Nephrol.* 2014 Oct;25(10):2169-75. doi: 10.1681/ASN.2013111209. Epub 2014 May 22. PMID: 24854271; PMCID: PMC4178446.
- 81.** Andrukhova O, Zeitz U, Goetz R, Mohammadi M, Lanske B, Erben RG. FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2-SGK1 signaling pathway. *Bone.* 2012 Sep;51(3):621-8. doi: 10.1016/j.bone.2012.05.015. Epub 2012 May 27. PMID: 22647968; PMCID: PMC3419258.
- 82.** Kim JH, Xie J, Hwang KH, Wu YL, Oliver N, Eom M, Park KS, Barrezueta N, Kong ID, Fracasso RP, Huang CL, Cha SK. Klotho May Ameliorate Proteinuria by Targeting TRPC6 Channels in Podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Jan;28(1):140-151. doi: 10.1681/ASN.2015080888. Epub 2016 May 5. PMID: 27151926; PMCID: PMC5198269.
- 83.** Lee JW, Chou CL, Knepper MA. Deep Sequencing in Microdissected Renal Tubules Identifies Nephron Segment-Specific Transcriptomes. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Nov;26(11):2669-77. doi: 10.1681/ASN.2014111067. Epub 2015 Mar 27. PMID: 25817355; PMCID: PMC4625681.
- 84.** Sato S, Kawamata Y, Takahashi A, Imai Y, Hanyu A, Okuma A, Takasugi M, Yamakoshi K, Sorimachi H, Kanda H, Ishikawa Y, Sone S, Nishioka Y, Ohtani N, Hara E. Ablation of the p16(INK4a) tumour suppressor reverses ageing phenotypes of klotho mice. *Nat Commun.* 2015 Apr 29;6:7035. doi: 10.1038/ncomms8035. PMID: 25923845; PMCID: PMC4421814.
- 85.** Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpour S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjöstedt E, Lundberg E, Szigartyo CA, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, von Feilitzen K, Forsberg M, Zvalnen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlén M. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2014 Feb;13(2):397-406. doi: 10.1074/mcp.M113.035600. Epub 2013 Dec 5. PMID: 24309898; PMCID: PMC3916642.
- 86.** 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. doi: 10.1016/j.mad.2005.07.007. Epub 2005 Sep 6. PMID: 16144705.
- 87.** Zhou X, Yang Q, Xie Y, Sun J, Hu J, Qiu P, Cao W, Wang S. Tetrahydroxystilbene glucoside extends mouse life span via upregulating neural klotho and downregulating neural insulin or insulin-like growth factor 1. *Neurobiol Aging.* 2015 Mar;36(3):1462-70. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.11.002. Epub 2014 Dec 18. PMID: 25595496.
- 88.** Lau WL, Leaf EM, Hu MC, Takeno MM, Kuro-o M, Moe OW, Giachelli CM. Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet. *Kidney Int.* 2012 Dec;82(12):1261-70. doi: 10.1038/ki.2012.322. Epub 2012 Aug 29. PMID: 22932118; PMCID: PMC3511664.
- 89.** Chen LJ, Cheng MF, Ku PM, Cheng JT. Cerebral klotho protein as a humoral factor for maintenance of baroreflex. *Horm Metab Res.* 2015 Feb;47(2):125-32. doi: 10.1055/s-0034-1375689. Epub 2014 May 27. PMID: 24867139.
- 90.** Chen CD, Sloane JA, Li H, Aytan N, Giannaris EL, Zeldich E, Hinman JD, Dedeoglu A, Rosene DL, Bansal R, Luebke JI, Kuro-o M, Abraham CR. The antiaging protein Klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS. *J Neurosci.* 2013 Jan 30;33(5):1927-39. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2080-12.2013. PMID: 23365232; PMCID: PMC3711388.

91. Asashima T, Iizasa H, Terasaki T, Nakashima E. Rat brain pericyte cell lines expressing beta2-adrenergic receptor, angiotensin II receptor type 1A, klotho, and CXCR4 mRNAs despite having endothelial cell markers. *J Cell Physiol.* 2003 Oct;197(1):69-76. doi: 10.1002/jcp.10343. PMID: 12942542.
92. Semba RD, Moghekar AR, Hu J, Sun K, Turner R, Ferrucci L, O'Brien R. Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2014 Jan 13;558:37-40. doi: 10.1016/j.neulet.2013.10.058. Epub 2013 Nov 7. PMID: 24211693; PMCID: PMC4037850.
93. 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. doi: 10.1016/j.febslet.2004.03.090. PMID: 15135068.
94. Sathyanesan M, Girgenti MJ, Banasr M, Stone K, Bruce C, Guilchicek E, Wilczak-Havill K, Nairn A, Williams K, Sass S, Duman JG, Newton SS. A molecular characterization of the choroid plexus and stress-induced gene regulation. *Transl Psychiatry.* 2012 Jul 10;2(7):e139. doi: 10.1038/tp.2012.64. PMID: 22781172; PMCID: PMC3410626.
95. Reish NJ, Maltare A, McKeown AS, Laszczyk AM, Kraft TW, Gross AK, King GD. The age-regulating protein klotho is vital to sustain retinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Oct 11;54(10):6675-85. doi: 10.1167/iovs.13-12550. PMID: 24045987; PMCID: PMC3796940.
96. Farinelli P, Arango-Gonzalez B, Völkl J, Alesutan I, Lang F, Zrenner E, Paquet-Durand F, Ekström PA. Retinitis Pigmentosa: over-expression of anti-ageing protein Klotho in degenerating photoreceptors. *J Neurochem.* 2013 Dec;127(6):868-79. doi: 10.1111/jnc.12353. Epub 2013 Jul 22. PMID: 23796581.
97. Kokkinaki M, Abu-Asab M, Gunawardena N, Ahern G, Javidnia M, Young J, Golestaneh N. Klotho regulates retinal pigment epithelial functions and protects against oxidative stress. *J Neurosci.* 2013 Oct 9;33(41):16346-59. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0402-13.2013. Erratum in: *J Neurosci.* 2016 Jun 15;36(24):6597. PMID: 24107965; PMCID: PMC3810551.
98. Jin SL, Zhang Y, Chen ZH, Qian DW, Qine YJ, Yongjie Q, He SK, Guo HK. Epigenetic changes of the Klotho gene in age-related cataracts. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(14):2544-53. PMID: 26221880.
99. Takumida M, Ishibashi T, Hamamoto T, Hirakawa K, Anniko M. Age-dependent changes in the expression of klotho protein, TRPV5 and TRPV6 in mouse inner ear. *Acta Otolaryngol.* 2009 Dec;129(12):1340-50. doi: 10.3109/00016480902725254. PMID: 19922080.
100. M. Yamaguchi, Y. Hirohashi, T. Torigoe, Y. Matsumoto, K. Yamashita, M. Kayama, N. Sato, T. Yotsuyanagi, Wound healing delays in alpha-klotho-deficient mice that have skin appearance similar to that in aged humans — study of delayed wound healing mechanism, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473 (2016) 845–852.
101. L. Li, Y. Wang, W. Gao, C. Yuan, S. Zhang, H. Zhou, M. Huang, X. Yao, Klotho reduction in alveolar macrophages contributes to cigarette smoke extract-induced inflammation in chronic obstructive pulmonary disease, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 27890–27900.
102. W. Gao, C. Yuan, J. Zhang, L. Li, L. Yu, C.H. Wiegman, P.J. Barnes, I.M. Adcock, M. Huang, X. Yao, Klotho expression is reduced in COPD airway epithelial cells: effects on inflammation and oxidant injury, *Clin. Sci. (Lond).* 129 (2015) 1011–1023.
103. Shin IS, Shin HK, Kim JC, Lee MY. Role of Klotho, an antiaging protein, in pulmonary fibrosis. *Arch Toxicol.* 2015 May;89(5):785-95. doi: 10.1007/s00204-014-1282-y. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24894433.

- 104** Wang Y, Chen L, Huang G, He D, He J, Xu W, Zou C, Zong F, Li Y, Chen B, Wu S, Zhao W, Wu J. Klotho sensitizes human lung cancer cell line to cisplatin via PI3k/Akt pathway. *PLoS One*. 2013;8(2):e57391. doi: 10.1371/journal.pone.0057391. Epub 2013 Feb 21. PMID: 23437382; PMCID: PMC3578855.
- 105** 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. doi: 10.1210/jc.2008-0564. Epub 2008 Aug 5. PMID: 18682507.
- 106** Olauson H, Lindberg K, Amin R, Sato T, Jia T, Goetz R, Mohammadi M, Andersson G, Lanske B, Larsson TE. Parathyroid-specific deletion of Klotho unravels a novel calcineurin-dependent FGF23 signaling pathway that regulates PTH secretion. *PLoS Genet*. 2013;9(12):e1003975. doi: 10.1371/journal.pgen.1003975. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24348262; PMCID: PMC3861040.
- 107.** Kawai M, Kinoshita S, Kimoto A, Hasegawa Y, Miyagawa K, Yamazaki M, Ohata Y, Ozono K, Michigami T. FGF23 suppresses chondrocyte proliferation in the presence of soluble α -Klotho both in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2013 Jan 25;288(4):2414-27. doi: 10.1074/jbc.M112.410043. Epub 2012 Dec 12. PMID: 23235154; PMCID: PMC3554911.
- 108.** Gesing A, Lewiński A, Karbownik-Lewińska M. The thyroid gland and the process of aging; what is new? *Thyroid Res*. 2012 Nov 24;5(1):16. doi: 10.1186/1756-6614-5-16. PMID: 23176389; PMCID: PMC3526560.
- 109.** Abramovitz L, Rubinek T, Ligumsky H, Bose S, Barshack I, Avivi C, Kaufman B, Wolf I. KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 1;17(13):4254-66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2749. Epub 2011 May 13. PMID: 21571866.
- 110.** Lin Y, Sun Z. Antiaging Gene Klotho Attenuates Pancreatic β -Cell Apoptosis in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2015 Dec;64(12):4298-311. doi: 10.2337/db15-0066. Epub 2015 Sep 4. PMID: 26340932; PMCID: PMC4657580.
- 111.** Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. 2008 Jul;5(7):621-8. doi: 10.1038/nmeth.1226. Epub 2008 May 30. PMID: 18516045.
- 112.** Hebenstreit D, Fang M, Gu M, Charoensawan V, van Oudenaarden A, Teichmann SA. RNA sequencing reveals two major classes of gene expression levels in metazoan cells. *Mol Syst Biol*. 2011 Jun 7;7:497. doi: 10.1038/msb.2011.28. PMID: 21654674; PMCID: PMC3159973..
- 113.** F. Izbeki, D.T. Asuzu, A. Lorincz, M.R. Bardsley, L.N. Popko, K.M. Choi, D.L. Young, Y. Hayashi, D.R. Linden, M. Kuro-o, G. Farrugia, T. Ordog, Loss of kitlow progenitors, reduced stem cell factor and high oxidative stress underlie gastric dysfunction in progeric mice, *J. Physiol*. 588 (2010) 3101–3117.
- 114.** Xie B, Zhou J, Shu G, Liu DC, Zhou J, Chen J, Yuan L. Restoration of klotho gene expression induces apoptosis and autophagy in gastric cancer cells: tumor suppressive role of klotho in gastric cancer. *Cancer Cell Int*. 2013 Feb 21;13(1):18. doi: 10.1186/1475-2867-13-18. PMID: 23432957; PMCID: PMC3599807.
- 115.** Y. Ohyama, M. Kurabayashi, H. Masuda, T. Nakamura, Y. Aihara, T. Kaname, T. Suga, M. Arai, H. Aizawa, Y. Matsumura, M. Kuro-o, Y. Nabeshima, R. Nagail, Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 251 (1998) 920–925.

- 116.** P. Khuituan, K. Wongdee, W. Jantarajit, P. Suntornsaratoon, N. Krishnamra, N. Charoenphandhu, Fibroblast growth factor-23 negates 1,25(OH)2D3-induced intestinal calcium transport by reducing the transcellular and paracellular calcium fluxes, *Arch. Biochem. Biophys.* 536 (2013) 46–52.
- 117.** Asuzu DT, Hayashi Y, Izbeki F, Popko LN, Young DL, Bardsley MR, Lorincz A, Kuro-O M, Linden DR, Farrugia G, Ordog T. Generalized neuromuscular hypoplasia, reduced smooth muscle myosin and altered gut motility in the kloθο model of premature aging. *Neurogastroenterol Motil.* 2011 Jul;23(7):e309-23. doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01730.x. Epub 2011 May 24. PMID: 21605285; PMCID: PMC3149585.
- 118.** Chen H, Ordög T, Chen J, Young DL, Bardsley MR, Redelman D, Ward SM, Sanders KM. Differential gene expression in functional classes of interstitial cells of Cajal in murine small intestine. *Physiol Genomics.* 2007 Nov 14;31(3):492-509. doi: 10.1152/physiolgenomics.00113.2007. Epub 2007 Sep 25. PMID: 17895395.
- 119.** 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. doi: 10.1247/csf.29.91. PMID: 15665504.
- 120.** Qiu X, Guo Q, Xiong W, Yang X, Tang YQ. Therapeutic effect of astragaloside-IV on bradycardia is involved in up-regulating klotho expression. *Life Sci.* 2016 Jan 1;144:94-102. doi: 10.1016/j.lfs.2015.11.021. Epub 2015 Nov 22. PMID: 26593401.
- 121.** Raimann A, Ertl DA, Helmreich M, Sagmeister S, Egerbacher M, Haeusler G. Fibroblast growth factor 23 and Klotho are present in the growth plate. *Connect Tissue Res.* 2013;54(2):108-17. doi: 10.3109/03008207.2012.753879. Epub 2013 Jan 18. PMID: 23206185.
- 122.** M. Leifheit-Nestler, R. Grosse Siemer, K. Flasbart, B. Richter, F. Kirchhoff, WH Ziegler, M. Klintschar, JU Becker, A. Erbersdobler, C. Aufricht, T. Seeman, DC Fischer, C. Faul, D. Haffner, c FGF23/FGFR4 expression is associated with left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease, *Nephrol. Dial. Transplant.* 31 (2016) 1089–1099.
- 123.** J.F. Navarro-Gonzalez, J. Donate-Correa, M. Muros de Fuentes, H. Perez-Hernandez, R. Martinez-Sanz, C. Mora-Fernandez, Reduced klotho is associated with the presence and severity of coronary artery disease, *Heart* 100 (2014) 34–40.
- 124.** Lin Y, Chen J, Sun Z. Antiaging Gene Klotho Deficiency Promoted High-Fat Diet-Induced Arterial Stiffening via Inactivation of AMP-Activated Protein Kinase. *Hypertension.* 2016 Mar;67(3):564-73. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06825. Epub 2016 Jan 18. PMID: 26781278; PMCID: PMC4752379.
- 125.** P. Buendia, J. Carracedo, S. Soriano, J.A. Madueno, A. Ortiz, A. Martin-Malo, P. Aljama, R. Ramirez, Klotho prevents NFκB translocation and protects endothelial cell from senescence induced by uremia, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 70 (2015) 1198–1209.
- 126.** Lindberg K, Olauson H, Amin R, Ponnusamy A, Goetz R, Taylor RF, Mohammadi M, Canfield A, Kublickiene K, Larsson TE. Arterial klotho expression and FGF23 effects on vascular calcification and function. *PLoS One.* 2013;8(4):e60658. doi: 10.1371/journal.pone.0060658. Epub 2013 Apr 5. PMID: 23577141; PMCID: PMC3618102.
- 127.** Wang Y, Sun Z. Klotho gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage. *Hypertension.* 2009 Oct;54(4):810-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134320. Epub 2009 Jul 27. PMID: 19635988; PMCID: PMC2814175.
- 128.** R. Jimbo, F. Kawakami-Mori, S. Mu, D. Hirohama, B. Majtan, Y. Shimizu, Y. Yatomi, S. Fukumoto, T. Fujita, T. Shimosawa, Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of klotho deficiency, *Kidney Int.* 85 (2014) 1103–111.

- 129.** Xia W, Zhang A, Jia Z, Gu J, Chen H. Klotho Contributes to Pravastatin Effect on Suppressing IL-6 Production in Endothelial Cells. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:2193210. doi: 10.1155/2016/2193210. Epub 2016 Feb 29. PMID: 27034587; PMCID: PMC4789490.
- 130.** Vadakke Madathil S, Coe LM, Casu C, Sitara D. Klotho deficiency disrupts hematopoietic stem cell development and erythropoiesis. *Am J Pathol.* 2014 Mar;184(3):827-41. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.11.016. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24412515; PMCID: PMC3936331.
- 131.** Vadakke Madathil S, Coe LM, Casu C, Sitara D. Klotho deficiency disrupts hematopoietic stem cell development and erythropoiesis. *Am J Pathol.* 2014 Mar;184(3):827-41. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.11.016. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24412515; PMCID: PMC3936331.
- 132.** O. Borst, P. Munzer, E. Schmid, E.M. Schmidt, A. Russo, B. Walker, W. Yang, C. Leibrock, K. Szteyn, S. Schmidt, M. Elvers, C. Faggio, E. Shumilina, M. Kuro-o, M. Gawaz, F. Lang, 1,25(OH)₂ vitamin D₃-dependent inhibition of platelet Ca²⁺ signaling and thrombus formation in klotho-deficient mice, *FASEB J.* 28 (2014) 2108–2119.
- 133.** E. Shumilina, M.K. Nurbaeva, W. Yang, E. Schmid, K. Szteyn, A. Russo, N. Heise, C. Leibrock, N.T. Xuan, C. Faggio, M. Kuro-o, F. Lang, Altered regulation of cytosolic ca(2)(+) concentration in dendritic cells from klotho hypomorphic mice, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 305 (2013) C70–C77.
- 134.** Witkowski JM, Soroczyńska-Cybula M, Bryl E, Smoleńska Z, Jóźwik A. Klotho--a common link in physiological and rheumatoid arthritis-related aging of human CD4⁺ lymphocytes. *J Immunol.* 2007 Jan 15;178(2):771-7. doi: 10.4049/jimmunol.178.2.771. PMID: 17202338.
- 135.** Soroczyńska-Cybula M, Bryl E, Smoleńska Z, Witkowski JM. Varying expression of four genes sharing a common regulatory sequence may differentiate rheumatoid arthritis from ageing effects on the CD4(+) lymphocytes. *Immunology.* 2011 Jan;132(1):78-86. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03341.x. Epub 2010 Aug 25. PMID: 20738421; PMCID: PMC3015077.
- 136.** Han X, Li L, Yang J, King G, Xiao Z, Quarles LD. Counter-regulatory paracrine actions of FGF-23 and 1,25(OH)₂ D in macrophages. *FEBS Lett.* 2016 Jan;590(1):53-67. doi: 10.1002/1873-3468.12040. Epub 2016 Jan 9. PMID: 26762170; PMCID: PMC5079529.
- 137.** Li DJ, Fu H, Zhao T, Ni M, Shen FM. Exercise-stimulated FGF23 promotes exercise performance via controlling the excess reactive oxygen species production and enhancing mitochondrial function in skeletal muscle. *Metabolism.* 2016 May;65(5):747-756. doi: 10.1016/j.metabol.2016.02.009. Epub 2016 Feb 24. PMID: 27085781..
- 138.** Wehling-Henricks M, Li Z, Lindsey C, Wang Y, Welc SS, Ramos JN, Khanlou N, Kuro-O M, Tidball JG. Klotho gene silencing promotes pathology in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2016 Jun 15;25(12):2465-2482. doi: 10.1093/hmg/ddw111. Epub 2016 May 6. PMID: 27154199; PMCID: PMC5181628.
- 139.** Yuan Q, Sato T, Densmore M, Saito H, Schöler C, Erben RG, Lanske B. Deletion of PTH rescues skeletal abnormalities and high osteopontin levels in Klotho^{-/-} mice. *PLoS Genet.* 2012;8(5):e1002726. doi: 10.1371/journal.pgen.1002726. Epub 2012 May 17. PMID: 22615584; PMCID: PMC3355080.
- 140.** Rhee Y, Bivi N, Farrow E, Lezcano V, Plotkin LI, White KE, Bellido T. Parathyroid hormone receptor signaling in osteocytes increases the expression of fibroblast growth factor-23 in vitro and in vivo. *Bone.* 2011 Oct;49(4):636-43. doi: 10.1016/j.bone.2011.06.025. Epub 2011 Jun 25. PMID: 21726676; PMCID: PMC3167030.
- 141.** Kaludjerovic J, Komaba H, Sato T, Erben RG, Baron R, Olauson H, Larsson TE, Lanske B. Klotho expression in long bones regulates FGF23 production during renal failure. *FASEB J.* 2017 May;31(5):2050-2064. doi: 10.1096/fj.201601036R. Epub 2017 Feb 9. PMID: 28183805.

- 142.** Lorenzi O, Veyrat-Durebex C, Wollheim CB, Villemain P, Rohner-Jeanrenaud F, Zanchi A, Vischer UM. Evidence against a direct role of klotho in insulin resistance. *Pflugers Arch.* 2010 Feb;459(3):465-73. doi: 10.1007/s00424-009-0735-2. Epub 2009 Sep 13. Erratum in: *Pflugers Arch.* 2010 Jun;460(1):219. Vischer, Ulrich [corrected to Vischer, Ulrich M]. PMID: 19756714..
- 143.** Stuelsatz P, Keire P, Almuly R, Yablonka-Reuveni Z. A contemporary atlas of the mouse diaphragm: myogenicity, vascularity, and the Pax3 connection. *J Histochem Cytochem.* 2012 Sep;60(9):638-57. doi: 10.1369/0022155412452417. Epub 2012 Jun 21. PMID: 22723526; PMCID: PMC3524553.
- 144.** H.J. Kim, H. Chang, S.H. Han, M.S. Lee, J.Y. Jung, S. An, S.Y. Baek, J.H. Lee, J.H. Lee, T.R. Lee, D.W. Shin, H. Kim, Epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate-induced differentiation of human keratinocytes involves klotho-mediated regulation of protein kinase-cAMP responsive element-binding protein signaling, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 5749–5761.
- 145.** Liu L, Xie H, Chen X, Shi W, Xiao X, Lei D, Li J. Differential response of normal human epidermal keratinocytes and HaCaT cells to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Clin Exp Dermatol.* 2012 Oct;37(7):772-80. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04315.x. Epub 2012 Mar 22. PMID: 22439662.
- 146.** Chihara Y, Rakugi H, Ishikawa K, Ikushima M, Maekawa Y, Ohta J, Kida I, Ogihara T. Klotho protein promotes adipocyte differentiation. *Endocrinology.* 2006 Aug;147(8):3835-42. doi: 10.1210/en.2005-1529. Epub 2006 May 18. PMID: 16709611.
- 147.** Lee J, Jeong DJ, Kim J, Lee S, Park JH, Chang B, Jung SI, Yi L, Han Y, Yang Y, Kim KI, Lim JS, Yang I, Jeon S, Bae DH, Kim CJ, Lee MS. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer.* 2010 May 18;9:109. doi: 10.1186/1476-4598-9-109. PMID: 20482749; PMCID: PMC2885346.
- 148.** Chang B, Kim J, Jeong D, Jeong Y, Jeon S, Jung SI, Yang Y, Kim KI, Lim JS, Kim C, Lee MS. Klotho inhibits the capacity of cell migration and invasion in cervical cancer. *Oncol Rep.* 2012 Sep;28(3):1022-8. doi: 10.3892/or.2012.1865. Epub 2012 Jun 14. PMID: 22710352.
- 149.** K. Godang, K.F. Frosli, T. Henriksen, G.A. Isaksen, N. Voldner, T. Lekva, T. Ueland, J. Bollerslev, Umbilical cord levels of sclerostin, placental weight, and birth weight are predictors of total bone mineral content in neonates, *Eur. J. Endocrinol.* 168 (2013) 371–378.
- 150.** Chen G, Liu Y, Goetz R, Fu L, Jayaraman S, Hu MC, Moe OW, Liang G, Li X, Mohammadi M. α -Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. *Nature.* 2018 Jan 25;553(7689):461-466. doi: 10.1038/nature25451. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29342138; PMCID: PMC6007875.
- 151.** Maltese G, Psefteli PM, Rizzo B, Srivastava S, Gnudi L, Mann GE, Siow RC. The anti-ageing hormone klotho induces Nrf2-mediated antioxidant defences in human aortic smooth muscle cells. *J Cell Mol Med.* 2017 Mar;21(3):621-627. doi: 10.1111/jcmm.12996. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27696667; PMCID: PMC5323877.
- 152.** Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, Maekawa Y, Yamamoto K, Ohta J, Chihara Y, Kida I, Ogihara T. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jan 20;339(3):827-32. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.11.094. Epub 2005 Nov 28. PMID: 16325773.
- 153.** Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, Shiizaki K, Gotschall R, Schiavi S, Yorioka N, Takahashi M, Boothman DA, Kuro-O M. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem.* 2011 Mar 11;286(10):8655-8665. doi: 10.1074/jbc.M110.174037. Epub 2011 Jan 5. PMID: 21209102; PMCID: PMC3048747.

- 154.** Cha SK, Hu MC, Kurosu H, Kuro-o M, Moe O, Huang CL. Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K(+) excretion by Klotho. *Mol Pharmacol*. 2009 Jul;76(1):38-46. doi: 10.1124/mol.109.055780. Epub 2009 Apr 6. PMID: 19349416; PMCID: PMC2701452.
- 155.** Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat Cell Biol*. 2011 Mar;13(3):254-62. doi: 10.1038/ncb2167. Epub 2011 Feb 20. Erratum in: *Nat Cell Biol*. 2011 Apr;13(4):487. PMID: 21336305.
- 156.** Cheng MF, Chen LJ, Niu HS, Yang TT, Lin KC, Cheng JT. Signals mediating Klotho-induced neuroprotection in hippocampal neuronal cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2015;75(1):60-71. PMID: 25856523.
- 157.** Hu MC, Shi M, Cho HJ, Zhang J, Pavlenco A, Liu S, et al. The erythropoietin receptor is a downstream effector of Klotho-induced cytoprotection. *Kidney International*. 2013; 84(3):468– 481. [PubMed: 23636173].
- 158.** 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. doi: 10.1074/jbc.C500457200. Epub 2006 Jan 25. PMID: 16436388; PMCID: PMC2637204.
- 159.** Mencke R, Olauson H, Hillebrands JL. Effects of Klotho on fibrosis and cancer: A renal focus on mechanisms and therapeutic strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017 Nov 1;121:85-100. doi: 10.1016/j.addr.2017.07.009. Epub 2017 Jul 12. PMID: 28709936.
- 160.** Zhang Y, Alexander PB, Wang XF. TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 Apr 3;9(4):a022145. doi: 10.1101/cshperspect.a022145. PMID: 27920038; PMCID: PMC5378054.
- 161.** Oishi H, Doi S, Nakashima A, Ike T, Maeoka Y, Sasaki K, Doi T, Masaki T. Klotho overexpression protects against renal aging along with suppression of transforming growth factor- β 1 signaling pathways. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2021 Dec 1;321(6):F799-F811. doi: 10.1152/ajprenal.00609.2020. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34779262.
- 162.** Yuan Q, Ren Q, Li L, Tan H, Lu M, Tian Y, Huang L, Zhao B, Fu H, Hou FF, Zhou L, Liu Y. A Klotho-derived peptide protects against kidney fibrosis by targeting TGF- β signaling. *Nat Commun*. 2022 Jan 21;13(1):438. doi: 10.1038/s41467-022-28096-z. Erratum in: *Nat Commun*. 2022 Nov 4;13(1):6640. PMID: 35064106; PMCID: PMC8782923.
- 163.** Derynck R, Miyazono K, The Biology of the TGF- β Family. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, ed. Derynck Rik, Miyazono Kohei2016), pp. 1164. 2. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K, TGF- β and the TGF- β family: context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a021873 (2016).
- 164.** de Streel G, Lucas S. Targeting immunosuppression by TGF- β 1 for cancer immunotherapy. *Biochem Pharmacol*. 2021 Oct;192:114697. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114697. Epub 2021 Jul 22. PMID: 34302795; PMCID: PMC8484859.
- 165.** Maizels RM. The multi-faceted roles of TGF- β in regulation of immunity to infection. *Adv Immunol*. 2021;150:1-42. doi: 10.1016/bs.ai.2021.05.001. Epub 2021 Jun 4. PMID: 34176558.
- 166.** Prud'homme GJ. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Invest*. 2007 Nov;87(11):1077-91. doi: 10.1038/labinvest.3700669. Epub 2007 Aug 27. PMID: 17724448.

- 167.** Mullen AC, Wrana JL. TGF- β Family Signaling in Embryonic and Somatic Stem-Cell Renewal and Differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Jul 5;9(7):a022186. doi: 10.1101/cshperspect.a022186. PMID: 28108485; PMCID: PMC5495062.
- 168.** Huang T, David L, Mendoza V, Yang Y, Villarreal M, De K, Sun L, Fang X, López-Casillas F, Wrana JL, Hinck AP. TGF- β signalling is mediated by two autonomously functioning T β RI:T β RII pairs. *EMBO J.* 2011 Apr 6;30(7):1263-76. doi: 10.1038/emboj.2011.54. Epub 2011 Mar 18. PMID: 21423151; PMCID: PMC3094126.
- 169.** Derynck R, Budi EH. Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Sci Signal.* 2019 Feb 26;12(570):eaav5183. doi: 10.1126/scisignal.aav5183. PMID: 30808818; PMCID: PMC6800142.
- 170.** Hayat R, Manzoor M, Hussain A. Wnt signaling pathway: A comprehensive review. *Cell Biol Int.* 2022 Jun;46(6):863-877. doi: 10.1002/cbin.11797. Epub 2022 Apr 6. PMID: 35297539.
- 171.** Kirstetter, P.; Anderson, K.; Porse, BT; Jacobsen, SEW; Nerlov, C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat. Immunol.* 2006, 7, 1048–1056.
- 172.** Wang Y, Sun Z. Current understanding of klotho. *Ageing Res Rev.* 2009 Jan;8(1):43-51. doi: 10.1016/j.arr.2008.10.002. Epub 2008 Oct 31. PMID: 19022406; PMCID: PMC2637560.
- 173.** Bian A, Neyra JA, Zhan M, Hu MC. Klotho, stem cells, and aging. *Clin Interv Aging.* 2015 Aug 4;10:1233-43. doi: 10.2147/CIA.S84978. PMID: 26346243; PMCID: PMC4531025.
- 174.** Li X, Lu P, Shao XF, Jiang T, Liu F, Li G. Klotho Regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition In Vitro via Wnt/ β -Catenin Pathway and Attenuates Chronic Allograft Dysfunction in a Rat Renal Transplant Model. *Ann Transplant.* 2021 Mar 19;26:e930066. doi: 10.12659/AOT.930066. PMID: 33737505; PMCID: PMC7986726.
- 175.** de Almeida, A. J. P. O., de Almeida Rezende, M. S., Dantas, S. H., de Lima Silva, S., de Oliveira, J. C. P. L., de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo, F., et al. (2020). Unveiling the Role of Inflammation and Oxidative Stress on Age-Related Cardiovascular Diseases. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2020, 1–20. doi:10.1155/2020/1954398
- 176.** Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 1986 Aug 29;46(5):705-16. doi: 10.1016/0092-8674(86)90346-6. PMID: 3091258.
- 177.** Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999 Nov 22;18(49):6853-66. doi: 10.1038/sj.onc.1203239. PMID: 10602461.
- 178.** Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002 Oct;2(10):725-34. doi: 10.1038/nri910. Erratum in: *Nat Rev Immunol* 2002 Dec;2(12):975. PMID: 12360211.
- 179.** Haga, M., and Okada, M. (Systems approaches to investigate the role of NFkB signaling in aging. *Biochem. J* 2022. 479 (2), 161–183. doi:10.1042/BCJ2023.
- 180.** Zhang , T., Ma, C., Zhang, Z., Zhang, H., and Hu, H.NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *MedComm* 2 (4)(2020), 618–653. doi:10.1002/mco2.104
- 181.** Sun Z, Andersson R. NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock.* 2002 Aug;18(2):99-106. doi: 10.1097/00024382-200208000-00001. PMID: 12166787.

- 182.** Müller CW, Rey FA, Sodeoka M, Verdine GL, Harrison SC. Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature*. 1995 Jan 26;373(6512):311-7. doi: 10.1038/373311a0. PMID: 7830764.
- 183.** Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002 Oct;2(10):725-34. doi: 10.1038/nri910. Erratum in: *Nat Rev Immunol* 2002 Dec;2(12):975. PMID: 12360211.
- 184.** Roberti, A., Chaffey, L. E., and Greaves, D. R. (2022). NF-κB Signaling and Inflammation-Drug Repurposing to Treat Inflammatory Disorders? *Biology* 11 (3), 372. doi:10.3390/biology11030372
- 185.** Maekawa, Y., Ishikawa, K., Yasuda, O., Oguro, R., Hanasaki, H., Kida, I., et al. (2009). Klotho suppresses TNF-α-induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF-κB activation. *Endocr* 35 (3), 341–346. doi:10.1007/s12020-009-9181-3
- 186.** Buendía, P., Ramírez, R., Aljama, P., and Carracedo, J. (2016). Klotho Prevents Translocation of NFκB. *Vitam. Horm.* 101, 119–150. doi:10.1016/bs.vh.2016. 02.005
- 187.** Yang, K., Nie, L., Huang, Y., Zhang, J., Xiao, T., Guan, X., et al. (2012). Amelioration of uremic toxin indoxyl sulfate-induced endothelial cell dysfunction by Klotho protein. *Toxicol. Lett.* 215 (2), 77–83. doi:10.1016/j.toxlet.2012.10.004
- 188.** Guo, Y., Zhuang, X., Huang, Z., Zou, J., Yang, D., Hu, X., et al. (2018). Klotho protects the heart from hyperglycemia-induced injury by inactivating ROS and NF-κB-mediated inflammation Both In Vitro and In Vivo. *Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Mol. Basis Dis.* 1864 (1), 238–251. doi:10.1016/j.bbadis.2017.09.029
- 189.** Zhao, Y., Banerjee, S., Dey, N., LeJeune, W. S., Sarkar, P. S., Brobey, R., et al. (2011). Klotho depletion contributes to increased inflammation in kidney of the db/db mouse model of diabetes via RelA (serine)536 phosphorylation. *Diabetes* 60 (7), 1907–1916. doi:10.2337/db10-1262
- 190.** Prud'homme, G. J., Glinka, Y., Kurt, M., Liu, W., and Wang, Q. (2017a). The antiaging protein Klotho is induced by GABA therapy and exerts protective and stimulatory effects on pancreatic beta cells. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 493 (4), 1542–1547. doi:10.1016/j.bbrc.2017.10.029
- 191.** Li, L., Wang, Y., Gao, W., Yuan, C., Zhang, S., Zhou, H., et al. (2015). Klotho Reduction in Alveolar Macrophages Contributes to Cigarette Smoke Extract Induced Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Biol. Chem.* 290 (46), 27890–27900. doi:10.1074/jbc.M115.655431
- 192.** Moreno, J. A., Izquierdo, M. C., Sanchez-Niño, M. D., Suárez-Alvarez, B., LopezLarrea, C., Jakubowski, A., et al. (2011). The Inflammatory Cytokines TWEAK and TNFα Reduce Renal Klotho Expression through NFκB. *J Am Soc Nephrol* 22 (7), 1315–1325. doi:10.1681/ASN.2010101073
- 193.** Izquierdo, M. C., Perez-Gomez, M. V., Sanchez-Niño, M. D., Sanz, A. B., Ruiz-Andres, O., Poveda, J., et al. (2012). Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 27(Suppl. 4), iv6–iv10
- 194.** Xing, L., Guo, H., Meng, S., Zhu, B., Fang, J., Huang, J., et al. (2021). Klotho ameliorates diabetic nephropathy by activating Nrf2 signaling pathway in podocytes. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 534, 450–456. doi:10.1016/j.bbrc.2020.11.061
- 195.** Qu, Z., Sun, J., Zhang, W., Yu, J., and Zhuang, C.. Transcription factor NRF2 as a promising therapeutic target for Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 159, 87–102. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.028 (2020)

- 196.** Panda H, Wen H, Suzuki M, Yamamoto M. Multifaceted Roles of the KEAP1-NRF2 System in Cancer and Inflammatory Disease Milieu. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Mar 11;11(3):538. doi: 10.3390/antiox11030538. PMID: 35326187; PMCID: PMC894452
- 197.** Zhu, H., Gao, Y., Zhu, S., Cui, Q., and Du, J. (2017). Klotho Improves Cardiac Function by Suppressing Reactive Oxygen Species (ROS) Mediated Apoptosis by Modulating Mapks/Nrf2 Signaling in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Med. Sci. Monit.* 23, 5283–5293. doi:10.12659/msm.907449
- 198.** Mathew R, Pal Bhadra M, Bhadra U. Insulin/insulin-like growth factor-1 signalling (IIS) based regulation of lifespan across species. *Biogerontology*. 2017 Feb;18(1):35-53. doi: 10.1007/s10522-016-9670-8. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28101820.
- 199.** Johnson SC. Nutrient Sensing, Signaling and Ageing: The Role of IGF-1 and mTOR in Ageing and Age-Related Disease. *Subcell Biochem*. 2018;90:49-97. doi: 10.1007/978-981-13-2835-0_3. PMID: 30779006.
- 200.** Kapahi P, Kaeberlein M, Hansen M. Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. *Ageing Res Rev*. 2017 Oct;39:3-14. doi: 10.1016/j.arr.2016.12.005. Epub 2016 Dec 19. PMID: 28007498; PMCID: PMC5476520.
- 201.** von Frieling J, Roeder T. Factors that affect the translation of dietary restriction into a longer life. *IUBMB Life*. 2020 May;72(5):814-824. doi: 10.1002/iub.2224. Epub 2019 Dec 30. PMID: 31889425.
- 202.** Fung, T. Y., Iyaswamy, A., Sreenivasamurthy, S. G., Krishnamoorthi, S., Guan, X.-J., Zhu, Z., et al. . Klotho an Autophagy Stimulator as a Potential Therapeutic Target for Alzheimer's Disease: A Review. *Biomedicines* 2022 10 (3), 705. doi:10.3390/biomedicines10030705
- 203.** 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 U S A*. 2008 Jul 15;105(28):9805-10. doi: 10.1073/pnas.0803223105. Epub 2008 Jul 7. PMID: 18606998; PMCID: PMC2474477.
- 204.** Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev*. 2005 Jan;85(1):373-422. doi: 10.1152/physrev.00003.2004. PMID: 15618484.
- 205.** Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Renal and extrarenal actions of Klotho. *Semin Nephrol*. 2013 Mar;33(2):118-29. doi: 10.1016/j.semnephrol.2012.12.013. PMID: 23465499; PMCID: PMC3593734.
- 206.** Budi EH, Duan D, Derynck R. Transforming Growth Factor- β Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility. *Trends Cell Biol*. 2017 Sep;27(9):658-672. doi: 10.1016/j.tcb.2017.04.005. Epub 2017 May 25. PMID: 28552280.
- 207.** Yamashita T. Structural and biochemical properties of fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial*. 2005 Aug;9(4):313-8. doi: 10.1111/j.1744-9987.2005.00288.x. PMID: 16076373.
- 208.** Kharitonov A, Adams AC. Inventing new medicines: The FGF21 story. *Mol Metab*. 2013 Dec 27;3(3):221-9. doi: 10.1016/j.molmet.2013.12.003. PMID: 24749049; PMCID: PMC3986619.
- 209.** Agrawal S, Maity S, AlRaawi Z, Al-Ameer M, Kumar TKS. Targeting Drugs Against Fibroblast Growth Factor(s)-Induced Cell Signaling. *Curr Drug Targets*. 2021;22(2):214-240. doi: 10.2174/1389450121999201012201926. PMID: 33045958.
- 210.** Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*. 2001;2(3):REVIEWS3005. doi: 10.1186/gb-2001-2-3-reviews3005. Epub 2001 Mar 9. PMID: 11276432; PMCID: PMC138918.

- 211.** Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem.* 2011 Feb;149(2):121-30. doi: 10.1093/jb/mvq121. Epub 2010 Oct 12. PMID: 20940169; PMCID: PMC3106964.
- 212.** Itoh N, Ohta H, Konishi M. Endocrine FGFs: Evolution, Physiology, Pathophysiology, and Pharmacotherapy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015 Sep 29;6:154. doi: 10.3389/fendo.2015.00154. PMID: 26483756; PMCID: PMC4586497.
- 213.** Dolegowska K, Marchelek-Mysliwiec M, Nowosiad-Magda M, Slawinski M, Dolegowska B. FGF19 subfamily members: FGF19 and FGF21. *J Physiol Biochem.* 2019 Jun;75(2):229-240. doi: 10.1007/s13105-019-00675-7. Epub 2019 Mar 29. PMID: 30927227; PMCID: PMC6611749.
- 214.** Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Mar;8(3):235-53. doi: 10.1038/nrd2792. PMID: 19247306; PMCID: PMC3684054.
- 215.** Harmer, N.J.; Pellegrini, L.; Chirgadze, D.; Fernandez-Recio, J.; Blundell, T.L. The crystal structure of fibroblast growth factor (FGF) 19 reveals novel features of the FGF family and offers a structural basis for its unusual receptor affinity. *Biochemistry* 2004, 43, 629–640.
- 216.** Degirolamo C, Sabbà C, Moschetta A. Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. *Nat Rev Drug Discov.* 2016 Jan;15(1):51-69. doi: 10.1038/nrd.2015.9. Epub 2015 Nov 16. PMID: 26567701.
- 217.** Phan P, Saikia BB, Sonnaila S, Agrawal S, Alraawi Z, Kumar TKS, Iyer S. The Saga of Endocrine FGFs. *Cells.* 2021 Sep 14;10(9):2418. doi: 10.3390/cells10092418. PMID: 34572066; PMCID: PMC8465397.
- 218.** Hofmann AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med.* 1999 Dec 13-27;159(22):2647-58. doi: 10.1001/archinte.159.22.2647. PMID: 10597755.
- 219.** van Erpecum KJ, Schaap FG. Intestinal failure to produce FGF19: A culprit in intestinal failure-associated liver disease? *J Hepatol.* 2015 Jun;62(6):1231-3. doi: 10.1016/j.jhep.2015.03.012. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25795585.
- 220.** Somm E, Jornayvaz FR. Fibroblast Growth Factor 15/19: From Basic Functions to Therapeutic Perspectives. *Endocr Rev.* 2018 Dec 1;39(6):960-989. doi: 10.1210/er.2018-00134. PMID: 30124818.
- 221.** Krejci P, Kunova M, Kubikova I, Trantirek L, Kozubik A, Dvorak P. Expression of FGF19 in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2013 Nov;31(11):2582-4. doi: 10.1002/stem.1493. PMID: 23934687.
- 222.** Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, Li Y, Goetz R, Mohammadi M, Esser V, Elmquist JK, Gerard RD, Burgess SC, Hammer RE, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* 2007 5:415–425
- 223.** Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. The colors of adipose tissue. *Gac Med Mex.* 2020;156(2):142-149. English. doi: 10.24875/GMM.M20000356. PMID: 32285854.
- 224.** Chartoumpekis, D.V.; Habeos, I.G.; Ziros, P.G.; Psyrogiannis, A.I.; Kyriazopoulou, V.E.; Papavassiliou, A.G. Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol. Med.* 2011, 17, 736–740.
- 225.** Lee, P.; Brychta, R.J.; Linderman, J.; Smith, S.; Chen, K.Y.; Celi, F.S. Mild cold exposure modulates fibroblast growth factor 21 (FGF21) diurnal rhythm in humans: Relationship between FGF21 levels, lipolysis, and cold-induced thermogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013, 98, E98–E102

- 226.** Lundåsen T, Hunt MC, Nilsson LM, Sanyal S, Angelin B, Alexson SE, Rudling M. PPAR α is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Aug 24;360(2):437-40. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.068. Epub 2007 Jun 21. PMID: 17601491.
- 227.** Kurosu H, Kuro-O M. The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Feb 5;299(1):72-8. doi: 10.1016/j.mce.2008.10.052. Epub 2008 Nov 21. PMID: 19063940.
- 228.** Suzuki, M.; Uehara, Y.; Motomura-Matsuzaka, K.; Oki, J.; Koyama, Y.; Kimura, M.; Asada, M.; Komi-Kuramochi, A.; Oka, S.; Imamura, T. β Klotho Is Required for Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 Signaling through FGF Receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Mol. Endocrinol.* 2008, 22, 1006–1014.
- 229.** Inagaki, T.; Choi, M.; Moschetta, A.; Peng, L.; Cummins, C.; McDonald, J.G.; Luo, G.; Jones, S.A.; Goodwin, B.; Richardson, J.A.; et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 2005, 2, 217–225.
- 230.** Yamashita, T.; Yoshioka, M.; Itoh, N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 277, 494–498.
- 231.** Khosravi A, Cutler CM, Kelly MH, Chang R, Royal RE, Sherry RM, Wodajo FM, Fedarko NS, Collins MT: Determination of the elimination half-life of fibroblast growth factor-23. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2374-2377.
- 232.** Faul C, Amaral AP, Oskoueï B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, Gutiérrez OM, Aguillon-Prada R, Lincoln J, Hare JM, Mundel P, Morales A, Scialla J, Fischer M, Soliman EZ, Chen J, Go AS, Rosas SE, Nessel L, Townsend RR, et al.: FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 2011;121:4393-4408
- 233.** Li H, Martin A, David V, Quarles LD. Compound deletion of Fgfr3 and Fgfr4 partially rescues the Hyp mouse phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Mar;300(3):E508-17. doi: 10.1152/ajpendo.00499.2010. Epub 2010 Dec 7. PMID: 21139072; PMCID: PMC3064005.
- 234.** 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. doi: 10.1038/nature05315. Epub 2006 Oct 29. PMID: 17086194.
- 235.** Goetz R, Nakada Y, Hu MC, Kurosu H, Wang L, Nakatani T, Shi M, Eliseenkova AV, Razzaque MS, Moe OW, Kuro-o M, Mohammadi M. Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan 5;107(1):407-12. doi: 10.1073/pnas.0902006107. Epub 2009 Dec 4. PMID: 19966287; PMCID: PMC2806769.
- 236.** 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. doi: 10.1097/01.mnh.0000232885.81142.83. PMID: 16775459.
- 237.** Yu X, Ibrahimi OA, Goetz R, Zhang F, Davis SI, Garringer HJ, Linhardt RJ, Ornitz DM, Mohammadi M, White KE (2005) Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23. *Endocrinology* 146:4647–4656
- 238.** Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2015 May-Jun;4(3):215-66. doi: 10.1002/wdev.176. Epub 2015 Mar 13. PMID: 25772309; PMCID: PMC4393358.
- 239.** Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T (2004) Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113:561–568.

- 240.** Quarles LD. Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2012 Jan 17;8(5):276-86. doi: 10.1038/nrendo.2011.218. PMID: 22249518; PMCID: PMC4489419..
- 241.** Zhang B, Umbach AT, Chen H, Yan J, Fakhri H, Fajol A, Salker MS, Spichtig D, Daryadel A, Wagner CA, Föller M, Lang F. Up-regulation of FGF23 release by aldosterone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Feb 5;470(2):384-390. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.034. Epub 2016 Jan 8. PMID: 26773502.
- 242.** Bär L, Feger M, Fajol A, Klotz LO, Zeng S, Lang F, Hocher B, Föller M. Insulin suppresses the production of fibroblast growth factor 23 (FGF23). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 May 29;115(22):5804-5809. doi: 10.1073/pnas.1800160115. Epub 2018 May 14. PMID: 29760049; PMCID: PMC5984514.
- 243.** Clinkenbeard EL, Hanudel MR, Stayrook KR, Appaiah HN, Farrow EG, Cass TA, Summers LJ, Ip CS, Hum JM, Thomas JC, Ivan M et al.: Erythropoietin stimulates murine and human fibroblast growth factor-23, revealing novel roles for bone and bone marrow. *Haematologica* (2017) 102(11):e427–e430.
- 244.** Michigami T, Ozono K. Roles of Phosphate in Skeleton. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019 Mar 26;10:180. doi: 10.3389/fendo.2019.00180. PMID: 30972027; PMCID: PMC6443631.
- 245.** Schiavi SC, Kumar R. The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int.* 2004 Jan;65(1):1-14. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00355.x. PMID: 14675031.
- 246.** Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jul;289(1):F8-28. doi: 10.1152/ajprenal.00336.2004. PMID: 15951480.
- 247.** Berndt T, Kumar R. Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiology (Bethesda).* 2009 Feb;24:17-25. doi: 10.1152/physiol.00034.2008. PMID: 19196648; PMCID: PMC3963411.
- 248.** Felsenfeld AJ, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E. Dynamics of parathyroid hormone secretion in health and secondary hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007 Nov;2(6):1283-305. doi: 10.2215/CJN.01520407. Epub 2007 Oct 17. PMID: 17942777.
- 249.** Hoenderop JG, Chon H, Gkika D, Bluysen HA, Holstege FC, St-Arnaud R, Braam B, Bindels RJ. Regulation of gene expression by dietary Ca²⁺ in kidneys of 25-hydroxyvitamin D₃-1 alpha-hydroxylase knockout mice. *Kidney Int.* 2004 Feb;65(2):531-9. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00402.x. PMID: 14717923.
- 250.** Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, Hasegawa H, Urakawa I, Oshima T, Ono K, Kakitani M, Tomizuka K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Nov;289(5):F1088-95. doi: 10.1152/ajprenal.00474.2004. Epub 2005 Jul 5. PMID: 15998839.
- 251.** Inoue Y, Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Kusano K, Kawakami E, et al. Role of the vitamin D receptor in FGF23 action on phosphate metabolism. *Biochem J.* (2005) 390:325–31. doi: 10.1042/BJ20041799
- 252.** Quinn SJ, Thomsen ARB, Pang JL, Kantham L, Bräuner-Osborne H, Pollak M, et al. Interactions between calcium and phosphorus in the regulation of the production of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* (2013) 304:E310–20. doi: 10.1152/ajpendo.00460.2012
- 253.** Rausch S, Föller M. The regulation of FGF23 under physiological and pathophysiological conditions. *Pflugers Arch.* 2022 Mar;474(3):281-292. doi: 10.1007/s00424-022-02668-w. Epub 2022 Jan 27. PMID: 35084563; PMCID: PMC8837506.

- 254.** Kawai M, Kinoshita S, Shimba S, Ozono K, Michigami T. Sympathetic activation induces skeletal Fgf23 expression in a circadian rhythm-dependent manner. *J Biol Chem.* 2014 Jan 17;289(3):1457-66. doi: 10.1074/jbc.M113.500850. Epub 2013 Dec 3. PMID: 24302726; PMCID: PMC3894328.
- 255.** Glosse P, Feger M, Mutig K, Chen H, Hirche F, Hasan AA, Gaballa MMS, Hocher B, Lang F, Föller M. AMP-activated kinase is a regulator of fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int.* 2018 Sep;94(3):491-501. doi: 10.1016/j.kint.2018.03.006. Epub 2018 May 31. PMID: 29861059.
- 256.** Ewendt F, Hirche F, Feger M, Föller M. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)-dependent regulation of fibroblast growth factor 23 (FGF23). *Pflugers Arch.* 2020 Apr;472(4):503-511. doi: 10.1007/s00424-020-02363-8. Epub 2020 Mar 18. PMID: 32189072.
- 257.** Tsuji K, Maeda T, Kawane T, Matsunuma A, Horiuchi N. Leptin stimulates fibroblast growth factor 23 expression in bone and suppresses renal 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 synthesis in leptin-deficient mice. *J Bone Miner Res.* 2010 Aug;25(8):1711-23. doi: 10.1002/jbmr.65. PMID: 20200981.
- 258.** Krieger NS, Culbertson CD, Kyker-Snowman K, Bushinsky DA. Metabolic acidosis increases fibroblast growth factor 23 in neonatal mouse bone. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Aug 1;303(3):F431-6. doi: 10.1152/ajprenal.00199.2012. Epub 2012 May 30. PMID: 22647635; PMCID: PMC3433868.
- 259.** Krick S, Grabner A, Baumlin N, Yanucil C, Helton S, Grosche A, Sailland J, Geraghty P, Viera L, Russell DW, Wells JM, Xu X, Gaggar A, Barnes J, King GD, Campos M, Faul C, Salathe M. Fibroblast growth factor 23 and Klotho contribute to airway inflammation. *Eur Respir J.* 2018 Jul 4;52(1):1800236. doi: 10.1183/13993003.00236-2018. PMID: 29748308; PMCID: PMC6044452.
- 260.** Hensel N, Schön A, Konen T, Lübben V, Förthmann B, Baron O, Grothe C, Leifheit-Nestler M, Claus P, Haffner D. Fibroblast growth factor 23 signaling in hippocampal cells: impact on neuronal morphology and synaptic density. *J Neurochem.* 2016 Jun;137(5):756-69. doi: 10.1111/jnc.13585. Epub 2016 Mar 7. PMID: 26896818.
- 261.** Singh S, Grabner A, Yanucil C, Schramm K, Czaya B, Krick S, Czaja MJ, Bartz R, Abraham R, Di Marco GS, Brand M, Wolf M, Faul C. Fibroblast growth factor 23 directly targets hepatocytes to promote inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2016 Nov;90(5):985-996. doi: 10.1016/j.kint.2016.05.019. Epub 2016 Jul 22. PMID: 27457912; PMCID: PMC5065745.
- 262.** Wolf M, Koch TA, Bregman DB. Effects of iron deficiency anemia and its treatment on fibroblast growth factor 23 and phosphate homeostasis in women. *J Bone Miner Res.* 2013 Aug;28(8):1793-803. doi: 10.1002/jbmr.1923. PMID: 23505057.
- 263.** Eisenga MF, van Londen M, Leaf DE, Nolte IM, Navis G, Bakker SJL, de Borst MH, Gaillard CAJM. C-Terminal Fibroblast Growth Factor 23, Iron Deficiency, and Mortality in Renal Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Dec;28(12):3639-3646. doi: 10.1681/ASN.2016121350. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28774998; PMCID: PMC5698067.
- 264.** Bacchetta J, Bardet C, Prié D. Physiology of FGF23 and overview of genetic diseases associated with renal phosphate wasting. *Metabolism.* 2020 Feb;103S:153865. doi: 10.1016/j.metabol.2019.01.006. Epub 2019 Jan 19. PMID: 30664852.
- 265.** Chong WH, Molinolo AA, Chen CC, Collins MT. Tumor-induced osteomalacia. *Endocr Relat Cancer.* 2011 Jun 8;18(3):R53-77. doi: 10.1530/ERC-11-0006. PMID: 21490240; PMCID: PMC3433741.
- 266.** Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Jul;291(1):E38-49. doi: 10.1152/ajpendo.00008.2006. Epub 2006 Jan 31. PMID: 16449303.

- 267.** Bouksila M, Mrad M, Kaabachi W, Kalai E, Smaoui W, Rekik S, Krir A, Issaoui N, Hamzaoui K, Sahli H, Kateb ECE, Zouaghi MK, Bahlous A. Correlation of Fgf23 and Balp with Bone Mineral Density in Hemodialysis Patients. *J Med Biochem.* 2019 Jul 30;38(4):418-426. doi: 10.2478/jomb-2019-0002. PMID: 31496905; PMCID: PMC6708290.
- 268.** Wolf M. Forging forward with 10 burning questions on FGF23 in kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Sep;21(9):1427-35. doi: 10.1681/ASN.2009121293. Epub 2010 May 27. PMID: 20507943.
- 269.** Mhatre KN, Wakula P, Klein O, Bisping E, Völkl J, Pieske B, Heinzel FR. Crosstalk between FGF23- and angiotensin II-mediated Ca²⁺ signaling in pathological cardiac hypertrophy. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Dec;75(23):4403-4416. doi: 10.1007/s00018-018-2885-x. Epub 2018 Jul 30. PMID: 30062428.
- 270.** Böckmann I, Lischka J, Richter B, Deppe J, Rahn A, Fischer DC, Heineke J, Haffner D, Leifheit-Nestler M. FGF23-Mediated Activation of Local RAAS Promotes Cardiac Hypertrophy and Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 18;20(18):4634. doi: 10.3390/ijms20184634. PMID: 31540546; PMCID: PMC6770314.
- 271.** Murali SK, Roschger P, Zeitz U, Klaushofer K, Andrukhova O, Erben RG. FGF23 Regulates Bone Mineralization in a 1,25(OH)₂ D₃ and Klotho-Independent Manner. *J Bone Miner Res.* 2016 Jan;31(1):129-42. doi: 10.1002/jbmr.2606. Epub 2015 Aug 29. PMID: 26235988.
- 272.** Addison WN, Azari F, Sørensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem.* 2007 May 25;282(21):15872-83. doi: 10.1074/jbc.M701116200. Epub 2007 Mar 23. PMID: 17383965.
- 273.** Fulop T, Larbi A, Witkowski JM, McElhaney J, Loeb M, Mitnitski A, Pawelec G. Aging, frailty and age-related diseases. *Biogerontology.* 2010 Oct;11(5):547-63. doi: 10.1007/s10522-010-9287-2. Epub 2010 Jun 18. PMID: 20559726.
- 274.** López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013 Jun 6;153(6):1194-217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039. PMID: 23746838; PMCID: PMC3836174.
- 275.** Shiels PG, Buchanan S, Selman C, Stenvinkel P. Allostatic load and ageing: linking the microbiome and nutrition with age-related health. *Biochem Soc Trans.* 2019 Aug 30;47(4):1165-1172. doi: 10.1042/BST20190110. Epub 2019 Aug 15. PMID: 31416886.
- 276.** Kuro-o M. Klotho. *Pflugers Arch.* 2010 Jan;459(2):333-43. doi: 10.1007/s00424-009-0722-7. PMID: 19730882.
- 277.** Carracedo J, Buendía P, Merino A, Madueño JA, Peralbo E, Ortiz A, Martín-Malo A, Aljama P, Rodríguez M, Ramírez R. Klotho modulates the stress response in human senescent endothelial cells. *Mech Ageing Dev.* 2012 Nov-Dec;133(11-12):647-54. doi: 10.1016/j.mad.2012.09.002. Epub 2012 Sep 21. PMID: 23000105..
- 278.** Kuro-o M. Klotho and the aging process. *Korean J Intern Med.* 2011 Jun;26(2):113-22. doi: 10.3904/kjim.2011.26.2.113. Epub 2011 Jun 1. PMID: 21716585; PMCID: PMC3110841..
- 279.** John GB, Cheng CY, Kuro-o M. Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *Am J Kidney Dis.* 2011 Jul;58(1):127-34. doi: 10.1053/j.ajkd.2010.12.027. Epub 2011 Apr 15. PMID: 21496980; PMCID: PMC3191324.
- 280.** Zeng Y, Wang PH, Zhang M, Du JR. Aging-related renal injury and inflammation are associated with downregulation of Klotho and induction of RIG-I/NF-κB signaling pathway in senescence-accelerated mice. *Aging Clin Exp Res.* 2016 Feb;28(1):69-76. doi: 10.1007/s40520-015-0371-y. Epub 2015 May 19. PMID: 25986237.

- 281.** Rotondi S, Pasquali M, Tartaglione L, Muci ML, Mandanici G, Leonangeli C, Sales S, Farcomeni A, Mazzaferro S. Soluble α -Klotho Serum Levels in Chronic Kidney Disease. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:872193. doi: 10.1155/2015/872193. Epub 2015 Mar 19. PMID: 25873958; PMCID: PMC4383388.
- 282.** Sopjani M, Rinnerthaler M, Kruja J, Dermaku-Sopjani M. Intracellular signaling of the aging suppressor protein Klotho. *Curr Mol Med*. 2015;15(1):27-37. doi: 10.2174/1566524015666150114111258. PMID: 25601466.
- 283.** Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G; Cholesterol And Recurrent Events Trial Investigators. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2627-33. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.553198. Erratum in: *Circulation*. 2007 Dec 4;116(23):e556. PMID: 16246962.
- 284.** Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, Rustemeyer P, Wittkowski W, Lang D, Pavenstädt H. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Jun;294(6):F1381-7. doi: 10.1152/ajprenal.00003.2008. Epub 2008 Apr 2. PMID: 18385273.
- 285.** Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*. 2000 Sep 29;87(7):E10-7. doi: 10.1161/01.res.87.7.e10. PMID: 11009570.
- 286.** Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Eppele M, et al. Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ Res*. 2008;103(5):e28-34.
- 287.** Smith ER, Hanssen E, McMahon LP, Holt SG. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One*. 2013;8(4):e60904. doi: 10.1371/journal.pone.0060904. Epub 2013 Apr 8. PMID: 23577176; PMCID: PMC3620111.
- 289.** Akiyama KI, Miura Y, Hayashi H, Sakata A, Matsumura Y, Kojima M, Tsuchiya K, Nitta K, Shiizaki K, Kurosu H, Kuro-O M. Calciprotein particles regulate fibroblast growth factor-23 expression in osteoblasts. *Kidney Int*. 2020 Apr;97(4):702-712. doi: 10.1016/j.kint.2019.10.019. Epub 2019 Nov 9. PMID: 32001068.
- 290.** Aghagolzadeh P, Bachtler M, Bijarnia R, Jackson C, Smith ER, Odermatt A, Radpour R, Pasch A. Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor- α . *Atherosclerosis*. 2016 Aug;251:404-414. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.044. Epub 2016 May 27. PMID: 27289275.
- 291.** Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Rajkumar C, McMahon LP, Holt SG. Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 May;27(5):1957-66. doi: 10.1093/ndt/gfr609. Epub 2011 Nov 20. PMID: 22105144.
- 292.** Kuro-o M. Klotho, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism. *Nat Rev Nephrol*. 2013 Nov;9(11):650-60. doi: 10.1038/nrneph.2013.111. Epub 2013 Jun 18. PMID: 23774819.
- 293.** Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FD. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Jul 6;11(7):e0158765. doi: 10.1371/journal.pone.0158765. PMID: 27383068; PMCID: PMC4934905.
- 294.** Hu MC, Shi M, Gillings N, Flores B, Takahashi M, Kuro OM, Moe OW. Recombinant alpha-Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy. *Kidney Int*. 2017;91(5):1104-14.

- 295.** Barker SL, Pastor J, Carranza D, et al: The demonstration of α Klotho deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30:223–233
- 296.** Sakan H, Nakatani K, Asai O, et al: Reduced renal α -Klotho expression in CKD patients and its effect on renal phosphate handling and vitamin D metabolism. *PLoS One* 2014; 9:e86301.
- 297.** Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Griffith C, Kuro-o M, Moe OW. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Jan;22(1):124-36. doi: 10.1681/ASN.2009121311. Epub 2010 Nov 29. PMID: 21115613; PMCID: PMC3014041.
- 298.** Pavik I, Jaeger P, Ebner L, Wagner CA, Petzold K, Spichtig D, Poster D, Wüthrich RP, Russmann S, Serra AL. Secreted Klotho and FGF23 in chronic kidney disease Stage 1 to 5: a sequence suggested from a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant.* 2013 Feb;28(2):352-9. doi: 10.1093/ndt/gfs460. Epub 2012 Nov 4. PMID: 23129826.
- 300.** Cano FJ, Freundlich M, Ceballos ML, Rojo AP, Azocar MA, Delgado IO, Ibacache MJ, Delucchi MA, Lillo AM, Irrarrázabal CE, Ugarte MF. Longitudinal FGF23 and Klotho axis characterization in children treated with chronic peritoneal dialysis. *Clin Kidney J.* 2014 Oct;7(5):457-63. doi: 10.1093/ckj/sfu074. Epub 2014 Aug 8. PMID: 25878777; PMCID: PMC4379333.
- 301.** Akimoto T, Yoshizawa H, Watanabe Y, Numata A, Yamazaki T, Takeshima E, Iwazu K, Komada T, Otani N, Morishita Y, Ito C, Shiizaki K, Ando Y, Muto S, Kuro-o M, Kusano E. Characteristics of urinary and serum soluble Klotho protein in patients with different degrees of chronic kidney disease. *BMC Nephrol.* 2012 Nov 23;13:155. doi: 10.1186/1471-2369-13-155. PMID: 23176706; PMCID: PMC3519712.
- 302.** Kim HR, Nam BY, Kim DW, Kang MW, Han JH, Lee MJ, Shin DH, Doh FM, Koo HM, Ko KI, Kim CH, Oh HJ, Yoo TH, Kang SW, Han DS, Han SH. Circulating α -klotho levels in CKD and relationship to progression. *Am J Kidney Dis.* 2013 Jun;61(6):899-909. doi: 10.1053/j.ajkd.2013.01.024. Epub 2013 Mar 27. PMID: 23540260.
- 303.** Park MY, Herrmann SM, Saad A, Eirin A, Tang H, Lerman A, Textor SC, Lerman LO. Biomarkers of kidney injury and klotho in patients with atherosclerotic renovascular disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015 Mar 6;10(3):443-51. doi: 10.2215/CJN.07290714. Epub 2014 Dec 26. PMID: 25542906; PMCID: PMC4348686.
- 304.** Shimada T, Takeshita Y, Murohara T, Sasaki K, Egami K, Shintani S, et al. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse. *Circulation.* (2004) 110:1148–55. doi: 10.1161/01.CIR.0000139854.74847.99
- 305.** Zou D, Wu W, He Y, Ma S, Gao J. The role of klotho in chronic kidney disease. *BMC Nephrol.* 2018 Oct 22;19(1):285. doi: 10.1186/s12882-018-1094-z. PMID: 30348110; PMCID: PMC6198535.
- 306.** Sanchez-Niño MD, Fernandez-Fernandez B, Ortiz A. Klotho, the elusive kidney-derived anti-ageing factor. *Clin Kidney J.* 2019 Sep 28;13(2):125-127. doi: 10.1093/ckj/sfz125. PMID: 32297880; PMCID: PMC7147303.
- 307.** Ide N, Olauson H, Sato T, Densmore MJ, Wang H, Hanai JI, Larsson TE, Lanske B. In vivo evidence for a limited role of proximal tubular Klotho in renal phosphate handling. *Kidney Int.* 2016 Aug;90(2):348-362. doi: 10.1016/j.kint.2016.04.009. Epub 2016 Jun 9. PMID: 27292223.
- 308.** Hruska KA, Lanske B, Moe OW. Crosstalk between kidney and bone - Bench to bedside. *Bone.* 2017 Jul;100:1-3. doi: 10.1016/j.bone.2017.03.046. Epub 2017 Apr 11. PMID: 28412470.
- 309.** Desjardins L, Liabeuf S, Renard C, Lenglet A, Lemke H-D, Choukroun G, et al. FGF23 is independently associated with vascular calcification but not bone mineral density in patients at various CKD stages. *Osteoporos Int.* (2012) 23:2017–25. doi: 10.1007/s00198-011-1838-0

- 310.** Sun C-Y, Chang S-C, Wu M-S. Suppression of Klotho expression by proteinbound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int.* (2012) 81:640–50. doi: 10.1038/ki.2011.445
- 311.** Ding X, Wang X, Xue W, Tian X, Li Y, Jiao F, et al. Blockade of the nuclear factor Kappa B pathway prolonged islet allograft survival: blockade of the NF-KB pathway. *Artif Organs.* (2012) 36:E21–7. doi: 10.1111/j.1525-1594.2011.01395.x
- 312.** Zeisberg M, Duffield JS. Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2010; 21(8):1247–1253. [PubMed: 20651165]
- 313.** Sugiura H, Yoshida T, Shiohira S, Kohei J, Mitobe M, Kurosu H, et al. Reduced Klotho expression level in kidney aggravates renal interstitial fibrosis. *American Journal of Physiology. Renal Physiology.* 2012; 302(10):F1252–F1264. [PubMed: 22338084]
- 314.** Satoh M, Nagasu H, Morita Y, Yamaguchi TP, Kanwar YS, Kashihara N. Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling. *American Journal of Physiology. Renal Physiology.* 2012; 303(12):F1641–F1651. [PubMed: 23034937]
- 315.** Shi M, Flores B, Gillings N, Bian A, Cho HJ, Yan S, et al. α Klotho mitigates progression of acute kidney injury to chronic kidney disease through activation of autophagy. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2015 pii: ASN.2015060613 Epub ahead of print.
- 316.** Maekawa Y, Ohishi M, Ikushima M, Yamamoto K, Yasuda O, Oguro R, et al. Klotho protein diminishes endothelial apoptosis and senescence via a mitogen-activated kinase pathway. *Geriatr Gerontol Int.* 2011; 11:510–6. [PubMed: 21518171]
- 317.** Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, Tomita N, Namikoshi T, Sasaki T, et al. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:2331–6. [PubMed: 17287345]
- 318.** Mitobe M, Yoshida T, Sugiura H, Shiota S, Tsuchiya K, Nihei H. Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line. *Nephron Exp Nephrol.* 2005; 101:e67–74. [PubMed: 15976510]
- 319.** Sugiura H, Yoshida T, Mitobe M, Yoshida S, Shiohira S, Nitta K, et al. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute kidney injury via HSP-70. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25:60–8. [PubMed: 19745103]
- 320.** 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. doi: 10.1016/j.febslet.2006.09.036. Epub 2006 Sep 27. PMID: 17014852.
- 321.** Nakano-Kurimoto R, Ikeda K, Uraoka M, Nakagawa Y, Yutaka K, Koide M, et al. Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297:H1673–84. [PubMed: 19749165]
- 322.** Drew DA, Katz R, Kritchevsky S, Ix JH, Shlipak MG, Newman AB, Hoofnagle AN, Fried LF, Sarnak M, Gutiérrez OM, Semba RD, Neyra JA. Soluble Klotho and Incident Hypertension. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2021 Oct;16(10):1502-1511. doi: 10.2215/CJN.05020421. Epub 2021 Sep 23. PMID: 34556498; PMCID: PMC8498995
- 323.** Gao D, Zuo Z, Tian J, Ali Q, Lin Y, Lei H, Sun Z. Activation of SIRT1 Attenuates Klotho Deficiency-Induced Arterial Stiffness and Hypertension by Enhancing AMP-Activated Protein Kinase Activity. *Hypertension.* 2016 Nov;68(5):1191-1199. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07709. Epub 2016 Sep 12. PMID: 27620389; PMCID: PMC5063709.

- 324.** Zhou X, Chen K, Lei H, Sun Z. Klotho gene deficiency causes salt-sensitive hypertension via monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine receptor 2-mediated inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Jan;26(1):121-32. doi: 10.1681/ASN.2013101033. Epub 2014 Jun 5. PMID: 24904083; PMCID: PMC4279730.
- 325.** Takenaka T, Inoue T, Miyazaki T, Kobori H, Nishiyama A, Ishii N, Hayashi M, Suzuki H. Klotho Ameliorates Medullary Fibrosis and Pressure Natriuresis in Hypertensive Rat Kidneys. *Hypertension*. 2018 Nov;72(5):1151-1159. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11176. PMID: 30354813; PMCID: PMC6247804.
- 326.** 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* 249: 865–871, 1998
- 327.** Karalliedde J, Maltese G, Hill B, Viberti G, Gnudi L: Effect of renin-angiotensin system blockade on soluble klotho in patients with type 2 diabetes, systolic hypertension, and albuminuria. *Clin J Am Soc Nephrol* 8: 1899–1905, 2013
- 328.** Citterio L, Delli Carpini S, Lupoli S, Brioni E, Simonini M, Fontana S, Zagato L, Messaggio E, Barlassina C, Cusi D, Manunta P, Lanzani C: Klotho gene in human salt-sensitive hypertension. *Clin J Am Soc Nephrol* 15: 375–383, 2020
- 329.** Olejnik A, Franczak A, Krzywonos-Zawadzka A, Kałużna-Oleksy M, Bil-Lula I. The Biological Role of Klotho Protein in the Development of Cardiovascular Diseases. *Biomed Res Int*. 2018 Dec 24;2018:5171945. doi: 10.1155/2018/5171945. Erratum in: *Biomed Res Int*. 2020 Sep 29;2020:1463925. PMID: 30671457; PMCID: PMC6323445.
- 330.** Keles N, Caliskan M, Dogan B, Keles NN, Kalcik M, Aksu F, Kostek O, Aung SM, Isbilen B, Oguz A. Low Serum Level of Klotho Is an Early Predictor of Atherosclerosis. *Tohoku J Exp Med*. 2015 Sep;237(1):17-23. doi: 10.1620/tjem.237.17. PMID: 26289053..
- 331.** Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, Guralnik JM, Ferrucci L. Plasma klotho and cardiovascular disease in adults. *J Am Geriatr Soc*. 2011 Sep;59(9):1596-601. doi: 10.1111/j.1532-5415.2011.03558.x. Epub 2011 Aug 24. PMID: 21883107; PMCID: PMC3486641.
- 332.** Taddei S, Nami R, Bruno RM, Quatrini I, Nuti R. Hypertension, left ventricular hypertrophy and chronic kidney disease. *Heart Fail Rev* 2011; 16: 615-620 [PMID: 21116711 DOI: 10.1007/ s10741-010-9197-z]
- 333.** Glassock RJ, Pecoits-Filho R, Barberato SH. Left ventricular mass in chronic kidney disease and ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4 Suppl 1: S79-S91 [PMID: 19996010 DOI: 10.2215/CJN.04860709]
- 334.** Xie J, Cha SK, An SW, Kuro-O M, Birnbaumer L, Huang CL. Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart. *Nat Commun*. 2012;3:1238. doi: 10.1038/ncomms2240. PMID: 23212367; PMCID: PMC3526952.
- 335.** Song S, Gao P, Xiao H, Xu Y, Si LY. Klotho suppresses cardiomyocyte apoptosis in mice with stress-induced cardiac injury via downregulation of endoplasmic reticulum stress. *PLoS One*. 2013 Dec 10;8(12):e82968. doi: 10.1371/journal.pone.0082968. Erratum in: *PLoS One*. 2013;8(12). doi:10.1371/annotation/d7fe4fdf-4be4-4aa5-b3f0-d98790fc0b11. Si, Lian Yi [corrected to Si, Liang Yi]. PMID: 24340070; PMCID: PMC3858310.
- 336.** Yang K, Wang C, Nie L, Zhao X, Gu J, Guan X, Wang S, Xiao T, Xu X, He T, Xia X, Wang J, Zhao J. Klotho Protects Against Indoxyl Sulphate-Induced Myocardial Hypertrophy. *J Am Soc Nephrol*. 2015

Oct;26(10):2434-46. doi: 10.1681/ASN.2014060543. Epub 2015 Mar 24. PMID: 25804281; PMCID: PMC4587686.

337. Corsetti G, Pasini E, Scarabelli TM, Romano C, Agrawal PR, Chen-Scarabelli C, Knight R, Saravolatz L, Narula J, Ferrari-Vivaldi M, Flati V, Assanelli D, Dioguardi FS. Decreased expression of Klotho in cardiac atria biopsy samples from patients at higher risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *J Geriatr Cardiol.* 2016 Aug;13(8):701-711. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2016.08.009. PMID: 27781061; PMCID: PMC5067432.

338. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, González-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr.* 2005 Oct;135(10):2299-304. doi: 10.1093/jn/135.10.2299. PMID: 16177186.

339. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012 Apr;33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21890489; PMCID: PMC3345541.

340 Hui H, Zhai Y, Ao L, Cleveland JC Jr, Liu H, Fullerton DA, Meng X. Klotho suppresses the inflammatory responses and ameliorates cardiac dysfunction in aging endotoxemic mice. *Oncotarget.* 2017 Feb 28;8(9):15663-15676. doi: 10.18632/oncotarget.14933. PMID: 28152512; PMCID: PMC5362514.7

341. Vervloet MG, Adema AY, Larsson TE, Massy ZA. The role of klotho on vascular calcification and endothelial function in chronic kidney disease. *Semin Nephrol.* 2014 Nov;34(6):578-85. doi: 10.1016/j.semnephrol.2014.09.003. PMID: 25498377.

342. Hum JM, O'Bryan LM, Tatiparthi AK, Cass TA, Clinkenbeard EL, Cramer MS, Bhaskaran M, Johnson RL, Wilson JM, Smith RC, White KE. Chronic Hyperphosphatemia and Vascular Calcification Are Reduced by Stable Delivery of Soluble Klotho. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Apr;28(4):1162-1174. doi: 10.1681/ASN.2015111266. Epub 2016 Nov 11. PMID: 27837149; PMCID: PMC5373441.

343. Richter B, Haller J, Haffner D, Leifheit-Nestler M. Klotho modulates FGF23-mediated NO synthesis and oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Pflugers Arch.* 2016 Sep;468(9):1621-35. doi: 10.1007/s00424-016-1858-x. Epub 2016 Jul 22. PMID: 27448998.

344. Kim JH, Hwang KH, Park KS, Kong ID, Cha SK. Biological Role of Anti-aging Protein Klotho. *J Lifestyle Med.* 2015 Mar;5(1):1-6. doi: 10.15280/jlm.2015.5.1.1. Epub 2015 Mar 30. PMID: 26528423; PMCID: PMC4608225.

345. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014 Feb;103(2):137-49. doi: 10.1016/j.diabres.2013.11.002. Epub 2013 Dec 1. PMID: 24630390.

346. 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. doi: 10.1053/meta.2000.8606. PMID: 11016890.

347 . Lin Y, Sun Z. In vivo pancreatic β -cell-specific expression of antiaging gene Klotho: a novel approach for preserving β -cells in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2015 Apr;64(4):1444-58. doi: 10.2337/db14-0632. Epub 2014 Nov 5. PMID: 25377875; PMCID: PMC4375073.

348. Takenaka T, Kobori H, Miyazaki T, Suzuki H, Nishiyama A, Ishii N, Yamashita M, Hayashi M. Klotho protein supplementation reduces blood pressure and renal hypertrophy in db/db mice, a model of type 2 diabetes. *Acta Physiol (Oxf).* 2019 Feb;225(2):e13190. doi: 10.1111/apha.13190. Epub 2018 Oct 16. PMID: 30251773; PMCID: PMC6335176.

- 349.**Wang Q, Ren L, Wan Y, Prud'homme GJ. GABAergic regulation of pancreatic islet cells: Physiology and antidiabetic effects. *J Cell Physiol.* 2019 Sep;234(9):14432-14444. doi: 10.1002/jcp.28214. Epub 2019 Jan 28. PMID: 30693506.
- 350.**Brun T, Hu He KH, Lupi R, Boehm B, Wojtuszczyk A, Sauter N, Donath M, Marchetti P, Maedler K, Gauthier BR. The diabetes-linked transcription factor Pax4 is expressed in human pancreatic islets and is activated by mitogens and GLP-1. *Hum Mol Genet.* 2008 Feb 15;17(4):478-89. doi: 10.1093/hmg/ddm325. Epub 2007 Nov 7. PMID: 17989064.
- 351.**Prud'homme GJ, Glinka Y, Kurt M, Liu W, Wang Q. Systemic Klotho therapy protects against insulinitis and enhances beta-cell mass in NOD mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 May 7;525(3):693-698. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.123. Epub 2020 Mar 3. PMID: 32139120.
- 352.**Prud'homme, G. J., Glinka, Y., Matkar, P. N., and Leong-Poi, H. (2017b). "The Role of Neuropilins in TGF- β Signaling and Cancer Biology," in *The Neuropilins: Role and Function in Health and Disease*. Editors G. Neufeld and O. Kessler (Cham: Springer International Publishing AG), 187–212. doi:10.1007/978-3-319-48824-0_11
- 353.** Razzaque MS. The role of Klotho in energy metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2012 Oct;8(10):579-87. doi: 10.1038/nrendo.2012.75. Epub 2012 May 29. PMID: 22641000; PMCID: PMC3704949.
- 354.**Landry T, Shookster D, Huang H. Circulating α -klotho regulates metabolism via distinct central and peripheral mechanisms. *Metabolism.* 2021 Aug;121:154819. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154819. Epub 2021 Jun 19. PMID: 34153302; PMCID: PMC8277751.
- 355.**Landry T, Laing BT, Li P, Bunner W, Rao Z, Prete A, Sylvestri J, Huang H. Central α -Klotho Suppresses NPY/AgRP Neuron Activity and Regulates Metabolism in Mice. *Diabetes.* 2020 Jul;69(7):1368-1381. doi: 10.2337/db19-0941. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32332158; PMCID: PMC7306125.
- 356.** Rao Z, Landry T, Li P, Bunner W, Laing BT, Yuan Y, Huang H. Administration of alpha klotho reduces liver and adipose lipid accumulation in obese mice. *Heliyon.* 2019 Apr 24;5(4):e01494. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01494. PMID: 31049427; PMCID: PMC6484204.
- 357.**Cararo-Lopes MM, Mazucanti CHY, Scavone C, Kawamoto EM, Berwick DC. The relevance of α -KLOTHO to the central nervous system: Some key questions. *Ageing Res Rev.* 2017 Jul;36:137-148. doi: 10.1016/j.arr.2017.03.003. Epub 2017 Mar 18. PMID: 28323064.
- 358.** David RB, Lim GB, Moritz KM, Koukoulas I, Wintour EM. Quantitation of the mRNA levels of Epo and EpoR in various tissues in the ovine fetus. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Feb 25;188(1-2):207-18. doi: 10.1016/s0303-7207(01)00718-3. PMID: 11911958.
- 359.** Chen ZY, Warin R, Noguchi CT. Erythropoietin and normal brain development: receptor expression determines multi-tissue response. *Neurodegener Dis.* 2006;3(1-2):68-75. doi: 10.1159/000092096. PMID: 16909040.
- 360.**Yang J, Huang Y, Yu X, Sun H, Li Y, Deng Y. Erythropoietin preconditioning suppresses neuronal death following status epilepticus in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2007;67(2):141-8. PMID: 17691221.
- 361.**Massó A, Sánchez A, Gimenez-Llort L, Lizcano JM, Cañete M, García B, Torres-Lista V, Puig M, Bosch A, Chillón M. Secreted and Transmembrane α Klotho Isoforms Have Different Spatio-Temporal Profiles in the Brain during Aging and Alzheimer's Disease Progression. *PLoS One.* 2015 Nov 24;10(11):e0143623. doi: 10.1371/journal.pone.0143623. PMID: 26599613; PMCID: PMC4658185..

- 362.** King GD, Rosene DL, Abraham CR. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. *Age (Dordr)*. 2012 Dec;34(6):1405-19. doi: 10.1007/s11357-011-9315-4. Epub 2011 Sep 16. PMID: 21922250; PMCID: PMC3528360..
- 363.** D.B. Dubal, J.S. Yokoyama, L. Zhu, L. Broestl, K. Worden, D. Wang, V.E. Sturm, D. Kim, E. Klein, G.Q. Yu, K. Ho, K.E. Eilertson, L. Yu, M. Kuro-o, P.L. De Jager, G. Coppola, G.W. Small, D.A. Bennett, J.H. Kramer, C.R. Abraham, B.L. Miller, L. Mucke, Life extension factor klotho enhances cognition, *Cell. Rep*. 7 (2014) 1065–1076
- 364.** Abraham CR, Mullen PC, Tucker-Zhou T, Chen CD, Zeldich E. Klotho Is a Neuroprotective and Cognition-Enhancing Protein. *Vitam Horm*. 2016;101:215-38. doi: 10.1016/bs.vh.2016.02.004. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27125744..
- 365.** Veronesi F, Borsari V, Cherubini A, Fini M. Association of Klotho with physical performance and frailty in middle-aged and older adults: A systematic review. *Exp Gerontol*. 2021 Oct 15;154:111518. doi: 10.1016/j.exger.2021.111518. Epub 2021 Aug 15. PMID: 34407459.
- 366.** Sanz B, Arrieta H, Rezola-Pardo C, Fernández-Atutxa A, Garin-Balerdi J, Arizaga N, Rodriguez-Larrad A, Irazusta J. Low serum klotho concentration is associated with worse cognition, psychological components of frailty, dependence, and falls in nursing home residents. *Sci Rep*. 2021 Apr 27;11(1):9098. doi: 10.1038/s41598-021-88455-6. PMID: 33907242; PMCID: PMC8079365.
- 367.** Thal DR, von Arnim C, Griffin WS, Yamaguchi H, Mrak RE, Attems J, Upadhaya AR. Pathology of clinical and preclinical Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2013 Nov;263 Suppl 2:S137-45. doi: 10.1007/s00406-013-0449-5. PMID: 24077890.
- 368.** Zeldich E, Chen CD, Colvin TA, Bove-Fenderson EA, Liang J, Tucker Zhou TB, Harris DA, Abraham CR. The neuroprotective effect of Klotho is mediated via regulation of members of the redox system. *J Biol Chem*. 2014 Aug 29;289(35):24700-15. doi: 10.1074/jbc.M114.567321. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25037225; PMCID: PMC4148892.
- 369.** Lichtenthaler SF, Tschirner SK, Steiner H. Secretases in Alzheimer's disease: Novel insights into proteolysis of APP and TREM2. *Curr Opin Neurobiol*. 2022 Feb;72:101-110. doi: 10.1016/j.conb.2021.09.003. Epub 2021 Oct 22. PMID: 34689040..
- 370.** Ju Hwang C, Choi DY, Park MH, Hong JT. NF-κB as a Key Mediator of Brain Inflammation in Alzheimer's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2019;18(1):3-10. doi: 10.2174/1871527316666170807130011. PMID: 28782486..
- 371.** Rao YL, Ganaraja B, Murlimanju BV, Joy T, Krishnamurthy A, Agrawal A. Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: a review. *3 Biotech*. 2022 Feb;12(2):55. doi: 10.1007/s13205-022-03123-4. Epub 2022 Feb 1. PMID: 35116217; PMCID: PMC8807768.
- 372.** Laszczyk AM, Fox-Quick S, Vo HT, Nettles D, Pugh PC, Overstreet-Wadiche L, King GD. Klotho regulates postnatal neurogenesis and protects against age-related spatial memory loss. *Neurobiol Aging*. 2017 Nov;59:41-54. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.07.008. Epub 2017 Jul 29. PMID: 28837861; PMCID: PMC5612914.
- 373.** Dias GP, Murphy T, Stangl D, Ahmet S, Morisse B, Nix A, Aimone LJ, Aimone JB, Kuro-O M, Gage FH, Thuret S. Intermittent fasting enhances long-term memory consolidation, adult hippocampal neurogenesis, and expression of longevity gene Klotho. *Mol Psychiatry*. 2021 Nov;26(11):6365-6379. doi: 10.1038/s41380-021-01102-4. Epub 2021 May 25. PMID: 34031536; PMCID: PMC8760057.
- 374.** Yossef RR, Al-Yamany MF, Saad MA, El-Sahar AE. Neuroprotective effects of vildagliptin on drug induced Alzheimer's disease in rats with metabolic syndrome: Role of hippocampal klotho and AKT

signaling pathways. *Eur J Pharmacol.* 2020 Dec 15;889:173612. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173612. Epub 2020 Oct 6. PMID: 33035520.

375. Adeli S, Zahmatkesh M, Tavoosidana G, Karimian M, Hassanzadeh G. Simvastatin enhances the hippocampal klotho in a rat model of streptozotocin-induced cognitive decline. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017 Jan 4;72:87-94. doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.09.009. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27687042.

376 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.

377 Zeng CY, Yang TT, Zhou HJ, Zhao Y, Kuang X, Duan W, Du JR. Lentiviral vector-mediated overexpression of Klotho in the brain improves Alzheimer's disease-like pathology and cognitive deficits in mice. *Neurobiol Aging.* 2019 Jun;78:18-28. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.02.003. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30851437.

378. Kundu P, Zimmerman B, Quinn JF, Kaye J, Mattek N, Westaway SK, Raber J. Serum Levels of α -Klotho Are Correlated with Cerebrospinal Fluid Levels and Predict Measures of Cognitive Function. *J Alzheimers Dis.* 2022;86(3):1471-1481. doi: 10.3233/JAD-215719. PMID: 35213382; PMCID: PMC9108571.

379. Driscoll, I., Ma, Y., Gallagher, C. L., Johnson, S. C., Asthana, S., Hermann, B. P., et al. (2021). Age-Related Tau Burden and Cognitive Deficits Are Attenuated in KLOTTHO KL-VS Heterozygotes. *Jad* 82 (3), 1369–1370. PMID: 34250957

380.Neitzel J, Franzmeier N, Rubinski A, Dichgans M, Brendel M; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI); Malik R, Ewers M. KL-VS heterozygosity is associated with lower amyloid-dependent tau accumulation and memory impairment in Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 2021 Jun 22;12(1):3825. doi: 10.1038/s41467-021-23755-z. PMID: 34158479; PMCID: PMC8219708.

381. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593.

382. Aunan JR, Cho WC, Søreide K. The Biology of Aging and Cancer: A Brief Overview of Shared and Divergent Molecular Hallmarks. *Aging Dis.* 2017 Oct 1;8(5):628-642. doi: 10.14336/AD.2017.0103. PMID: 28966806; PMCID: PMC5614326.

383. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.

384. Xie B, Chen J, Liu B, Zhan J. Klotho acts as a tumor suppressor in cancers. *Pathol Oncol Res.* 2013 Oct;19(4):611-7. doi: 10.1007/s12253-013-9663-8. Epub 2013 Jul 5. PMID: 23828695.

385. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Mar;11(3):220-8. doi: 10.1038/nrm2858. PMID: 20177397.

386. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res.* 2000 Dec 15;60(24):6788-93. PMID: 11156366.

387. Werner H. Tumor suppressors govern insulin-like growth factor signaling pathways: implications in metabolism and cancer. *Oncogene.* 2012 May 31;31(22):2703-14. doi: 10.1038/onc.2011.447. Epub 2011 Oct 3. PMID: 21963847.

- 388.** Maki RG. Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Nov 20;28(33):4985-95. doi: 10.1200/JCO.2009.27.5040. Epub 2010 Oct 25. PMID: 20975071; PMCID: PMC3039924.
- 389.** Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jul;4(7):505-18. doi: 10.1038/nrc1387. PMID: 15229476.
- 390.** 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. doi: 10.1038/onc.2008.292. Epub 2008 Sep 1. PMID: 18762812.
- 391.** Jiang B, Gu Y, Chen Y. Identification of novel predictive markers for the prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Invest.* 2014 Jul;32(6):218-25. doi: 10.3109/07357907.2014.905586. Epub 2014 Apr 18. PMID: 24745611.
- 392.** Joshi A, Cao D. TGF-beta signaling, tumor microenvironment and tumor progression: the butterfly effect. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2010 Jan 1;15(1):180-94. doi: 10.2741/3614. PMID: 20036814.
- 393.** Tzavlaki K, Moustakas A. TGF- β Signaling. *Biomolecules.* 2020 Mar 23;10(3):487. doi: 10.3390/biom10030487. PMID: 32210029; PMCID: PMC7175140.
- 394.** Ozaki I, Hamajima H, Matsushashi S, Mizuta T. Regulation of TGF- β 1-Induced Pro-Apoptotic Signaling by Growth Factor Receptors and Extracellular Matrix Receptor Integrins in the Liver. *Front Physiol.* 2011 Oct 24;2:78. doi: 10.3389/fphys.2011.00078. PMID: 22028694; PMCID: PMC3199809.
- 395.** Korkut A, Zaidi S, Kanchi RS, Rao S, Gough NR, Schultz A, Li X, Lorenzi PL, Berger AC, Robertson G, Kwong LN, Datto M, Roszik J, Ling S, Ravikumar V, Manyam G, Rao A, Shelley S, Liu Y, Ju Z, Hansel D, de Velasco G, Pennathur A, Andersen JB, O'Rourke CJ, Ohshiro K, Jogunoori W, Nguyen BN, Li S, Osmanbeyoglu HU, Ajani JA, Mani SA, Houseman A, Wiznerowicz M, Chen J, Gu S, Ma W, Zhang J, Tong P, Cherniack AD, Deng C, Resar L; Cancer Genome Atlas Research Network; Weinstein JN, Mishra L, Akbani R. A Pan-Cancer Analysis Reveals High-Frequency Genetic Alterations in Mediators of Signaling by the TGF- β Superfamily. *Cell Syst.* 2018 Oct 24;7(4):422-437.e7. doi: 10.1016/j.cels.2018.08.010. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30268436; PMCID: PMC6370347.
- 396.** Zhang L, Zhou F, ten Dijke P. Signaling interplay between transforming growth factor- β receptor and PI3K/AKT pathways in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2013 Dec;38(12):612-20. doi: 10.1016/j.tibs.2013.10.001. Epub 2013 Nov 14. PMID: 24239264.
- 397.** Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Iglesias M, Céspedes MV, Sevillano M, Nadal C, Jung P, Zhang XH, Byrom D, Riera A, Rossell D, Mangués R, Massagué J, Sancho E, Batlle E. Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell.* 2012 Nov 13;22(5):571-84. doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.013. PMID: 23153532; PMCID: PMC3512565.
- 398.** Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 30;93(9):4219-23. doi: 10.1073/pnas.93.9.4219. PMID: 8633044; PMCID: PMC39515..
- 399.** Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008 May;8(5):387-98. doi: 10.1038/nrc2389. PMID: 18432252.
- 400.** Sun H, Gao Y, Lu K, Zhao G, Li X, Li Z, Chang H. Overexpression of Klotho suppresses liver cancer progression and induces cell apoptosis by negatively regulating wnt/ β -catenin signaling pathway. *World J Surg Oncol.* 2015 Oct 24;13:307. doi: 10.1186/s12957-015-0717-0. PMID: 26499380; PMCID: PMC4619481.

- 401.** Arbel Rubinstein T, Shahmoon S, Zigmond E, Etan T, Merenbakh-Lamin K, Pasmanik-Chor M, Har-Zahav G, Barshack I, Vainer GW, Skalka N, Rosin-Arbesfeld R, Varol C, Rubinek T, Wolf I. Klotho suppresses colorectal cancer through modulation of the unfolded protein response. *Oncogene*. 2019 Feb;38(6):794-807. doi: 10.1038/s41388-018-0489-4. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30232408.
- 402.** Pan J, Zhong J, Gan LH, Chen SJ, Jin HC, Wang X, Wang LJ. Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Tumour Biol*. 2011 Aug;32(4):729-35. doi: 10.1007/s13277-011-0174-5. Epub 2011 Apr 27. PMID: 21523445.
- 403.** Wang L, Wang X, Wang X, Jie P, Lu H, Zhang S, Lin X, Lam EK, Cui Y, Yu J, Jin H. Klotho is silenced through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Am J Cancer Res*. 2011;1(1):111-119. Epub 2010 Nov 10. PMID: 21969138; PMCID: PMC3180103.
- 404.** Chen B, Huang S, Pisanic li TR, Stark A, Tao Y, Cheng B, Li Y, Wei Y, Zhao W, Wang TH, Wu J. Rab8 GTPase regulates Klotho-mediated inhibition of cell growth and progression by directly modulating its surface expression in human non-small cell lung cancer. *EBioMedicine*. 2019 Nov;49:118-132. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.10.040. Epub 2019 Nov 6. PMID: 31707148; PMCID: PMC6945242.
- 405.** Usuda J, Ichinose S, Ishizumi T, Ohtani K, Inoue T, Saji H, Kakihana M, Kajiwara N, Uchida O, Nomura M, Tsutsui H, Ohira T, Ikeda N. Klotho is a novel biomarker for good survival in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2011 Jun;72(3):355-9. doi: 10.1016/j.lungcan.2010.10.008. Epub 2010 Nov 13. PMID: 21075474.
- 406.** Rubinek T, Shulman M, Israeli S, Bose S, Avraham A, Zundeleovich A, Evron E, Gal-Yam EN, Kaufman B, Wolf I. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jun;133(2):649-57. doi: 10.1007/s10549-011-1824-4. Epub 2011 Oct 22. PMID: 22042362.
- 407.** Dallol A, Buhmeida A, Merdad A, Al-Maghrabi J, Gari MA, Abu-Elmagd MM, Elaimi A, Assidi M, Chaudhary AG, Abuzenadah AM, Nedjadi T, Ermiah E, Alkhayyat SS, Al-Qahtani MH. Frequent methylation of the KLOTHO gene and overexpression of the FGFR4 receptor in invasive ductal carcinoma of the breast. *Tumour Biol*. 2015 Dec;36(12):9677-83. doi: 10.1007/s13277-015-3733-3. Epub 2015 Jul 8. PMID: 26152288.
- 408.** Ligumsky H, Rubinek T, Merenbakh-Lamin K, Yeheskel A, Sertchook R, Shahmoon S, Aviel-Ronen S, Wolf I. Tumor Suppressor Activity of Klotho in Breast Cancer Is Revealed by Structure-Function Analysis. *Mol Cancer Res*. 2015 Oct;13(10):1398-407. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0141. Epub 2015 Jun 25. PMID: 26113466.
- 409.** Aviel-Ronen S, Rubinek T, Zadok O, Vituri A, Avivi C, Wolf I, Barshack I. Klotho expression in cervical cancer: differential expression in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 2016 Jan;69(1):53-7. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202929. Epub 2015 Jul 24. PMID: 26209729.
- 410.** Qureshi R, Arora H, Rizvi MA. EMT in cervical cancer: its role in tumour progression and response to therapy. *Cancer Lett*. 2015 Jan 28;356(2 Pt B):321-31. doi: 10.1016/j.canlet.2014.09.021. Epub 2014 Sep 30. PMID: 25281477.
- 411.** Irina Lojkin, Omer Schwartzman, Tami Rubinek and Wolf I. The aging suppressor hormone Klotho inhibits ovarian cancer cell proliferation by down-regulation of the estrogen receptor. [abstract]. *Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2013*; 3557-3557.
- 412.** Lojkin I, Rubinek T, Orsulic S, Schwarzmann O, Karlan BY, Bose S, Wolf I. Reduced expression and growth inhibitory activity of the aging suppressor klotho in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett*. 2015 Jul 1;362(2):149-57. doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.035. Epub 2015 Mar 28. PMID: 25827069.

413. Camilli, T. C., Xu, M., O'Connell, M. P., Chien, B., Frank, B. P., Subaran, S. et al. (2011). Loss of Klotho during melanoma progression leads to increased filamin cleavage, increased Wnt5A expression, and enhanced melanoma cell motility. *Pigment Cell Melan. Res.* 24, 175–186. doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00792.
414. Dai D, Wang Q, Li X, Liu J, Ma X, Xu W. Klotho inhibits human follicular thyroid cancer cell growth and promotes apoptosis through regulation of the expression of stanniocalcin-1. *Oncol Rep.* 2016 Jan;35(1):552-8. doi: 10.3892/or.2015.4358. Epub 2015 Oct 29. PMID: 26531219.
415. Tang X, Wang Y, Fan Z, Ji G, Wang M, Lin J, Huang S, Meltzer SJ. Klotho: a tumor suppressor and modulator of the Wnt/ β -catenin pathway in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest.* 2016 Feb;96(2):197-205. doi: 10.1038/labinvest.2015.86. Epub 2015 Aug 3. PMID: 26237271; PMCID: PMC4731258.
416. Zhou X, Fang X, Jiang Y, Geng L, Li X, Li Y, Lu K, Li P, Lv X, Wang X. Klotho, an anti-aging gene, acts as a tumor suppressor and inhibitor of IGF-1R signaling in diffuse large B cell lymphoma. *J Hematol Oncol.* 2017 Feb 2;10(1):37. doi: 10.1186/s13045-017-0391-5. PMID: 28153033; PMCID: PMC5288890.
417. Kim HJ, Lee J, Lee SY, Cheong HS, Kye YS, Kim W, Byun SS, Myung SC. The association between KL polymorphism and prostate cancer risk in Korean patients. *Mol Biol Rep.* 2014 Nov;41(11):7595-606. doi: 10.1007/s11033-014-3647-y. Epub 2014 Aug 14. PMID: 25120167.
418. Seo M, Kim MS, Jang A, Chung HJ, Noh Y, Kim DH, Lee J, Ko K, Myung SC. Epigenetic suppression of the anti-aging gene *KLOTHO* in human prostate cancer cell lines. *Anim Cells Syst (Seoul).* 2017 Jun 22;21(4):223-232. doi: 10.1080/19768354.2017.1336112. PMID: 30460073; PMCID: PMC6138301.
419. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;24(3):148-54. doi: 10.1007/BF00300234. PMID: 2544306.
420. Bookout AL, de Groot MH, Owen BM, Lee S, Gautron L, Lawrence HL, Ding X, Elmquist JK, Takahashi JS, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat Med.* 2013 Sep;19(9):1147-52. doi: 10.1038/nm.3249. Epub 2013 Aug 11. PMID: 23933984; PMCID: PMC3769420.
421. Yatsenko SA, Rajkovic A. Genetics of human female infertility†. *Biol Reprod.* 2019 Sep 1;101(3):549-566. doi: 10.1093/biolre/ioz084. PMID: 31077289; PMCID: PMC8127036.
422. Xie T, Ye W, Liu J, Zhou L, Song Y. The Emerging Key Role of Klotho in the Hypothalamus-Pituitary-Ovarian Axis. *Reprod Sci.* 2021 Feb;28(2):322-331. doi: 10.1007/s43032-020-00277-5. Epub 2020 Aug 11. PMID: 32783104.
423. Liu T, Wang S, Li Q, Huang Y, Chen C, Zheng J. Telocytes as potential targets in a cyclophosphamide-induced animal model of premature ovarian failure. *Mol Med Rep.* 2016 Sep;14(3):2415-22. doi: 10.3892/mmr.2016.5540. Epub 2016 Jul 22. PMID: 27485835; PMCID: PMC4991733.
424. Ghahremani-Nasab M, Ghanbari E, Jahanbani Y, Mehdizadeh A, Yousefi M. Premature ovarian failure and tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2020 May;235(5):4217-4226. doi: 10.1002/jcp.29376. Epub 2019 Oct 29. PMID: 31663142.
425. Liu T, Liu Y, Huang Y, Chen J, Yu Z, Chen C, Lai L. miR-15b induces premature ovarian failure in mice via inhibition of α -Klotho expression in ovarian granulosa cells. *Free Radic Biol Med.* 2019 Sep;141:383-392. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.010. Epub 2019 Jul 13. PMID: 31310795.

- 426.** Ben-Aharon I, Levi M, Margel D, Yerushalmi R, Rizel S, Perry S, Sharon E, Hasky N, Abir R, Fisch B, Tobar A, Shalgi R, Stemmer SM. Premature ovarian aging in *BRCA* carriers: a prototype of systemic precocious aging? *Oncotarget*. 2018 Mar 23;9(22):15931-15941. doi: 10.18632/oncotarget.24638. PMID: 29662617; PMCID: PMC5882308.
- 427.** Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev*. 1994 Dec;15(6):725-51. doi: 10.1210/edrv-15-6-725. PMID: 7705279.
- 428.** Shahmoon S, Rubinfeld H, Wolf I, Cohen ZR, Hadani M, Shimon I, Rubinek T. The aging suppressor *klotho*: a potential regulator of growth hormone secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Aug 1;307(3):E326-34. doi: 10.1152/ajpendo.00090.2014. Epub 2014 Jun 17. PMID: 24939736.
- 429.** Xu C, Messina A, Somm E, Miraoui H, Kinnunen T, Acierno J Jr, Niederländer NJ, Bouilly J, Dwyer AA, Sidis Y, Cassatella D, Sykietis GP, Quinton R, De Geyter C, Dirlewanger M, Schwitzgebel V, Cole TR, Toogood AA, Kirk JM, Plummer L, Albrecht U, Crowley WF Jr, Mohammadi M, Tena-Sempere M, Prevot V, Pitteloud N. *KLB*, encoding β -Klotho, is mutated in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *EMBO Mol Med*. 2017 Oct;9(10):1379-1397. doi: 10.15252/emmm.201607376. PMID: 28754744; PMCID: PMC5623842.
- 430.** Mao Z, Fan L, Yu Q, Luo S, Wu X, Tang J, Kang G, Tang L. Abnormality of Klotho Signaling Is Involved in Polycystic Ovary Syndrome. *Reprod Sci*. 2018 Mar;25(3):372-383. doi: 10.1177/1933719117715129. Epub 2017 Jul 4. PMID: 28673204.
- 431.** Xu X, Hao Y, Zhong Q, Hang J, Zhao Y, Qiao J. Low KLOTHO level related to aging is associated with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2020 Dec;114(6):1250-1255. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.06.035. Epub 2020 Nov 3. PMID: 33153705.
- 432.** Abedelahi, A.; Salehnia, M.; Allameh, A.A.; Davoodi, D. Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. *Hum. Reprod*. 2010, 25, 977–985.
- 433.** Park, J.H.; Kang, S.S.; Kim, J.Y.; Tchah, H. The Antioxidant N-Acetylcysteine Inhibits Inflammatory and Apoptotic Processes in Human Conjunctival Epithelial Cells in a High-Glucose Environment. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2015, 56, 5614–5621.
- 434.** Kim B, Yoon H, Kim T, Lee S. Role of Klotho as a Modulator of Oxidative Stress Associated with Ovarian Tissue Cryopreservation. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 17;22(24):13547. doi: 10.3390/ijms222413547. PMID: 34948343; PMCID: PMC8707502
- 435.** Lee S, Song JY, Ku SY, Kim SH, Kim T. Fertility preservation in women with cancer. *Clin Exp Reprod Med*. 2012 Jun;39(2):46-51. doi: 10.5653/term.2012.39.2.46. Epub 2012 Jun 30. PMID: 22816069; PMCID: PMC3398116.
- 436.** Liu X, Xu Y, Liu F, Pan Y, Miao L, Zhu Q, Tan S. The Feasibility of Antioxidants Avoiding Oxidative Damages from Reactive Oxygen Species in Cryopreservation. *Front Chem*. 2021 Feb 26;9:648684. doi: 10.3389/fchem.2021.648684. PMID: 33718331; PMCID: PMC7952315.
- 437.** Correction to: Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions, by Best BP. *Rejuvenation Res* 2015;18(5):422-436; DOI: 10.1089/rej.2014.1656. *Rejuvenation Res*. 2018 Feb;21(1):87. doi: 10.1089/rej.2014.1656.correx. Epub 2018 Jan 22. Erratum for: *Rejuvenation Res*. 2015 Oct;18(5):422-36. PMID: 29356600; PMCID: PMC5824976.
- 438.** Takahashi, S.; Ando, A.; Takagi, H.; Shima, J. Insufficiency of copper ion homeostasis causes freeze-thaw injury of yeast cells as revealed by indirect gene expression analysis. *Appl. Environ. Microbiol*. 2009, 75, 6706–6711.

- 439** Shiraki-Iida T, Iida A, Nabeshima Y, Anazawa H, Nishikawa S, Noda M, Kuro-o M and Nabeshima Y. Improvement of multiple pathophysiological phenotypes of *klotho* (*kl/kl*) mice by adenovirus-mediated expression of the *klotho* gene. *J Gene Med* 2000; 2: 233-242
- 440** Takemura T, Okabe M. Serum α -*klotho* concentrations during preimplantation can predict aging or quality of human oocytes and clinical pregnancy rates. *Springerplus*. 2016 Jan 20;5:53. doi: 10.1186/s40064-016-1706-7. PMID: 26835233; PMCID: PMC4720619.
- 441.** Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, Hasegawa H, Yamashita T, Nakatani K, Saito Y, Okamoto N, Kurumatani N, Namba N, Kitaoka T, Ozono K, Sakai T, Hataya H, Ichikawa S, Imel EA, Econs MJ, Nabeshima Y. Establishment of sandwich ELISA for soluble α -*Klotho* measurement: Age-dependent change of soluble α -*Klotho* levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jul 30;398(3):513-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.110. Epub 2010 Jul 1. PMID: 20599764; PMCID: PMC4130489.
- 442.** Guo Z, Wang Y, Wen X, Xu X, Yan L. β -*Klotho* Promotes the Development of Intrauterine Adhesions via the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 25;23(19):11294. doi: 10.3390/ijms231911294. PMID: 36232594; PMCID: PMC9569898.
- 443** Loichinger MH, Towner D, Thompson KS, Ahn HJ and Bryant-Greenwood GD. Systemic and placental α -*klotho*: effects of preeclampsia in the last trimester of gestation. *Placenta* 2016; 41: 53-61
- 444** Ohata Y, Arahori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, Nakayama M, Michigami T, Imura A, Nabeshima Y, Yamazaki Y and Ozono K. Circulating levels of soluble α -*Klotho* are markedly elevated in human umbilical cord blood. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: E943-947.
- 445** Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tsugawa N, Tachikawa K, Koinuma T, Miyagawa K, Kimoto A, Nakayama M, Namba N, Yamamoto H, Okano T, Ozono K, Michigami T. Elevated fibroblast growth factor 23 exerts its effects on placenta and regulates vitamin D metabolism in pregnancy of Hyp mice. *J Bone Miner Res*. 2014 Jul;29(7):1627-38. doi: 10.1002/jbmr.2186. PMID: 24470103.
- 446.** Lu P, Boros S, Chang Q, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase *klotho* exclusively activates the epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23:3397–3402. [PubMed: 18495742]
- 447.** Ma R, Gu Y, Groome LJ, Wang Y. ADAM17 regulates TNF α production by placental trophoblasts. *Placenta*. 2011; 32:975–980. [PubMed: 22018416]
- 448.** Miranda J, Romero R, Korzeniewski SJ, Schwartz AG, Chaemsaitong P, Stampalija T, Yeo L, Dong Z, Hassan SS, Chrousos GP, Gold P, Chaiworapongsa T. The anti-aging factor α -*klotho* during human pregnancy and its expression in pregnancies complicated by small-for-gestational-age neonates and/or preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014 Mar;27(5):449-57. doi: 10.3109/14767058.2013.818652. Epub 2013 Aug 19. PMID: 23808483; PMCID: PMC4157896.
- 449.** Siahianidou, T., Garatzioti, M., Lazaropoulou, C., Kourlaba, G., Papassotiriou, I., Kino, T., Imura, A., Nabeshima, Y.-I., & Chrousos, G. (2012). Plasma soluble α -*klotho* protein levels in premature and term neonates: correlations with growth and metabolic parameters. *European Journal of Endocrinology*, 167(3), 433–440. <https://doi.org/10.1530/eje-12-0476>
- 450.** Chen Z, Xiong L, Jin H, Yu J, Li X, Fu H, Wen L, Qi H, Tong C, Saffery R, Kilby MD, Baker PN. Advanced maternal age causes premature placental senescence and malformation via dysregulated α -*Klotho* expression in trophoblasts. *Aging Cell*. 2021 Jul;20(7):e13417. doi: 10.1111/acer.13417. Epub 2021 Jun 9. PMID: 34105233; PMCID: PMC8282245.

- 451.** Martinelli, K. G., Garcia, E. M., Santos Neto, E. T. D., & Gama, S. (2018). Advanced maternal age and its association with placenta praevia and placental abruption: a meta-analysis. *Cadernos de Saúde Pública*, 34(2), e00206116. <https://doi.org/10.1590/0102-311x00206116>
- 452.** Martin JA, Hamilton BE, Osterman MJK. Births in the United States, 2018. *NCHS Data Brief*. 2019 Jul;(346):1-8. PMID: 31442195.
- 453.** Sultana Z, Maiti K, Dedman L, Smith R. Is there a role for placental senescence in the genesis of obstetric complications and fetal growth restriction? *Am J Obstet Gynecol*. 2018 Feb;218(2S):S762-S773. doi: 10.1016/j.ajog.2017.11.567. Epub 2017 Dec 22. PMID: 29275823.
- 454.** Mayne BT, Leemaqz SY, Smith AK, Breen J, Roberts CT, Bianco-Miotto T. Accelerated placental aging in early onset preeclampsia pregnancies identified by DNA methylation. *Epigenomics*. 2017 Mar;9(3):279-289. doi: 10.2217/epi-2016-0103. Epub 2016 Nov 29. PMID: 27894195; PMCID: PMC6040051.
- 455.** Maiti K, Sultana Z, Aitken RJ, Morris J, Park F, Andrew B, Riley SC, Smith R. Evidence that fetal death is associated with placental aging. *Am J Obstet Gynecol*. 2017 Oct;217(4):441.e1-441.e14. doi: 10.1016/j.ajog.2017.06.015. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28645573.
- 456.** Redman CWG, Staff AC, Roberts JM. Syncytiotrophoblast stress in preeclampsia: the convergence point for multiple pathways. *Am J Obstet Gynecol*. 2022 Feb;226(2S):S907-S927. doi: 10.1016/j.ajog.2020.09.047. Epub 2021 Feb 2. PMID: 33546842.
- 457.** Cindrova-Davies T, Fogarty NME, Jones CJP, Kingdom J, Burton GJ. Evidence of oxidative stress-induced senescence in mature, post-mature and pathological human placentas. *Placenta*. 2018 Aug;68:15-22. doi: 10.1016/j.placenta.2018.06.307. Epub 2018 Jun 19. PMID: 30055665; PMCID: PMC6083404.
- 458.** Giannubilo SR, Cecati M, Saccucci F, Emanuelli M, Tranquilli AL. PP008. Placental klotho gene in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2013 Apr;3(2):70. doi: 10.1016/j.preghy.2013.04.036. Epub 2013 Jun 6. PMID: 26105864.
- 459.** Lo JO, Mission JF, Caughey AB. Hypertensive disease of pregnancy and maternal mortality. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2013 Apr;25(2):124-32. doi: 10.1097/GCO.0b013e32835e0ef5. PMID: 23403779.
- 460.** Eiland E, Nzerue C, Faulkner M. Preeclampsia 2012. *J Pregnancy*. 2012;2012:586578. doi: 10.1155/2012/586578. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22848831; PMCID: PMC3403177.
- 461.** Jung E, Romero R, Yeo L, Gomez-Lopez N, Chaemsathong P, Jaovisidha A, Gotsch F, Erez O. The etiology of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2022 Feb;226(2S):S844-S866. doi: 10.1016/j.ajog.2021.11.1356. PMID: 35177222; PMCID: PMC8988238.
- 462.** Suvakov S, Ghamrawi R, Cubro H, Tu H, White WM, Tobah YSB, Milic NM, Grande JP, Cunningham JM, Chebib FT, Prata LGPL, Zhu Y, Tchkonja T, Kirkland JL, Nath KA, Milosavljevic A, Garovic VD. Epigenetic and senescence markers indicate an accelerated ageing-like state in women with preeclamptic pregnancies. *EBioMedicine*. 2021 Aug;70:103536. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103536. Epub 2021 Aug 11. PMID: 34391091; PMCID: PMC8365351.
- 463.** van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 2014 May 22;509(7501):439-46. doi: 10.1038/nature13193. PMID: 24848057; PMCID: PMC4214092.
- 464.** Fan C, Wang Y, Wang J, Lei D, Sun Y, Lei S, Hu M, Tian Y, Li R, Wang S. Clinic significance of markedly decreased α -klothoin women with preeclampsia. *Am J Transl Res*. 2016 May 15;8(5):1998-2010. PMID: 27347309; PMCID: PMC4891414.

- 465.** Yang HC, Deleuze S, Zuo Y, Potthoff SA, Ma LJ and Fogo AB. The PPARgamma agonist pioglitazone ameliorates aging-related progressive renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 2380- 2388
- 466.** Cindrova-Davies T. Gabor Than Award Lecture 2008: pre-eclampsia - from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. *Placenta*. 2009 Mar;30 Suppl A:S55-65. doi: 10.1016/j.placenta.2008.11.020. Epub 2008 Dec 31. PMID: 19118896.
- 467.** Wang J, Lin Y, Lv F, Hou H, Chu K, Jiang B, Liu J, Liu S, Hou B. Effects of Klotho polymorphisms on Preeclampsia risk in a case-control study. *Pregnancy Hypertens*. 2018 Jul;13:95-99. doi: 10.1016/j.preghy.2018.04.016. Epub 2018 Apr 23. PMID: 30177080
- 468.** Uzun Cilindir I, Varol F, Gurkan H, Sutcu H, Atli E, Eker D, Inan C, Erzincan S, Sayin C. Placental and serum levels of human Klotho in severe preeclampsia: A potential sensitive biomarker. *Placenta*. 2019 Sep 15;85:49-55. doi: 10.1016/j.placenta.2019.08.084. Epub 2019 Aug 19. PMID: 31446221.
- 469.** Fowden AL. The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta* (2003) 24:803–12. doi: 10.1016/S0143-4004(03)00080-8
- 5/470.** Iñiguez G, Gonzalez CA, Argandoña F, Kakarieka E, Johnson MC, Cassorla F. Expression and protein content of IGF-I and IGF-I receptor (IGF-IR) in placentas from small, adequate and large for gestational age newborns. *Horm Res Paediatr*. (2010) 73:320–7. doi: 10.1159/000308163
- 471.** Iñiguez G, Castro JJ, Garcia M, Kakarieka E, Johnson MC, Cassorla F, et al. IGF-IR signal transduction protein content and its activation by IGF-I in human placentas: relationship with gestational age and birth weight. *PLoS ONE* (2014) 9:e102252. doi: 10.1371/journal.pone.0102252
- 472.** Iñiguez G, Gallardo P, Castro JJ, Gonzalez R, Garcia M, Kakarieka E, San Martin S, Johnson MC, Mericq V and Cassorla F (2019) Klotho Gene and Protein in Human Placentas According to Birth Weight and Gestational Age. *Front. Endocrinol*. 9:797. doi: 10.3389/fendo.2018.00797
- 473.** Franklin AD, Saqibuddin J, Stephens K, Birkett R, Marsden L, Ernst LM, Mestan KK. Cord blood alpha klotho is decreased in small for gestational age preterm infants with placental lesions of accelerated aging. *Placenta*. 2019 Nov;87:1-7. doi: 10.1016/j.placenta.2019.08.088. Epub 2019 Aug 30. PMID: 31499336; PMCID: PMC6854317
- 474.** Lian IA, Loset M, Mundal SB, Fenstad MH, Johnson MP, Eide IP, Bjorge L, et al. Increased endoplasmic reticulum stress in decidual tissue from pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia. *Placenta*. 2011; 32:823–829. [PubMed: 21907405]
- 475.** Benton SJ, Hu Y, Xie F, Kupfer K, Lee SW, Magee LA, von Dadelszen P. Can placental growth factor in maternal circulation identify fetuses with placental intrauterine growth restriction? *Am J Obstet Gynecol*. 2012; 206:163, e161–167. [PubMed: 22055338]
- 476.** Mannik J, Vaas P, Rull K, Teesalu P, Rebane T, Laan M. Differential expression profile of growth hormone/chorionic somatomammotropin genes in placenta of small- and large-for-gestational-age newborns. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95:2433–2442. [PubMed: 20233782]
- 477.** Shao WJ, Wang DX, Wan QY, Zhang MM, Chen MM, Song WW. [Expression of mRNA and protein of Klotho gene in placental tissue of macrosomia and its relationship with birth weight of neonates]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2016 Jun 25;51(6):420-3. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.issn.0529-567X.2016.06.004. PMID: 27356476.
- 478.** Lam-Rachlin J, Romero R, Korzeniewski SJ, Schwartz AG, Chaemsaitong P, HernandezAndrade E, Dong Z, Yeo L, Hassan SS and Chaiworapongsa T. Infection and smoking are associated with decreased plasma concentration of the anti-aging protein, alpha-klotho. *J Perinat Med* 2013; 41: 581-594.

- 479.** Taguchi S, Funabiki M and Nakamura Y. Abnormally high levels of serum α -klotho may result in a poor clinical outcome for a 41-year-old woman. *Journal of Medical Cases* 2015; 6: 472-473
- 480.** Tayyar AT, Tayyar A, Kozali S, Karakus R, Koroglu N, Yuksel IT, Yildirim GY, Dag I, Eroglu M. Evaluation of FGF-19 and β -klotho as biomarkers in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Arch Med Sci.* 2019 Jan;15(1):113-119. doi: 10.5114/aoms.2017.72424. Epub 2018 Jan 10. PMID: 30697260; PMCID: PMC6348354.
- 481.** Gkentzi D, Efthymiadou A, Kritikou D, Chrysis D. Fibroblast growth factor 23 and Klotho serum levels in healthy children. *Bone.* 2014 Sep;66:8-14. doi: 10.1016/j.bone.2014.05.012. Epub 2014 May 29. PMID: 24880094.
- 482.** Koo WW, Walters JC, Hockman EM. Body composition in neonates: relationship between measured and derived anthropometry with dual-energy X-ray absorptiometry measurements. *Pediatric Research.* 2004; 56:694–700.10.1203/01.PDR. 0000142587.59238.BD [PubMed: 15371563]
- 483.** Mutsaers HA, Levchenko EN, Martinierie L, Pertijs JC, Allegaert K, Devriendt K, Masereeuw R, Monnens LA, Lombès M. Switch in FGFR3 and -4 expression profile during human renal development may account for transient hypercalcemia in patients with Sotos syndrome due to 5q35 microdeletions. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Jul;99(7):E1361-7. doi: 10.1210/jc.2014-1123. Epub 2014 Mar 26. PMID: 24670087; PMCID: PMC5373678.
- 484.** Wojcicki JM, Prather AA, Epel E, Wang D, Dubal DB. Cord blood klotho levels are inversely associated with leptin in healthy Latino neonates at risk for obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2018 Apr 25;31(5):515-520. doi: 10.1515/jpem-2017-0357. PMID: 29648999; PMCID:
- 485.** Karakosta P, Chatzi L, Plana E, Margioris A, Castanas E, Kogevinas M. Leptin levels in cord blood and anthropometric measures at birth: a systematic review and meta-analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2011 Mar;25(2):150-63. doi: 10.1111/j.1365-3016.2010.01163.x. Epub 2010 Dec 9. PMID: 21281328.
- 486.** Kyriakakou M, Malamitsi-Pucher A, Millitsi H, Boutsikou T, Margeli A, et al. Leptin and adiponectin concentrations in intrauterine growth restricted and appropriate for gestational age fetuses, neonates and their mothers. *Eur J Endocrinol* 2008;158:343–8. [PubMed: 18299467]
- 487.** Ali MF, Venkatarayappa SKB, Benny M, Rojas C, Yousefi K, Shehadeh LA, Kulandavelu S, Sharma M, Da Silva N, Freundlich M, Abitbol CL, DeFreitas MJ, Young KC. Effects of Klotho supplementation on hyperoxia-induced renal injury in a rodent model of postnatal nephrogenesis. *Pediatr Res.* 2020 Oct;88(4):565-570. doi: 10.1038/s41390-020-0803-z. Epub 2020 Feb 14. PMID: 32059229; PMCID: PMC8226112..
- 488.** Sutherland MR, O'Reilly M, Kenna K, Ong K, Harding R, Sozo F, Black MJ. Neonatal hyperoxia: effects on nephrogenesis and long-term glomerular structure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013 May 15;304(10):F1308-16. doi: 10.1152/ajprenal.00172.2012. Epub 2013 Feb 20. PMID: 23427140.
- 489.** Arrich J, Holzer M, Havel C, Müllner M, Herkner H. Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Feb 15;2(2):CD004128. doi: 10.1002/14651858.CD004128.pub4. PMID: 26878327; PMCID: PMC6516972.
- 490.** Jackson TC, Kotermanski SE, Kochanek PM. Infants Uniquely Express High Levels of RBM3 and Other Cold-Adaptive Neuroprotectant Proteins in the Human Brain. *Dev Neurosci.* 2018;40(4):325-336. doi: 10.1159/000493637. Epub 2018 Nov 6. PMID: 30399610; PMCID: PMC6311128.
- 491.** Hull D, Smales O. In: Sinclair JC, editor. Temperature regulation and energy metabolism in the newborn. New York: Grune & Stratton; 1978.

- 492.** Bal NC, Maurya SK, Sopariwala DH, Sahoo SK, Gupta SC, Shaikh SA, Pant M, Rowland LA, Bombardier E, Goonasekera SA, Tupling AR, Molkentin JD, Periasamy M. Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. *Nat Med.* 2012 Oct;18(10):1575-9. doi: 10.1038/nm.2897. Epub 2012 Sep 9. Erratum in: *Nat Med.* 2012 Dec;18(12):1857. Tupling, A Russell [added]; Bombardier, Eric [added]. PMID: 22961106; PMCID: PMC3676351.
- 493.** Sánchez-Infantes D, Gallego-Escuredo JM, Díaz M, Aragonés G, Sebastiani G, López-Bermejo A, de Zegher F, Domingo P, Villarroya F, Ibáñez L. Circulating FGF19 and FGF21 surge in early infancy from infra- to supra-adult concentrations. *Int J Obes (Lond).* 2015 May;39(5):742-6. doi: 10.1038/ijo.2015.2. Epub 2015 Jan 20. PMID: 25599612..
- 494.** Gavalda-Navarro A, Hondares E, Giralt M, Mampel T, Iglesias R, Villarroya F. Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function. *Sci Rep.* 2015 Sep 2;5:13717. doi: 10.1038/srep13717. PMID: 26329882; PMCID: PMC4557064.
- 495.** Batlahally S, Franklin A, Damianos A, Huang J, Chen P, Sharma M, Duara J, Keerthy D, Zambrano R, Shehadeh LA, Martinez EC, DeFreitas MJ, Kulandavelu S, Abitbol CL, Freundlich M, Kanashiro-Takeuchi RM, Schmidt A, Benny M, Wu S, Mestan KK, Young KC. Soluble Klotho, a biomarker and therapeutic strategy to reduce bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension in preterm infants. *Sci Rep.* 2020 Jul 23;10(1):12368. doi: 10.1038/s41598-020-69296-1. PMID: 32704023; PMCID: PMC7378054.
- 496.** South AM, Shaltout HA, Gwathmey TM, Jensen ET, Nixon PA, Diz DI, Chappell MC, Washburn LK. Lower urinary α -Klotho is associated with lower angiotensin-(1-7) and higher blood pressure in young adults born preterm with very low birthweight. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2020 Jun;22(6):1033-1040. doi: 10.1111/jch.13897. Epub 2020 May 31. PMID: 32475043; PMCID: PMC8030001