



**Jolanta Małyszko**

Klinika Nefrologii i Transplantologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

# Białko Klotho a przewlekła choroba nerek

## STRESZCZENIE

W 1997 roku dr Kuro-o i wsp. odkryli gen Klotho i nazwali go imieniem jednej z Mojr (tej, która nawijała na wrzeciono nić życia). Ekspresja białka Klotho zachodzi w różnych tkankach, szczególnie cewkach dystalnych w nerce, splocie naczyniówkowym w mózgu oraz w przytarczycach. Białko Klotho ma też aktywność  $\beta$ -glukuronidazy. Zwierzęta pozbawione tego genu wykazują cechy przedwczesnego starzenia się. Jest ono kofaktorem dla czynnika wzrostowego fibroblastów 23 (FGF23). Czynniki FGF23 to jeden z najnowszych członków rodziny FGF — pochodzący z kości hormon fosfatyryczny, który hamuje nerkową reabsorpcję fosforanów i powoduje ich wydalanie oraz — poprzez hamowanie  $1\alpha$ -hydroksylazy i stymulowanie 24-hydroksylazy — po-

woduje zmniejszenia stężenia  $1,25(\text{OH})$  witaminy  $\text{D}_3$ . System Klotho/FGF23 ma zatem przeciwstawne działanie do witaminy D poprzez działanie:  $1\alpha$ -hydroksylazy (w nerce), 24-hydroksylazy (w nerce) oraz PTH (w przytarczycach). Efektem tego jest zmniejszenie stężenia witaminy  $\text{D}_3$ . Stężenie białka Klotho jest zmniejszone w przewlekłej chorobie nerek. Myszy bez genu Klotho i pacjenci ze schyłkową niewydolnością nerek mają wspólne cechy, takie jak: hiperfosfatemia, zwapnienia naczyń czy wysokie stężenie FGF23. Z drugiej strony białko Klotho powoduje powstanie insulinooporności i wszystkie związane z tym konsekwencje. Czyżby to była cena za wydłużenie życia przy „nadaktywnym” genie Klotho?

Forum Nefrologiczne 2009, tom 2, nr 2, 69–73

**Słowa kluczowe:** białko Klotho, przewlekła choroba nerek, FGF23, witamina  $\text{D}_3$

## WSTĘP

W greckiej mitologii Klotho (gr. *Κλωθώ* ‘ta, która przędzie nić’) była najmłodszą z Mojr (w mitologii rzymskiej Parki; ryc. 1). Klotho nawijała na wrzeciono nić życia. Według *Teogonii* Hezjoda ona i jej siostry, Atropos (splatała nić w tkaninę) i Lachesis (zrywała nić życia), były córkami Nocy. W 1997 roku dr Kuro-o i wsp. odkryli gen, który nazwali właśnie imieniem Klotho [1]. Gen Klotho (ma on ponad 50kDa, 5 eksonów) znajduje się na chromosomie 13. Myszy Klotho (ryc. 2) powstały przez przypadek, jako jedna z linii transgenicznnych myszek (mutacja insercyjna jednego genu i potem rozpad genów w tym miejscu), która wydawała się bezużyteczna aż do momentu, gdy okazało się, że homozygoty już w 4. tygodniu mają fenotyp starzenia się, a giną około 2. miesiąca. Może zatem gen Klotho opóźnia efekt starzenia się, wpły-

wa na osteoporozę, zapobiega miażdżycy naczyń czy utracie sprawności mięśni? Hiperfosfatemia i hiperkalcemia są obserwowane w 3.–4. tygodniu życia myszek, czyli 2 tygodnie wcześniej, zanim pojawiają się pierwsze oznaki starzenia się, takie jak zwapnienia naczyń przypominające zwapnienia środkowej części aorty typu Monckeberga (*arteriosclerosis*), zwapnienia u osób w podeszłym wieku, cukrzyca, przewlekłej chorobie nerek, w której występują także zwapnienia małych tętnic w nerkach [2–5]. Z kolei myszki z „nadaktywnym” genem Klotho żyją dłużej niż normalne (samczki o 19% i samce o 31%), ale mają mniej mysząt i rozwija się u nich insulinooporność, a w konsekwencji cukrzyca (czyżby to była cena za długowieczność?) [6].

U myszek Klotho cechy starzenia się obejmują: skrócenie czasu przeżycia, opóźnienie wzrostu, hipogonadyzm, przedwczesną inwolucję grasicy, zanik skóry, zaniki mięśniowe,

## Adres do korespondencji:

prof. dr hab. med. Jolanta Małyszko  
Klinika Nefrologii  
i Transplantologii UM  
ul. Żurawia 14, 15–540 Białystok  
e-mail: jolmal@poczta.onet.pl



**Rycina 1.** Mojry (Parki). Klotho (oznaczona strzałką) nawijała na wrzeciono nić życia. Według *Teogonii* Hezjoda ona i jej siostry, Atropos (splatała nić w tkaninę) i Lachesis (zrywała nić życia), były córkami Nocy



**Rycina 2.** Myszkki Klotho

»Obniżona ekspresja genu Klotho może się przyczyniać do wielu powikłań przewlekłej choroby nerek«

zwapnienia naczyń, osteoporozę, rozedmę płuc, zwapnienia ektopowe, degenerację neuronów ruchowych i upośledzenie słuchu. W dodatku kilka polimorfizmów (dotyczących jednego nukleozydu) ludzkiego genu Klotho jest związanych z czasem przeżycia, występowaniem osteoporozy, udaru, choroby niedokrwiennej serca, sugerując potencjalną rolę tego genu w regulacji procesu starzenia się oraz schorzeń związanych z wiekiem [7–9]. Ponadto homozygotyczna mutacja typu *missence* ludzkiego genu Klotho powoduje istotne zwapnienia naczyń oraz hiperfosfatemię — zmiany obserwowane także u myszek pozbawionych genu Klotho (*Klotho-deficient mice*) [10]. Gen Klotho koduje pojedyncze białko przezbłonowe. Domena zewnątrzkomórkowa ma dwie domeny homologiczne z sekwencją podobną do  $\beta$ -glukuronidazy roślin i bakterii. Aktywność Klotho jest podobna do  $\beta$ -glukuronidazy, aczkolwiek nie obserwuje się jej w rekombinowa-

nym białku Klotho. Jest to prawdopodobnie związane z faktem, że we wszystkich genach z rodziny  $\beta$ -glukuronidaz reszty aminokwasowe, niezbędne do posiadania tej aktywności enzymatycznej, są takie same, zaś w rekombinowanym białku Klotho zostały one zastąpione innymi aminokwasami. Natomiast dodanie sztucznych substratów do tej rekombinowanej domeny białka Klotho powoduje pojawienie się aktywności  $\beta$ -glukuronidazy [11]. Ekspresja białka Klotho zachodzi w różnych tkankach, szczególnie cewkach dystalnych w nerce, splocie naczyniówkowym w mózgu oraz w przytarczycach [1].

## BIAŁKO KLOTHO A NERKI

Białko Klotho (ryc. 3) istnieje w nerce w dwóch formach:

- związane z błoną (komórki nabłonka cewek — *renal epithelial cell*),
- wydzielnicze (*secreted*) — krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, mocza.

Koh i wsp. [12] oceniali biopaty pochodzące od 10 pacjentów z klinicznymi i histopatologicznymi rozpoznaniem przewlekłej choroby nerek. Stwierdzili oni, że poziom ekspresji genu Klotho (oceniany metodą *RNase protection assay*) i ekspresja białka Klotho (oceniana przy użyciu *Western blot* i immunohistochemicznie) były istotnie obniżone u tych pacjentów. Sugeruje to, że obniżona ekspresja genu Klotho może się przyczyniać do wielu powikłań przewlekłej choroby nerek. Czynnikiem wzrostowy fibroblastów 23 (FGF23) (ryc. 4) to jeden z najnowszych członków rodziny FGF — pochodzący z kości hormon fosfatyczny, który hamuje nerkową reabsorpcję fosforanów i powoduje ich wydalanie oraz — poprzez hamowanie  $1\alpha$ -hydroksylazy i stymulowanie 24-hydroksylazy — powoduje zmniejszenia stężenia  $1,25(\text{OH})_2$  witaminy  $\text{D}_3$ . Mutacja typu *gain-of-function* powoduje utratę fosforanów (krzywica hipofosfatemiczna ADHR, autosomalna, dominująca u ludzi), zaś mutacja typu *loss-of-function* powoduje retencję fosforanów (hiperfosfatemia u myszy *FGF23 knockout*) [13–18]. Myszy pozbawione genu Klotho mają ponad 1000 razy wyższe stężenia FGF23 niż typ dziki. Z kolei fenotyp myszek pozbawionych genu Klotho, bardzo podobny do myszek pozbawionych genu dla FGF23, jest praktycznie taki sam [19]. Pojawia się zatem pytanie, czy Klotho ma związek z przekazem sygnału FGF23? Sugerować to może działanie tych dwóch hormonów na podobnym szlaku sygnalizacyjnym. Otóż okazało się, że białko Klo-

to wiąże się z różnymi receptorami dla FGF (1, 2, 3, 4; może być nawet 30–40 izoform tych receptorów), a głównie wiąże się z receptorami 1c, 3c i 4c dla FGF. Kompleks Klotho/FGFR wiąże się z FGF23, zaś FGF23 potrzebuje Klotho do aktywacji drogi przekąnikowej FGF. Zatem Klotho funkcjonuje jako niezbędny koreceptor dla FGF23. Aktywacja systemu FGF23/Klotho prowadzi do ujemnego bilansu fosforanowego poprzez: pobudzenie wydalania fosforanów w cewce proksymalnej oraz hamowanie nerkowej produkcji witaminy D w cewkach proksymalnych [20, 21].

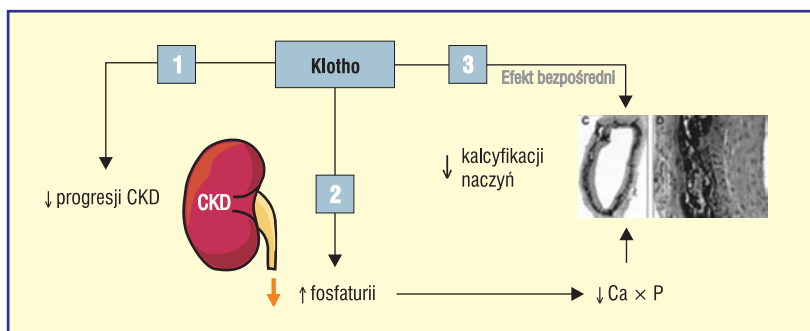
### HISTORIA WITAMINY D — ROLA KLOTHO?

U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (eGFR < 60 ml/min) częstość występowania niedoboru witaminy 25(OH)D<sub>3</sub> wynosi 12% (stężenie < 15 ng/ml) zaś witaminy 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> — 32% (stężenie < 22 pg/ml) [22]. W grupie chorych po zabiegu transplantacji nerki (w różnym czasie po transplantacji) stwierdzono niedobór witaminy D<sub>3</sub> aż u 75,5% [23]. W skórze zachodzi konwersja witaminy D<sub>3</sub> do nieaktywnych steroli, głównie na drodze enzymatycznej poprzez cytochrom CYP24A1 do 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 1,24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> [24]. Cytochrom ten jest pobudzany przez 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, dietę wysokofosforanową oraz FGF23. Liu i wsp. [16] wykazali, że kalcytriol powoduje zależne od dawki zwiększenie stężenia FGF23.

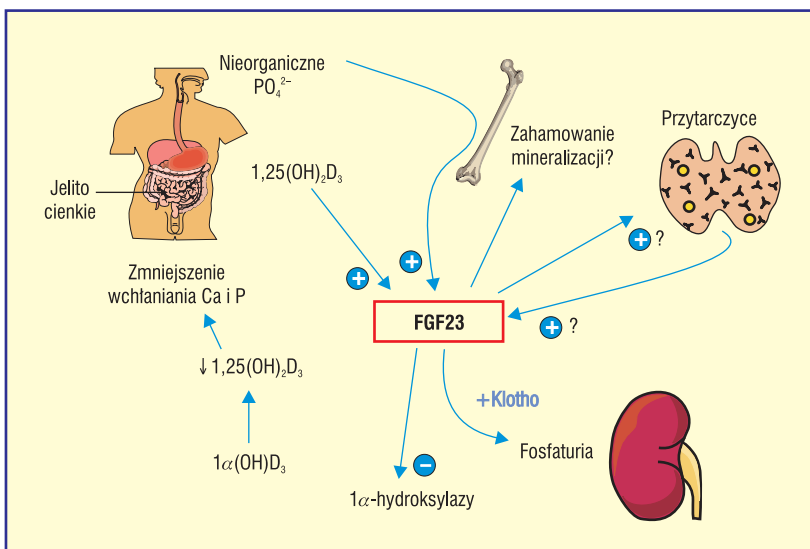
System Klotho/FGF23 ma zatem przeciwnie działanie do witaminy D poprzez działanie 1 $\alpha$ -hydroksylazy (w nerce), 24-hydroksylazy (w nerce), oraz PTH (w przytarczycach). Efektem tego jest zmniejszenie stężenia witaminy D<sub>3</sub>.

### ENIGMA KLOTHO/FGF23

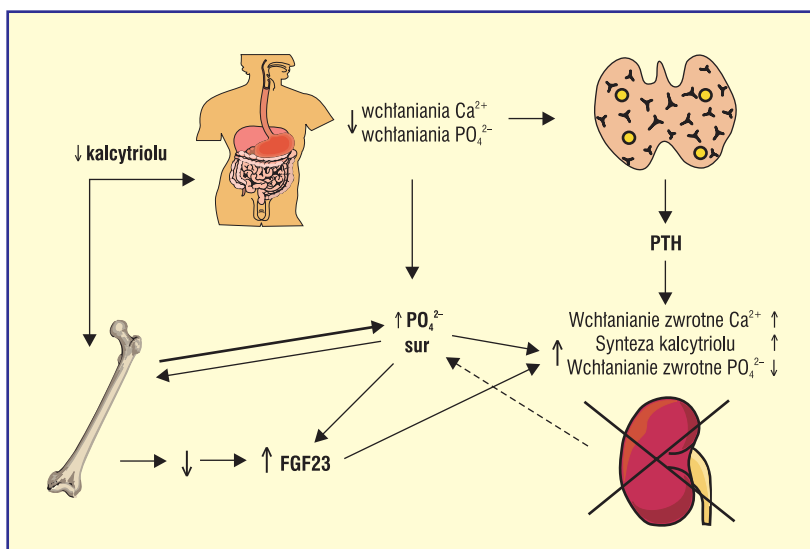
Reabsorpcja fosforanów i synteza witaminy D zachodzi głównie z cewkach proksymalnych. Największa ekspresja genu Klotho zachodzi w cewkach dystalnych. Co zatem robi białko Klotho w cewkach dystalnych, jaka jest jego rola? Otóż Klotho może być złączane i rozszczepiane na powierzchni komórki przez proteazę błonową ADAM10 i wydzielane do przestrzeni pozakomórkowej. U szczurów, którym podawano dożylnie rekombinowane białko Klotho, zaobserwowano spadek stężenia fosforanów w surowicy oraz fosfaturię. Ponadto, wydzielnicze (*secreted*) Klotho powoduje fosfaturię niezależnie od FGF23. W warunkach fizjologicznych 70–80% fosforanów jest reab-



Rycina 3. Białko Klotho — zapobieganie rozwojowi i progresji przewlekłej choroby nerek



Rycina 4. Mechanizm działania FGF23



Rycina 5. Gospodarka Ca-P w przewlekłej chorobie nerek (stadium 5)

sorbowanych w cewkach proksymalnych. W cewkach proksymalnych kotransporter fosforanów typu 2a znajduje się na rąbku szczo-



teczkowym lub błonie apikalnej i pierwotnie odpowiada za wychwyt fosforanów z przesączu cewkowego. Białko Klotho powoduje usuwanie glikanów z kotransportera Na/P i kanału wapniowego-TRPV5. Białko Klotho wykazuje aktywność  $\beta$ -glukuronidazy, poprzez częściową glikozylację TRPV5 ułatwia „wciągnięcie” tego kanału wapniowego do błony komórkowej i tym samym ułatwia translokację  $\text{Ca}^{2+}$  do komórek. Syntezę białka Klotho stymulują zarówno PTH, jak i 1,25(OH)2D. Ekspresję TRPV5 zwiększa też bradykinina i alkalizacja tworzącego się moczu, zaś wzrost stężenia  $\text{H}^+$  w tworzącym się moczu zmniejsza liczbę kanałów TRPV5 i wchłanianie zwrotne  $\text{Ca}^{2+}$  przez cewki nerkowe [25–27]. Zatem wydzielnicze Klotho jest endokrynnym regulatorem funkcji glikoprotein na powierzchni komórek.

### **DLACZEGO NIEDOBÓR KLOTHO/FGF23 WYGLĄDA JAK STARZENIE SIĘ?**

Ograniczenie spożycia fosforanów znosi wiele fenotypowych objawów starzenia się u myszek Klotho<sup>-/-</sup> i FGF23<sup>-/-</sup> [28]. Zmniejszenie podaży witaminy D w diecie powoduje spadek stężenia fosforanów w surowicy i znosi wiele fenotypowych objawów starzenia się u myszek Klotho<sup>-/-</sup> i FGF23<sup>-/-</sup> [29]. Prowadzi to do kolejnych pytań. Czy zatem fenotyp „starzenia się” jest spowodowany przez „toksyczność fosforanów” [30]. Czy fosforany przyspieszają starzenie się? Czy zmniejszenie podaży fosforanów spowalnia starzenie się?

### **PRZEWLEKŁA CHOROBA NEREK — CZY JEST TO NIEDOBÓR KLOTHO?**

Stężenie Klotho jest zmniejszone w przewlekłej chorobie nerek [12]. Myszy bez genu Klotho i pacjenci ze schyłkową niewydolnością

nerek mają wspólne cechy, takie jak: hiperfosfatemia, zwężenie naczyń oraz wysokie stężenie FGF23. Wydaje się, że wydzielnicze Klotho zapobiega rozwojowi przewlekłej choroby nerek. U myszy transgenicznych (*Tg-Kl mice*) w modelu przewlekłej choroby nerek (nefrotomia jednostronna i częściowa po drugiej stronie) nie rozwijają się cechy choroby (taki sam klirens kreatyniny, białkomocz, stężenia wapnia, fosforanów czy kreatyniny jak w grupie kontrolnej u zwierząt pozornie operowanych — *sham operated*) [31, 32].

Białko Klotho można oznaczać w surowicy, przy użyciu metody SRM (*selection reaction monitoring*). Z próbek poprzez przesączanie na kolumnach usuwa się część białka (12 górnych frakcji), potem występuje trawienie trypsyną, wymiana kationów i na analizatorze SRM Quantum Ultra. U zdrowych osób średnie stężenie Klotho w surowicy wynosi 17 ng/ml (142 pM), zaś w ESRD — około 2 ng/ml (ASN, San Diego 2008).

### **„DRUGA STRONA KSIĘŻYCA”**

Klotho zaburza fosforylację, w której pośredniczy insulina, blokuje stymulowany insuliną wychwyt glukozy i powoduje obniżenie malonylu koenzymu A, promując w ten sposób powstawanie oksydowanych kwasów tłuszczowych. Białko Klotho powoduje powstanie insulinooporności i wszystkie związane z tym konsekwencje [33]. Czyżby to była cena za wydłużenie życia przy „nadaktywnym” genie Klotho? Konsekwencjami wydłużenia życia, w którym istotną rolę wydaje się odgrywać białko Klotho, są pojawiające się problemy związane z insulinoopornością, a następnie rozwojem cukrzycy z jej konsekwencjami. Są to zatem problemy z którymi boryka się współczesna cywilizacja i medycyna, stworzona na jej potrzeby.

## **Piśmiennictwo**

1. 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.
2. Nagai T., Yamada K., Kim H.C. i wsp. Cognition impairment in the genetic model of aging Klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *Faseb J.* 2003; 17: 50–52.
3. Kamemori M., Ohya Y., Kurabayashi M. i wsp. Expression of Klotho protein in the inner ear. *Hear. Res.* 2002; 171: 103–110.
4. Anamizu Y., Kawaguchi H., Seichi A. i wsp. Klotho insufficiency causes decrease of ribosomal RNA gene transcription activity, cytoplasmic RNA and rough ER in the spinal anterior horn cells. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2005; 109: 457–466.
5. Yoshida T., Fujimori T., Nabeshima Y. Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous Klotho mutant mice by increased expression of renal 1 $\alpha$ -hydroxylase gene. *Endocrinology* 2002; 143: 683–689.
6. Kurosu H., Yamamoto M., Clark J.D. i wsp. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 2005; 309: 1829–1833.
7. Arking D.E., Atzmon G., Arking A., Barzilai N., Dietz H.C. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ. Res.* 2005; 96: 412–418.
8. Arking D.E., Becker D.M., Yanek L.R. i wsp. KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 72: 1154–1161.

9. Arking D.E., Krebsova A., Macek M. Sr i wsp. Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 856–861.
10. Ichikawa S., Imel E.A., Kreiter M.L. i wsp. A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 2684–2691.
11. Tohyama O., Imura A., Iwano A., Freund J.N., Henrissat B., Fujimori T., Nabeshima Y. Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 9777–9784.
12. Koh N., Fujimori T., Nishiguchi S. i wsp. Severely reduced production of Klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 280: 1015–1020.
13. Yamashita T., Yoshioka M., Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 277: 494–498.
14. White K.E., Evans W.E., O'Riordan J.L.H. i wsp. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat. Genet.* 2000; 26: 345–348.
15. Goetz R., Beenken A., Ibrahim O.A. i wsp. Molecular insights into the Klotho-dependent, endocrine mode of action of FGF19 subfamily members. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27: 3417–3428.
16. Liu S., Tang W., Zhou J. i wsp. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17: 1305–1315.
17. White K.E., Carn G., Lorenz-Depiereux B. i wsp. Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23. *Kidney Int.* 2001; 60: 2079–2086.
18. Yu X., Ibrahim O.A., Goetz R. i wsp. Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23. *Endocrinology* 2005; 146: 4647–4656.
19. Shimada T., Kakitani M., Yamazaki Y. i wsp. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J. Clin. Invest.* 2004; 113: 561–568.
20. Kurosu H., Ogawa Y., Miyoshi M. i wsp. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 6120–6123.
21. Urakawa I., Yamazaki Y., Shimada T. i wsp. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006; 444: 770–774.
22. Levin A., Bakris G.L., Molitch M. i wsp. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int.* 2007; 71: 31–38.
23. Boudville N.C., Hodsmann A.B. Renal function and 25-hydroxyvitamin D concentrations predict parathyroid hormone levels in renal transplant patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006; 21: 2621–2624.
24. Perwad F., Azam N., Zhang M.Y., Yamashita T., Tenenhouse H.S., Portale A.A. Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice. *Endocrinology* 2005; 146: 5358–5364.
25. Schiavi S.C., Kumar R. The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int.* 2004; 65: 1–14.
26. Liu S., Vierthaler L., Tang W. i wsp. FGFR3 and FGFR4 do not mediate renal effects of FGF23. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 19: 2342–2350.
27. Ben-Dov I.Z., Galitzer H., Lavi-Moshayoff V. i wsp. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 4003–4008.
28. Tsujikawa H., Kurotaki Y., Fujimori T. i wsp. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol. Endocrinol.* 2003; 17: 2393–2403.
29. Stubbs J.R., Liu S., Tang W. i wsp. Role of hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic growth factor 23 null mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 18: 2116–2124.
30. Tonelli M., Sacks F., Pfeffer M. i wsp. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation* 2005; 112: 2627–2633.
31. Haruna Y., Kashihara N., Satoh M. i wsp. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104: 2331–2336.
32. Sugiura H., Yoshida T., Tsuchiya K. i wsp. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005; 20: 2636–2645.
33. Unger R.H. Klotho-induced insulin resistance: a blessing in disguise? *Nat. Med.* 2006; 12: 56–57.