



# Kloto — nowy regulator gospodarki mineralnej

## Klotho — a new regulator of mineral homeostasis

Jacek Łukaszkiwicz<sup>1</sup>, Gabriela Mikołajczak<sup>1</sup>, Roman Lorenc<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

<sup>2</sup>Instytut „Pomnik — Centrum Zdrowia Dziecka”, Zakład Biochemii i Medycyny Doświadczalnej, Warszawa

### Streszczenie

Badania nad regulacją homeostazy mineralnej, trwające na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat, utrwaliły pogląd, że rządzące nią mechanizmy są już w znacznym stopniu poznane i zrozumiane. Ujawnienie molekularnych mechanizmów działania białka Kloto spowodowało konieczność zrewidowania poglądów obowiązujących dotychczas. Wiadomo już, że Kloto jest unikalnym efektem regulacyjnym odgrywającym kluczową rolę w szybkim przywracaniu właściwych stężeń pozakomórkowego Ca<sup>++</sup> poprzez zmiany intensywności transportu transbłonkowego, modulację wydzielania parathormonu, współdziałanie w przekazywaniu sygnału przez czynnik fosforany (Fgf23) — regulujący stężenie wapnia na drodze supresji wytwarzania 1,25 dwuhydroksywitaminy D (1,25(OH)<sub>2</sub>D) oraz reabsorpcji fosforanów w kanaliku nerkowym. Za pomocą tych mechanizmów Kloto bierze udział w regulacji homeostazy mineralnej płynu mózgowo-rdzeniowego oraz krwi i innych płynów ustrojowych, działając na spłot naczyńkowy, przytarczycę i dystalne części krętych odcinków nefronów, stając się jednym z głównych „graczy” na polu złożonego i wielopoziomowego układu utrzymania homeostazy mineralnej. (*Endokrynol Pol* 2009; 60 (2): 104–109)

**Słowa kluczowe:** Kloto, homeostaza mineralna, wapń, fosforan

### Abstract

Research on the regulation of mineral homeostasis have been continuing for the decades, with an effect of establishing the impression that the governing mechanisms are already fairly well known and understood. Revealing of the molecular mechanism of action of the Klotho protein, forced us to revise this knowledge. It is known already that Klotho is a unique regulatory effector playing key role in reversing the imbalanced extracellular Ca<sup>++</sup> concentrations, by affecting the intensity of the transepithelial transport and modulation of the parathormone excretion. In cooperation with the phosphaturic hormone — Fgf23 it regulates calcium concentration by suppression of 1,25(OH)<sub>2</sub>D synthesis, and reabsorption of phosphate in a distal convoluted part of nephron. Acting through these mechanisms Klotho takes part in the regulation of the mineral homeostasis of cerebrospinal fluid, blood and body fluids acting on the choroid plexus, parathyroid glands and distal convoluted nephrons. In that way Klotho becomes one of the main players in a complex and multilevel system of maintaining the mineral homeostasis of the organism. (*Pol J Endocrinol* 2009; 60 (2): 104–109)

**Key words:** Klotho, mineral homeostasis, calcium, phosphate

### Wstęp

Zespół badawczy pod kierunkiem Makoto Kuro-o odkrył w 1997 roku gen *Klotho* u myszy, natomiast w 1998 roku określił strukturę i wyizolował ludzki homolog genu *Klotho* [1]. Nazwa genu pochodzi od imienia greckiej bogini losu i przeznaczenia Kloto — jednej z trzech siostr, która przędła nić ludzkiego żywota. Odkrywczy genu długowieczności zainspirowani znaczeniem tego imienia tak właśnie go nazwali, ponieważ gen *Klotho* odpowiada za długość i jakość ludzkiego życia niczym wrzeciono mitycznej bogini Kloto (tab. I).

W obrębie eksonu 3 mRNA Kloto, podlega procesowi alternatywnego splicingu (procesu usuwania intro-

nów). Ekspresja *Klotho* w większości tkanek jest niewielka i z wyjątkiem spłotów naczyńkowych komórek mózgowych, dystalnych części kanalików krętych w nerkach i przytarczyc. Aktywna forma witaminy D (dihydroksykalcyferol) stanowi ważny regulator ekspresji tego genu [2, 5].

Gen *Klotho* koduje białko o charakterze transbłonowym (przechodzące przez błonę komórkową). Ludzkie białko Kloto składa się z 1012 aminokwasów i wykazuje 86% identyczności w stosunku do białka mysiego (1014 aa). Domena pozakomórkowa białka Kloto zawiera dwa elementy homologiczne o sekwencji zbliżonej do  $\beta$ -glukozydazy spotykanej u bakterii i roślin. Białko Kloto ma jednak zmienione niektóre reszty ami-



Dr hab. med. Jacek Łukaszkiwicz, Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, tel.: (022) 572 07 66, faks: (022) 572 07 35, e-mail: [jacekluk@farm.amwaw.edu.pl](mailto:jacekluk@farm.amwaw.edu.pl)

Tabela I. Podstawowe informacje o genie *Klotho* [2–4]Table I. Basic information about the *Klotho* gene [2–4]

Cecha	Gen <i>Klotho</i>
Położenie	13q12
Długość	> 50 kbp
Struktura	5 eksonów
Polimorfizm	W obrębie promotora i eksonu 4.
Dziedziczenie	Zgodnie z prawami Mendla

nokwasowe, co sprawia, że wykazuje ono aktywność  $\beta$ -glukuronidazy [2, 3, 6, 7].

Mimo że intensywna ekspresja genu *Klotho* zachodzi tylko w ograniczonej liczbie tkanek, to niedobory jego ekspresji prowadzą do powstawania złożonych fenotypów o charakterze starzenia się, obejmujących wszystkie narządy. Myszy z rozbitym genem *Klotho* (myszy *Klotho*,  $KL^{-/-}$ ) wykazują niedobór lub całkowity brak białka Klotho. Obserwuje się u nich widoczne oznaki starzenia, takie jak skrócona długość życia (do 8 tygodni), mniejszy wzrost i masa ciała oraz pogłębiona kifoza. Około 2. tygodnia życia myszy *Klotho* pojawiają się zmiany biochemiczne, takie jak: hipoglikemia, hiperfosfatemia, hiperkalcemia, podwyższone stężenia aktywnej formy witaminy D. Około 4. tygodnia życia u myszy *Klotho* obserwowano następujące zmiany morfologiczne: miażdżycę, ektopową kalcyfikację tętnic, osteoporozę, rozednię płuc, atrofie skóry, zanik gonad (bezpłodność). Dość często obserwowano inne zmiany, między innymi uszkodzenia narządu słuchu, zanik grasicy, zaburzenia działania włókien Purkiniego, ataksję i zaburzenia działania przysadki mózgowej, zanik mięśni [2, 3, 6, 7].

Myszy  $KL^{-/-}$  wykazują obecność hiperfosfatemii i hiperkalcemii na dwa tygodnie przed wystąpieniem fenotypu starzeniowego. Kalcyfikacja naczyń u myszy  $KL^{-/-}$  objawia się między innymi zwapnieniem śródbłonna aorty i tętniczek w nerce. Mimo podwyższonego stężenia wapnia (Ca) i fosforanów nieorganicznych (Pi) w surowicy krwi, myszy  $KL^{-/-}$  wykazują paradoksalnie zwiększone stężenia 1,25 dwuhydroksywitaminy D ( $1,25(OH)_2D$ ). Zwapnienia naczyń i tkanek miękkich mogą być po części skutkiem zaburzonej homeostazy mineralnej w efekcie hiperwitaminozy D. Spadek liczby osteoblastów u myszy  $KL^{-/-}$  przekracza spadek liczby osteoklastów. Powoduje to wystąpienie efektu obniżonego obrotu kostnego — o mechanizmie zbliżonym do osteoporozy starczej (a nie jak w osteoporozie pomenopauzalnej). Dotychczas nie wyjaśniono mechanizmu, dzięki któremu wyłączenie ekspresji genu *Klotho* zmniejsza liczebność osteoblastów [8, 9].

Białko Klotho, uważane za krążący hormon, wykazuje działanie pleiotropowe — bierze udział w nerko-

wej regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej i metabolizmie witaminy D, ochronie naczyń krwionośnych, redukcji stresu oksydacyjnego oraz tłumieniu wewnątrzkomórkowych sygnałów insuliny i insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1, *insulin-like growth factor*). Na poziomie molekularnym białko Klotho może pełnić funkcję konwertującą, czynnika humoralnego, receptora, liganda, enzymu i kofaktora [2, 6, 10–13].

Ochronny wpływ białka Klotho na układ sercowo-naczyniowy polega na zwiększonej produkcji tlenku azotu (NO, *nitric oxide*) w śródbłonku. Białko Klotho posiada również właściwości antyoksydantu. Uważa się, że białko Klotho zwiększa oporność szlaku sygnalizacyjnego insulina/IGF-1 (redukcja obwodowej wrażliwości na insulinę i IGF-1 — przeciwdziałanie procesowi starzenia się). Myszy *Klotho* są nadwrażliwe na działanie insuliny (hipoglikemia), natomiast myszy ze zwiększoną ekspresją genu *Klotho* wykazują oporność na insulinę i IGF-1 [2, 5, 8, 9].

Reasumując, uważa się, że białko Klotho przeciwdziała starzeniu się w następujący sposób:

- pobudza tworzenie NO w śródbłonku;
- zwiększa oporność osi insulina/IGF-1;
- redukuje stres oksydacyjny;
- przeciwdziała nadmiernej resorpcji kości;
- utrzymuje na właściwym poziomie metabolizm wapnia, fosforanów i witaminy D.

## Ekspresja i wydzielanie białka Klotho

Gen *Klotho* koduje białko błonowe typu I, posiadające domenę zewnątrzkomórkową złożoną z dwóch podjednostek KL1 i KL2, pojedynczej jednostki transbłonowej i krótkiej domeny wewnątrzkomórkowej. W efekcie alternatywnego wycinania intronów powstaje forma białka Klotho pozbawiona podjednostki KL2 oraz domeny wewnątrzkomórkowej i transbłonowej. Dzięki temu Klotho jest również czynnikiem humoralnym — może być wydzielane do układu krążenia. Podjednostki Klotho pod względem budowy przypominają rodzinę białek  $\beta$ -glikozydaz, w związku z czym posiadają naturalną skłonność do tworzenia oligomerów. Właściwość ta powoduje, że zarówno forma wydzielana (ok. 130 kDa — kilodaltonów), jak i forma związana z błoną wydają się heterodimerami, składającymi się z podjednostek KL1 i KL2. Analiza transkryptów genu *Klotho* wskazuje na to, że jego produkt (monomer) ma około 70 kDa [14–16].

Do układu krążenia białko Klotho trafia dzięki trzem współdziałającym ze sobą mechanizmom:

- alternatywnemu wycinaniu intronów z mRNA — gen *Klotho* bezpośrednio generuje podjednostkę KL2. Białko to wydzielane jest poza komórkę, a następnie do układu krążenia, gdzie może się znajdo-

wać w formie monomeru lub heterodimeru (KL1/KL2);

- rozszczepieniu proteolitycznemu — błonowa forma Kloto może zostać odcięta od fragmentu kotwiczącego w błonie (będącego częścią KL2) i uwolniona do układu krążenia. Reakcję tę przeprowadza zestaw enzymów należących do grupy dezintegryn i metaloproteinaz. Rozcinają one kotwiczący w błonie fragment cząsteczki, tworząc fragmenty o masie 130 i 68 kDa. Proces ten, w wyniku którego powstaje zestaw 130 kDa, określa się jako „cięcie  $\alpha$ ”, a dający fragment 68 kDa jako „cięcie  $\beta$ ”. Na skutek różnej wydajności obu procesów, fragment  $\alpha$  stanowi główną formę Kloto w układzie krążenia;
- przemieszczaniu ATPazy  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  — białko Kloto, ulegając ekspresji w komórce nabłonka kanalika nerkowego, znajduje się w formie rozproszonej w cytoplazmie, ze szczególnym powinowactwem do struktur siateczki endoplazmatycznej i aparatu Golgiego. Białko Kloto wiąże się z ATPazą, po czym cały kompleks zostaje przeniesiony do błony komórkowej, przy czym ATPaza pozostaje zakotwiczona w błonie, a Kloto zostaje wydzielone do przestrzeni pozakomórkowej. W błonie komórki kanalika nerkowego znajduje się pewna ilość kompleksów ATPazy, zapewniająca poziom tak zwanej aktywności podstawowej. Proces rekrutacji ATPazy nie podlega tu regulacji — działa w sposób konstytutywny. W przeciwieństwie do tego wydajność mechanizmu transportu ATPazy  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , zależnego od białka Kloto, jest regulowana w sposób ujemny przez stężenie pozakomórkowych jonów wapnia [15, 17, 18].

## Homeostaza wapniowa, rola białka Kloto

Wapń pełni ważną funkcję w skali całego organizmu jako czynnik zarówno zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowy. Jego rola w przestrzeni pozakomórkowej obejmuje udział w krzepnięciu krwi, utrzymywanie integralności błon komórkowych i właściwego działania międzykomórkowych procesów adhezyjnych. Pula wapnia pozakomórkowego stanowi także źródło jonów  $\text{Ca}^{++}$  niezbędnych dla działania procesów wewnątrzkomórkowych. Odpowiednie stężenie wapnia pozakomórkowego jest niezbędne dla utrzymania prawidłowej wymiany wapnia z zasobami szkieletowymi, stanowiącymi największy magazyn wapnia zawierający 99% całej puli wapnia organizmu człowieka [19]. Wapń wewnątrz komórki stanowi ważny przekaźnik II rzędu, regulujący wiele jej funkcji, takich jak: metabolizm, zdolność ruchu, czynności wydzielnicze, proliferacja. Jest on kofaktorem dla wielu enzymów — na przykład mitochondrialnych dehydrogenaz, różnych fosfolipaz i proteaz [19–21]. Konieczne jest zatem, aby stężenie

jonów  $\text{Ca}^{++}$  w płynach pozakomórkowych utrzymywane było w bardzo wąskich granicach [22].

Tradycyjny model ustrojowej homeostazy wapniowej zawiera dwa kluczowe elementy. W skład pierwszego wchodzi komórki wyposażone w układy sensoryczne reagujące na zmiany w stężeniu pozakomórkowych jonów  $\text{Ca}^{++}$ , co prowadzi do stosownych zmian w wydzielaniu hormonów kalcjotropowych, takich jak parathormon (PTH),  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  czy kalcytonina. Drugim elementem jest system efektorowy działający poprzez wyspecjalizowane komórki w nerkach kości i jelicie, których działanie regulują hormony kalcjotropowe [19, 20, 23].

Przemieszczanie  $\text{Ca}^{++}$  w komórkach nabłonka jelita cienkiego oraz dystalnej części kanalika nerkowego stanowi proces trzystopniowy. Rozpoczyna się on od pasywnego (zgodnego z gradientem stężeń) wniknięcia jonu wapniowego przez błonę luminalną lub apikalną z udziałem selektywnych kanałów zmiennopotencjałowego receptora waniloidowego typu piątego (TRPV5, *transient receptor potential vanilloid*) (nerka) i TRPV6 (jelito), dyfuzję poprzez cytozol komórki, podczas której  $\text{Ca}^{++}$  wiązany jest przez kalbandyny ( $\text{D}_{28\text{K}}$  i  $\text{D}_{9\text{K}}$ ). Pobrane jony wapniowe zostają usunięte z komórek poprzez przeniesienie jonu wapnia przez błonę podstawną w drodze transportu aktywnego (wbrew gradientowi stężeń) — z udziałem wymiennika  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  w nerce i ATPazy  $\text{Ca}^{++}$  w przypadku nerek i jelita [24].

Klasyczny model utrzymania homeostazy wapniowej uwzględnia współdziałanie trzech hormonów, takich jak: PTH,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  i (CT) kalcytonina. Uruchamiają one odpowiedź komórek docelowych, wiążąc się z ich receptorami, a w konsekwencji regulując pobieranie, metabolizm i wydzielanie  $\text{Ca}^{++}$ . Synteza i wydzielanie tych hormonów znajdują się pod kontrolą wapnia zewnątrzkomórkowego, „śledzonego” przez receptory wapniowe. W odpowiedzi na nawet niewielki spadek stężenia  $\text{Ca}^{++}$  w ciągu kilku sekund następuje w układzie krążenia podwyższenie wydzielania PTH. Hormon ten w ciągu kilku minut zmniejsza reabsorpcję jonów fosforanowych w kanalikule nerkowym, zwiększając równocześnie reabsorpcję  $\text{Ca}^{++}$ . Parathormon działa również na komórki kości, podwyższając uwalnianie  $\text{Ca}^{++}$  z zasobów szkieletowych, przy czym proces ten uruchomiony zostaje w ciągu 1–2 godzin [25]. Błonowe sensory wzrostu zewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{Ca}^{++}$  to białka receptorowe CaR należące do rodziny receptorów sprzężonych z białkami G. Ich obecność stwierdzono w wielu tkankach, których komórki reagują na stężenie wapnia w środowisku. Gdy białko CaR ulegnie aktywacji, w odpowiedzi na wzrost pozakomórkowego stężenia  $\text{Ca}^{++}$ , dochodzi do akumulacji 1,4,5-trifosforanu inozytolu. Powoduje to wzrost stęże-

nia wapnia wewnątrz komórki, będącego skutkiem otwierania się kanałów wapniowych położonych zarówno w błonie komórkowej, jak i w błonach kompartmentów wewnątrzkomórkowych. W przypadku przytarczyc prowadzi to do obniżenia wydzielania parathormonu. Dotychczas nie wyjaśniono ostatecznie mechanizmu podwyższania się wydzielania PTH po obniżeniu stężenia wapnia pozakomórkowego. Wynika z tego, że układ  $\alpha$ -Kl/ATPazy  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  reguluje transport wapnia i wydzielanie PTH, przynajmniej w części opierając się na mechanizmie niezależnym od CaR [25–27].

Utrzymanie homeostazy wapniowej ma charakter wielofazowej odpowiedzi, kategoryzowanej w zależności od czasu jej wystąpienia po zadziałaniu bodźca: (I) sekundy–minuty, (II) minuty–godziny, (III) godziny–dni. W odpowiedzi na bodziec hipokalcemiczny, stwierdza się w splocie naczyniówkowym i w części kanalika nerkowego, w którym ma miejsce ekspresja  $\alpha$ -Kl, wzrost gradientu elektrochemicznego wytwarzanego przez ATPazę  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ . Proces ten rozpoczyna się natychmiast po spadku stężenia wapnia pozakomórkowego i trwa na tyle krótko, że może być zaliczony do fazy „sekundy–minuty”. Wywołany działaniem PTH wzrost resorpcji  $\text{Ca}^{++}$  z kości i wzrost reabsorpcji  $\text{Ca}^{++}$  w kanaliku nerkowym utrzymuje się w ciągu godzin — zatem zakwalifikowany jest do fazy „minuty–godziny”. Z kolei podwyższenie syntezy  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  i intensyfikacja przez ten hormon jelitowej absorpcji wapnia klasyfikuje się do fazy „godziny–dni”. Niezależnie od tego  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  podwyższa ekspresję i aktywność TRPV5 obecnych w błonie apikalnej komórek DCT (kanalik dystalny), co podwyższa reabsorpcję wapnia w nerce. Podwyższone stężenia wapnia wywołują supresję transepitelialnego transportu wapnia i wydzielania PTH. Z kolei podwyższone stężenie  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  zmniejsza ekspresję genu  $1\alpha$ -hydroksylazy na dwa sposoby: ujemnego sprzężenia zwrotnego oraz w drodze szlaku transdukcji sygnału z udziałem  $\alpha$ -Kl/FGF23. Metabolizm wapnia jest regulowany przez sieć wzajemnie powiązanych, mających charakter sprzężeń zwrotnych, procesów umożliwiających szybką odpowiedź regulacyjną i długotrwałe utrzymywanie stężenia wapnia pozakomórkowego w ściśle określonych granicach [25, 26, 28].

Globalny obraz działania Kłoto w sieci regulacyjnej homeostazy wapniowej ma zatem charakter złożony. Białko to bierze udział w regulacji szybkiej transepitelialnego transportu wapnia i wydzielania PTH. Z kolei jego udział ma miejsce również w akcjach przebiegających w dłuższych horyzontach czasowych i obejmujących wydzielanie PTH i  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , przy czym  $\alpha$ -Kl bierze udział w przekazywaniu sygnału przez Fgf23 obniżającego stężenia wapnia przez hamowanie produkcji  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Ponadto  $\alpha$ -Kl obecny w moczu zwiększa

obfitość występowania TRPV5 na luminalnej powierzchni komórki, hydrolizując reszty cukrowe związane z TRPV5, co również podwyższa reabsorpcję  $\text{Ca}^{++}$  w nerce. Alfa-Kl jest zatem kluczowym „graczem” integrującym w systemie wielofazowej regulacji stężenia wapnia zewnątrzkomórkowego. W tym sensie różni się od występujących tu innych cząsteczek regulacyjnych (PTH, CT,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ) oraz cząsteczek bezpośrednio stykających się z jonami  $\text{Ca}^{++}$  podczas transepitelialnego transportu wapnia (TRPV5, kalbandyna czy NCX1 [wymiennik sodowo-wapniowy]) [25].

### Kompleks Kłoto/ATPaza $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$

Białko Kłoto obecne jest na powierzchni komórki, ale znaczne jego ilości można znaleźć w cytoplazmie komórek. Domena zewnątrzkomórkowa jest odszczepiana i wydzielana do krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego i moczu. Sugeruje to, że Kłoto może pełnić różne funkcje w zależności od formy i lokalizacji. Kompleks ATPazy  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  (podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$ ) ma właściwości białka wiążącego dla wewnątrzkomórkowych form Kłoto. ATPaza  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  jest szeroko rozpowszechnionym enzymem, znajdującym się w wielu komórkach. Zalicza się ją do enzymów metabolizmu podstawowego. ATPaza ta, przenosząc 2 jony  $\text{K}^+$  do wnętrza komórki, usuwa na zewnątrz 3 jony  $\text{Na}^+$ . Jej ekspresja jest zróżnicowana w zależności od typu tkanki, ale szczególnie wysoka w komórkach nabłonka dystalnej części kanalika krętego w nerce, splocach naczyniówkowych i przytarczycach. W komórkach tych stwierdzono również wysoką ekspresję Kłoto, co wskazuje na możliwość istnienia związku przyczynowego i współpracy obu białek [25, 26, 29–31].

Gradient elektrochemiczny tworzony przez działającą ATPazę  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  uruchamia aktywność innych ATPaz, wymienników jonowych i kanałów jonowych. Wpływa też na funkcje błony komórkowej (np. wydzielanie hormonów). Wykryta możliwość interakcji  $\alpha$ -Kłoto i ATPazy  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  zrodziła pytanie, w jaki sposób Kłoto może wpływać na jej aktywność. Okazało się, że nie reguluje ono bezpośrednio aktywności katabolicznej ATPazy, a tylko proces rekrutacji ATPazy z wnętrza komórki do jej powierzchni [25].

Ekspresja genów kodujących kompleksy kanałów wapniowych TRPV regulowana jest przez  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  i nie zależy bezpośrednio od stężenia wapnia w diecie, czy estrogenów w surowicy krwi. Z kolei pojawianie się kompleksów TRPV5 i w błonie komórek kanalika nerkowego opiera się na ich przemieszczeniu z kompartmentów wewnątrzkomórkowych. Kompleksy te aktywowane są dzięki aktywności  $\beta$ -glukuronidazy wykazywanej przez wydzielaną, pozakomórkową odmianę białka Kłoto. Hydrolizuje ono wiązania N-gliko-

zydowe związane ze strukturami kanałów zewnętrznych (pozakomórkowych reszt cukrowych), co wydłuża czas retencji kanałów TRPV5 na błonach luminalnych komórek kanalikowych, zwiększając efektywność dopływu jonów wapnia do wnętrza komórki. Najnowsze badania na ludzkich liniach komórkowych wykazały, że wydzielane białko Kloto aktywuje kanały TRPV5 poprzez usuwanie terminalnych reszt kwasu sialowego — łańcuchów N-glikanowych związanych z kompleksami kanałów. Umożliwia to związanie się galektyny-1 z zewnątrzkomórkową częścią kompleksu kanałowego, a to z kolei utrudnia endocytozę TRPV5, zwiększając tym samym jego retencję na powierzchni komórki [9, 15, 25, 32, 33].

## Rola białka Kloto w homeostazie fosforanów

Utrzymanie homeostazy fosforanowej jest ważne dla prawidłowego przebiegu różnych procesów fizjologicznych łącznie z bioenergetyką, tworzeniem dwustrawstw lipidowych i kościotworzeniem. Z hipofosfatemią spowodowaną nadmierną utratą fosforanów w nerce wiążą się krzywica, obniżona wytrzymałość kości, deformacje, niski wzrost i bóle kostne. Z drugiej strony, wysokie stężenia fosforanów również mogą mieć ujemne skutki fizjologiczne. Pacjenci z przewlekłą niewydolnością nerek w związku z obniżonym klirensen nerkowym wykazują hiperfosfatemię, a w konsekwencji nadczynność przytarczyc i osteodystrofię nerkową. Nerka odgrywa kluczową rolę w regulacji stężenia fosforanów w surowicy krwi. Reabsorpcja fosforanów zachodzi głównie w kanalikach proksymalnych, z udziałem przenośników NaPi-IIa i NaPi-IIc. Niedawno odkryty czynnik fosfatyczny — czynnik wzrostowy fibroblastów 23 (Fgf23, *fibroblast growth factor 23*), wytwarzany przez osteocyty w odpowiedzi na podwyższenie stężenia fosforanów — hamuje reabsorpcję fosforanu w nerce na drodze supresji obu kotransporterów. Poprzedza się to jednak w nerce obniżeniem ekspresji  $1\alpha$ -hydroksylazy 25(OH)D i podwyższeniem aktywności 24-hydroksylazy 25(OH)D (enzymu metabolizującego aktywną formę witaminy D). W związku z tym, że  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  stymuluje jelitową absorpcję fosforanów, podwyższenie stężenia Fgf23 w układzie krążenia wywołuje efekt spadku stężenia fosforanów w surowicy krwi. Czynnik ten równocześnie spowalnia produkcję PTH w przytarczycach. Działanie Fgf23 jest możliwe dzięki istnieniu specyficznych receptorów (Fgfr) osadzonych w błonach komórek docelowych. Receptory te wykazują swoje działanie w zakresie regulacji homeostazy mineralnej tylko w obecności niezbędnych kofaktorów białkowych, do których należy Kloto. O istotności udziału Kloto w regulacji homeostazy fosforanów świadczy fakt, że mutanty myszy  $\text{KL}^{-/-}$  mają te

same cechy fenotypowe w tym zakresie fizjologicznym, co  $\text{Fgf23}^{-/-}$ . Osteocyt odpowiada na bodziec podwyższonego stężenia fosforanów w surowicy krwi lub podwyższone stężenie kalcitriolu, wydzielając Fgf23. Hormon ten współdziała z receptorem będącym heterodimerem. Obecność Kloto w danej tkance określa jej możliwość odpowiedzi na sygnał ze strony znajdującego się w układzie krążenia Fgf23. Hormon ten działa poprzez kompleks Kloto-FGFR1c na nerkę, zwiększając fosfaturię i obniżając aktywność CYP27B1 ( $1\alpha$ -hydroksylazy 25(OH)D). Działa także na przytarczycę poprzez aktywację szlaku MAPK, zmniejszając ekspresję genu kodującego PTH i stężenie PTH w surowicy krwi. Jest to nowy system sprzężeń zwrotnych na osi kość–przytarczycę–nerki, w którym kość uzyskała rangę organu endokrynnego [33–36].

## Efekty mutacji genu kodującego białko Kloto u człowieka

W przypadku mutacji powodującej wyłączenie ekspresji genu *Klotho* stwierdzono obecność ciężkiej wapnicy, objawiającej się między innymi złogami w tętnicy szyjnej i niektórych tętnicach wewnątrz czaszki. Wydaje się, że mechanizm ich powstawania jest analogiczny jak w przypadku mutacji genu kodującego białko Fgf23. Jest ono hormonem fosfatycznym, pobudzającym wydalanie fosforanów przez nerki, równocześnie obniżającym stężenie  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  w układzie krążenia na drodze obniżania aktywności  $1\alpha$ -hydroksylazy 25(OH)D. Podobne efekty wywołuje mutacja genu *GALNT3* (UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galaktozamina: polipeptyd N-acetylo-galaktozaminylotransferaza 3). Jest to enzym związany z aparatem Golgiego dokonujący O-glikozylacji kluczowych sekwencji Fgf23, co z kolei zapobiega degradacji proteolitycznej Fgf23 i umożliwia jego sekrecję w formie nienaruszonej. We wszystkich tych przypadkach obserwuje się również hiperkalcemię i podwyższone wytwarzanie  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Z kolei białko Kloto stanowi niezbędny element kompleksu receptorowego dla Fgf23. Nadprodukcja Kloto ma również niekorzystne skutki fizjologiczne. Może być ona wynikiem translokacji w pobliżu genu kodującego białko Kloto, powodującej podwyższoną wydajność transkrypcji. Objawia się ona krzywicą hipofosfatemiczną z wyraźną hiperplazją i obniżeniem stężenia  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  w układzie krążenia. U pacjenta z tego rodzaju mutacją, stwierdzono również znacznie podwyższone stężenia Fgf23 w układzie krążenia. Jest to skutkiem istnienia złożonej sieci sprzężeń zwrotnych pomiędzy Kloto i Fgf23. W tym przypadku podwyższone stężenie Fgf23 w połączeniu z wysoką ekspresją *Klotho* doprowadziły do silnej supresji zarówno syntezy  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , jak i nerkowej reabsorpcji fosforanów.

Dalszym efektem była intensywna utrata fosforanów i obniżone stężenie  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ . Z kolei wzrost PTH w surowicy krwi przyczynił się do szybkiego usunięcia transportera  $\text{NaPi-IIa}$  z błony apikalnej komórek kanałika nerkowego i jego degradacji [33, 37–39].

Znalezienie przypadków mutacji typu „utrata funkcji” oraz typu „zwiększona aktywność” w przypadku myszy i człowieka dostarczyło przekonujących dowodów na to, że białko Klotho stanowi kluczowy regulator homeostazy wapnia i fosforanów, chociaż jego roli w przypadku fosforanów do końca jeszcze nie wyjaśniono.

## Podsumowanie

Klotho bierze udział w regulacji homeostazy wapniowej w płynie mózgowo-rdzeniowym, krwi i innych płynach ustrojowych, działając na spłot naczyń włosowatych, przytarczycę i dystalne fragmenty krętej części nefronów. Wydaje się, że białko to może odgrywać rolę kluczowego regulatora o funkcji integrującej homeostazę wapniową, chociaż konieczna jest dalsza weryfikacja tej tezy. Przez swój udział w tworzeniu kompleksów receptorów dla hormonu fosforanowego  $\text{Fgf23}$ , Klotho współuczestniczy również w regulacji homeostazy fosforanowej. Lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych plejotropowego działania Klotho może się przyczynić do zmiany aktualnie obowiązujących paradygmatów dotyczących gospodarki mineralnej i zwiększenia praktycznych możliwości wpływania na procesy związane ze starzeniem się organizmu.

## Piśmiennictwo

- Drüeke TB, Prié D. Klotho spins thread of life — what does Klotho do to the receptors of fibroblast growth factor-23 (FGF23)? *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 1524–1526.
- Negri AL. The Klotho gene: A gene predominantly expressed in the kidney is a fundamental regulator of aging and calcium/phosphorus metabolism. *J Nephrol* 2005; 18: 654–658.
- Nabeshima Y. Challenge of overcoming aging-related disorders. *J Dermatol Sci* 2000; 24: 15–21.
- Hofbauer LC, Brueck CC, Shanahan CM. Vascular calcification and osteoporosis — from clinical observation towards molecular understanding. *Osteoporosis Int* 2007; 18: 251–259.
- Franek E, Kokot F. Postępy w badaniach nad gospodarką wapniowo-fosforanową — część II. *Postępy Nauk Medycznych* 2007; 20: 175–179.
- Nabeshima Y. Toward a better understanding of Klotho. *Sci Aging Knowledge Environ* 2006; 8: pe11.
- Yamashita T, Yoshitake H, Tsuji K. Retardation in bone resorption after bone marrow ablation in Klotho mutant mice. *Endocrinology* 2000; 141: 438–445.
- Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C i wsp. Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in Klotho mouse exhibiting low turnover osteopenia. *J Clin Invest* 1999; 104: 229–237.
- Hiroshi Kurosua, Makoto Kuro-O. The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 299: 72–78.
- Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y. Structure of the mouse Klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Letters* 1998; 424: 6–10.
- Nabeshima Y. Klotho: a fundamental regulator of aging. *Ageing Res Rev* 2002; 1: 627–638.
- Haruna Y, Kashihara N, Satoh M. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 2331–2336.
- Wang YA. Klotho, the long sought-after elixir and a novel tumor suppressor? *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 20–21.
- Akihiro I, Akiko I, Osamu T i wsp. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Letters* 2004; 565: 143–147.
- Yuhong W, Zhongjie S. Current understanding of Klotho. *Ageing Res Rev* 2009; 8: 43–51.
- Tohyama O, Imura A, Iwano A i wsp. Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J Biol Chem* 2004; 279: 9777–9784.
- Chen CD, Podvin S, Gillespie E i wsp. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 19796–19801.
- Li SA, Watanabe M, Yamada H i wsp. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell Struct Funct* 2004; 29: 91–99.
- Lewin E, Olgaard K. Klotho, an important new factor for the activity of  $\text{Ca}^{2+}$  channels, connecting calcium homeostasis, ageing and uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 1770–1772.
- Brown EM. Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of  $\text{Ca}^{2+}$  and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol Rev* 1991; 71: 371–411.
- Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 1994; 74: 595–636.
- Markowitz M, Rotkin L, Rosen JF. Circadian rhythms of blood minerals in humans. *Science* 1981; 213: 672–674.
- Brown EM, Gamba G, Riccardi D i wsp. Cloning and characterization of an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993; 366: 575–580.
- van Abel M, Hoenderop JG, Bindels RJ. The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2005; 371: 295–306.
- Yo-ichi N, Hiroaki I.  $\alpha$ -Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis. *Am J Nephrol* 2008; 28: 455–464.
- Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M. Cloning and characterization of an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993; 366: 575–580.
- Brown EM, MacLead RJ. Extracellular calcium sensing and extra cellular calcium signaling. *Physiol Rev* 2001; 81: 239–297.
- Imura A, Tsuji Y, Murata M i wsp.  $\alpha$ -Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science* 2007; 316: 1615–1618.
- Imura A, Iwano A, Kita N i wsp. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for posttranslational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett* 2004; 565: 143–147.
- Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW i wsp. The  $\beta$ -glucuronidase Klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* 2005; 310: 490–493.
- Skou JC, Esmann M. The  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 1992; 24: 249–261.
- Cha SK, Ortega B, Kurosu H i wsp. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 9805–9810.
- Nabeshima Y. The discovery of  $\alpha$ -Klotho and FGF23 unveiled new insight into calcium and phosphate homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 3218–3230.
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H i wsp. Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390: 45–51.
- Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T i wsp. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006; 444: 770–774.
- Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML i wsp. A homozygous missense mutation in human Klotho causes severe tumoral calcinosis. *J Clin Invest* 2007; 117: 2684–2691.
- Strom TM, Jüppner H. PHEX, FGF23, DMP1 and beyond. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 357–362.
- Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML i wsp. A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis. *J Clin Invest* 2007; 117: 2684–2691.
- Razzaque MS, Lanske B. Hypervitaminosis D and premature aging: lessons learned from Fgf23 and Klotho mutant mice. *TRENDS in Molecular Medicine* 2006; 12: 298–305.