

Aus der Universitäts- Kinder- und Jugendklinik Rostock

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jan Däbritz

**Untersuchungen an humanen Plazenta-Präparaten zur Expression des Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) und seines Co-Faktors Klotho**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades

**Doctor medicinae**  
(Dr.med.)

der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

Vorgelegt von

Sophia Maria Mann  
geb. am 02.08.1984 in Leipzig

Kiel, im August 2021

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. D.- C. Fischer, Experimentelle Pädiatrie  
Universität Rostock

Gutachter: 2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Leifheit-Nestler, Zentrum für  
Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Medizinische Hoch-  
schule Hannover

Gutachter: 3. Priv.-Doz. Dr. med. habil. A. Stachs, Universitätsfrauen-  
klinik, Klinikum Südstadt Rostock

Jahr der Einreichung: 2021  
Jahr der Verteidigung: 2022

**I        Inhaltsverzeichnis**  
**II      Verzeichnis der Abkürzungen**  
**III     Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen**

**I        Inhaltsverzeichnis**

1    Einleitung .....	1
1.1    Aufbau und Entwicklung der humanen Plazenta .....	2
1.2    Erkrankungen und Pathologien der humanen Plazenta .....	6
1.3    Eigenschaften und Funktion des Fibroblast-Growth-Factor-23 .....	9
1.4    Struktur und Funktion des Co-Faktors Klotho. ....	12
2    Ziel der Arbeit.....	13
3    Material und Methoden.....	14
3.1    Studienablauf.....	14
3.2    Laborgeräte und Programme .....	15
3.3    Reagenzien für immunhistochemische Untersuchungen .....	15
3.3.1    Chemikalien und Antikörper.....	15
3.3.2    Puffer- und Waschlösungen .....	16
3.4    Histologische Färbungen.....	17
3.4.1    Hämalaun-Eosin-Färbung.....	17
3.4.2    Nachweis von FGF-23 und Klotho mit der Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode) .....	17
3.5    Semiquantitative Auswertung am Lichtmikroskop .....	19
3.6    Isolierung von mRNA aus humaner Plazenta, Synthese der cDNA und nachfolgender rtPCR .....	19
3.7    Statistische Auswertung .....	22
4    Ergebnisse .....	23
4.1    Charakterisierung des Patientenkollektives.....	23
4.2    Histomorphologische Charakterisierung und immunhistochemische Analyse der humanen Plazenta .....	25
4.2.1    Morphologische Charakterisierung der humanen Plazenta.....	25
4.2.2    Immunhistochemische Darstellung von FGF-23 und Klotho .....	26

4.2.3 Semiquantitative Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen .....	28
4.3. Zusammenhang zwischen Färbeintensität und mütterlichen anthropometrischen Daten.....	30
4.4 Ergebnisse zur lokalen Synthese von FGF-23 und Klotho .....	31
5 Diskussion.....	32
5.1 Immunhistochemische Analyse.....	32
5.2 Kritische Betrachtung der Studie .....	34
5.3 Ausblick.....	35
6 Zusammenfassung.....	36
7 Thesen .....	37
8 Literaturverzeichnis .....	38
9 Danksagung .....	42
11 Eidesstattliche Erklärung.....	43

## II Verzeichnis der Abkürzungen

CaSR	Calcium-Sensing-Rezeptor
CrP	C-reaktives Protein
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
ES	Entnahmestelle
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded tissue
FGF-23	Fibroblast Growth Factor-23
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GH	Growth Hormon (Wachstumshormon)
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HE- Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hPL	Humanes Plazentalaktogen
KG	Körpergewicht
LVH	Linksventrikulare Hypertrophie
Na-Pi	Natrium-abhängiger Phosphat Cotransporter
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
PLC	Phospholipase C
PTH	Parathormon
PTH-RP	Parathormon Related- Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
qPCR	quantitative Polymerasekettenreakton
ROI	Regions of Interest
SGA	Small for Gestational Age
SS	Schwangerschaft
SSW	Schwangerschaftswoche
TNF- $\alpha$	Tumernekrosefaktor- $\alpha$
TRPV5	Transmembran receptor potential channel der Vanilloid Unterfamilie (apikaler Calcium-Transporter im distalen Tubulus der Niere)
VDR	Vitamin D Rezeptor
VDRE	Vitamin D Responsive Element

### **III Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen**

#### **Abbildungen:**

- Abb. 1: Schematischer Querschnitt durch die Plazenta (modifiziert nach (Welsch et al. 2014))
- Abb. 2.: Histologische Darstellung (HE-Färbung) einer Plazentazotte im zweiten Schwangerschaftsmonat (modifiziert nach (Welsch et al. 2014))
- Abb. 3.: Histologische Darstellung (HE-Färbung) eines Zottenanschnittes einer reifen Plazenta (modifiziert nach (Welsch et al. 2014))
- Abb. 4.: Histologische Darstellung einer Endangiopathia obliterans (modifiziert nach (Vogel 1996))
- Abb. 5.: FGF-23: Knochen-Nieren-Nebenschilddrüsen-Achse und hormoneller Regelkreis (Degirolamo et al. 2016)
- Abb. 6.: Immunhistochemische Lokalisation von FGF-23 und Klotho in der humanen Plazenta
- Abb. 7.: Darstellung verschiedener Färbeintensitäten von FGF-23 und Klotho in plazentarem Gewebe

#### **Tabellen:**

- Tab. I: Anthropometrische Daten der Kinder zum Zeitpunkt der Geburt
- Tab. II: Anthropometrische Daten beider Elternteile zum Zeitpunkt der Geburt
- Tab. III: Mütterliche Eigenschaften und Geburtsspezifika
- Tab. IV: Häufigkeiten globaler und lokaler Pathologien der Plazenta
- Tab. V: Kategorisierung der Präparate anhand der Färbeintensität
- Tab. VI: Die Färbeintensität in Relation zum mütterlichen Alter

## 1 Einleitung

Die Entstehung menschlichen Lebens wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Obwohl der Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind für die Entwicklung des Fetus essentiell ist, ist dieser doch nur in Ansätzen erforscht (Sethi et al. 2019; Ryan & Kovacs 2019).

Die Plazenta spielt hierbei eine zentrale Rolle, da sie während der fetalen Entwicklung als allogenes Transplantat den Austausch zwischen mütterlichem und kindlichem Kreislauf vermittelt (<http://www.embryology.ch/allemand/fplacenta/objectpl01.html#presequis>, 21.02.21). Zusätzlich übernimmt sie die Rolle einer endokrinen Drüse und ist für die Nährstoffzufuhr und die Regulation des Mineralstoffwechsels zuständig (Welsch et al. 2014). Die optimale Versorgung des Feten ist gleichermaßen Voraussetzung für die Entwicklung wie auch die Geburt eines reifen und gesunden Kindes. Überproportional kleine und leichte Babys (SGA - Small for Gestational Age) weisen in der Neonatalperiode und als Erwachsene ein höheres Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko auf (Iniguez et al. 2018; Kramer et al. 1990). Dieses ist auf ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Diabetes, einer Adipositas oder kardiovaskulärer Veränderungen zurückzuführen (Iniguez et al. 2018).

In den letzten Jahren wurde neben Vitamin D und dem Parathormon (PTH) der Fibroblast-Growth-Factor-23 (FGF-23) als ein weiterer Faktor identifiziert, der den humangen Mineral- und Knochenstoffwechsel beeinflusst und möglicherweise auch kausal an der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt ist (Haffner & Leifheit-Nestler 2017; Bhattacharyya et al. 2012). Ob und wie weit FGF-23 auch den fetalen Mineralhaushalt und Knochenstoffwechsel reguliert, ist noch weitestgehend unklar. In Studien von Takaiwa und Ohata wurde FGF-23 als potenter Regulator des Phosphatstoffwechsels und der Vitamin-D<sub>3</sub>-Homöostase während der Schwangerschaft und postpartal untersucht (Ohata et al. 2011; Takaiwa et al. 2010).

Im humanen Nabelschnurblut konnten, im Vergleich zu den Serumspiegeln von gesunden Erwachsenen, signifikant niedrigere FGF-23-Spiegel beobachtet werden (Takaiwa et al. 2010). Dies steht im Kontrast zu deutlich höheren, postpartalen Serumwerten (Takaiwa et al. 2010). Darüberhinaus konnte Klotho bei Untersuchungen an einer kleinen Zahl humaner Plazenten in Synzytiotrophoblasten nachgewiesen werden und es wird vermutet, dass es lokal synthetisiert wird (Ohata et al. 2011).

Um die kindliche Entwicklung im Mutterleib zu gewährleisten und gegebenenfalls zu optimieren, sind Kenntnisse darüber, welche Stoffe in der Plazenta gebildet und an den Fetus weitergegeben werden, von großer Bedeutung. Daher wird in der vorliegenden

Arbeit untersucht, ob und gegebenenfalls wo sich FGF-23 und seine Rezeptoren in der Plazenta nachweisen lassen und ob diese Proteine dort auch gebildet werden.

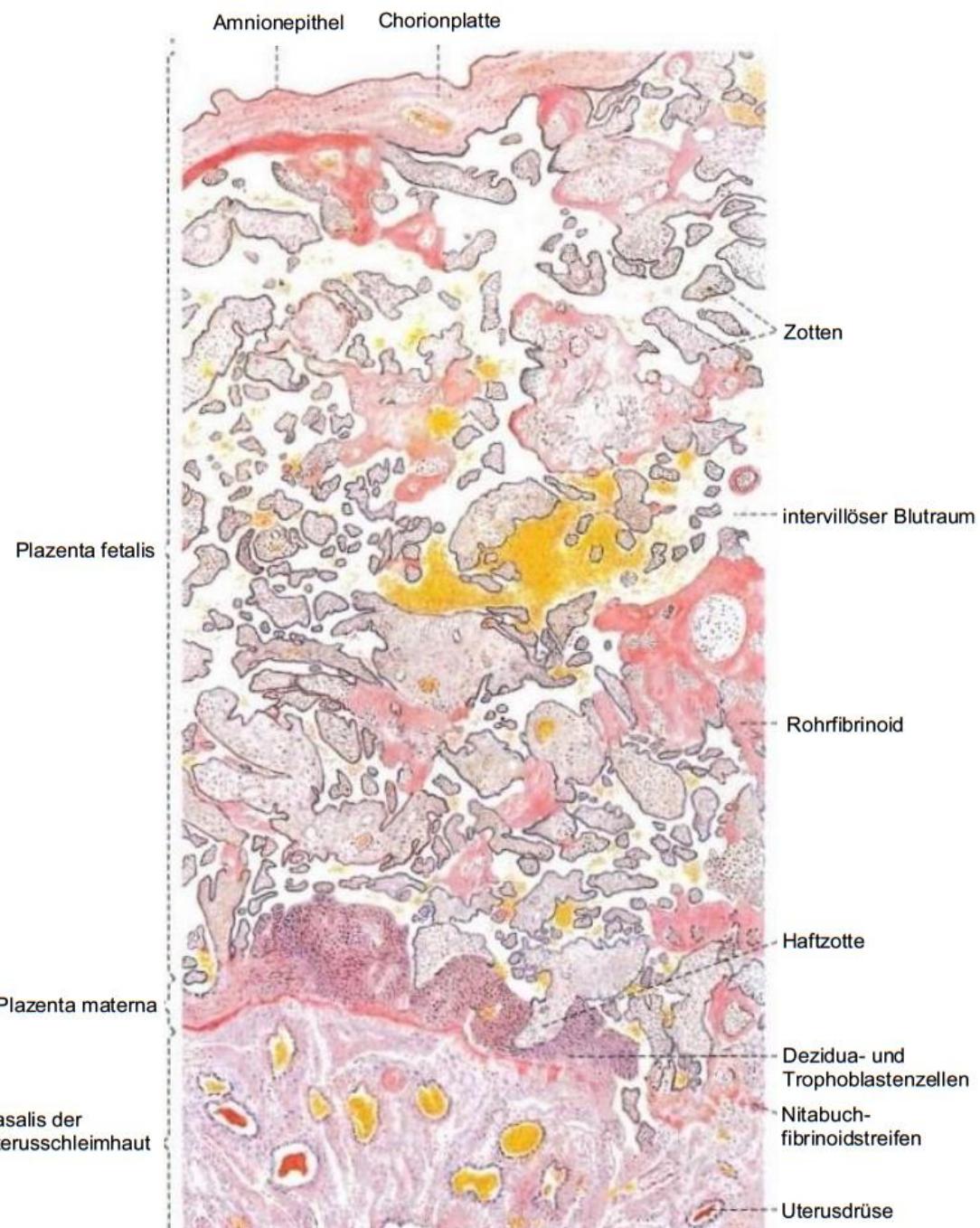
## 1.1 Aufbau und Entwicklung der humanen Plazenta

Die Plazenta dient dem Stoff- und Gas austausch zwischen mütterlichem und kindlichem Kreislauf. Darüberhinaus sezerniert sie einige Hormone, die für die kindliche Entwicklung und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft notwendigen sind, hierzu zählen unter anderem humanes Choriongonadotropin (hCG), Progesteron, Östrogen und humanes Plazentalaktogen (Vogel 1996; Welsch et al. 2014; Ulfig 2009).

Um dem steigenden Nährstoffbedarf des Kindes, trotz intrauteriner räumlicher Begrenzung, gerecht zu werden, sind verschiedene Anpassungs- und Differenzierungsvorgänge innerhalb der Plazenta nötig. Hierfür sind die Vaskularisierung und eine exzessive Angiogenese in den fetalen Zotten und der Dezidua wichtige Kennzeichen (Cross et al. 1994).

Die Entwicklung der Plazenta beginnt etwa in der zweiten Woche post konzeptionem. Die befruchtete Eizelle entwickelt sich zum Embryoblasten, aus der umgebenden Trophoblastenschicht differenzieren sich die innenliegenden Zytotrophoblasten sowie die nach außen gewandten Synzytiotrophoblasten. Letztere nisten sich in der Dezidua des Endometriums ein und beginnen dort, sich und das Gewebe lückenartig aufzulockern. Sie hemmen darüberhinaus die natürliche Abwehrreaktion des mütterlichen Organismus gegen den sich einnistenden Embryo (Ulfig 2009; Welsch et al. 2014).

Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft entwickeln sich aus der Zytotrophoblasten- und Synzytiotrophoblastenschicht die Zotten sowie der intervillöse Raum, der in der Plazenta die mütterliche gegen die fetale Seite abgrenzt. Das im intervillösen Raum liegende Zottensystem wird mütterlicherseits durch die Basalplatte und fetal durch die Chorionplatte begrenzt (Abb. 1). In der Basalplatte verlaufen mütterliche Gefäße, die zum Teil in den intervillösen Raum münden. Das von der Chorionplatte ausgehende und in den intervillösen Raum ragende Zottensystem wird von mütterlichem Blut umspült und gewährleistet so den uteroplazentaren Austausch (Welsch et al. 2014).



**Abb. 1: Schematischer Querschnitt durch die Plazenta** (modifiziert nach (Welsch et al. 2014)).

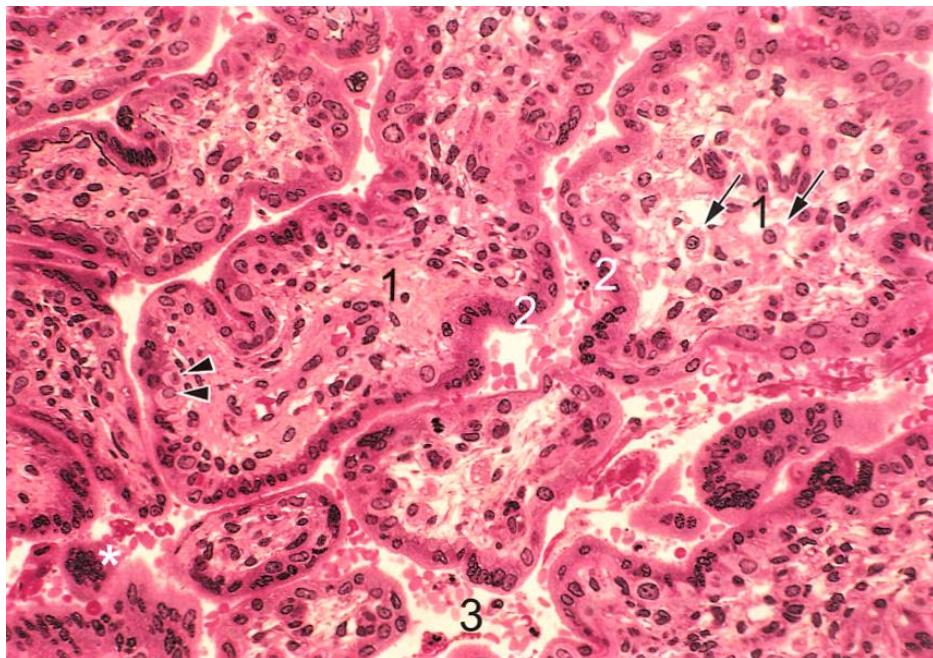
Am Geburtstermin gilt die Plazenta mit einem Durchmesser von circa 18 cm, einer Basalfläche von etwa 250 cm<sup>2</sup> und einer Dicke von 2-3 cm als ausgereift. Das durchschnittliche Endgewicht der Plazenta mit Nabelschnur und Eihäuten liegt zwischen 500 und 600 g (Vogel 1996; Welsch et al. 2014; Schmidt & Kurjak 2001).

In der ausgereiften Plazenta lassen sich verschiedene Entwicklungsstufen der Zotten, die eine Oberfläche von 10-14 m<sup>2</sup> haben, finden. Die Basis bilden die von der Chorionplatte ausgehenden Stammzotten (~ 30-50 Stück) mit fetalen Arterien und Venen. Aus diesen verzweigen sich Intermediär- und Terminalzotten. Sie beinhalten Arteriolen und Kapillaren, und dienen dem eigentlichen Stoffaustausch. Die Zottenbäume sind durch Haftzotten mit der Dezidua verbunden (Ulfig 2009; Welsch et al. 2014). Neben einer durchgehenden Syncytiotrophoblastenschicht bestehen die Zotten auch aus Zytotrophoblasten, Basallamina des Trophoblasten, aus kindlichen Kapillargefäßen (Abb. 2) sowie faserarmem Bindegewebe (Abb. 3) der Kapillarendothelien und Endothelzellen. Diese sind wesentlich für die Ausbildung der Plazentaschranke.



**Abb. 2: Histologische Darstellung (H.E.-Färbung) einer Plazentazotte im zweiten Schwangerschaftsmonat**

**(a)** Intervillöser Raum **(b)** Kindliche Zotte mit Bindegewebe; **(1)** Zytotrophoblastenschicht **(2)** Syncytiotrophoblastenschicht **(3)** Embryonales Blutgefäß (modifiziert nach (Welsch et al. 2014)).



**Abb. 3: Histologische Darstellung (HE-Färbung) eines Zottenanschnittes einer reifen Plazenta**

**(1)** Bindegewebe (Stroma) der Zotten und Fibroblasten **(2)** Syncytiotrophoblasten **(3)** intervillöser Raum; (**→**) Makrophagen (Hofbauer-Zellen) (**►**) Zytotrophoblasten (modifiziert nach (Welsch et al. 2014)).

Da in der Syncytiotrophoblastenschicht kaum Interzellulärspalten vorhanden sind, ist diese Schicht (Plazentaschranke) nicht für alle Stoffe gleich passierbar. Für verhältnismäßig kleine Substanzen wie zum Beispiel  $O_2$ ,  $CO_2$  aber auch Ethanol und ganz allgemein Substanzen mit einem Molekulargewicht von maximal 800 Dalton, stellt die Plazentaschranke kein Hindernis dar und diese Substanzen können durch die Plazenta diffundieren (Strauss 2008; Welsch et al. 2014).

Für größere Moleküle erfolgt der Transport entweder aktiv durch rezeptorvermittelte Endozytose oder durch Transzytose (Welsch et al. 2014). Auf diesen Wegen werden sowohl Infektionserreger als auch Hormone wie Progesteron, Östrogen oder humanes Choriongonadotropin und darüber hinaus Antikörper und Immunglobulin-G (IgG) zwischen Mutter und Embryo ausgetauscht. Andere Immunglobulinklassen sind zu groß, um die Plazentaschranke per Trans- oder Endozytose zu passieren (Welsch et al. 2014).

Im Verlauf der Schwangerschaft kommt es in der Plazenta zu einer extrazellulären Ablagerung von eosinophilem Fibrinoid. Dieses besteht zum Großteil aus Fibrin, Immunglobulinen und toten Trophoblasten und kann gegebenenfalls ganze Zotten ersetzen

(Welsch et al. 2014). Man unterscheidet anhand der anatomischen Lokalisation zwischen dem Langhans-Fibrinoid an der Chorionplatte, dem Rohrfibrinoid an der Oberfläche der Basalplatte und den Zotten, sowie dem Nitabuchfibrinoid in der maternofetalen Durchdringungszone zwischen Dezidua und Zytotrophoblast (Welsch et al. 2014). Das Fibrinoid dient in diesem Bereich der Defektabdeckung und entsteht zum Teil durch den Kontakt von Mesenchym mit mütterlichem Blut, also der lokalen Aktivierung der Gerinnung (Welsch et al. 2014; Ufig 2009; Kaufmann et al. 1996).

Neben der Versorgung des Embryos übernimmt die Plazenta endokrine Funktionen und produziert neben Laktogen und Wachstumshormon (GH) auch Prostaglandine, Chorionthyrotropin und Parathormon-related Protein (PTH-RP), welches den transplazentaren Calciumtransport beeinflusst (Welsch et al. 2014; Salles 2016). Die Plazenta dient hierbei als aktiver Mineraltransporter. Der Calcium-Sensing-Rezeptor (CaSR) in der Niere und Nebenschilddrüse reguliert die Parathormon- (PTH) und PTH-RP-Produktion (Salles 2016). Ein hoher fetaler Calcium- und Phosphatspiegel ist Voraussetzung für den kindlichen Knochenaufbau (Salles 2016). Bei unzureichender mütterlicher Calciumaufnahme wird Calcium aus dem mütterlichen Knochen rekrutiert, um den Mineralhaushalt des Embryos zu stabilisieren (Salles 2016).

## 1.2 Erkrankungen und Pathologien der humanen Plazenta

Im Verlauf der Schwangerschaft kann das Wachstum der Plazenta und damit auch das Wachstum des Kindes durch plazentare Wachstums- und Durchblutungsstörungen, Tumore und Infarkte der Plazenta, Zottenreifungsstörungen und Endangiopathien behindert werden (Vogel 1996).

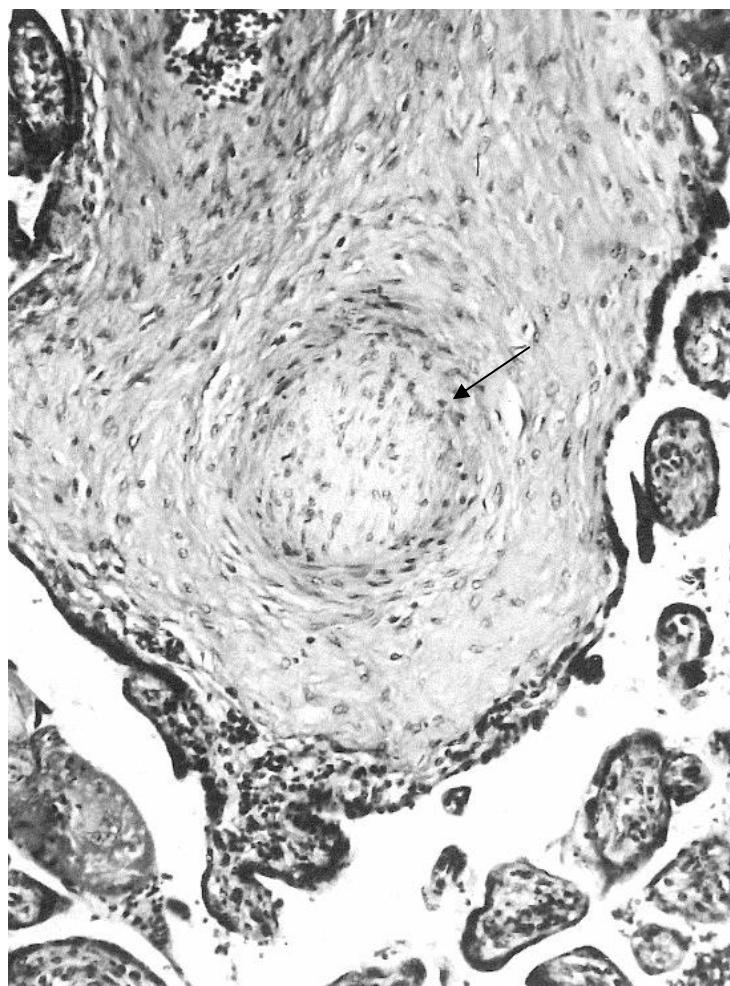
Kleine Plazenten sind meist die Folge chronischer intrauteriner Infektionen, chronischer Nierenerkrankungen, einer Schwangerschaftshypertonie oder Folge von Kollagenosen. Unabhängig von ihren Ursachen sind kleine Plazenten oftmals Auslöser für Frühgeburten (Vogel 1996).

Neben genetischen Ursachen sind unter anderem ein Gestationsdiabetes und damit verbundene Gefäßobliterationen oder großflächige Zottenreifungsstörungen Ursache für übergroße und ebenfalls in ihrer Funktion eingeschränkte Plazenten zu nennen (Vogel 1996).

Chronische plazentare Durchblutungsstörungen können Ursache für eine eingeschränkte Perfusionskapazität und damit für einen gestörten maternofetalen Stoffaustausch sein. Durchblutungsstörungen finden sich vorwiegend im materno- beziehungsweise im fetoplazentaren Bereich und sind Folge einer Störung des arteriellen

oder venösen Abflusses. Maternoplazentare Durchblutungsstörungen zeigen sich vor allem in Plazentainfarkten, Thromben oder Hämatomen. Demgegenüber zählen Zottensstromafibrosen, Zottenstromablutungen und fetale Thromben zu den fetoplazentaren Durchblutungsstörungen (Vogel 1996).

Folge einer akuten Durchblutungsstörung kann eine manifeste Plazentainsuffizienz sein. Eine eingeschränkte Perfusionskapazität sowie eine manifeste Plazentainsuffizienz können mit einer intrauterinen Asphyxie, einer intrauterinen Wachstumsretardierung und/oder einer Frühgeburtlichkeit einhergehen (Vogel 1996). Auch bei der Endangiopathia obliterans handelt es sich um eine Perfusionsstörung. Hier kommt es auf Grund bindegewebiger Veränderungen im Bereich der Chorionplatte und Stammzotten zu Zottenunreife, Zottensstromafibrose und zur Verödung von Kapillarlichtungen (Abb. 4) (Vogel 1996).



**Abb. 4: Histologische Darstellung einer Endangiopathia obliterans**

Der plombenartige, bindegewebige Verschluss eines fetalen Gefäßes ist deutlich erkennbar (modifiziert nach (Vogel 1996)).

Durchblutungsstörungen führen weiterhin zu Fibrinabscheidungen, die wiederum als histologisches Vorstadium eines Gitterinfarktes gelten (Vogel 1996). Diese Fibrinabscheidungen sind als formvariable Strombahneinheiten beschrieben und das Ausmaß dieser Ablagerungen korreliert mit der Pathologie, also zum Beispiel einer Einschränkung des intervillösen Volumens mit konsekutiv reduzierter Durchblutung des fetalen intervillösen Raumes sowie Wachstums- und Differenzierungsstörungen der Zotten mit Ausbildung einer Zottenstromafibrose (Vogel 1996).

Die Zottenstromafibrose ist durch die vermehrte Bildung und Ablagerung von Kollagen, vor allem im Bereich von Intermediär- und Terminalzotten mit Einengung und Verschluss der Zottenkapillaren und konsekutiver fetoplazentarer Durchblutungsstörung gekennzeichnet (Vogel 1996). Die Folgen einer gestörten Zottenperfusion hängen von dem Ausmaß der Perfusionstörung und der damit einhergehenden Fibrose ab (Vogel 1996). Kleinere Areale gelten als klinisch irrelevant (Vogel 1996).

Weiterhin kann es während der Schwangerschaft zu Zottenreifungsstörungen beziehungsweise zu einer gestörten Verzweigung des Zottenbaums kommen. Diese Störung betrifft quantitative und/oder zeitliche Abweichungen der Zottenentwicklung (Vogel 1996). Abhängig von der Größe des Befundes kann die Diffusionskapazität der Plazenta beeinträchtigt sein und es kommt, in Kombination mit einem Plazentaminderwuchs, zu einer Reduktion der Zottenoberfläche und damit letztendlich zur chronischen Plazentainsuffizienz. Zottenunreife und zu kleine Plazenten beeinflussen die endokrine Aktivität nicht. Daher können auch in diesen Fällen fälschlicherweise normale oder sogar überhöhte Werte für das Plazentalaktogen (hPL) im Serum der Mutter gefunden werden (Vogel 1996).

### 1.3 Eigenschaften und Funktion des Fibroblast-Growth-Factor-23

Die Einschätzung und Beobachtung des Mineral- und Knochenstoffwechsels ist, insbesondere für Patienten mit hereditären oder erworbenen metabolischen Knochenerkrankungen, aber auch im Rahmen von Wachstum und Entwicklung, von großer Relevanz (Fischer et al. 2012; Iniguez et al. 2018). Neben aktivem Vitamin D und Parathormon (PTH) spielt der überwiegend von Osteoblasten und Osteozyten sezernierte Fibroblast-Growth-Factor-23 (FGF-23) in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle und bildet mit Vitamin D und PTH einen hormonellen Regelkreis (Martin et al. 2012; Ma et al. 2014). FGF-23 ist ein aus 251 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von circa 32 kDalton (Martin et al. 2012; Haffner & Leifheit-Nestler 2017; Blau & Collins 2015). Es zählt innerhalb der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren mit FGF-19 und FGF-21 zur Unterfamilie der endokrinen Wachstumsfaktoren, die nicht in der Extrazellulärmatrix gespeichert werden, da sie keine Heparsulfat-bindende Domäne enthalten (Liu & Quarles 2007; Martin et al. 2012; Hu et al. 2013). FGF-23 wird überwiegend von Osteozyten und Osteoblasten sezerniert und findet sich in geringen Mengen auch in Skelettmuskeln, im ventrolateralen Thalamuskern, Lymphknoten, Brustdrüse, Magen und Herz (Liu & Quarles 2007; Martin et al. 2012; Haffner & Leifheit-Nestler 2017). Die durchschnittliche Plasmakonzentration von FGF-23 beträgt bei einem gesunden Erwachsenen in der Regel 30 pg/ml (Haffner & Leifheit-Nestler 2017).

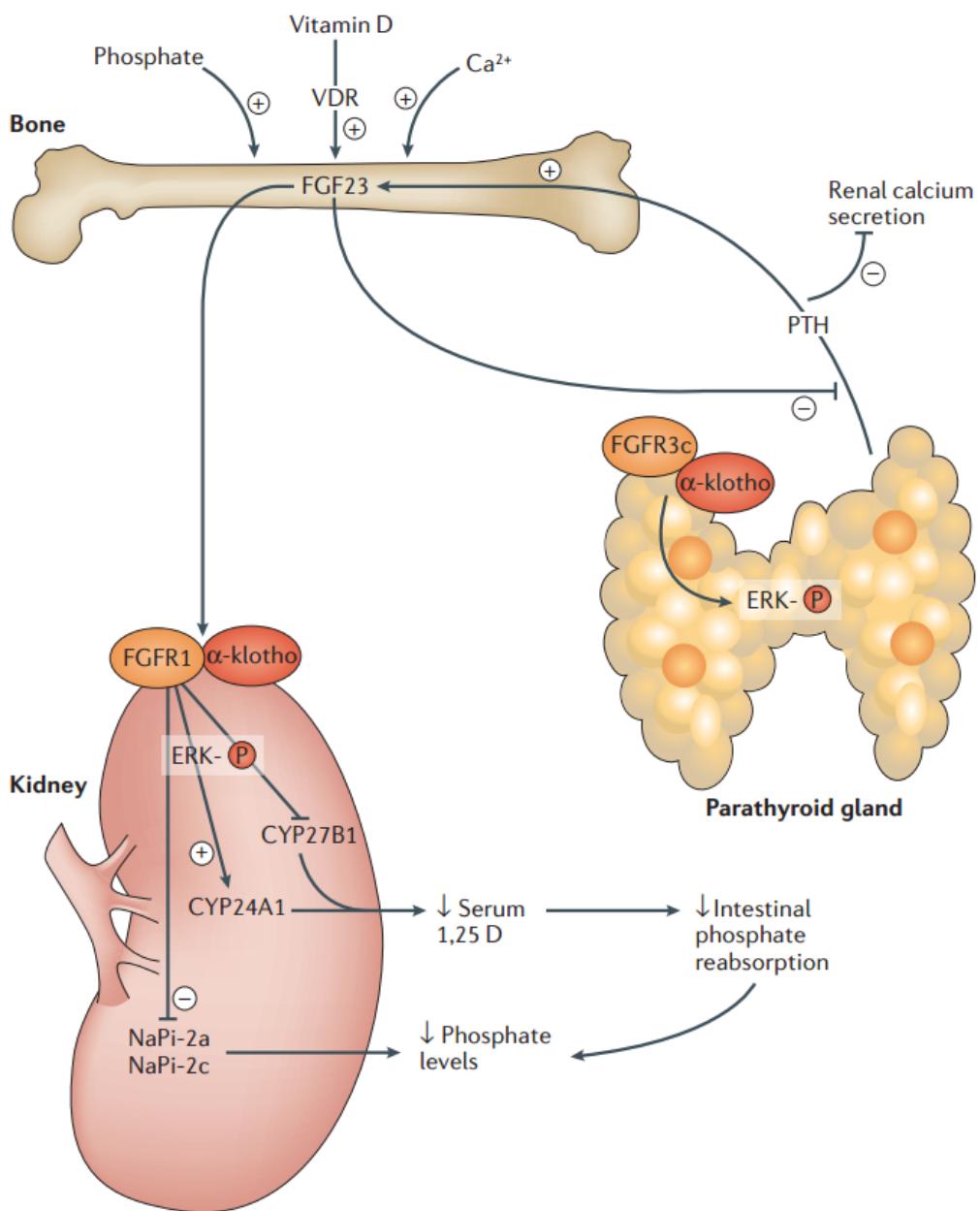
Neuere Studien zeigen darüberhinaus, dass proinflammatorische Cytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  und IL-6 nicht nur die Produktion von FGF-23 induzieren, sondern schreiben FGF-23 selbst auch eine proinflammatorische Wirkung zu (Han & Quarles 2016; Francis & David 2016; Czaya & Faul 2019). Hohe FGF-23-Spiegel stimulieren in peritonealen Makrophagen, Hepatozyten und bronchialen Epithelzellen die Produktion von IL-6, IL-1 $\beta$  und CrP (C-reaktives Protein) durch Interaktion von FGF-23 mit FGFR4 und Aktivierung des PLC- $\gamma$  (Phospholipase C)/ Calcineurin/ NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) Signalweges (Czaya & Faul 2019). Darüberhinaus wird FGF-23 ektop in Makrophagen exprimiert und erhöht die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  in Makrophagen (Haffner & Leifheit-Nestler 2017; Bacchetta et al. 2013).

FGF-23 agiert als endokrines Hormon über die Bindung seiner C-terminalen Domäne mit dem Co-Faktor  $\alpha$ -Klotho; innerhalb der N-terminalen Domäne befindet sich die FGFR-bindende Domäne (Blau & Collins 2015). Die biologische Aktivität von FGF-23 wird maßgeblich durch seine Spaltung reguliert (Haffner & Leifheit-Nestler 2017). Intaktes FGF-23 wird durch die Furin Pro-Protein-Convertase in inaktive N- und C-terminale

Fragmente gespalten, die ihrerseits den FGFR-Klotho-Komplex nicht aktivieren können und über die Niere ausgeschieden werden (Haffner & Leifheit-Nestler 2017; Kovesdy & Quarles 2013).

Wesentliches Zielorgan für die Wirkung von FGF-23 ist die Niere, dort reguliert es nach Bindung an seine Rezeptoren die renale Phosphataufnahme und die Aktivität der 1 $\alpha$ -Hydroxylase (CytochromP450 27B1) (Liu & Quarles 2007). Durch Hemmung der Natrium-abhängigen Phosphat-Cotransporter (NaPi-2a, NaPi-2c) unterdrückt FGF-23 die renale Phosphatresorption im proximalen Tubulus (Hu et al. 2013) (Abb. 5). Darüberhinaus wird der Vitamin D-Spiegel durch Inhibition der 1 $\alpha$ -Hydroxylase (CytochromP450 27B1) beziehungsweise durch Hemmung der für den Abbau von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> notwendigen 24 $\alpha$ -Hydroxylase (CytochromP450 24A1) reguliert (Kovesdy & Quarles 2013; Hu et al. 2013). Zusätzlich blockiert FGF-23 den intestinalen Natrium-abhängigen Phosphattransporter (NaPi2b) (Ma et al. 2014). Im Gegenzug stimulieren erhöhte Serumphosphatspiegel und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Konzentrationen die Transkription von FGF-23 durch Aktivierung des Vitamin D Responsive Elements (VDRE) in der Promoterregion von FGF-23 (Liu & Quarles 2007; Ma et al. 2014; Degirolamo et al. 2016). Auch PTH und supraphysiologische Phosphatspiegel stimulieren die Synthese und Freisetzung von FGF-23 (Degirolamo et al. 2016). Im Gegenzug hemmt FGF-23 in der Nebenschilddrüse die PTH-Freisetzung über die mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) (Bergwitz & Jüppner 2010; Martin et al. 2012; Degirolamo et al. 2016).

Die Aktivitäten von FGF-23, PTH und Vitamin D<sub>3</sub> sind eng miteinander verknüpft und regulieren sich im Sinne eines Feedback-Mechanismus (Abb. 5) (Martin et al. 2012; Kovesdy & Quarles 2013; Ma et al. 2014). Neben seiner proinflammatorischen Wirkung kann FGF-23 auch hämodynamisch wirksam werden. Erhöhte FGF-23 Werte führen bei Mäusen unabhängig von der Expression von Klotho, zu arterieller Hypertonie und Linksventrikulärer Hypertrophie (LVH) (Han & Quarles 2016; David et al. 2017; Czaya & Faul 2019). FGF-23 ist daher als eigenständiges Hormon mit komplexem Wirkungsprofil anzusehen (Bergwitz & Jüppner 2010; Bhattacharyya et al. 2012; David et al. 2017).



**Abb. 5: FGF-23: Knochen-Nieren-Nebenschilddrüsen-Achse und hormoneller Regelkreis** (Degirolamo et al. 2016)

FGF-23 wird nach Stimulation von aktivem Vitamin-D, Phosphat,  $\text{Ca}^{2+}$  und PTH aus dem Knochen freigesetzt, bindet an den FGF-Rezeptor-Klotho-Komplex (FGFR1 in der Niere; FGFR3c in der Nebenschilddrüse) und reguliert den Phosphat- und Vitamin D-Stoffwechsel. In der Nebenschilddrüse hemmt FGF-23 die Freisetzung von PTH. CYP24A1 (24 $\alpha$ -Hydroxylase); CYP27B1 (1 $\alpha$ -Hydroxylase); ERK (Extrazelluläre signal-regulierte Kinase); NaPi-2a (Natriumabhängiger-Phosphat-Co-transporter 2A); NaPi-2c (Natriumabhängiger-Phosphat-Co-transporter 2A).

## 1.4 Struktur und Funktion des Co-Faktors Klotho.

$\alpha$ -Klotho (auch Klotho genannt) wurde zunächst bei Mäusen als Anti-Aging Protein entdeckt, da es mit einer längeren Lebenserwartung assoziiert ist (Fan et al. 2016). Im menschlichen Körper kommt  $\alpha$ -Klotho als Transmembranprotein und, nach Abspaltung der extrazellulären Domäne, als gelöstes Protein vor (Fan et al. 2016; Ohata et al. 2011; Haffner & Leifheit-Nestler 2017; Han & Quarles 2016). In der Niere, der Nebenschilddrüse und dem Plexus Choroideus wird es als Single-Pass-Transmembranprotein exprimiert (Fan et al. 2016; Ohata et al. 2011; Imura et al. 2007). Unter pathologischen Voraussetzungen kann  $\alpha$ -Klotho aber auch in anderen Geweben exprimiert werden (Han & Quarles 2016).

$\alpha$ -Klotho dient als Kofaktor zur Bindung von FGF-23 an einen der vier kanonischen FGF-Rezeptoren und bildet mit diesen einen heterodimeren Komplex (Liu & Quarles 2007; Martin et al. 2012; Hu et al. 2013).

In der Nebenschilddrüse bindet Klotho an die Na/K-ATPase und reguliert die PTH-Sekretion. Durch Aktivierung des apikalen  $\text{Ca}^{2+}$ Transporters im distalen Tubulus (TRPV5) der Niere ist es darüberhinaus an der Regulation des Calciumhaushalts beteiligt (Ohata et al. 2011). Alternatives Splicen und proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne führen zu einer löslichen Form von Klotho (Ohata et al. 2011; Miranda et al. 2014; Martin et al. 2012; Iniguez et al. 2018). Diese lösliche Form wirkt humoral und ist sowohl im Extrazellularraum als auch im Urin, im Liquor und im Blut nachweisbar (Ohata et al. 2011; Miranda et al. 2014; Martin et al. 2012; Iniguez et al. 2018). Allerdings sind die Mechanismen zum Großteil noch nicht genau bekannt (Ohata et al. 2011; Miranda et al. 2014; Martin et al. 2012).

Als zirkulierendes Hormon beeinflusst Klotho die Synthese von antioxidativen Enzymen und die Produktion von Stickoxid (Fan et al. 2016; Miranda et al. 2014). Es schützt vor endothelialen Dysfunktionen, und spielt sowohl im Energiestoffwechsel als auch in der Angiogenese eine Rolle (Fan et al. 2016; Miranda et al. 2014).

Während der Schwangerschaft konnte  $\alpha$ -Klotho sowohl in der Plazenta als auch im Nabelschnurblut nachgewiesen werden (Ohata et al. 2011). Es zeigten sich dabei im Blut von schwangeren Frauen deutlich höhere Werte für lösliches Klotho als im Blut von Nicht-Schwangeren (Loichinger et al. 2016). Untersuchungen an einer kleinen Gruppe von japanischen Schwangeren deuten darauf hin, dass Klotho in Synzytiotrophoblasten gebildet wird (Ohata et al. 2011).

## **2 Ziel der Arbeit**

Die Nährstoffversorgung und der Mineralstoffwechsel sind für die Entwicklung des Feten wichtig. Phosphat und Calcium sind essentielle Baustoffe für die fetale Knochenentwicklung und Störungen im fetalen Mineralhaushalt können die kindliche Entwicklung beeinflussen. Erste Untersuchungen an einer kleinen Zahl von Plazenten wiesen darauf hin, dass Klotho, sowie möglicherweise auch FGF-23, in der humanen Plazenta nachweisbar sind und potentiell Einfluss auf den Mineralstoffwechsel nehmen können (Takaiwa et al. 2010; Ohata et al. 2011).

Im Rahmen der Arbeit soll untersucht werden:

Ob sich die präliminären Befunde der japanischen Arbeitsgruppen auch in einer größeren Stichprobe bestätigen

Ob FGF-23 und Klotho an vergleichbaren Strukturen nachweisbar sind.

Ob ein Zusammenhang zwischen den immunhistochemischen Befunden und den anthropometrischen Daten beziehungsweise Schwangerschaftsspezifischen Kenngrößen besteht.

Ob FGF-23 und/oder Klotho, sowie die Rezeptoren FGFR 1-4 in der humanen Plazenta gebildet werden.

### **3 Material und Methoden**

Im Rahmen der Studie „Expression des Fibroblast-Growth-Factor-23 (FGF-23) und seiner Rezeptoren (FGF-R, Klotho) in der Plazenta, sowie die Bestimmung der systemischen Konzentrationen von FGF-23 und Klotho bei Mutter und Kind zum Zeitpunkt der Geburt und beim Kind während des ersten Lebensjahres“ (Geschäftszeichen der Ethikkommission: A2013-0079) wurden verschiedene Proben (Nabelschnurblut, postpartal kindliches und mütterliches Blut, Plazentaschnitte) und Daten asserviert. Die werdenden Mütter wurden frühzeitig vor der Geburt sowohl mündlich als auch schriftlich über den Umfang der Studie informiert und zur Teilnahme eingeladen. Alle Probandinnen haben der Teilnahme an der Studie schriftlich zugestimmt und erhielten als Aufwandsentschädigung Gutscheine der Firma „Babyland“ im Gegenwert von 15,- Euro. Gegenstand dieser Arbeit sind Untersuchungen an der Plazenta.

#### **3.1 Studienablauf**

Die Akquirierung der Probandinnen erfolgte im Rahmen des geburtsvorbereitenden Gesprächs sowie während der Informationsabende für werdende Eltern am Südstadtklinikum Rostock. Die Schwangeren konnten an der Studie teilnehmen, sofern bei der Geburt des Kindes die folgenden Kriterien erfüllt waren:

Einschlusskriterien:

- Geburtsgewicht von mindestens 1500g
- Geburt nach der vollendeten 35. Schwangerschaftswoche (SSW) und vor der 42. SSW.

Ausschlusskriterien:

- Frühgeborene vor der 35.SSW
- Chronische konsumierende Erkrankungen (z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen) mit entsprechender pharmakologischer Therapie während der Schwangerschaft
- Akute Infektionen der Mutter
- Leber- oder Herzinsuffizienz der Mutter
- eingeschränkte Einsichtsfähigkeit der Eltern
- fehlende Einwilligung in die Studienteilnahme

Die Plazenten wurden unmittelbar nach Geburt für die makroskopische Beurteilung sowie zur Probenentnahme in die Abteilung für Pathologie des Südstadtklinikums Rostock gebracht. Nach makroskopischer Befundung des Plazentagewebes durch den Pathologen Dr. med. H.J. Kreutzer wurden zwei repräsentative Proben an unterschiedlichen Stellen (Entnahmestelle 1 und 2) entnommen. Diese wurden für die weitere Analyse in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Anamnese wurde postpartal erhoben, wenn Mutter und Kind sich von der Geburt erholt hatten.

### **3.2 Laborgeräte und Programme**

Für die morphologischen Begutachtungen der Plazenten wurden Dünnschnitte (circa 4 µm) mit einem Rotationsmikrotom (Leica, Wetzlar Deutschland) angefertigt und auf Objekträger (Superfrost Plus®) aufgezogen. Die gefärbten Präparate wurden an einem Mikroskop (Typ DMI4000, Leica), das mit zwei Digitalkameras (Farbkamera: DFC320R2 / Schwarz-/Weißkamera: DFC350 Fx) und entsprechender Software für Dokumentation und Auswertung (Leica Applikation Suite V.3.6.0.) ausgerüstet war, beurteilt.

### **3.3 Reagenzien für immunhistochemische Untersuchungen**

#### **3.3.1 Chemikalien und Antikörper**

Dako (Glostrup, Dänemark)

Dako Pen (Fettstift), Code:S2002

Menzel GmbH& Co.( Braunschweig)

Deckgläser

Superfrost Objekträger Plus

Merck KGaA (Darmstadt):

Aquatex (Eindeckmittel)

Citronensäure, Tri-Natriumcitrat

Di-aminobenzidin-tetra-hydrochlorid (DAB) als Tablette (10mg/Tbl.)

Eosin-G

Ethanol

Mayers Hämalaun (gebrauchsfertige Lösung)

Wasserstoffperoxid 30%

Xylol

Qiagen (Hilden)

RNeasy FFPE Kit (#73504)

Quantitect Reverse Transkription Kit (#205311)

SYBR Green PCR Kit (#204054)

Roth (Karlsruhe)

10-fach konzentrierte Phosphat- gepufferte Kochsalzlösung (10xPBS); Roti®-Stock

Santa Cruz Biotech (Heidelberg)

Ziegen-Anti-human-FGF-23 Antiserum (sc-27249)

Ziegen-Anti-human-Klotho Antiserum (sc-22220)

Vector Laboratories (Vertrieb über Biozol, Eching)

Biotinmarkierter Kaninchen-Anti-Ziegen Antikörper (BA-5000)

Vectastain Elite ABC-Kit (PK-6200,Universal)

Alle übrigen Chemikalien stammten, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt) oder Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) und hatten mindestens p.a. Qualität.

### 3.3.2 Puffer- und Waschlösungen

Citratpuffer

0,1M Citronensäure und 0,1M Tri-Natriumcitrat gegeneinander bis pH 6,0 titriert

DAB-Lösung für die Färbung mit Peroxidase-konjugierten Antikörpern:

10mg DAB in 10ml Aqua dest. lösen, unmittelbar vor Gebrauch Zugabe von

5µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)

Alle Lösungen wurden mit zweifach deionisiertem Wasser angesetzt (Wasseraufbereitung mit Ionenaustauscher Typ Destillo 20).

### **3.4 Histologische Färbungen**

Die Präparate wurden zunächst mit Xylol entparaffiniert (2x 15 min.), in einer absteigenden Alkoholreihe (100%; 96%; 80%; 70% jeweils 2 min.) in wässriges Milieu überführt und mit Aqua dest. gespült. Anschließend erfolgte entweder eine histologische oder eine immunhistochemische Färbung.

#### **3.4.1 Hämalaun-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) wurde sowohl als Übersichtsfärbung als auch zur Gegenfärbung eingesetzt.

##### **Protokoll:**

1. Mayers Hämalaun 6 min.
2. Unter fließendem lauwarmen Leitungswasser bläuen 10 min.
3. Eosin G-Lösung 0,1% 3 min.
4. Spülen mit Aqua dest.
5. Aufsteigende Alkoholreihe (70%; 80%; 90%; 96%, je kurz eintauchen)
6. Trocknen der Präparate zwischen Filterpapier
7. Klären mit Xylol (vor dem Eindecken mit xylolhaltigem Eindeckmittel) 5 min.
8. Eindecken mit Entellan

#### **3.4.2 Nachweis von FGF-23 und Klotho mit der Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode)**

Zur immunhistochemischen Färbung wurde die ABC-Methode (indirekte Färbung) verwendet. Zu jeder Färbereihe wurden geeignete Positiv- und Negativ-Kontrollen mitgeführt. Präparate von verkalkten Gefäßen, die in einer früheren Studie als FGF-23 beziehungsweise Klotho positiv identifiziert worden waren, wurden als Positiv-Kontrolle verwendet (Voigt et al. 2010). Präparate, die lediglich mit dem Detektionsantikörper und dem ABC Reagenz behandelt wurden, dienten als Negativ-Kontrolle.

**Protokoll:**

- |  |     |            |
|--|-----|------------|
| 1. Entparaffinieren mit Xylol  | 2 x | 15 min     |
| 2. Absteigende Alkoholreihe  |     |            |
| 100%   | 2 x | 5 min.     |
| 96%  | 2 x | 5 min.     |
| 80%  | 1 x | 5 min.     |
| 70%  | 1 x | 5 min.     |
| 3. Spülen mit Aqua dest.   | 1 x | 5 min.     |
| 4. Hemmung der endogenen Peroxidase in 3%igem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :                              |     | 20 min.    |
| 5. Spülen in Aqua dest.  |     | 5 min.     |
| 6. Antigendemaskierung mit Citratpuffer  | 3 x | 8 min.     |
| Erhitzung in der Mikrowelle mit 450 W und je 5 min. Pause zum Abkühlen                                     |     |            |
| 7. Abkühlen  |     | 10 min.    |
| 8. Spülen mit PBS  |     | 5 min.     |
| 9. Umranden der Präparate mit einem Fettstift  |     |            |
| 10. Blockieren unspezifischer Reaktionen :   |     | 40 min.    |
| Für 10 Präparate 5ml PBS, 1 Tropfen Blockierserum (Vectastain Kit), Blockierserum ablaufen lassen          |     |            |
| 11. Inkubation mit Primärantikörper, Verdünnung: 1:200 in Blockierserum bei 4°C in feuchter Kammer         |     | über Nacht |
| 12. Spülen mit PBS   | 2 x | 5 min.     |
| 13. Inkubation mit Biotin-konjugiertem Zweitantikörper 1:1000 in verdünntem Blockierserum (Vectastain Kit) |     | 45 min.    |
| 14. Spülen mit PBS   | 2 x | 5 min.     |
| 15. Inkubation mit enzymkonjugiertem Avidin/Biotin-Komplex   |     | 30 min.    |
| 16. Spülen in PBS  | 2 x | 5 min.     |
| 17. Inkubation mit DAB   |     | 3 min.     |
| 18. Spülen in PBS  |     | 5 min.     |

- |  |         |
|--|---------|
| 19. Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer | 45 sek. |
| 20. Bläuen und spülen mit Leitungswasser | 10 min. |
| 21. Eindecken mit Aquatex                |         |

### **3.5 Semiquantitative Auswertung am Lichtmikroskop**

Alle Präparate wurden am Lichtmikroskop mit 100- und 200-facher Vergrößerung durchgemustert und anhand der Anzahl der angefärbten Areale kategorisiert. Es konnten folgende Färbestufen erfasst werden

- 1-fach positiv: 1-6 Areale
- 2-fach positiv: 7-12 Areale
- 3-fach positiv: >12 Areale

Eindeutig gefärbte Areale wurden als ROI („Regions of interest“) identifiziert. Da sich die Präparate bezüglich der Zahl der gefärbten Areale unterschieden, wurden diese nach Färbestufen graduiert und im Folgenden als Färbeintensitäten definiert. Die Durchmusterung und Auswertung der FGF-23 und Klotho gefärbten Präparate erfolgte bei identischer Vergrößerung (100- und 200-fach). Diese FGF-23 positiven ROI wurden in den mit Klotho-Antikörpern gefärbten Präparaten aufgesucht, verglichen und fotografiert. Es erfolgte außerdem eine Einschätzung zur Lokalisation der FGF-23- und Klotho-positiven Areale in den Plazentaschnitten.

### **3.6 Isolierung von mRNA aus humaner Plazenta, Synthese der cDNA und nachfolgender rtPCR**

Aus dem in Paraffin eingebetteten Plazentagewebe wurde mit Hilfe des RNeasy FFPE-Kit (Qiagen, Hilden) RNA isoliert, von anhaftender genomischer DNA (gDNA) gereinigt und in cDNA umgeschrieben. Die Entparaffinierung erfolgte mit einer von Qiagen entwickelten und für den Einsatz mit dem oben genannten Kit optimierten Lösung. Die Präparate (jeweils 2 Schnitte á 10 µm Dicke) wurden mit 160 µl Deparaffinierungslösung (oder 240 µl bei mehr als 2 Schnitten) sowie dem Lysis-Puffer (150 µl) und Proteinase K (10 µl) versetzt und über jeweils 15 min. zunächst bei 56°C und anschließend bei 80°C in einem Heizblöckchen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation auf Eis (3 min.) beendet, der Überstand mit den gelösten Nukleinsäuren vorsichtig abgehoben und in ein sauberes Röhrchen überführt. Zur weiteren Reinigung wurde die Lösung mit DNase I (15 min., RT) inkubiert und nach Zusatz von Ethanol (700 µl) und Puffer (320 µl) auf die RNeasy MiniElute Spin Column zur spezifischen Anreicherung der RNA aufgetragen. Die Säulchen wurden einmal mit RPE-Puffer (500 µl pro Ansatz)

gewaschen und gebundene RNA mit RNase-freiem Wasser (20 µl) eluiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch (Nano Drop 1000, Peqlab, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 260nm ermittelt. Für die nachfolgende Synthese der cDNA wurde etwa 1 µg RNA (12 µl) eingesetzt und auch diese Reaktion erfolgte mit vorkonfektionierten Reagenzien (QuantiTect Reverse Transcription kit, Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers und mit einem Gemisch zufälliger Nonamere als Primer für die cDNA Synthese. Die nachfolgende PCR wurde in 96-well Platten als Dreifach-Bestimmung pro Amplicon angesetzt und an einem StepOne Plus Realtime PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. An die initiale Denaturierung (95°C, 5min) schlossen sich 45 Zyklen aus Denaturierung (95°C, 10 sek.) und Annealing/Extension (60°C, 30 sek.) an. Auf jeder Platte wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Schmelzkurvenanalyse quantifiziert und auf die GAPDH (Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase) Konzentration normiert. Die rt-PCR und die Auswertung erfolgte in enger Kooperation mit Dr. B. Schneider (Molekularpathologisches Labor, Institut für Pathologie der UMR).

Es wurden die folgenden Primerpaare

Hs\_GAPDH\_2\_SG (Positivkontrolle),  
Hs\_FGF23\_1\_SG,  
Hs\_KL\_1\_SG,  
Hs\_FGFR1\_1\_SG,  
Hs\_FGFR2\_1\_SG,  
Hs\_FGFR3\_1\_SG,  
Hs\_FGFR4\_1\_SG

der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet, die zur Bildung von Sybergreen (SG) markierten Amplicons führten.

Hs_GAPDH_2_SG	(Katalognummer: QT01192646)
Entrez Gene Id:	2597
Ensembl Transcript ID:	ENST00000229239
Amplifizierte Exone:	1/2/3
Amplicon Länge (bp):	119, 211

Hs_FGF23_1_SG	(Katalognummer: QT00047614)
Entrez Gene Id:	8074
Ensembl Transcript ID:	ENST00000237837
Amplifizierte Exone:	2/3
Amplicon Länge (bp):	75
Hs_KL_1_SG	(Katalognummer: QT00246232)
Entrez Gene Id:	9365
Amplicon Länge (bp):	143
Hs_FGFR1_1_SG	(Katalognummer: QT00102837)
Entrez Gene Id:	2260
Ensembl Transcript ID:	ENST00000356207
Amplifizierte Exone:	9/10
Amplicon Länge (bp):	72
Hs_FGFR2_1_SG	(Katalognummer: QT00098560)
Entrez Gene Id:	2263
Ensembl Transcript ID:	ENST00000357555
Amplifizierte Exone:	2/3
Amplicon Länge (bp):	110
Hs_FGFR3_1_SG	(Katalognummer: QT01000685)
Entrez Gene Id:	2261
Ensembl Transcript ID:	ENST00000260795
Amplifizierte Exone:	6/7
Amplicon Länge (bp):	145
Hs_FGFR4_1_SG	(Katalognummer: QT00027636)
Entrez Gene Id:	2264
Ensembl Transcript ID:	ENST00000292408
Amplifizierte Exone:	1/2
Amplicon Länge (bp):	109, 153, 94

### **3.7 Statistische Auswertung**

Für die Berechnung der kindlichen Z-Scores wurde das Onlineprogramm ([www.pedz.de/de/neo.html](http://www.pedz.de/de/neo.html)) mit dem Datensatz nach Fenton herangezogen (Fenton & Kim 2013). Die statistische Berechnung und Auswertung wurde mit dem Softwarepaket SPSS Version 22.0 durchgeführt. Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewendet. Bei zum Großteil nicht normal verteilten Daten sind grundsätzlich Median und Bereich angegeben.

Um Assoziationen zwischen verschiedenen Variablen zu beurteilen, wurde der Spearman-Rho und Kendall-Tau b-Test herangezogen. Die Probanden wurden gegebenenfalls anhand geeigneter Merkmale kategorisiert. Vergleiche zwischen den so gebildeten Untergruppen erfolgten mit dem Mann-Whitney-U-Test (metrische Größen) beziehungsweise dem Chi-Quadrat-Test (Häufigkeiten). Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung des Patientenkollektives

Im Zeitraum von Oktober 2013 bis Februar 2015 nahmen 80 Schwangere an der Studie teil und stellten ihre Plazenta zu Verfügung. Material von 8 Probandinnen wurde auf Grund fehlender Angaben von der Analyse ausgeschlossen. Die Auswertung bezieht sich dementsprechend auf 72 Schwangere, die nach Geburt von 82 Babys (62 Einlinge und 10 Zwillinge, davon 33 männlich/ 49 weiblich), ihre Plazenta zu Verfügung stellten. Von allen Präparaten konnten die Färbungen der ES-1 (Entnahmestelle 1) ausgewertet werden, die Beurteilung der ES-2 (Entnahmestelle 2) war lediglich bei 2 Präparaten nicht möglich. Die anthropometrischen Daten sowie die Charakteristika der Kinder sind in Tab. I, jene der Studienteilnehmerinnen in Tab. II zusammengefasst.

**Tab. I. : Anthropometrische Daten der Kinder zum Zeitpunkt der Geburt**

<b>Vollendete SSW</b>	38	(35 - 41)
<b>Gewicht</b>		
absolut [g]	3.210	(1.870 - 4.500)
Z-Score	0,19	(-1,83 - 3,41)
<b>Körperlänge (KL)</b>		
absolut [cm]	49	(43 - 54)
Z-Score KL	0,17	(-1,49 - 2,95)
<b>Kopfumfang (KU)</b>		
absolut [cm]	34	(30 - 38)
Z-Score KU	0,23	(-2,36 - 2,63)

**Tab. II. : Anthropometrische Daten beider Elternteile zum Zeitpunkt der Geburt**

**Mutter**

Alter bei Geburt [Jahre]	31	(21 - 39)
KG [kg] vor der Schwangerschaft	67	(45 - 104)
KG [kg] bei Ende der Schwangerschaft	83	(59 - 123)
Körperlänge [cm]	170	(147 - 183)
Anzahl aller Schwangerschaften	1	(1 - 6)

**Vater**

Körpergewicht [kg]	85,5	(62 - 182)
Körperlänge [cm]	181	(95 - 202)

Sowohl pathologische Veränderungen der Plazenta als auch Risikofaktoren und spezielle Medikamente kamen in den unterschiedlichsten Kombinationen vor. So wiesen 39 von 72 Patientinnen chronische nicht-konsumierende Erkrankungen auf. 21 von 39 Patientinnen litten unter Allergien, weitere 11 Patientinnen gaben Allergien in Kombination mit einer weiteren Erkrankung an. Hierzu zählten Hypothyreose, Neurodermitis, Asthma, Herzrhythmusstörungen und Hypertonie.

69 der 72 Probandinnen nahmen während der Schwangerschaft unterstützend Nahrungsergänzungsmittel wie Eisen, Folsäure und/ oder Magnesium ein. 29 Probandinnen nahmen während der Schwangerschaft spezielle Medikamente wie L-Thyroxin, Antibiotika (nicht näher spezifizierte) aufgrund transienter Infekte, Antikoagulation (Niedermolekulares Heparin und/oder Acetylsalicylsäure), Progesteron und Glukokortikoide ein. Weitere mütterliche Eigenschaften und Geburtsspezifika sind in Tab.III zusammengefasst.

**Tab. III. : Mütterliche Eigenschaften und Geburtsspezifika (n=80)**

<b>verwendete Proben</b>	ES-1:82/ ES-2:80
<b>Zwillinge</b>	21*
<b>Sterilitätsbehandlung</b>	18
<b>Geburtsmodus</b>	
spontan	52
vaginaloperativ	4
Sectio	26
<b>Geburtswoche</b>	
35 – 37 SSW	20
37 – 40 SSW	50
40 – 41 SSW	12
<b>BMI der Mutter</b>	23,18 (17,69 - 36,73)
Untergewicht $\leq 18,49$	3
Normalgewicht 18,5 - 24,9	48
Übergewicht $\geq 25$	29

\*10 Paare und 1 einzelner Zwilling

## **4.2 Histomorphologische Charakterisierung und immunhistochemische Analyse der humanen Plazenta**

### **4.2.1 Morphologische Charakterisierung der humanen Plazenta**

Bei der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung fanden sich in 16 von 82 Fällen globale und in 18 von 82 Fällen lokale Pathologien.

Makroskopisch zeigten sich bei Inspektion von Plazenta, Nabelschnur und Eihäuten in 11 von 16 Präparaten chronische Durchblutungsstörungen. Von diesen Plazenten zeigten 3 eine Endangiopathia obliterans und in 4 Fällen konnten Infarkte nachgewiesen werden. 6 der 16 Plazenten überschritten die 90. Perzentile und die Organe wurden als über groß klassifiziert. In Tabelle IV sind sowohl die globalen, als auch die lokalen Pathologien wie Mikroverkalkungen (4 von 18), Zottendegeneration sowie Zottenreifungsstörungen (10 von 18) und Fibrindepots (17 von 18) zusammengefasst.

Lokale und globale Pathologien fanden sich unabhängig an den einzelnen Plazenten. Sie traten zum Teil gleichzeitig an einer Plazenta auf, zum Teil waren sie nur singulär zu finden.

**Tab. IV : Häufigkeiten globaler und lokaler Pathologien der Plazenta**

**Globale Plazentopathologien (n=16)**

chron. Durchblutungstörung	
isoliert	n=6
mit Infarkten	n=2
Endangiopathien	
mit Durchblutungsstörung und Infarkten	n=1
mit Durchblutungsstörungen und	n=2
Infarkte und übergroßer Plazenta	
fibrinoide Zottendegeneration	n=1
übergroße Plazenta	n=4

**Lokale Plazentopathologien (n=18)**

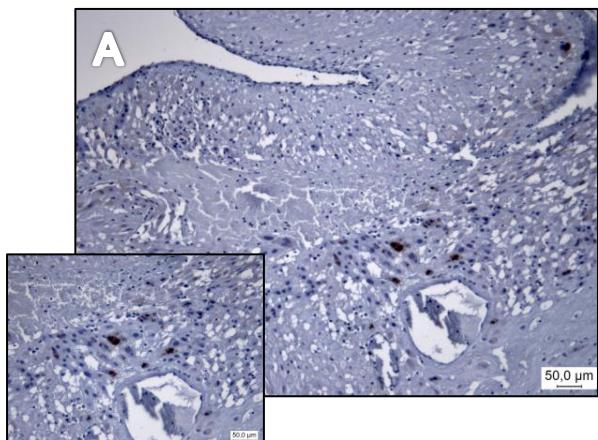
Mikroverkalkungen	
isoliert	n=1
mit Zottendegeneration und Fibrinabscheidung	n=3
fibrinoide Zottendegeneration und teilweise Fibrinabscheidung	n=7
Fibrinabscheidungen/-depots	n=7

#### **4.2.2 Immunhistochemische Darstellung von FGF-23 und Klotho**

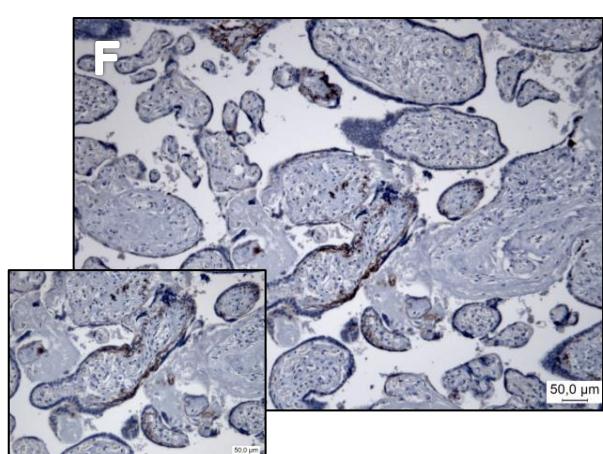
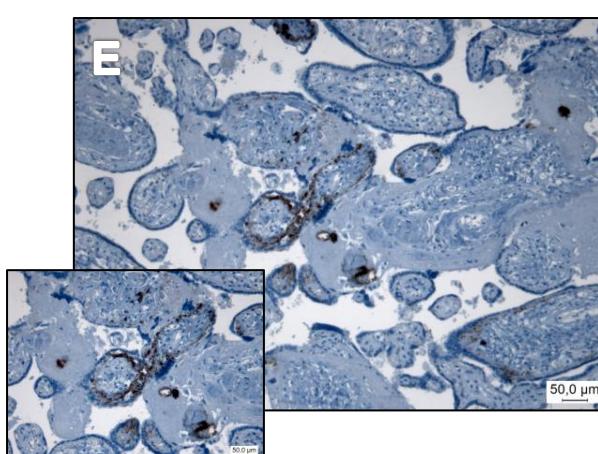
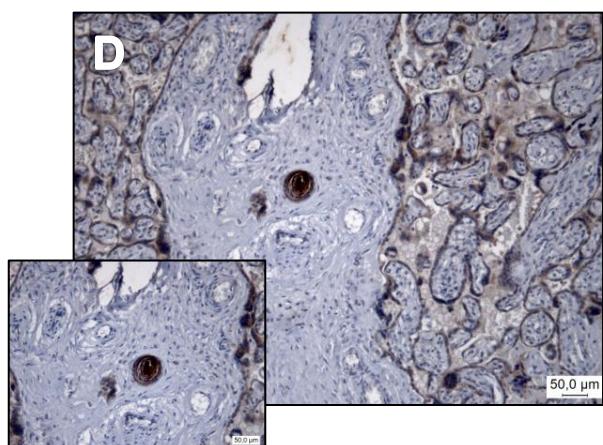
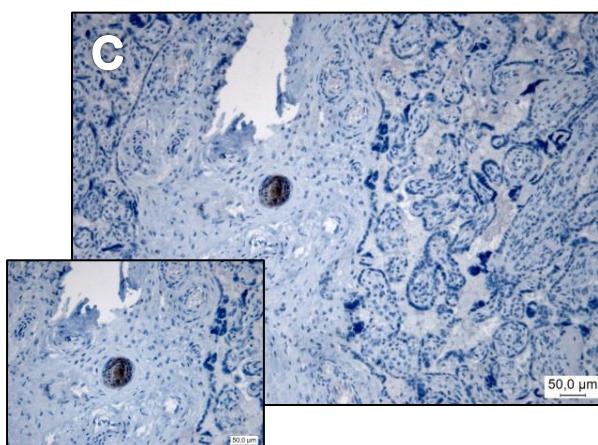
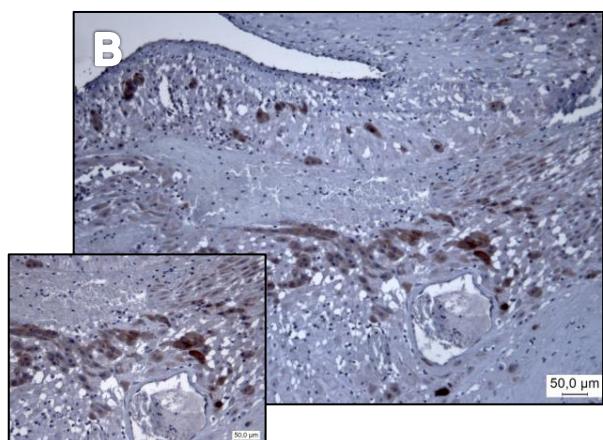
Für die immunhistochemische Lokalisation von FGF-23 und Klotho standen 82 Plazentapräparate der Entnahmestelle 1 (ES-1) und 80 Präparate der ES-2 zu Verfügung.

FGF-23 sowie Klotho ließen sich im Synzytiotrophoblasten, im Rohrfibrinoid, in obliterierten Gefäßen und an der Basalplatte nachweisen (Abb. 6). Anfärbungen der Basal- oder Chorionplatte wurden nur sporadisch beobachtet, dagegen färbten sich verkalkte Bereiche oder mit Fibrinoid gefüllte Gefäßanschnitte deutlich intensiver.

## FGF-23



## Klotho



**Abb. 6 : Immunhistochemische Lokalisation von FGF-23 (A, C, E) und Klotho (B, D, F) in der humanen Plazenta.**

Die positiven Areale sind in der Basalplatte (**A/B**), in einem lamellenartig obliterierten Gefäßanschnitt (**C/D**) und im Syncytiotrophoblasten eines Zottenanschnittes (**E/F**) lokalisiert. Vergrößerung: 100x und 200x (Ausschnittvergrößerung).

#### 4.2.3 Semiquantitative Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen

Die Präparate wurden hinsichtlich der Zahl positiver Areale kategorisiert (Tab.V). Die Unterschiede der einzelnen Anfärbeintensitäten sind in Abb. 7 exemplarisch dargestellt.

**Tab. V. : Kategorisierung der Präparate anhand der Färbeintensität**

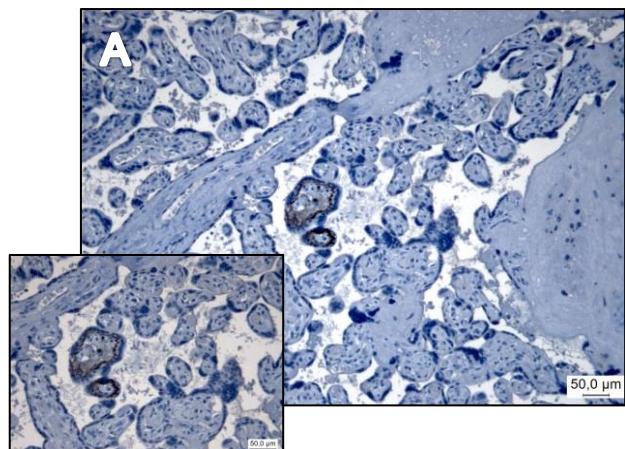
	FGF-23		Klotho	
	ES-1	ES-2	ES-1	ES-2
1fach positiv	38	29	41	33
2fach positiv	24	32	22	27
3fach positiv	20	19	19	20

Darüberhinaus wurde geprüft, ob an den Präparaten der ES-1 und ES-2 die Befunde für FGF-23 beziehungsweise Klotho übereinstimmten und ob innerhalb eines Präparates die FGF-23- und Klotho-spezifischen Färbungen kolokalisiert waren. Anschließend wurden zwei voneinander unabhängige Zusammenfassungen vorgenommen.

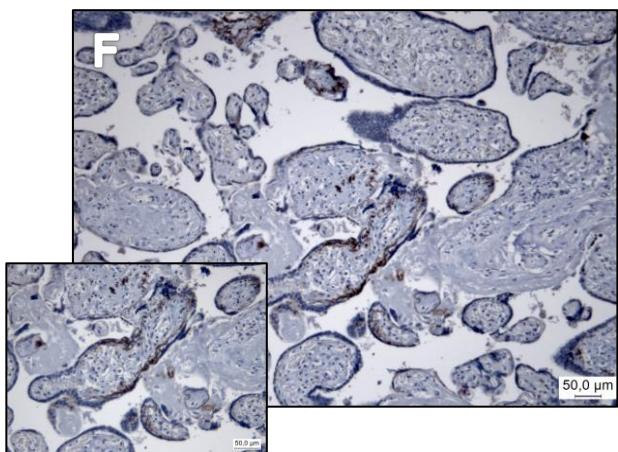
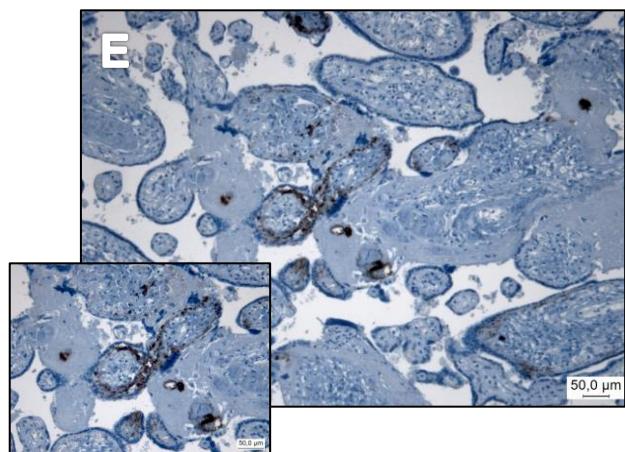
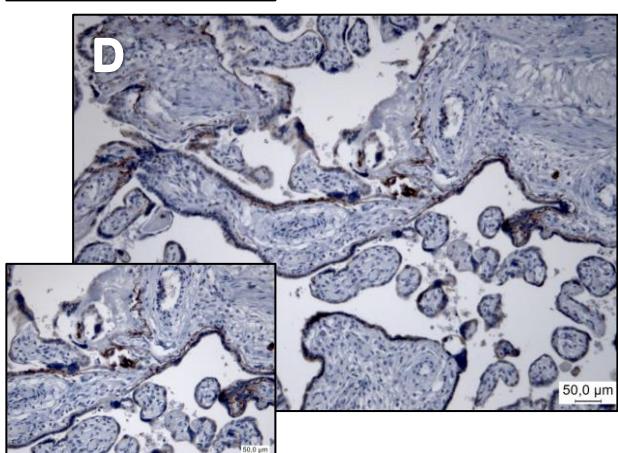
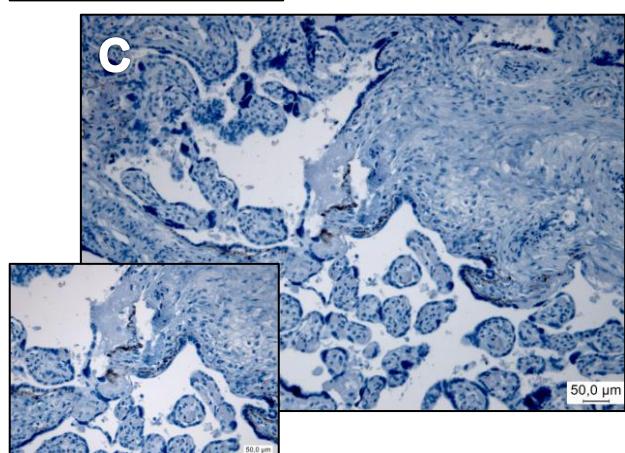
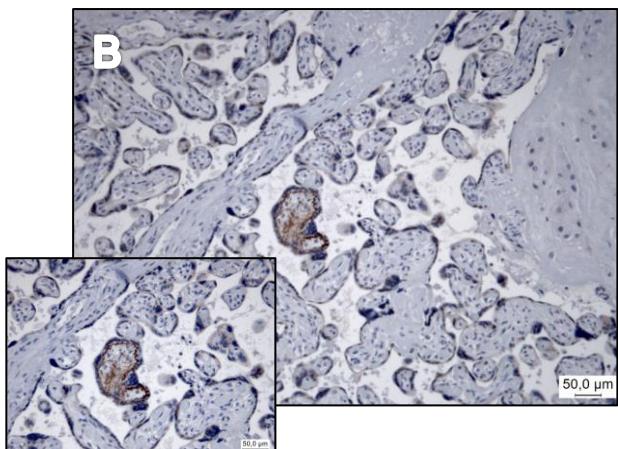
Sofern die Färbungen beider Entnahmestellen (ES-1 und ES-2) für FGF-23 und Klotho identisch beurteilt wurden, wurden die Befunde zu einem Ergebnis (FGF-23 ES-1+2, sowie Klotho ES-1+2) zusammengefasst. Dieses war für FGF-23 bei 43 und für Klotho bei 39 Präparaten der Fall.

Weiterhin wurden die Ergebnisse für FGF-23 und Klotho verglichen und zu Idem (Übereinstimmende Lokalisation) und Non-Idem (Nicht-übereinstimmende Lokalisation) zusammengefasst. Diese Analyse wurde für beide Entnahmestellen durchgeführt. In der ES-1 stimmten bei 53 von 82 Präparaten die Lokalisation und Intensität von FGF-23 und Klotho überein (Idem), in 29 der 82 Präparate unterschieden sich die Ergebnisse (Non-Idem). In der ES- 2 konnten 50 konkordante Befunde erhoben werden, 30 Ergebnisse unterschieden sich. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Idem/Non-Idem und den Charakteristika der Probandinnen konnte nicht gezeigt werden. Auf diese Weise konnten sowohl die Befunde zwischen zwei Entnahmestellen als auch die Lokalisation von FGF-23 und Klotho verglichen werden.

**FGF-23**



**Klotho**



**Abb. 7: Darstellung verschiedener Färbeintensitäten in plazentarem Gewebe**

Färbestufen von FGF-23 (**A, C, E**) und Klotho (**B, D, F**) in plazentarem Gewebe: (**A/B**)

1-fach positiv: 1-6 solcher Areale pro Präparat angefärbt; (**C/D**) 2-fach positiv: 7-12

solcher Areale pro Präparat gefärbt; (**E/F**) 3-fach positiv: mehr als 12 solcher Areale

sind im Präparat angefärbt. Vergrößerung: 100x und 200x (Ausschnittvergrößerung)

### 4.3. Zusammenhang zwischen Färbeintensität und mütterlichen anthropometrischen Daten

Um potentielle Zusammenhänge zwischen der Färbeintensität für FGF-23 beziehungsweise Klotho und den anthropometrischen Eigenschaften der Mutter zu evaluieren, wurde der Datensatz entsprechend kategorisiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass mit zunehmenden Alter der Mutter die Zahl der angefärbten Areale von FGF-23 und Klotho signifikant abnimmt ( $p < 0,05$ ). Dies ließ sich sowohl in der Entnahmestelle 1 als auch der Entnahmestelle 2 nachweisen (Tab. VI). Weitere signifikante Zusammenhänge zwischen immunhistochemischen Befunden und mütterlichen Eigenschaften waren nicht nachweisbar.

**Tab.VI: Die Färbeintensität in Relation zum mütterlichen Alter**

	Alter der Mutter
<b>1fach positiv</b>	
FGF-23 (ES-1)	33* (23-39)
FGF-23 (ES-2)	36# (23-39)
Klotho (ES-1)	33\\$ (23-39)
Klotho (ES-2)	33\\$ (23-39)
<b>2fach positiv</b>	
FGF-23 (ES-1)	30* (23-39)
FGF-23 (ES-2)	29,5# (23-38)
Klotho (ES-1)	32\\$ (23-39)
Klotho (ES-2)	30\\$ (23-38)
<b>3fach positiv</b>	
FGF-23 (ES-1)	29* (21-39)
FGF-23 (ES-2)	28# (21-39)
Klotho (ES-1)	28\\$ (21-36)
Klotho (ES-2)	28\\$ (21-39)

\* , #, §, \$ jeweils  $p < 0,05$  für den Vergleich zwischen den Gruppen

#### **4.4 Ergebnisse zur lokalen Synthese von FGF-23 und Klotho**

Um zu prüfen, ob FGF-23 beziehungsweise Klotho in der Plazenta synthetisiert werden, wurde aus den vorhandenen Paraffinblöckchen RNA isoliert und in eine quantitative rt-PCR eingesetzt. Die Isolierung von RNA war in 55 von 82 Präparaten möglich und in allen Proben war das als Positivkontrolle genutzte GAPDH nachweisbar. In keinem der Präparate ließen sich mit den verfügbaren Primern FGF-23 beziehungsweise einer der FGF-Rezeptoren oder Klotho nachweisen. Damit ist davon auszugehen, dass die immunhistochemischen Färbungen weniger für lokal synthetisiertes Protein, sondern vielmehr für die Ablagerung aus dem Blut sprechen.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Plazenten postnatal untersucht und die klinischen Daten der Mütter und ihrer Neugeborenen erfasst. Die Plazenten wurden in Relation zu den anthropometrischen Daten sowohl morphologisch als auch immunhistochemisch befundet. Zu Beginn dieser Arbeit lagen lediglich zwei japanische Studien zum Einfluss von FGF-23 und Klotho auf den fetalen Calcium- und Phosphatstoffwechsel vor (Takaiwa et al. 2010; Ohata et al. 2011). Aufgrund niedriger FGF-23 Werte im humanen Nabelschnurblut und auf Grund der Studienergebnisse von Yoshiko (2007), in der eine geringe Expression von Fgf-23 in fetalen Rattenknochen gezeigt wurde, wird in der Studie von Ohata vermutet, dass humanes mütterliches FGF-23 nicht transplazentar auf den Feten übertragen wird, sondern nur von fetalen Geweben selbst exprimiert wird (Ohata et al. 2011; Yoshiko et al. 2007). Klotho hingegen konnte als Co-Faktor sowohl im Nabelschnurblut als auch im Synzytiotrophoblasten der humanen Plazenta nachgewiesen werden (Ohata et al. 2011). Erhöhte Werte von Klotho im Nabelschnurblut lassen vermuten, dass Klotho in der Plazenta synthetisiert wird (Ohata et al. 2011). Ziel dieser Arbeit war es, die von Takaiwa (2010) und Ohata (2011) berichteten Befunde zur Existenz von FGF-23 und Klotho in der humanen Plazenta zu überprüfen und eine eventuell vorhandene Kolokalisation beider Proteine zu erfassen. Darüberhinaus galt es herauszufinden, ob FGF-23, Klotho und die Rezeptoren FGFR 1-4 in humanem plazentarem Gewebe synthetisiert werden.

### 5.1 Immunhistochemische Analyse

Im ersten Schritt wurden immunhistochemische Färbungen mit FGF-23 und Klotho angefertigt und lichtmikroskopisch ausgewertet. In allen Präparaten ließ sich FGF-23 und sein Co-Faktor Klotho nachweisen. Die Anfärbungen fanden sich vorwiegend in Synzytiotrophoblasten, im Fibrinoid des intervillösen Raumes und in obliterierten Gefäßanschnitten. Diese Ergebnisse sind somit zum Teil konkordant zu den Erkenntnissen von Ohata et al. (Ohata et al. 2011). Auch eine Studie von Loichinger (2016), die im Verlauf dieser Arbeit veröffentlicht wurde, kommt zu ähnlichen Befunden. Hier konnte Klotho sowohl in Synzytiotrophoblasten als auch zu geringem Teil in Zytotrophoblasten der humanen Plazenta nachgewiesen werden (Loichinger et al. 2016). Darüberhinaus zeigt sich in unseren Präparaten auch, dass FGF-23 und Klotho in weitestgehend identischen Arealen und dort in Synzytiotrophoblasten lokalisiert sind. Diese Befunde führen zu der Vermutung, dass ein Komplex aus zirkulierendem FGF-23 und Klotho als Dimer an einen der FGF-Rezeptoren bindet (Godang et al. 2013).

Allerdings konnten wir in keinem der von uns untersuchten Präparate die für eine lokale Synthese dieser Proteine notwendigen RNA nachweisen. Damit konnten die von Ohata erhobenen Befunde zur Expression von Klotho in unserer Stichprobe bestätigt werden, während sich im Falle von FGF-23 unsere und die Ergebnisse von Ohata (Ohata et al. 2014) widersprechen. Selbst wenn man berücksichtigt, dass die aus Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe isolierte RNA per se von geringerer Qualität ist, so ist es doch sehr unwahrscheinlich, dass nur die für GAPDH kodierende RNA erhalten geblieben ist. Es ist also vielmehr davon auszugehen, dass weder FGF-23 noch Klotho oder einer der kanonischen FGF-Rezeptoren in der humanen Plazenta exprimiert werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit stellte sich nach den bis dahin gewonnenen Ergebnissen zudem die Frage, ob zirkulierendes FGF-23 in der Plazenta Einfluss auf den fetalen Stoffwechsel nimmt. Dies ist insofern von Relevanz, dass Phosphat während der fetalen enchondralen Knochenentwicklung eine Schlüsselrolle spielt (Ma et al. 2014). Es induziert die Apoptose von hypertrophen Chondrozyten und wird primär in das Osteoid eingebaut. Veränderungen führen unter anderem zu einer gestörten Knochenbildung (Ma et al. 2014).

Allein durch die immunhistochemische Färbung kann der transplazentare Übertritt von FGF-23 jedoch nicht nachgewiesen werden. Hierzu führten wir ebenfalls eine qPCR der notwendigen Rezeptoren (FGFR 1-4) für FGF-23 durch, um zu sehen, ob Rezeptoren für den FGF-23-Klotho-Rezeptorkomplex in der Plazenta exprimiert werden. Weder FGFR 1 noch die anderen drei FGF-Rezeptoren konnten mittels qPCR nachgewiesen werden. Folglich kann ein transplazentarer Einfluss von FGF-23 auf den Calcium- und Phosphatstoffwechsel des Fetus ausgeschlossen werden. Auch dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Ohata, in denen die Rezeptoren FGFR 1-4 mittels qPCR in der humanen Plazenta nachgewiesen wurden (Ohata et al. 2014). Allerdings kam die Studie sowie weiterführende Studien an Hyp-Mäusen (Mäuse mit einer hereditären Störung des Phosphatstoffwechsels) ebenfalls zu der Erkenntnis, dass kein transplazentarer Einfluss von FGF-23 auf das Knochenwachstums des Feten ausgeübt wird (Ma et al. 2014; Ma et al. 2016; Ohata et al. 2011). Die Versorgung und Aufrechterhaltung des Feten mit Phosphat findet allein durch den aktiven Transport über die Plazenta statt (Ma et al. 2014; Kovacs 2014). Selbst der vollständige Verlust von FGF-23 beeinflusst den fetalen Mineralstoffwechsel nicht (Ma et al. 2014). Erst postnatal nimmt FGF-23 Einfluss auf Niere und Darm und reguliert nach der Geburt den Mineralstoffwechsel des Kindes (Ma et al. 2016).

Um weitere Erkenntnisse zu möglichen Assoziationen zu erhalten, haben wir die mütterlichen und kindlichen Daten mit den Färbeintensitäten verglichen. In der statistischen Auswertung zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den jeweiligen Färbeintensitäten und dem Alter der Mütter. Mit abnehmendem Alter der Mutter nimmt die Intensität der Färbung signifikant zu. Dies konnte sowohl bei Klotho als auch bei FGF-23 beobachtet werden und steht im Gegensatz zu vorangegangenen Studien, in denen ein Anstieg von zirkulierendem Klotho mit zunehmendem Alter beobachtet wurde. Hier stiegen die Spiegel von zirkulierendem Klotho bis zum circa 40. Lebensjahr an und fielen anschließend wieder ab (Yamazaki et al. 2010; Miranda et al. 2014). Die Konzentration von Klotho ist von der Syntheserate (vor allem in der Niere) und der proteolytischen Spaltung abhängig (Miranda et al. 2014). Eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse konnte mit den von uns erhobenen Daten nicht erarbeitet werden. Die Einteilung der Präparate nach Entnahmestelle und Färbeintensität sowie die Zusammenfassung der jeweiligen Entnahmestellen zu Idem (übereinstimmende Färbungen) und Non-Idem (Nicht-übereinstimmende Färbungen) zeigte keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den anthropometrischen Daten, den Erkrankungen der Mutter, den Medikamenteneinnahmen oder den Pathologien der Plazenta. Aufgrund unserer Ergebnisse können wir davon ausgehen, dass FGF-23 transplazentar keinen Einfluss auf den fetalen Stoffwechsel nimmt. Diese Schlussfolgerung wird durch die Studien von Ma und Ohata gestützt (Ma et al. 2014; Ohata et al. 2014). Aus den Ergebnissen können wir zudem schließen, dass die Färbeintensität von FGF-23 und Klotho unabhängig von Gewicht, Schwangerschaftswoche und Anzahl der Schwangerschaften ist.

## 5.2 Kritische Betrachtung der Studie

Einzelne Aspekte der Studie erfordern eine differenzierte Betrachtung. Da jede Plazenta individuell ausgeprägt ist, konnten die Probenentnahmestellen nicht standardisiert werden. Vom befundenen Pathologen wurden jeweils zwei als repräsentativ erachtete Stellen für die Probenentnahme ausgewählt und dieses Gewebe mit Formalin fixiert und eingebettet. Auch wenn alle Präparate nach dem gleichen Protokoll und mit Antikörpern einer Charge gefärbt wurden, sind Unterschiede bei Präparateeinbettung, Chemikalienchargen und Temperaturschwankungen unvermeidbar. Die Färbungen wurden manuell durchgeführt und trotz einheitlichen Vorgehens konnten Schwankungen in der Färbereaktion nicht vermieden werden. Die Beurteilung der Färbeintensität erwies sich als schwierig, da auch der intervillöse Raum zum Teil mitgefärbt wurde.

Weiterhin zeigt die immunhistochemische Auswertung nur eine Momentaufnahme und erfasst nur einen kleinen Ausschnitt der Plazenta.

Auch die Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen und die darauf aufbauende Kategorisierung der Präparate in Färbestufen beziehungsweise in Färbeintensitäten ist subjektiv zu werten - selbst wenn diese individuelle Beurteilung zweizeitig und unabhängig erfolgte. Da bislang keine andere Arbeitsgruppe die immunhistochemischen Färbungen anhand von Färbestufen und zu Kolokalisation von FGF-23 und Klotho in der humanen Plazenta untersucht hat, ist die Verallgemeinerung unserer Befunde schwierig. Darüberhinaus ist es sinnvoll, Plazentaproben möglichst umgehend in flüssigem Stickstoff zu konservieren, um die Isolierung von qualitativ hochwertiger RNA zu ermöglichen. Dennoch stimmten die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen teilweise überein (Ma et al. 2014; Ohata et al. 2014; Ohata et al. 2011; Takaiwa et al. 2010).

### **5.3 Ausblick**

Unsere Studie hat gezeigt, dass FGF-23 und Klotho immunhistochemisch in der Plazenta nachweisbar sind und überwiegend auch an gleicher Lokalisation vorkommen. Um diese Beobachtung zu verifizieren, bieten sich Doppelfärbungen der Präparate an. Andererseits konnte durch die rt-PCR die lokale Synthese von FGF-23 sowie seiner Rezeptoren Klotho und FGFR1-4 ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse weichen von den publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen ab (Ohata et al. 2014; Ma et al. 2014). Hier wäre es sinnvoll, die Untersuchungen mit RNA, die unmittelbar aus frischen oder schockgefrorenen Plazenten isoliert wurde, zu wiederholen.

Da wir in unserer Studie nur gesunde Schwangere eingeschlossen haben, bleibt des Weiteren unklar, ob und gegebenenfalls in welchem Ausmaß, schwangerschaftsbedingte Erkrankungen, wie ein HELLP-Syndrom oder eine Präekklampsie die Akkumulation von FGF-23 und Klotho in der Plazenta beeinflussen.

## 6 Zusammenfassung

Für die zeitgerechte Entwicklung des Feten ist eine ungestörte Nähr- und Mineralstoffbereitstellung/-versorgung essentiell. Die Plazenta dient hierbei als aktiver Mineraltransporter. Neben der Nährstoffversorgung übernimmt die Plazenta endokrine Funktionen und reguliert transplazentär den Calciumhaushalt/-transport des Feten. Sowohl Calcium, Phosphat, Vitamin D, PTH, FGF-23 als auch Klotho sind für den Knochen- und Mineralstoffwechsel und damit auch für die Knochenentwicklung essentiell.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl FGF-23 als auch Klotho sich in der humanen Plazenta an ähnlicher Lokalisation anreichern, dort jedoch nicht synthetisiert werden und auch transplazentär keinen Einfluss auf den fetalen Calcium- und Phosphatstoffwechsel nehmen. Ob die mit zunehmenden Alter der Mutter abnehmende Intensität der FGF-23- und Klotho-spezifischen Färbungen biologisch relevant ist, kann mit den erhobenen Daten nicht geklärt werden. Darüberhinaus konnte festgestellt werden, dass FGF-23 - und Klotho - positive Areale vornehmlich im Synzytiotrophoblasten, in obliterierten Gefäßen und im Fibrinoid nachweisbar sind.

## 7 Thesen

1. Die Plazenta ist ein essentielles Stoffwechselorgan und für die Versorgung des Feten wichtig.
2. FGF-23 und Klotho werden in der Plazenta nicht exprimiert.
3. Immunhistochemische Konnten lokale Ansammlungen von FGF-23 und Klotho in allen Plazenten nachgewiesen werden.
4. Eine Anfärbung von FGF-23 und Klotho an gleicher beziehungsweise ähnlicher Lokalisation scheint sehr wahrscheinlich und ist mit der Funktion von Klotho als FGF-23 spezifischen Korezeptor vereinbar.
5. In der Plazenta zeigte sich eine vermehrte Anfärbung von FGF-23 und Klotho vor allem in Synzytiotrophoblasten und obliterierten Gefäßen sowie dem Fibrinoid.

## 8 Literaturverzeichnis

- Bacchetta J, Sea JL, Chun RF, Lisse TS, Wesseling-Perry K, Gales B, Adams JS, Salusky IB, Hewison M. 2013. "Fibroblast Growth Factor 23 Inhibits Extrarenal Synthesis of 1,25-Dihydroxyvitamin D in Human Monocytes." *J. Bone Miner. Res.*, 28(1): 46–55.
- Bergwitz C, Jüppner H. 2010. "Regulation of Phosphate Homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23." *Annu. Rev. Med.* 61, pp.91–104.
- Bhattacharyya N, Chong WH, Gafni RI, Collins MT. 2012. Fibroblast growth factor 23: state of the field and future directions. *Trends Endocrinol. Metab.: TEM*, 23(12), pp.610–618.
- Blau JE, Collins MT. 2015. The PTH-Vitamin D-FGF23 axis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 16(2), pp.165–174.
- Cross J, Werb Z, Fisher S. 1994. "Implantation and the Placenta: Key Pieces of the Development Puzzle." *Science* 266 (5190): 1508–18.
- Czaya B, Faul C. 2019. The Role of Fibroblast Growth Factor 23 in Inflammation and Anemia. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(17), p.4195.
- David V, Francis C, Babbitt JL. 2017. Ironing out the cross talk between FGF23 and inflammation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 312(1), pp.F1–F8.
- Degirolamo C, Sabba C, Moschetta A. 2016. Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 15(1), pp.51–69.
- Fan C, Wang Y, Wang J, Lei D, Sun Y, Lei S, Sun Y, Lei S, Hu M, Tian Y, Li R, Wang S. 2016. Clinic significance of markedly decreased alpha-klotho in women with preeclampsia. *Am. J. Transl. Res.*, 8(5), pp.1998–2010.
- Fenton TR, Kim JH. 2013. A systematic review and meta-analysis to revise the Fenton growth chart for preterm infants. *BMC Pediatr.* 13(1), p.59.
- Fischer D-C, Mischek A, Wolf S, Rahn A, Salweski B, Kundt G, Haffner D. 2012. Paediatric reference values for the C-terminal fragment of fibroblast-growth factor-23, sclerostin, bone-specific alkaline phosphatase and isoform 5b of tartrate-resistant acid phosphatase. *Ann. Clin. Biochem.*, 49(Pt 6), pp.546–553.
- Francis C, David V. 2016. Inflammation regulates fibroblast growth factor 23 production. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 25(4), pp.325–332.
- Godang K, Froslie KF, Henriksen T, Isaksen GA, Voldner N, Lekva T, Ueland T, Bollerslev J. 2013. Umbilical cord levels of sclerostin, placental weight, and birth weight are predictors of total bone mineral content in neonates. *Eur. J. Endocrinol.*, 168(3), pp.371–378.
- Haffner D, Leifheit-Nestler M. 2017. Extrarenal effects of FGF23. *Pediatr. Nephrol.*, 32(5), pp.753–765.

- Han X, Quarles LD. 2016. Multiple faces of fibroblast growth factor-23. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 25(4), pp.333–342.
- Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. 2013. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu. Rev. Physiol.*, 75, pp.503–533.
- Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A, et al. 2007. alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5831), pp.1615–1618.
- Iniguez G, Gallardo P, Castro JJ, Gonzalez R, Garcia M, Kakarieka E, Martin SS, Johnson MC, Mericq V, Cassorla F. 2018. Klotho Gene and Protein in Human Placentas According to Birth Weight and Gestational Age. *Front. Endocrinol.*, 9, p.797.
- Kaufmann P, Huppertz B, Frank HG. 1996. The fibrinoids of the human placenta: origin, composition and functional relevance. *Ann. Anat.*, 178(6), pp.485–501.
- Kovacs CS. 2014. Bone metabolism in the fetus and neonate. *Pediatr. Nephrol.*, pp.793–803.
- Kovesdy CP, Quarles LD. 2013. Fibroblast growth factor-23: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Nephrol. Dial. Transplant.* 28(9), pp.2228–2236.
- Kramer MS, Olivier M, McLean FH, Willis DM, Usher RH. 1990. Impact of intrauterine growth retardation and body proportionality on fetal and neonatal outcome. *Pediatrics*, 86(5), pp.707–713.
- Liu S, Quarles LD. 2007. How fibroblast growth factor 23 works. *J. Am. Soc. Nephrol. : JASN*, 18(6), pp.1637–1647.
- Loichinger MH, Towner D, Thompson KS, Ahn HJ, Bryant-Greenwood GD. 2016. Systemic and placental alpha-klotho: Effects of preeclampsia in the last trimester of gestation. *Placenta*, 41, pp.53–61.
- Ma Y, Kirby BJ, Fairbridge NA, Karaplis AC, Lanske B, Kovacs CS. 2016. FGF23 is not required to regulate fetal phosphorus metabolism but exerts effects within 12 hours after birth. *Endocrinology*, p.en20161369.
- Ma Y, Samaraweera M, Cooke-Hubley S, Kirby BJ, Karaplis AC, Lanske B, Kovacs CS. 2014. Neither absence nor excess of FGF23 disturbs murine fetal-placental phosphorus homeostasis or prenatal skeletal development and mineralization. *Endocrinology*, 155(5), pp.1596–605.
- Martin A, David V, Quarles LD. 2012. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiological reviews*, 92(1), pp.131–55.
- Miranda J, Romero R, Korzeniewski SJ, Schwartz AG, Chaemsathong P, Stampalija T, Yeo L, et al. 2014. The anti-aging factor alpha-klotho during human pregnancy and its expression in pregnancies complicated by small-for-gestational-age

neonates and/or preeclampsia. *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* 27(5), pp.449–457.

Ohata Y, Arahori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, Nakayama M, et al. 2011. Circulating levels of soluble alpha-Klotho are markedly elevated in human umbilical cord blood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 96(6), pp.E943-7.

Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tsugawa N, Tachikawa K, Koinuma T, Miyagawa K, et al. 2014. Elevated fibroblast growth factor 23 exerts its effects on placenta and regulates vitamin D metabolism in pregnancy of Hyp mice. *J. Bone Miner. Res.*, 29(7), pp.1627–1638.

Ryan BA, Kovacs CS. 2019. Calcitropic and phosphotropic hormones in fetal and neonatal bone development. *Semin Fetal Neonatal Med.*, p.101062.

Salles, Jean Pierre. 2016. Bone metabolism during pregnancy. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 77(2), pp.163–168.

Schmidt W, Kurjak A, eds. 2001. 24 Aufbau der menschlichen Plazenta und pathomorphologische Veränderungen bei Plazentainsuffizienz. *Farbdopplersonographie in Gynäkologie und Geburtshilfe*. Georg Thieme Verlag KG.

Sethi A, Priyadarshi M, Agarwal R. 2019. “ Mineral and bone physiology in the foetus, preterm and full-term neonates. *Semin. Fetal Neonatal Med.*, p.101076.

Strauss A, 2008. Ultraschallpraxis/ Geburtshilfe und Gynäkologie. In Springer- Verlag Berlin Heidelberg, p. XVIII, 478.

Takaiwa M, Aya K, Miyai T, Hasegawa K, Yokoyama M, Kondo Y, Kodani N, Seino Y, Tanaka H, Morishima T. 2010. Fibroblast growth factor 23 concentrations in healthy term infants during the early postpartum period. *Bone*, 47(2), pp.256–262.

Ulfig N, 2009. *Kurzlehrbuch Embryologie* 2. Auflage., Georg Thieme Verlag KG.

Vogel M, 1996. *Atlas der mophologischen Plazentadiagnostik*, 2. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer, pp. 18–29/ 70–73

Voigt M, Fischer D-C, Rimpau M, Schareck W, Haffner D. 2010. Fibroblast growth factor (FGF)-23 and fetuin-A in calcified carotid atheroma. *Histopathology*, 56(6), pp.775–788.

Welsch U, Kummer W, Deller T. 2014. “Lehrbuch Histologie.” In , 4. Auflage, 710. München: urban&fischer Elsevier. Lehrbuch Histologie. Urban&Fischer Elsevier München, pp. 515–528.

Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, Hasegawa H, et al. 2010. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 398(3), pp.513–518.

Yoshiko Y, Wang H, Minamizaki T, Ijuin C, Yamamoto R, Suemune S, Kozai K, Tanne K, Aubin JE, Maeda N. 2007. Mineralized Tissue Cells Are a Principal Source of FGF23. *Bone* 40 (6): 1565–73.

<http://www.embryology.ch/allemand/fplacenta/objectpl01.html#prerequis>, letzter Aufruf 13.02.2020.

<https://www.pedz.de/de/neo.html>, letzter Aufruf 11.08.2020.

## **9 Danksagung**

Mein spezieller Dank gilt Frau Prof. Dr. rer.-nat. D.-C. Fischer. Ich möchte mich bei Ihr für das interessante Thema sowie für die geduldige und intensive Betreuung über den gesamten Zeitraum bedanken.

Herrn Dr. med. H.-J. Kreutzer und den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie danke ich für ihre unkomplizierte Hilfe und Befundung der Plazenten sowie die zuverlässige und zügige Einbettung und Zuschnitte der Präparate.

Ich möchte mich zudem bei Anja Rahn, Birgit Salewski, Claudia Winkelmann und Doreen William für die freundschaftliche, aber stets auch professionelle Zusammenarbeit im Labor bedanken. Die vielen unterhaltsamen und lustigen Momente werde ich nicht vergessen.

Zudem bedanke ich mich bei allen Probandinnen, die an dieser Studie teilgenommen haben und sie somit überhaupt erst möglich gemacht haben.

Großer Dank gilt meiner Familie, die mich nicht nur bei dieser Promotionsarbeit, sondern auch durch mein Studium hindurch, bei meinen beruflichen und privaten Vorhaben sowohl emotional als auch finanziell unterstützt haben und immer für mich da waren.

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund Hannes, der mich unermüdlich motiviert, aufgemuntert und unterstützt hat, diese Arbeit zu vollenden.

## **11 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, die vorliegende Arbeit selbstständig ohne fremde Hilfe, nur unter Nutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und weder diese noch eine andere Arbeit zuvor an einer Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Sophia Mann