

Jolanta Małyżko

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 β -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 fosfatyczny, który hamuje nerkową reabsorpcję fosforanów i powoduje ich wydalanie oraz — poprzez hamowanie 1α -hydroksylazy i stymulowanie 24-hydroksylazy — po-

woduje zmniejszenia stężenia $1,25(\text{OH})$ witaminy D_3 . System Klotho/FGF23 ma zatem przeciwstawne działanie do witaminy D poprzez działanie: 1α -hydroksylazy (w nerce), 24-hydroksylazy (w nerce) oraz PTH (w przytarczycach). Efektem tego jest zmniejszenie stężenia witaminy 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 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 beзуżyteczna 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 (samice 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 Małyżko
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 nukleotydu) 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 β -glukuronidazy roślin i bakterii. Aktywność Klotho jest podobna do β -glukuronidazy, aczkolwiek nie obserwuje się jej w rekombinowa-

nym białku Klotho. Jest to prawdopodobnie związane z faktem, że we wszystkich genach z rodziny β -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 β -glukuronidazy [11]. Ekspresja białka Klotho zachodzi w różnych tkankach, szczególnie cewkach dystalnych w nerce, splocie naczyniówkowym w mózgu oraz w przytarczycach [1].

BIĄŁKO 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 1α -hydroksylazy i stymulowanie 24-hydroksylazy — powoduje zmniejszenia stężenia $1,25(\text{OH})_2$ witaminy 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].

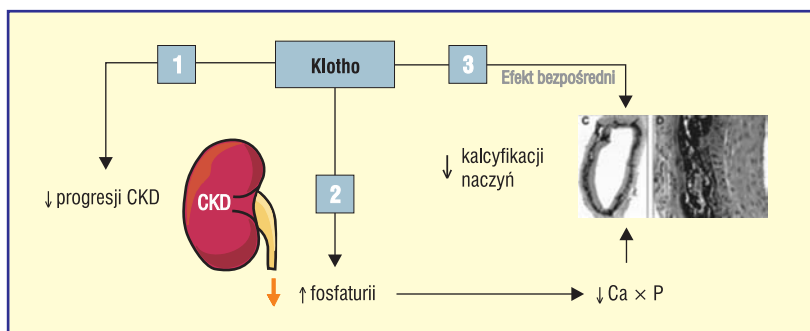
HISTORIA WITAMINY D — ROLA KLOTHO?

U pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (eGFR < 60 ml/min) częstość występowania niedoboru witaminy 25(OH)D₃ wynosi 12% (stężenie < 15 ng/ml) zaś witaminy 1,25(OH)₂D₃ — 32% (stężenie < 22 pg/ml) [22]. W grupie chorych po zabiegu transplantacji nerki (w różnym czasie po transplantacji) stwierdzono niedobór witaminy D₃ aż u 75,5% [23]. W skórze zachodzi konwersja witaminy D₃ do nieaktywnych steroli, głównie na drodze enzymatycznej poprzez cytochrom CYP24A1 do 24,25-(OH)₂D₃ i 1,24,25-(OH)₂D₃ [24]. Cytochrom ten jest pobudzany przez 1,25-(OH)₂D₃, dietę wysokofosforanową oraz FGF23. Liu i wsp. [16] wykazali, że kalcytriol powoduje zależne od dawki zwiększenie stężenia FGF23.

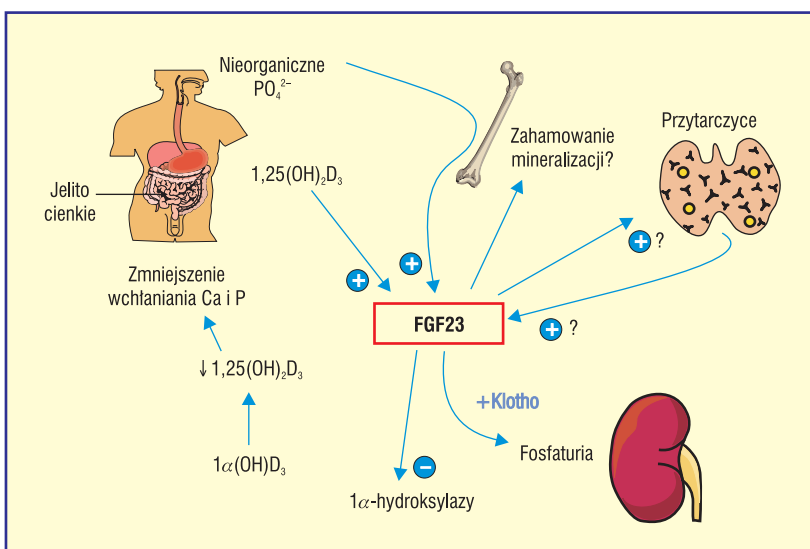
System Klotho/FGF23 ma zatem przeciwnie działanie do witaminy D poprzez działanie 1 α -hydroksylazy (w nerce), 24-hydroksylazy (w nerce), oraz PTH (w przytarczycach). Efektem tego jest zmniejszenie stężenia witaminy D₃.

ENIGMA KLOTHO/FGF23

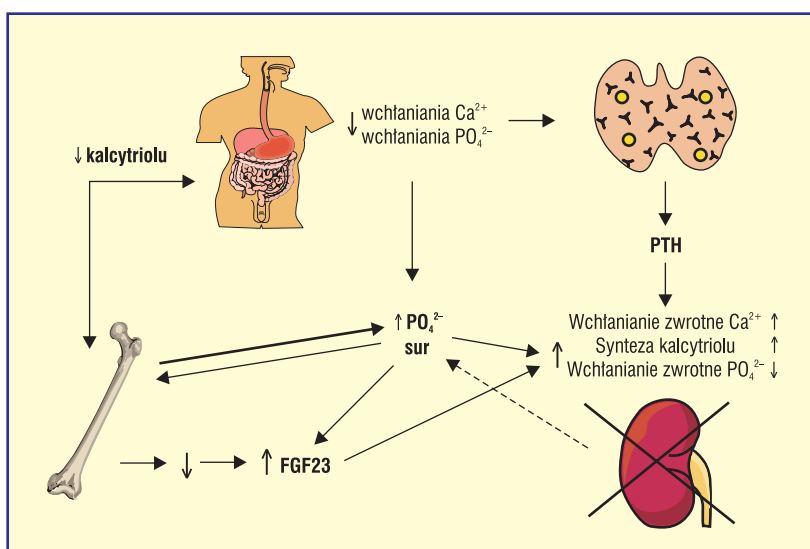
Reabsorpcja fosforanów i synteza witaminy D zachodzi głównie z cewkami proksymalnymi. Największa ekspresja genu Klotho zachodzi w cewkach dystalnych. Co zatem robi białko Klotho w cewkach dystalnych, jaka jest jego rola? Otóż Klotho może być złączane i rozszczepiane na powierzchni komórki przez proteazę 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 β -glukuronidazy, poprzez częściową glikozylację TRPV5 ułatwia „wciągnięcie” tego kanału wapniowego do błony komórkowej i tym samym ułatwia translokację 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 H^+ w tworzącym się moczu zmniejsza liczbę kanałów TRPV5 i wchłanianie zwrotne 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^{-/-} i FGF23^{-/-} [28]. Zmniejszenie podaży witaminy D w diecie powoduje spadek stężenia fosforanów w surowicy i znosi wiele fenotypowych objawów starzenia się u myszek Klotho^{-/-} i FGF23^{-/-} [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 transgenicznym (*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 α -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.