ROLA BIAŁKA α-KLOTHO W PROCESACH STARZENIA

THE ROLE OF α-KLOTHO PROTEIN IN AGING

Ewa SOKOŁOWSKA, Ryszard MILCZAREK,
Anna HALLMANN, Jerzy KLIMEK

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej,
Gdański Uniwersytet Medyczny

Streszczenie: Gen *α-klotho* został zidentyfikowany jako gen supresorowy starzenia. Mutacje prowadzące do inaktywacji genu *α-klotho* są przyczyną pojawienia się fenotypu przedwczesnego starzenia, mutanty takie żyją również krócej. Natomiast nadekspresja genu *α-klotho* u myszy hamuje procesy starzenia i wydłuża czas przeżycia, w czym wydaje się uczestniczyć mechanizm hamowania ścieżki sygnałowej insulina/IGF-1 oraz stresu oksydacyjnego. Odkrycie białka α-klotho doprowadziło do identyfikacji nowych osi endokrynnych łączących zaburzenia w homeostazie gospodarki wapniowo-fosforanowej ze starzeniem się organizmu. Błonowe białko α-klotho funkcjonuje jako niezbędny koreceptor dla czynnika wzrostowego fibroblastów 23 (FGF23), natomiast wydzielnicze białko α-klotho wykazuje aktywność β-glukuronidazy i aktywuje kanały wapniowe (TRPV2/5/6) oraz kanały potasowe (ROMK1). Białko α-klotho wpływa również na takie ścieżki sygnalizacyjne, jak Wnt/β-katenina, PI3K/PKB, p53/p21, czy cAMP/PKA.

Słowa kluczowe: α-klotho, gospodarka wapniowo-fosforanowa, FGF23, β-klotho

Summary: The *α-klotho* gene was identified as an aging suppressor gene. In mice loss of function mutations of *α-klotho* gene cause appearance of human aging-like phenotype and shortens the lifespan. Overexpression the *α-klotho* gene suppresses mice aging and extends the lifespan, it may involve the mechanism of suppression of insulin/IGF-1 signalling and oxidative stress. The α-klotho protein discovery caused the identification of novel endocrine axes that link calcium and phosphate homeostasis disorders and aging. Membrane α-klotho protein functions as a coreceptor regulating fibroblast growth factor 23 (FGF23) signalling. Soluble α-klotho protein acts as a β-glucuronidase and activates ion channels: TRPV2/5/6 and ROMK1. The α-klotho protein also influences signalling pathways including Wnt/β-catenin, PI3K/PKB, p53/p21, cAMP/PKA.

Key words: α-klotho, calcium and phosphate homeostasis, FGF23, β-klotho

Wykaz stosowanych skrótów: ***α-Kl***$^{-/-}$ – myszy z nokautem genu *α-klotho*, **ADAM10/17** – α-sekretazy, metaloproteinazy dezintegryn zależne od jonów cynku**,** **BACE1** – β -sekretaza, proteaza aspartylowa Asp2, **PPARγ** – receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów typu gamma, **COS-7** – linia komórkowa uzyskana z nerki afrykańskiej małpy zielonej *Cercopithecus aethiops*, **FGF23** – ludzki czynnik wzrostowy fibroblastów 23, **Fgf23** – mysi czynnik wzrostowy fibroblastów 23, **Fgf15** – mysi czynnik wzrostowy fibroblastów 15 (odpowiednikiem u ludzi jest FGF19), **Fgf21** – mysi czynnik wzrostowy fibroblastów 21, **PTH** – parathormon, **ADHR** – autosomalna dominująca krzywica hipofosfatemiczna, ***Cyp27b1*** – gen kodujący 1α-hydroksylazę, ***Cyp24*** – gen kodujący 24-hydroksylazę, ***Fgf23***$^{-/-}$ – myszy z nokautem genu kodującego czynnik wzrostowy Fgf23, **Fgfr-1c, -3c i -4** – receptory dla czynników wzrostowych fibroblastów typu 1c, 3c i 4, **TRPV2/5/6** (*ang. Transient Receptor Potential Vanilloid*) – zmiennopotencjałowe waniloidowe kanały wapniowe typu 2, 5 i 6, **TRPC-1 (***ang. Canonical Transient Receptor Potential 1*) – zmiennopotencjałowy, kanoniczny kanał wapniowy typu 1, ulegający ekspresji w komórkach śródbłonka, **ROMK1** – kanał potasowy typu 1, **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego, **Na^+/K^+ATP-aza** – pompa sodowo-potasowa, **cAMP** – cykliczny AMP, **PKA** – kinaza białkowa A, **PI3K** – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, **PKB** – kinaza białkowa B, **PKC** – kinaza białkowa C, **MAPK** – kinazy aktywowane mitogenem, **HUVEC** – komórki śródbłonka naczyniowego izolowane z ludzkiej żyły pępowinowej, **FOXO** – rodzina czynników transkrypcyjnych O z rodziny forkhead, **MnSOD** – manganowa dysmutaza ponadtlenkowa, **Wnt/β-katenina** – szlak sygnałowy odgrywający rolę w embriogenezie i karcynogenezie oraz w procesach fizjologicznych zachodzących w organizmie, **IGF-1** – insulinopodobny czynnik wzrostowy 1, **RFT** – reaktywne formy tlenu, **p53** – białko o właściwościach supresora nowotworowego odpowiedzialne za utrzymanie integralności genomu, **p21** – białko o właściwościach regulatora cyklu komórkowego, inhibitor kinaz cyklinozależnych

WSTĘP

W procesach starzenia się organizmu istotną rolę odgrywają m.in. zaburzenia homeostazy wapniowo-fosforanowej, zmniejszenie efektywności działania insuliny oraz nasilony stres oksydacyjny. Prawidłowy poziom wapnia i fosforanów we krwi zależy od utrzymania równowagi pomiędzy wchłanianiem tych pierwiastków w jelicie, mobilizacją z kości i wydalaniem ich z moczem. Metabolizm wapnia i fosforanów jest regulowany przez wiele czynników, w tym przez witaminę D, parathormon i kalcytoninę. Ostatnie badania wskazują jednak, że w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej istotną rolę odgrywa również białko α-klotho, działając w kooperacji z białkiem FGF23. Co więcej, α-klotho wpływa również na ścieżkę sygnałową insulina/IGF-1 oraz na stres oksydacyjny, a więc procesy związane z patogenezą chorób wieku podeszłego.

Gen *α-klotho* został zidentyfikowany u myszy w 1997 roku, przy czym wykazano, że brak białka α-klotho powoduje pojawienie się fenotypu przedwczesnego starzenia. Rok później gen *α-klotho* został zidentyfikowany również u człowieka. Nazwa genu wywodzi się z mitologii, istnieje bowiem mit o trzech Mojrach (w mitologii rzymskiej określanych jako Parki), boginiach losu i przeznaczenia, które wyznaczały długość ludzkiego życia. Były to córki Zeusa i Temidy: Lachesis –

przydzielająca los, która jako pierwsza snuła nić, Klotho – prządka nici ludzkiego życia, która przedstawiana była z wrzecionem oraz Atropos – przecinająca nić, gdy życie ludzkie dobiegało końca. Ze względu na rolę, jaką gen *α-klotho* wydaje się odgrywać w opóźnianiu pojawienia się procesów starzenia, odkrywcy nadali mu nazwę pochodzącą właśnie od bogini Klotho [34, 70].

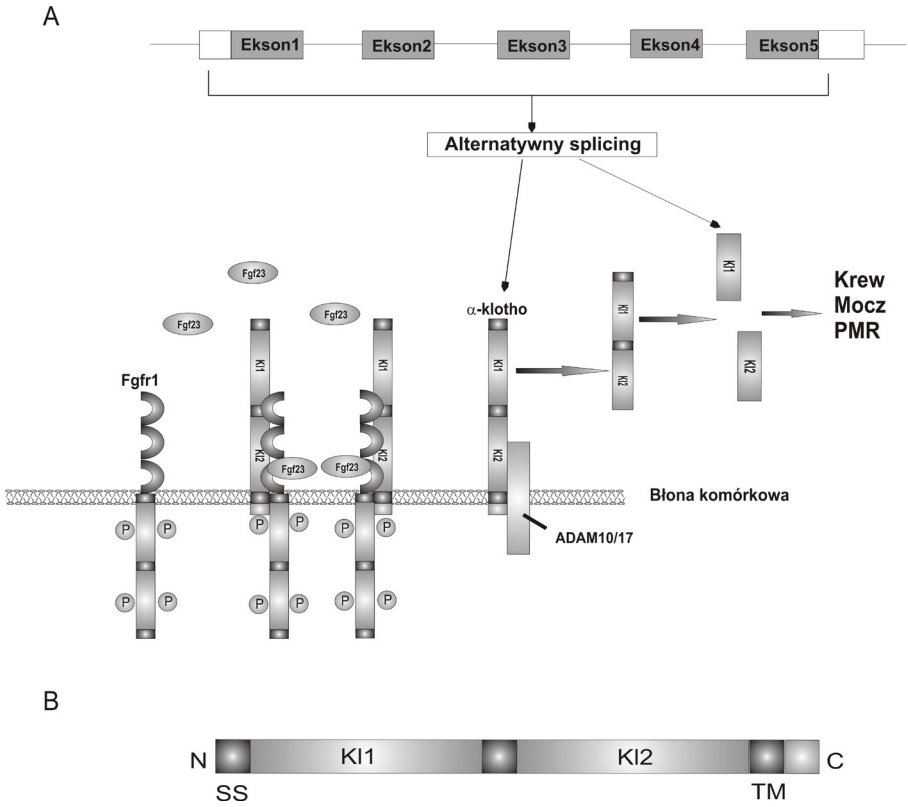
Myszy *α-Kl*$^{-/-}$ (pozbawione funkcjonalnego białka α-klotho) rozwijają się prawidłowo do około 3 tygodnia życia, po czym pojawia się u nich fenotyp przedwczesnego starzenia (tab.1). Myszy te umierają około 8-9 tygodnia życia, a więc znacznie wcześniej, niż myszy typu dzikiego [15, 33, 70]. Natomiast u myszy z nadekspresją *α-klotho* stwierdza się wydłużony czas przeżycia w porównaniu z myszami typu dzikiego. Przeżywają one dłużej o ok. 20-30% w przypadku samców i o ok. 18-19% w przypadku samic, przy czym wykazują one zwiększoną oporność na insulinę oraz zmniejszoną płodność (tab.1) [38, 70].

TABELA 1. Porównanie fenotypów myszy z nokautem genu *α-klotho* i nadekspresją genu *α-klotho*
TABLE 1. Comparison of phenotypes of *α-klotho* deficient and *α-klotho* overexpression mice

MYSZY Z NOKAUTEM GENU *α-KLOTHO*	**MYSZY Z NADEKSPRESJĄ GENU *α-KLOTHO***
opóźniony wzrost, osłabiona aktywność i wyniszczenie już około 3-4 tygodnia życia	prawidłowy wzrost
przeżywają około 2 miesiące	przeżywają około 20-30% dłużej, niż myszy typu dzikiego, które żyją około 3 lat
zmniejszone wydzielanie insuliny i zwiększona wrażliwość na insulinę, hipoglikemia	prawidłowy lub zwiększony poziom insuliny i IGF-1, zwiększona oporność na insulinę i IGF-1, normoglikemia
hiperfosfatemia, zwiększone stężenie 1,25-dihydroksycholekalcyferolu, hiperkalcemia	prawidłowa gospodarka wapniowo-fosforanowa
hipogonadyzm, niepłodność, przedwczesna inwolucja grasicy, ektopowa kalcyfikacja różnych narządów, w tym kalcyfikacja naczyń, zmniejszona mineralizacja kości, atrofia skóry i mięśni, ataksja, rozedma płuc, zaburzenia poznawcze, utrata sierści, obniżona synteza NO w komórkach endotelialnych naczyń, hiperaldosteronizm	ochrona przed uszkodzeniem nerek indukowanym przez angiotensynę II, hamowanie indukowanej przez H_2O_2 apoptozy i starzenia się komórek naczyń, redukcja czynników ryzyka arteriosklerozy, polepszenie słuchu

GEN I STRUKTURA BIAŁKA α-KLOTHO

Gen *α-klotho* składa się z 5 eksonów (ryc.1A) i znajduje się na chromosomie 13q12 u ludzi, na chromosomie 5 u myszy i na chromosomie 12p12 u szczura [36, 51, 55]. Koduje on białko błonowe typu 1 zawierające długą domenę zewnątrzkomórkową (~130kDa), domenę transbłonową i krótką domenę wewnątrzkomórkową



RYCINA 1. A) Gen *α-klotho* myszy. Fgf23 – czynnik wzrostowy fibroblastów 23, Fgfr1 – receptor czynnika wzrostowego fibroblastów typu 1, P – reszta fosforanowa, ADAM10/17 – metaloproteinazy odszczepiające zewnątrzkomórkową domenę białka α-klotho B) Struktura transbłonowego białka α-klotho. Białko to składa się z dwóch powtórzeń (KL1 i KL2) o sekwencji aminokwasów homologicznej do β-glukuronidazy, sekwencji sygnałowej (SS), domeny transbłonowej (TM) oraz krótkiej domeny cytoplazmatycznej

FIGURE 1. A) The mouse *α-klotho* gene, Fgf23 – fibroblast growth factor 23, Fgfr1 – fibroblast growth factor receptor 1, P – phosphoric residue, ADAM 10/17 – metalloproteinases shedding extracellular domain of *α*-klotho protein. B) The structure of transmembrane *α*-klotho protein. The protein is composed of two repeats (KL1 and KL2) with amino acid sequence homology to β-glucuronidase, signal sequence (SS), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain

(około 10 aminokwasów) (ryc.1B). U ludzi białko α-klotho zbudowane jest z 1012 aminokwasów i wykazuje ono 86% podobieństwa w stosunku do białka mysiego, zbudowanego z 1014 aminokwasów. Zewnątrzkomórkowy region α-klotho składa się z dwóch powtórzeń (KL1 i KL2), które wykazują znaczną homologię do sekwencji aminokwasów β-glukuronidazy występującej u bakterii i roślin [50].

Białko to może funkcjonować zarówno jako białko błonowe, jak i białko wydzielnicze, które powstaje na skutek odszczepienia domeny zewnątrzkomórkowej przez związane z błoną metaloproteinazy: ADAM10 i ADAM17 albo na drodze alternatywnego splicingu mRNA (ryc.1A). Wydzielniczą formę α-klotho stwierdza się we krwi, moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym [35,50]. Badania, przeprowadzone na transfekowanych genem *α-klotho* komórkach COS-7 wykazały, że metaloproteinazy powodują odcinanie z transbłonowego białka α-klotho fragmentów o wielkości 130 kDa i 68 kDa, przy czym okazuje się, że dominującą formą jest fragment 130 kDa. Forma o długości 68 kDa może prawdopodobnie powstawać na skutek dalszego metabolizmu odszczepionej formy zewnątrzkomórkowej ale również w wyniku alternatywnego splicingu mRNA. Stwierdzono ponadto, że insulina indukuje odszczepienie zewnątrzkomórkowej domeny białka α-klotho, poprzez stymulację proteolitycznej aktywności metaloproteinaz: ADAM10 i ADAM17 [9].

REGULACJA EKSPRESJI GENU *α-KLOTHO*

Gen *α-klotho* u myszy ulega ekspresji głównie w kanalikach dystalnych nerek i splotach naczyniówkowych komór mózgu, a w mniejszym stopniu w przytarczycach, łożysku, mięśniach szkieletowych, pęcherzu moczowym, trzustce, jądrach, jajnikach, okrężnicy i uchu wewnętrznym. U szczurów *α-klotho* również ulega ekspresji głównie w nerkach ale także w mózgu, płucach, jelitach i gonadach. Podobnie u ludzi ekspresja tego genu jest największa w nerkach, chociaż wykrywa się go również w łożysku, prostacie i jelicie cienkim [70].

Zbadano wiele czynników, które mogą regulować ekspresję genu *α-klotho*. Czynniki, które zwiększają ekspresję tego genu to: dieta niskofosforanowa, 1,25-dihydroksycholekalcyferol, statyny (atorwastatyna i prawastatyna), agoniści PPARγ (pioglitazon) i trójjodotyronina. Poziom tego białka jest również zwiększony w nerkach myszy z brakiem aktywności aromatazy, kluczowego enzymu biosyntezy estrogenów, spada jednak po terapii estrogenami. Natomiast zmniejszenie ekspresji genu *α-klotho* mogą powodować czynniki, takie jak: starzenie się, dieta wysokofosforanowa, niewydolność nerek, nadciśnienie, odwodnienie czy cukrzyca [2, 26, 40, 56, 64, 66, 72, 73]. Stwierdzono obniżoną ekspresję tego białka w nerkach szczurów stanowiących modele ludzkich chorób, takich jak: spontaniczne nadciśnienie u szczurów linii SHR, nadciśnienie wywołane octanem deoksykortykosteronu, uszkodzenia spowodowane ischemią-reperfuzją, czy u szczurów z ostrym zawałem

serca. Spadek ekspresji *α-klotho* w nerkach obserwuje się również na skutek działania angiotensyny II oraz pod wpływem stresu oksydacyjnego indukowanego przez parakwat lub H_2O_2 [11, 33]. Jak wspomniano wcześniej ekspresja genu *α-klotho* ulega zmniejszeniu wraz z wiekiem. I tak u ludzi poziom krążącego białka α-klotho zmniejsza się po 40 roku życia. Co więcej wykazano, że w istocie białej mózgu starzejących się małp należących do gatunku rezus, gen *α-klotho* podlega modyfikacjom epigenetycznym (ulega wyciszeniu na skutek metylacji promotora) [14, 30]. Hamowanie ekspresji *α-klotho* na skutek hipermetylacji DNA zaobserwowano również w nerkach myszy po iniekcji toksyn mocznicowych [63].

FUNKCJA BŁONOWEGO BIAŁKA α-KLOTHO

Wiadomo, że utrzymanie prawidłowej homeostazy wapniowo-fosforanowej jest niezwykle istotne dla długowieczności, a zaburzenia prowadzące do zwiększonego poziomu fosforanów (ale nie wapnia) łączy się z przyspieszeniem procesów starzenia, przy czym wydaje się, że jest to związane z ich udziałem w patogenezie różnych chorób. Zwłaszcza u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (PChN), na skutek upośledzonej czynności wydalniczej nerek, dochodzi do groźnego dla życia, znacznego zwiększenia poziomu fosforanów we krwi. Konsekwencją hiperfosfatemii w PChN jest zmniejszony poziom kalcytriolu i hipokalcemia, która dalej prowadzi do wtórnej nadczynności przytarczyc i osteodystrofii nerkowej. Ostatnie badania dowodzą, że istotną rolę w utrzymaniu homeostazy fosforanów w organizmie odgrywają FGF23 i białko α-klotho, a zwłaszcza jego błonowa forma [26].

Funkcja błonowego białka α-klotho nie była jasna dopóki nie okazało się, że myszy z nokautem genu *α-klotho (α-Kl$^{-/-}$)* wykazują fenotyp podobny do myszy z nieaktywnym genem *Fgf-23* (*Fgf23$^{-/-}$*) [34].

Fgf-23 jest jednym z członków rodziny czynników wzrostowych fibroblastów działających jako hormony, w skład której wchodzą również Fgf15, FGF19 (ludzki ortolog mysiego Fgf15) oraz Fgf21 [25]. Funkcja genu *FGF-23* została wyjaśniona, gdy został on zidentyfikowany jako gen zmutowany u pacjentów z krzywicą hipofosfatemiczną, dziedziczącą się w sposób autosomalny dominujący (ADHR). Zaburzenie to charakteryzuje się hipofosfatemią spowodowaną zwiększoną utratą fosforanów z moczem, zmniejszonym poziomem witaminy D w surowicy i zaburzoną mineralizacją kości (krzywicą). Okazało się, że u pacjentów z ADHR mutacja genu *FGF-23* powoduje oporność białka FGF-23 na proteolityczną inaktywację. Efektem jest wzrost stężenia FGF-23 w surowicy, co prowadzi do fosfaturii i związanych z tym zaburzeń pojawiających się u pacjentów z ADHR [3]. Odwrotna sytuacja ma miejsce u myszy *Fgf23$^{-/-}$*, pozbawionych funkcjonalnego białka Fgf23, u których rozwija się fenotyp charakteryzujący się m.in. hiperfosfatemią, nadmier-

ną kalcyfikacją tkanek miękkich i innymi zaburzeniami, które pojawiają się również u myszy *α-Kl*$^{-/-}$. Ponadto, u myszy z nokautem genu *α-klotho* stwierdzono znacznie zwiększone stężenie Fgf23 w porównaniu do myszy typu dzikiego, co sugerowało, że utrata białka α-klotho indukuje oporność na Fgf23 [34].

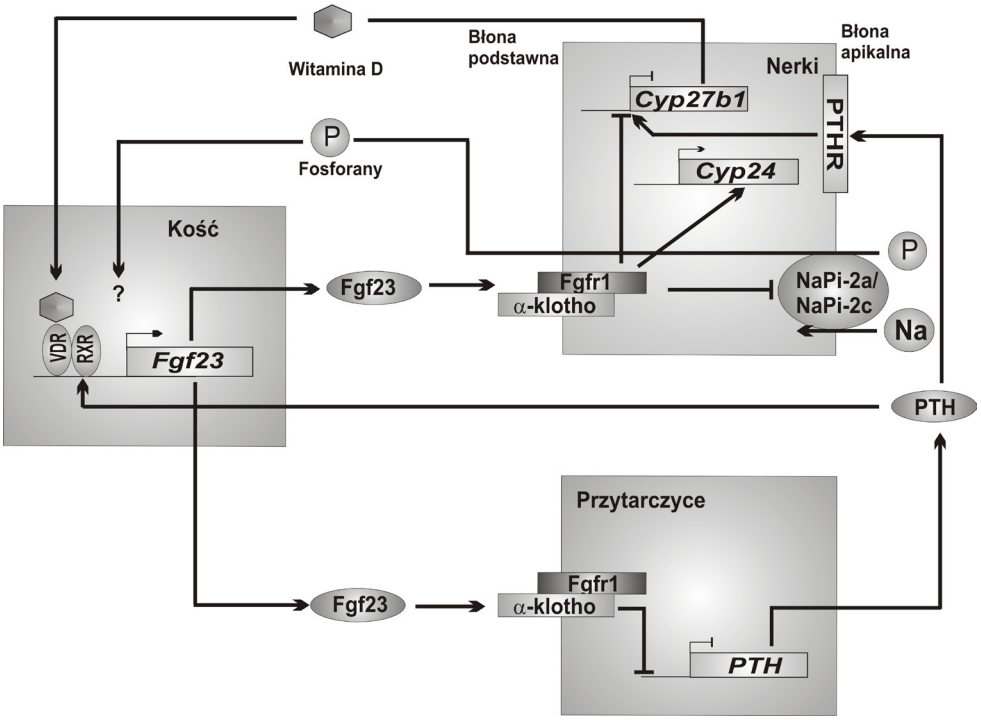
Zidentyfikowanie receptora dla Fgf23 było dość trudne, ponieważ znane receptory dla czynników Fgf wykazywały bardzo niskie powinowactwo do Fgf23 *in vitro*, co sugerowało istnienie jakiegoś kofaktora, który zwiększałby to powinowactwo w narządach docelowych. Dalsze badania wykazały, że transbłonowe białko α-klotho tworzy kompleks z różnymi izoformami receptorów Fgf (Fgfr-1c, -3c i -4) i znacząco zwiększa ich powinowactwo do Fgf23. α-Klotho funkcjonuje więc jako obligatoryjny koreceptor dla Fgf23 [35]. Przeprowadzone badania wskazują, że Fgfr1 w kompleksie z białkiem α-klotho, jest dominującym receptorem dla hipofosfatemicznego i fosfaturycznego działania Fgf23 w nerkach, natomiast receptory Fgfr3 i Fgfr4 odgrywają mniejszą rolę w tym procesie [17, 45]. Kolejne prace doświadczalne wykazały, że Fgf23, działając poprzez receptory Fgfr3 i Fgfr4, uczestniczy głównie w regulacji poziomu witaminy D w surowicy, prowadząc do spadku jej poziomu [18].

Fakt, że Fgf23 wymaga białka α-klotho jako koreceptora wyjaśnia dlaczego myszy *α-Kl*$^{-/-}$ wykazują fenotyp podobny do myszy *Fgf23*$^{-/-}$. W dodatku *α-klotho* ulega zwiększonej ekspresji w nerkach, co wyjaśnia dlaczego organem docelowym dla Fgf23 są głównie nerki [33].

Wszystkie te odkrycia doprowadziły do powstania koncepcji nowej osi endokrynnej kość – nerki – przytarczyce, uczestniczącej w regulacji homeostazy wapniowo-fosforanowej ustroju, w której istotną rolę odgrywają α-klotho i Fgf23 (ryc.2). Fgf23 jest hormonem wydzielanym przez osteocyty pod wpływem zwiększonego poziomu witaminy D lub fosforanów zawartych w diecie. Aktywna forma witaminy D wiąże się do receptora witaminy D (VDR), który tworzy heterodimer z receptorem retinoidu X (RXR) i działając jako czynnik transkrypcyjny, zwiększa ekspresję Fgf23 w osteocytach. Wydzielony Fgf23 łączy się z kompleksem α-klotho/Fgfr (głównie Fgfr1c, ale również z Fgfr3c i Fgfr4) w nerkach (oś endokrynna kość – nerki) oraz w przytarczycach (oś endokrynna kość – przytarczyce). W nerkach Fgf23 hamuje ekspresję genu *Cyp27b1*, kodującego 1α-hydroksylazę (enzym uczestniczący w syntezie witaminy D) oraz zwiększa ekspresję genu *Cyp24*, który koduje 24-hydroksylazę (enzym uczestniczący w metabolizmie witaminy D). W ten sposób Fgf23 obniża poziom kalcytriolu w surowicy krwi. W przytarczycach Fgf23 hamuje ekspresję parathormonu (PTH), który działając na nerki poprzez receptor PTH (PTHR), indukuje ekspresję genu *Cyp27b1*, co dalej prowadzi do obniżenia poziomu aktywnej formy witaminy D [58, 59]. Swoje działanie fosfaturyczne hormon ten wykazuje poprzez zmniejszenie ekspresji kotransporterów sodowo-fosforanowych typu 2a (NaPi-2a) i typu 2c (NaPi-2c) znajdujących się w błonie apikalnej komórek kanalików proksymalnych, które to transportery uczestniczą we wchłanianiu zwrotnym fosforanów w nerkach [17, 44]. Mamy tu

więc do czynienia z ujemnym sprzężeniem zwrotnym, polegającym na wzajemnym oddziaływaniu pomiędzy witaminą D, fosforanami i Fgf23 [58]. Co więcej, Fgf23, poprzez aktywację szlaku MAPK, zmniejsza ekspresję i wydzielanie parathormonu (PTH) przez komórki przytarczyc, który jak wiadomo stymuluje aktywność 1α-hydroksylazy w nerkach. Z drugiej strony PTH również może stymulować wydzielanie Fgf23 poprzez aktywację osteoblastów, co sugerują badania przeprowadzone na pacjentach z pierwotną nadczynnością przytarczyc. W związku z powyższym Fgf23, w kooperacji z α-klotho, powoduje spadek poziomu fosforanów działając zarówno jako hormon fosfaturyczny, jak również jako czynnik ujemnie regulujący poziom aktywnej formy witaminy D oraz PTH w organizmie [4, 28, 31, 43].

Podsumowując, z jednej strony Fgf23 wspólnie z α-klotho wykazuje działanie fosfaturyczne, poprzez hamowanie kotransporterów sodowo-fosforanowych (regulacja homeostazy fosforanów na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego), a z drugiej hamuje syntezę i przyspiesza metabolizm 1,25-dihydroksycholekalcyferolu (regulacja homeostazy aktywnej formy witaminy D na drodze ujemnego sprzęże-



RYCINA 2. Rola Fgf23 i białka α-klotho w osi endokrynnej kość – nerki – przytarczyce, uczestniczącej w regulacji homeostazy wapniowo-fosforanowej i metabolizmu witaminy D
FIGURE 2. The role of Fgf23 and α-klotho protein in bone – kidney – parathyroid endocrine axis participating in regulation calcium and phosphate homeostasis and vitamin D metabolism

nia zwrotnego). Zaburzenie, polegające na wyłączeniu aktywności białka α-klotho, czy Fgf23, powoduje ujawnienie się stanu metabolicznego charakteryzującego się hiperfosfatemią, hiperwitaminozą D oraz hiperkalcemią, który to stan może być związany z pojawieniem się fenotypu przedwczesnego starzenia [34].

FUNKCJA WYDZIELNICZEJ FORMY BIAŁKA α-KLOTHO

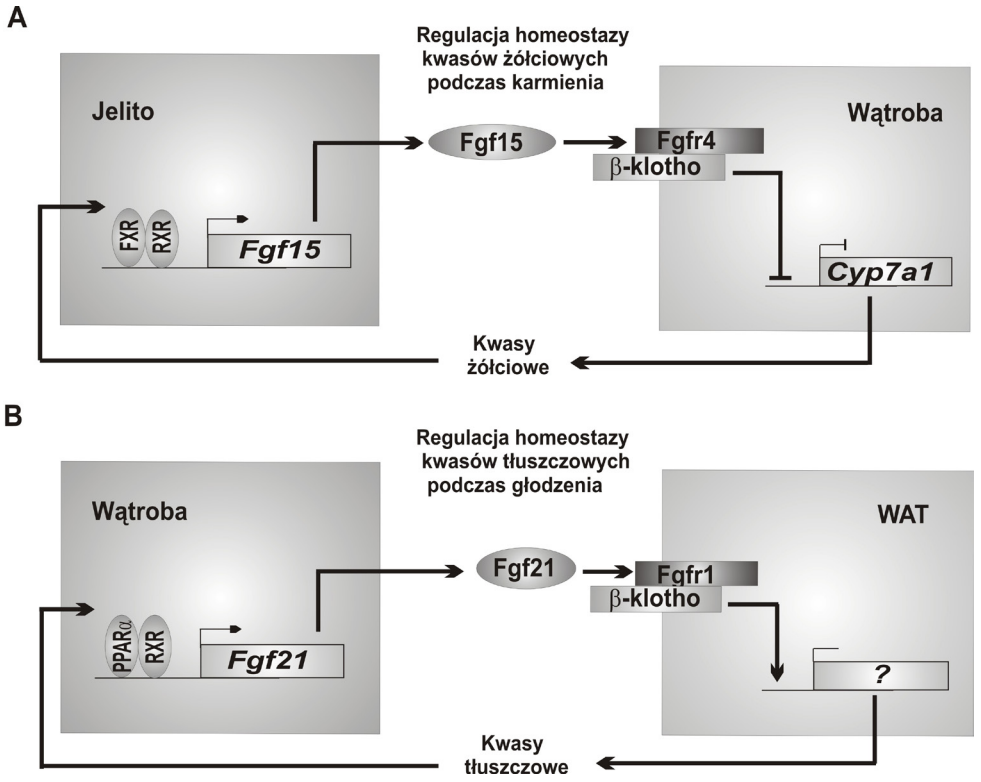
Wydzielnicze białko α-klotho powstaje na skutek hydrolizy formy błonowej przez znajdujące się w błonie α-sekretazy: ADAM10 i ADAM17. Może ono również podlegać proteolizie przez β-sekretazę BACE1, enzym odgrywający kluczową rolę w patogenezie choroby Alzheimera. Co więcej, wykazano, że pozostały odcinek, po odszczepieniu formy wydzielniczej, może być substratem dla γ-sekretaz. Wydzielnicza forma α-klotho wykazuje plejotropowe wpływy, działając jako niezależny od Fgf23 hormon fosfaturyczny, który uczestniczy również w regulacji aktywności kanałów wapniowych i potasowych oraz pompy sodowo-potasowej [6, 33].

Rola wydzielniczej formy α-klotho, związana z jego aktywnością β-glukuronidazy, została poznana po raz pierwszy na przykładzie oddziaływania tego białka na kanały wapniowe TRPV5 [8, 19, 47]. Kanały TRPV5 należą do rodziny zmiennopotencjałowych kanałów jonowych (TRP), wśród których wyróżnia się cztery podrodziny: TRPV (zależne od receptora waniloidowego), TRPC (kanoniczne, klasyczne), TRPM (zależne od melastatyny) i TRPP (zależne od policystyny). TRPV5 ulegają ekspresji w komórkach kanalików dystalnych nerek i uczestniczą we wchłanianiu zwrotnym wapnia w nerkach. Aktywność tych kanałów zależy od utrzymania właściwej równowagi pomiędzy ich endocytozą, a internalizacją do apikalnej błony komórek dystalnych kanalików nerkowych. Białko α-klotho modyfikuje N-końcowe reszty glikanów kanałów TRPV5. Wydzielnicze białko α-klotho usuwa końcowe reszty kwasu sjalowego w N-glikanach kanałów TRPV5 znajdujących się w błonie komórkowej, co powoduje odsłonięcie reszt galaktozy, które z kolei mogą wiązać się z galektyną-1 (lektyną wiążącą galaktozydy obecne w cytoplazmie). Powstanie tego kompleksu hamuje endocytozę kanałów TRPV5, doprowadza do ich akumulacji w błonie komórkowej i tym samym powoduje wzrost reabsorpcji wapnia w kanalikach dystalnych nerek (ryc.3). W ten sam sposób są również regulowane kanały wapniowe ulegające ekspresji w jelitach (TRPV6) i w komórkach β trzustki (TRPV2) oraz ulegające ekspresji w nerkach kanały potasowe (ROMK1). Należy zaznaczyć jednak, że internalizacja ROMK1 przebiega przy udziale pęcherzyków opłaszczonych klatryną, natomiast w internalizacji TRPV5 pośredniczą kaweole, a więc mamy tu do czynienia z endocytozą klatryno-niezależną [7, 8, 22, 39, 41, 47].

Jak wcześniej wspomniano, jednym z typów kanałów wapniowych jest TRPC1, który ulega ekspresji w komórkach śródbłonka naczyń i uczestniczy w stymulowanym przez VEGF wzroście wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Okazuje się, że α-klotho wiąże się bezpośrednio z TRPC1 oraz z receptorem VEGFR-2 (receptor dla VEGF). Kompleks ten, w odpowiedzi na stymulację przez VEGF, ulega następnie internalizacji do błony komórkowej, w wyniku czego zwiększa się napływ wapnia do komórki, a białko α-klotho uczestniczy w ten sposób w utrzymaniu integralności endotelium [39].

Białko α-klotho może również wpływać bezpośrednio na aktywność pompy sodowo-potasowej (Na^+/K^+ATP-azy), która należy do ważnych enzymów metabolizmu podstawowego. Wykazano bowiem, że w komórkach, w których białko α-klotho ulega zwiększonej ekspresji (głównie nerki, sploty naczyniówkowe komór mózgu i przytarczyce), białko to częściowo jest związane w kompleksie z Na^+/K^+ATP-azą (wiążąc się z podjednostką α1 tego enzymu) Kompleks ten znajdujący się w organellach cytoplazmatycznych: endosomach i aparacie Golgiego, może być następnie internalizowany do błony komórkowej („ścieżka α-klotho-zależna") [23, 54, 61]. W tej sytuacji ilość cząsteczek Na^+/K^+ATP-azy rekrutowanych do zewnętrznej błony komórkowej, zależy od kombinacji „ścieżki konwencjonalnej" ze „ścieżką α-klotho-zależną". Proces ten jest stymulowany przez niskie stężenie wapnia zewnątrzkomórkowego, a hamowany przez jego wysokie stężenie [23]. Istotną rolę w zwiększaniu aktywności Na^+/K^+ATP-azy wydaje się też odgrywać aktywność β-glukuronidazy białka α-klotho, podobnie jak w przypadku kanałów TRPV5 [61].

Rozpuszczalna forma białka α-klotho zmniejsza również bezpośrednio (niezależnie od Fgf23) ekspresję kotransporterów sodowo-fosforanowych NaPi-2a i NaPi-2c w kanalikach proksymalnych nerek i NaPi-2b w jelitach. Hamuje ona także aktywność kotransporterów sodowo-fosforanowych typu 3 (Pit-1 i Pit-2) znajdujących się w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń (VSMC), które odgrywają istotną rolę w kalcyfikacji naczyń [12, 19, 20, 34, 71]. Wykazano, że Fgf23 wiążąc się do kompleksu α-klotho/Fgfr w kanalikach dystalnych nerek aktywuje kinazy MAP (ERK1/2) i indukuje ekspresję czynnika transkrypcyjnego Egr1. Czynnik Egr1 z kolei zwiększa ekspresję genu *α-klotho* i tym samym ilość błonowego białka α-klotho w kanalikach dystalnych. Prowadzi to do wzrostu ilości wydzielniczej formy tego białka, które dalej może hamować ekspresję kotransporterów sodowo-fosforanowych w kanalikach proksymalnych. Podobnie EGF (naskórkowy czynnik wzrostu) indukuje ekspresję genu *α-klotho* poprzez aktywację ścieżki sygnałowej MAPK i indukcję Egr1 w komórkach HEK293 (linia wywodząca się z ludzkich embrionalnych komórek nerek) [10, 32].



RYCINA 3. Aktywacja kanałów jonowych TRPV5 przez wydzielniczą formę białka α-klotho w kanalikach dystalnych nerek
FIGURE 3. Activation of ion channels TRPV5 by secreted α-klotho protein in renal distal tubules

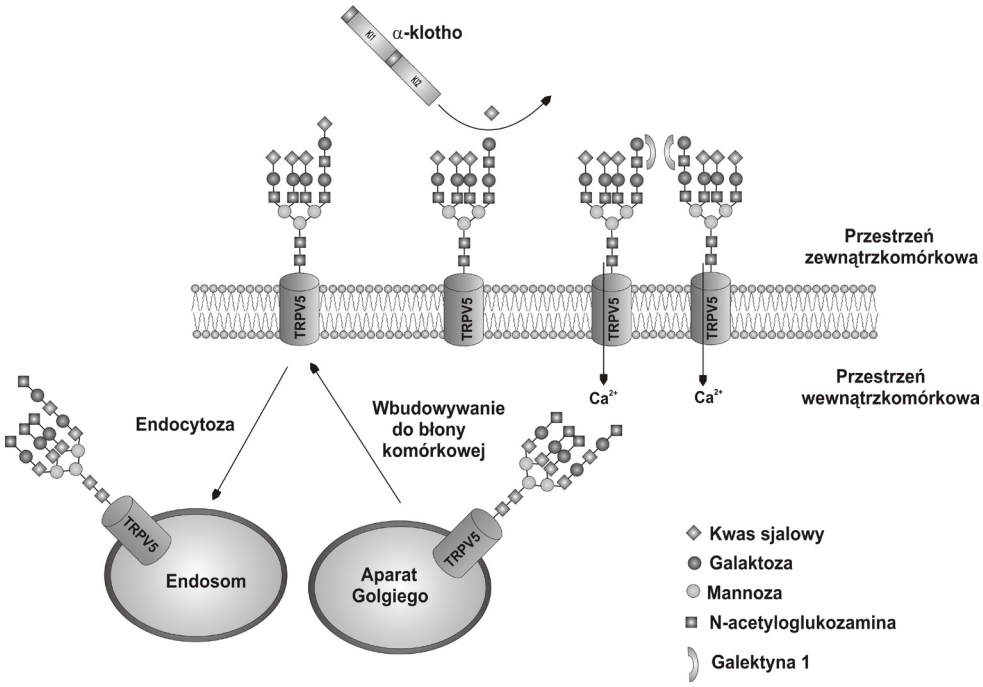
WPŁYW BIAŁKA α-KLOTHO NA KOMÓRKOWE ŚCIEŻKI SYGNAŁOWE

Biologiczna rola α-klotho i molekularny mechanizm jego działania nie zostały jeszcze do końca wyjaśnione ale wiadomo, że białko to hamuje ścieżkę sygnałową insulina/IGF-1, jak również wpływa na wiele innych ścieżek sygnałowych w organizmie, w tym na: Wnt/β-katenina, p53/p21, PI3K/PKB, cAMP/PKA, czy PKC [70].

Wiadomo, że częściowa redukcja sygnałowania osi insulina/IGF-1 na którymkolwiek etapie związana jest z ewolucyjnie konserwowanym mechanizmem, który sprzyja długowieczności. Szlaki sygnałowe związane z insuliną i IGF-1 są silnie

konserwatywne ewolucyjnie, tak więc stwierdza się ich występowanie również u prostych organizmów, takich jak nicień *Caenorhabditis elegans*, czy muszka owocowa *Drosophila melanogaster*. Okazało się, że mutacje powodujące hamowanie ścieżki sygnałowej insulina/IGF-1 u tych organizmów powodują znaczące wydłużenie czasu ich przeżycia. Wiadomo również, że zarówno myszy z heterozygotyczną mutacją genu dla receptora IGF-1, jak i myszy karłowate: *Ames* i *Snell*, które nie wydzielają hormonu wzrostu i tym samym mają niski poziom IGF-1, żyją dłużej, niż myszy typu dzikiego [29, 53]. Co więcej myszy FIRKO z nokautem genu dla receptora insulinowego w tkance tłuszczowej również żyją dłużej, niż myszy typu dzikiego, przy czym nie rozwija się u nich nawet związana z wiekiem insulinooporność. Okazuje się więc, że zmiana działania insuliny w jednej tkance może wpływać na długość życia całego organizmu [27]. Uważa się, że działanie sprzyjające długowieczności związane jest w tym przypadku z odblokowaniem czynnika FOXO, który może aktywować geny wpływające na dłuższy czas przeżycia, takie jak geny odpowiedzialne za syntezę antyoksydantów. Czynnik transkrypcyjny FOXO ma znaczenie zarówno w sygnałowaniu insuliny, jak i w komórkowej odpowiedzi na stres oksydacyjny, w związku z tym może być łącznikiem pomiędzy insulinoopornością, stresem oksydacyjnym oraz procesem starzenia [49].

Nadekspresja genu *α-klotho* również wydłuża czas przeżycia myszy, co wydaje się być związane z regulującym wpływem białka α-klotho na wiele czynników wzrostowych, w tym uczestniczących w sygnałowaniu osi insulina/IGF-1, czy Wnt/β-katenina. α-Klotho hamuje bowiem indukowaną przez insulinę i IGF-1 autofosforylację receptora insulinowego oraz receptora IGF-1 *in vitro*, a myszy z brakiem α-klotho, obok innych zaburzeń, wykazują hipoglikemię, hipoinsulinemię i zwiększoną wrażliwość na insulinę. Sugeruje się, że hamowanie sygnałowania insuliny przez α-klotho jest związane z opornością na stres oksydacyjny, wynikającą z hamowania fosforylacji czynnika FOXO (odblokowania jego aktywności), co sprzyja jego translokacji do jądra komórkowego, wiązaniu z promotorem manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD) i zwiększaniu ekspresji tego enzymu. Jak powszechnie wiadomo MnSOD jest enzymem antyoksydacyjnym, który dalej ułatwia usuwanie reaktywnych form tlenu (RFT), wspierając jednocześnie oporność na stres oksydacyjny [57]. Wykazano również, że α-klotho zwiększa ekspresję MnSOD i całkowitą aktywność SOD w aorcie myszy poprzez zwiększanie produkcji NO i obniżanie stężenia wodoronadtlenków lipidowych w surowicy. W komórkach HUVEC α-klotho zwiększa ekspresję MnSOD około dwukrotnie, częściowo przez aktywację ścieżki sygnałowej cAMP/PKA, a częściowo przez zwiększenie produkcji NO oraz hamuje indukowaną przez angiotensynę II produkcję RFT [1]. Ostatnie badania wskazują, że α-klotho hamuje ekspresję Nox2, izoformy oksydazy NAD(P)H, będącej głównym źródłem reaktywnych form tlenu w naczyniach krwionośnych, poprzez aktywację ścieżki sygnałowej cAMP/PKA [69]. Co wiecej, należy zaznaczyć, że obok działania antyoksydacyjnego, białko α-klotho wykazuje rów-



RYCINA 4. Potencjalny mechanizm wpływu białka α-klotho na przyspieszenie starzenia się organizmu
FIGURE 4. The potential mechanism of α-klotho protein influence on acceleration of aging

nież właściwości antyapoptotyczne [48, 52, 62]. W związku z powyższym można stwierdzić, że α-klotho uczestniczy przynajmniej w dwóch konserwatywnych ewolucyjnie mechanizmach przeciwdziałających starzeniu, tzn. w hamowaniu ścieżki sygnałowej insulina/IGF-1 i zwiększaniu oporności na stres oksydacyjny [1, 57].

α-Klotho wpływa również na szlak Wnt/β-katenina, który funkcjonuje w komórkach macierzystych różnych tkanek, dzięki czemu mają one zapewnioną ochronę przed różnicowaniem i wykazują zdolność do samoodnawiania. Z drugiej strony chroniczna stymulacja szlaku Wnt może prowadzić do wyczerpania się i deplecji komórek macierzystych, a to z kolei może być jedną z przyczyn wspierających proces starzenia. Liu i wsp. [42] wykazali, że zewnątrzkomórkowa domena białka α-klotho wiąże wiele ligandów Wnt i hamuje ich zdolność do aktywacji ścieżki sygnałowej Wnt. Istotnie u myszy *α-Kl*$^{-/-}$ zaobserwowano mniejszą liczbę epidermalnych komórek macierzystych w mieszkach włosowych, przy czym komórki te wykazywały aktywację szlaku sygnałowego Wnt, co mogło być przyczyną szybszego wyczerpywania się komórek macierzystych i w efekcie obserwowano słabsze gojenie się ran. Ponadto u myszy *α-Kl*$^{-/-}$ stwierdza się aktywację μ-kalpainy, zależnej od wapnia proteazy, która rozszczepia różne białka komórkowe, w tym β-

kateninę stabilizowaną przez ścieżkę Wnt. Aktywacja kalpain wydaje się więc być mechanizmem kompensacyjnym uruchamiającym się w odpowiedzi na zwiększoną aktywację szlaku sygnałowego Wnt wynikającą z niedoboru białka α-klotho [70].

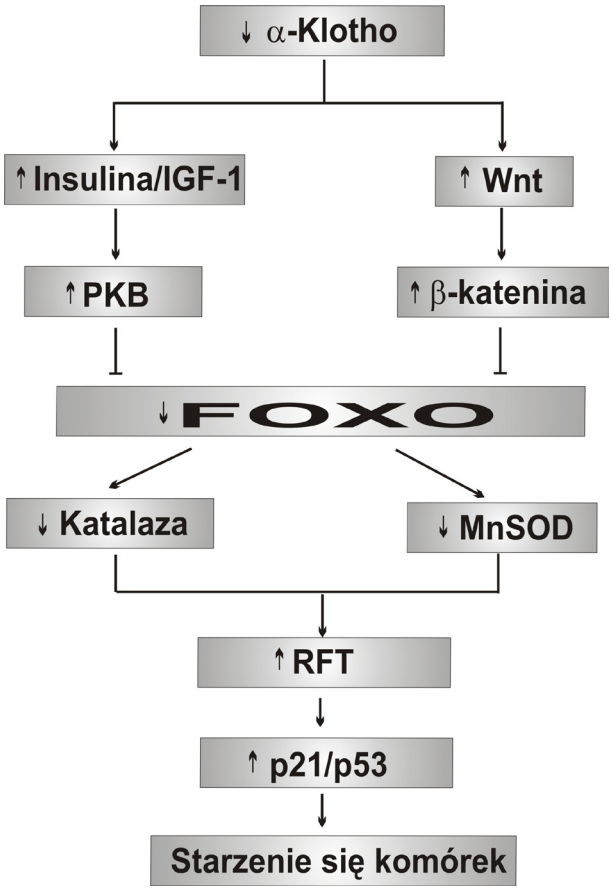
W związku z powyższym spadek stężenia α-klotho będzie skutkował nadmierną stymulacją szlaków sygnałowych insulina/IGF-1 oraz Wnt/β-katenina. Aktywacja obu tych szlaków może prowadzić do hamowania aktywności transkrypcyjnej czynnika FOXO, a tym samym do spadku ekspresji genów enzymów antyoksydacyjnych: manganowej dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy. Efektem będzie wzrost ilości RFT, aktywacja ścieżki p21/p53 i w konsekwencji przyspieszenie starzenia się komórek (ryc.4) [70].

β-KLOTHO

Podobnie jak w przypadku Fgf23, który do swojego działania wymaga obecności koreceptora α-klotho, również Fgf15 (u człowieka FGF19) i Fgf21 wymagają obecności odpowiedniego koreceptora, którym w tym przypadku jest białko β-klotho.

β-klotho, podobnie jak α-klotho, stanowi białko błonowe typu 1. Mysie białko β-klotho składa się z 1043 aminokwasów i wykazuje około 40% podobieństwo do mysiego białka α-klotho. Zewnątrzkomórkowy region białka β-klotho składa się z dwóch powtórzeń (βKL1 i βKL2), w których stwierdza się jednak brak reszt kwasu glutaminowego, obecnych w α-klotho. β-klotho ulega dominującej ekspresji w wątrobie, trzustce i tkance tłuszczowej [24].

Wykazano, że u myszy z nokautem genu *β-klotho* synteza i wydzielanie kwasów żółciowych jest znacznie zwiększona, przy czym myszy te wykazują fenotyp podobny do myszy z nokautem genów *Fgfr4* oraz *Fgf15*. W dalszych badaniach potwierdzono, że Fgf15, Fgfr4 i β-klotho są podstawowymi składnikami osi endokrynnej uczestniczącej w regulacji syntezy kwasów żółciowych. Ekspresja *Fgf15* w jelicie jest regulowana przez kwasy żółciowe produkowane w wątrobie. Karmienie zwiększa uwalnianie kwasów żółciowych, wiążących się z receptorem FXR (farnesoid X receptor), który tworzy heterodimer z receptorem RXR i działając jako czynnik transkrypcyjny zwiększa ekspresję Fgf15 w komórkach epitelialnych jelita. Uwolniony w jelicie pod wpływem karmienia czynnik Fgf15 wiąże się z kompleksem β-klotho/Fgfr4 znajdującym się w hepatocytach i zmniejsza ekspresję genu *Cyp7a1* kodującego 7α-hydroksylazę cholesterolu, enzymu ograniczającego szybkość syntezy kwasów żółciowych. Mamy więc do czynienia z pętlą ujemnego sprzężenia zwrotnego na osi endokrynnej jelito – wątroba (ryc.5A) [25, 37]. β-klotho jest również niezbędne w działaniu Fgf21, jednakże fenotyp myszy z nokautem *Fgf21* wyraźnie różni się od fenotypu myszy z nokautem *β-klotho* [25]. Ekspresja Fgf21 wzrasta podczas procesów głodzenia. Głodzenie zwiększa uwalnianie niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (NEFA) wiążących się do receptorów aktywowanych przez proliferatory



RYCINA 5. A) Rola Fgf15 i białka β-klotho w osi endokrynnej jelito – wątroba B) Rola Fgf21 i białka β-klotho w osi endokrynnej wątroba – biała tkanka tłuszczowa (WAT)
FIGURE 5. A) The role of Fgf15 and β-klotho protein in intestine – liver endocrine axis, B) The role of Fgf21 and β-klotho protein in liver – white adipose tissue (WAT) endocrine axis

peroksysomów α (PPARα), które tworzą heterodimer z RXR i działając jako czynnik transkrypcyjny zwiększają ekspresję Fgf21 w hepatocytach. Prowadzi to do uwolnienia z hepatocytów Fgf21, który wiąże się z kompleksem β-klotho/Fgfr1 w adipocytach i zwiększa lipolizę, prowadząc do uwolnienia NEFA, które w wątrobie są utleniane do acetylo-CoA. W hepatocytach z acetylo-CoA syntetyzowane są ciała ketonowe, które stanowią główne źródło energii dla mózgu podczas głodzenia. W tym przypadku mamy więc do czynienia z osią endokrynną wątroba – biała tkanka tłuszczowa (ryc.5B). Potwierdzenie roli β-klotho w działaniu Fgf21 wymaga jeszcze dalszych badań, sugerowano bowiem istnienie niezależnej od β-klotho ścieżki sygnałowej Fgf21 [65]. Ostatnie doniesienia wskazują jednak,

że wpływ Fgf21 jest całkowicie zniesiony u myszy z nokautem *β-klotho*, co potwierdzałoby krytyczną rolę tego białka w sygnałowaniu Fgf21 [46].

W świetle powyższych danych można wnioskować, że istotne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu i zapobiegania przedwczesnemu starzeniu jest wzajemne współdziałanie trzech osi endokrynnych: Fgf23/α-klotho/kalcytriol/fosforany, regulującej gospodarkę wapniowo-fosforanową, Fgf15/β-klotho/kwasy żółciowe, zwiększającej klirens cholesterolu oraz Fgf21/β-klotho/niezestryfikowane kwasy tłuszczowe, regulującej metabolizm lipidów. Uderzające jest, że te trzy osie endokrynne współdziałając ze sobą, zapewniają utrzymanie homeostazy lipidów i gospodarki mineralnej organizmu, co może być znaczące w opóźnianiu pojawiania się procesów starzenia [35].

Ostatnie badania dowodzą istnienia jeszcze jednej formy białka klotho, określanej jako γ-klotho lub Lctl, która ulega dominującej ekspresji w brunatnej tkance tłuszczowej i w oczach. γ-Klotho tworzy kompleksy z receptorami Fgfr1b, Fgfr1c, Fgfr2c i Fgfr4, które prawdopodobnie mogą być aktywowane przez Fgf15 [16].

PODSUMOWANIE

W niniejszej pracy przedstawiono mechanizmy, poprzez które białko α-klotho może brać udział w hamowaniu procesów starzenia. Zidentyfikowanie białka α-klotho wydaje się bardzo interesujące ze względu na odkrycie nowej osi endokrynnej kość – nerki – przytarczyce, w której istotną rolę odgrywają FGF23 i α-klotho. Błonowa forma białka α-klotho uczestniczy w regulacji homeostazy wapniowo-fosforanowej i tym samym w regulacji metabolizmu witaminy D funkcjonując, jako niezbędny koreceptor dla FGF23. Natomiast wydzielnicza forma białka α-klotho, to czynnik endokrynny, który działając jako β-glukuronidaza zwiększa aktywność kanałów jonowych (TRPV2/5/6, ROMK1, TRPC1) i wpływa hamująco na różne czynniki wzrostowe (insulina/IGF-1, Wnt/β-katenina) regulując sygnałowanie komórkowe. Okazuje się, że białko α-klotho, ze względu na swoje właściwości, może być istotnym markerem w diagnostyce chorób związanych ze starzeniem się, takich jak: przewlekłe choroby nerek, choroby sercowo-naczyniowe, czy nowotwory [5, 13, 21, 60, 67, 68]. Wydaje się, że przyszłością może być również działanie terapeutyczne, polegające na zwiększaniu poziomu białka α-klotho w celu opóźnienia pojawienia się procesów starzenia.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana z projektu ST-40 Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

LITERATURA

[1] Afanas'ev I. Reactive oxygen species and age-related genes p66shc, Sirtuin, FOX03 and Klotho in senescence. *Oxid Med Cell Longev* 2010; **3**: 77-85.

[2] Asai O, Nakatani K, Tanaka T, Sakan H, Imura A, Yoshimoto S, Samejima K, Yamaguchi Y, Matsui M, Akai Y, Konishi N, Iwano M, Nabeshima Y, Saito Y. Decreased renal α-Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney Int* 2012; **81**: 539-547.

[3] Bastepe M, Juppner H. Inherited hypophosphatemic disorders in children and the evolving mechanisms of phosphate regulation. *Rev Endocr Metab Disord* 2008; **9**: 171-180.

[4] Ben Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-O M, Mohammadi M, Sirkis R, Naveh-Many T, Silver J. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 2007; **117**: 4003-4008.

[5] Bernheim J, Benchetrit S. The potential roles of FGF23 and Klotho in the prognosis of renal and cardiovascular diseases. *Nephrol Dial Transplant* 2011; **26**: 2433-2438.

[6] Bloch L, Sineshchekova O, Reichenbach D, Reiss K, Saftig P, Kuro-O M, Kaether C. Klotho is a substrate for α-, β- and gamma-secretase. *FEBS Lett* 2009; **583**: 3221-3224.

[7] Cha SK, Hu MC, Kurosu H, Kuro-O M, Moe O, Huang CL. Regulation of renal outer medullary potass sium channel and renal K(+) excretion by Klotho. *Mol Pharmacol* 2009; **76**: 38-46.

[8] Cha SK, Ortega B, Kurosu H, Rosenblatt KP, Kuro O, Huang CL. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 9805-9810.

[9] Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 19796-19801.

[10] Choi BH, Kim CG, Lim Y, Lee YH, Shin SY. Transcriptional activation of the human Klotho gene by epidermal growth factor in HEK293 cells; role of Egr-1. *Gene* 2010; **450**: 121-127.

[11] De Cavanagh EM, Inserra F, Ferder L. Angiotensin II blockade: a strategy to slow ageing by protecting mitochondria? *Cardiovasc Res* 2011; **89**: 31-40.

[12] Dermaku-Sopjani M, Sopjani M, Saxena A, Shojaiefard M, Bogatikov E, Alesutan I, Eichenmuller M, Lang F. Downregulation of NaPi-IIa and NaPi-IIb Na-coupled phosphate transporters by coexpression of Klotho. *Cell Physiol Biochem* 2011; **28**: 251-258.

[13] Devaraj S, Syed B, Chien A, Jialal I. Validation of an immunoassay for soluble klotho protein: decreased levels in diabetes and increased levels in chronic kidney disease. *Am J Clin Pathol* 2012; **137**: 479-485.

[14] Duce JA, Podvin S, Hollander W, Kipling D, Rosene DL, Abraham CR. Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey. *Glia* 2008; **56**: 106-117.

[15] Fischer SS, Kempe DS, Leibrock CB, Rexhepaj R, Siraskar B, Boini KM, Ackermann TF, Foller M, Hocher B, Rosenblatt KP, Kuro O, Lang F. Hyperaldosteronism in Klotho-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; **299**: F1171-F1177.

[16] Fon TK, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, Goetz R, Mohammadi M, Kuro-O M, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol* 2010; **24**: 2050-2064.

[17] Gattineni J, Bates C, Twombley K, Dwarakanath V, Robinson Ml, Goetz R, Mohammadi M, Baum M. FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **297**: F282-F291.

[18] Gattineni J, Twombley K, Goetz R, Mohammadi M, Baum M. Regulation of serum 1,25(OH)2 vitamin D3 levels by fibroblast growth factor 23 is mediated by FGF receptors 3 and 4. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; **301**: F371-F377.

[19] Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-O M, Moe OW. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J* 2010; **24**: 3438-3450.

[20] Hu MC, Shi M, Zhang J, Quinones H, Griffith C, Kuro-O M, Moe OW. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; **22**: 124-136.

[21] Hu MC, Shi M, Zhang J, Quinones H, Kuro-O M, Moe OW. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective. *Kidney Int* 2010; **78**: 1240-1251.

[22] Huang CL. Regulation of ion channels by secreted Klotho: mechanisms and implications. *Kidney Int* 2010; **77**: 855-860.

[23] Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A, Obuse C, Togashi K, Tominaga M, Kita N, Tomiyama K, Iijima J, Nabeshima Y, Fujioka M, Asato R, Tanaka S, Kojima K, Ito J, Nozaki K, Hashimoto N, Ito T, Nishio T, Uchiyama T, Fujimori T, Nabeshima Y. A-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science* 2007; **316**: 1615-1618.

[24] Ito S, Kinoshita S, Shiraishi N, Nakagawa S, Sekine S, Fujimori T, Nabeshima YI. Molecular cloning and expression analyses of mouse βklotho, which encodes a novel Klotho family protein. *Mech Dev* 2000; **98**: 115-119.

[25] Itoh N. Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res* 2010; **342**: 1-11.

[26] John GB, Cheng CY, Kuro-O M. Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *Am J Kidney Dis* 2011; **58**: 127-134.

[27] Katic M, Kennedy AR, Leykin I, Norris A, Mcgettrick A, Gesta S, Russell SJ, Bluher M, Maratos-Flier E, Kahn CR. Mitochondrial gene expression and increased oxidative metabolism: role in increased lifespan of fat-specific insulin receptor knock-out mice. *Aging Cell* 2007; **6**: 827-839.

[28] Kawata T, Imanishi Y, Kobayashi K, Miki T, Arnold A, Inaba M, Nishizawa Y. Parathyroid hormone regulates fibroblast growth factor-23 in a mouse model of primary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol* 2007; **18**: 2683-2688

[29] Kenyon C. The first long-lived mutants: discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011; **366**: 9-16.

[30] King GD, Rosene DL, Abraham CR. Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. *Age (Dordr)* 2012; **34**: 1405-1419.

[31] Krajisnik T, Bjorklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerstrom G, Jonsson KB, Westin G, Larsson TE. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1α-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 2007; **195**: 125-131.

[32] Kuro OM. Klotho in health and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; **21**: 362-368.

[33] Kuro-OM. Klotho and aging. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1790**: 1049-1058.

[34] Kuro-OM. Klotho. *Pflugers Arch* 2010; **459**: 333-343.

[35] Kuro-OM. Klotho and the aging process. *Korean J Intern Med* 2011; **26**: 113-122.

[36] Kuro-OM, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; **390**: 45-51.

[37] Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Rosenblatt KP, Kliewer SA, Kuro-OM. Tissue-specific expression of β-Klotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem* 2007; **282**: 26687-26695.

[38] Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, Mcguinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-OM. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 2005; **309**: 1829-1833.

[39] Kusaba T, Okigaki M, Matui A, Murakami M, Ishikawa K, Kimura T, Sonomura K, Adachi Y, Shibuya M, Shirayama T, Tanda S, Hatta T, Sasaki S, Mori Y, Matsubara H. Klotho is associated with VEGF

receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca2+ channel to maintain endothelial integrity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 19308-19313.

[40] Kusano E. Mechanism by which chronic kidney disease causes cardiovascular disease and the measures to manage this phenomenon. *Clin Exp Nephrol* 2011; **15**: 627-633.

[41] LIN Y, SUN Z. Antiaging gene Klotho enhances glucose-induced insulin secretion by up-regulating plasma membrane levels of TRPV2 in MIN6 β-cells. *Endocrinology* 2012; **153**: 3029-3039.

[42] Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, Malide D, Rovira II, Schimel D, Kuo CJ, Gutkind JS, Hwang PM, Finkel T. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 2007; **317**: 803-806.

[43] Liu S, Gupta A, Quarles LD. Emerging role of fibroblast growth factor 23 in a bone-kidney axis regulating systemic phosphate homeostasis and extracellular matrix mineralization. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; **16**: 329-335.

[44] Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol* 2007; **18**: 1637-1647.

[45] Liu S, Vierthaler L, Tang W, Zhou J, Quarles LD. FGFR3 and FGFR4 do not mediate renal effects of FGF23. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 2342-2350.

[46] Long YC, Kharitonenkov A. Hormone-like fibroblast growth factors and metabolic regulation. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1812**: 791-795.

[47] Lu P, Boros S, Chang Q, Bindels RJ, Hoenderop JG. The β-glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca2+ channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol Dial Transplant* 2008; **23**: 3397-3402.

[48] Maekawa Y, Ohishi M, Ikushima M, Yamamoto K, Yasuda O, Oguro R, Yamamoto-Hanasaki H, Tatara Y, Takeya Y, Rakugi H. Klotho protein diminishes endothelial apoptosis and senescence via a mitogen-activated kinase pathway. *Geriatr Gerontol Int* 2011; **11**: 510-516.

[49] Manolopoulos KN, Klotz LO, Korsten P, Bornstein SR, Barthel A. Linking Alzheimer's disease to insulin resistance: the FoxO response to oxidative stress. *Mol Psychiatry* 2010; **15**: 1046-1052.

[50] Manya H, Akasaka-Manya K, Endo T. Klotho protein deficiency and aging. *Geriatr Gerontol Int* 2010; **10** (Suppl 1)**:** S80-S87.

[51] Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-O M, Nabeshima Y. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **242**: 626-630.

[52] Medici D, Razzaque MS, Deluca S, Rector TL, Hou B, Kang K, Goetz R, Mohammadi M, Kuro O, Olsen BR, Lanske B. FGF-23-Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2008; **182**: 459-465.

[53] Murakami S. Stress resistance in long-lived mouse models. *Exp Gerontol* 2006; **41**: 1014-1019.

[54] Nabeshima Y. Discovery of α-Klotho unveiled new insights into calcium and phosphate homeostasis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009; **85**: 125-141.

[55] Ohyama Y, Kurabayashi M, Masuda H, Nakamura T, Aihara Y, Kaname T, Suga T, Arai M, Aizawa H, Matsumura Y, Kuro-O M, Nabeshima Y, Nagail R. Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **251**: 920-925.

[56] Oz OK, Hajibeigi A, Howard K, Cummins CL, Van Abel M, Bindels RJ, Word RA, Kuro-O M, Pak CY, Zerwekh JE. Aromatase deficiency causes altered expression of molecules critical for calcium reabsorption in the kidneys of female mice *. *J Bone Miner Res* 2007; **22**: 1893-1902.

[57] Papaconstantinou J. Insulin/IGF-1 and ROS signaling pathway cross-talk in aging and longevity determination. *Mol Cell Endocrinol* 2009; **299**: 89-100.

[58] Quarles LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest* 2008; **118**: 3820-3828.

[59] Quarles LD. Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 2012; **8**: 276-286.

[60] Shimamura Y, Hamada K, Inoue K, Ogata K, Ishihara M, Kagawa T, Inoue M, Fujimoto S, Ikebe M, Yuasa K, Yamanaka S, Sugiura T, Terada Y. Serum levels of soluble secreted α-Klotho are decreased

in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis. *Clin Exp Nephrol* 2012; **16**: 722-729.

[61] Sopjani M, Alesutan I, Dermaku-Sopjani M, Gu S, Zelenak C, Munoz C, Velic A, Foller M, Rosenblatt KP, Kuro-O M, Lang F. Regulation of the Na+/K+ ATPase by Klotho. *FEBS Lett* 2011; **585**: 1759-1764.

[62] Sugiura H, Yoshida T, Mitobe M, Yoshida S, Shiohira S, Nitta K, Tsuchiya K. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute kidney injury via HSP-70. *Nephrol Dial Transplant* 2010; **25**: 60-68.

[63] Sun CY, Chang SC, Wu MS. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int* 2012; **81**: 640-650.

[64] Tang C, Pathare G, Michael D, Fajol A, Eichenmuller M, Lang F. Downregulation of Klotho expression by dehydration. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; **301**: F745-F750.

[65] Tomiyama K, Maeda R, Urakawa I, Yamazaki Y, Tanaka T, Ito S, Nabeshima Y, Tomita T, Odori S, Hosoda K, Nakao K, Imura A, Nabeshima Y. Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 1666-1671.

[66] Torres PU, Prie D, Molina-Bletry V, Beck L, Silve C, Friedlander G. Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. *Kidney Int* 2007; **71**: 730-737.

[67] Usuda J, Ichinose S, Ishizumi T, Ohtani K, Inoue T, Saji H, Kakihana M, Kajiwara N, Uchida O, Nomura M, Ohira T, Ikeda N. Klotho predicts good clinical outcome in patients with limited-disease small cell lung cancer who received surgery. *Lung Cancer* 2011; **74**: 332-337.

[68] Usuda J, Ichinose S, Ishizumi T, Ohtani K, Inoue T, Saji H, Kakihana M, Kajiwara N, Uchida O, Nomura M, Tsutsui H, Ohira T, Ikeda N. Klotho is a novel biomarker for good survival in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2011; **72**: 355-359.

[69] Wang Y, Kuro-OM, Sun Z. Klotho gene delivery suppresses Nox2 expression and attenuates oxidative stress in rat aortic smooth muscle cells via the cAMP-PKA pathway. *Aging Cell* 2012; **11**: 410-417.

[70] Wang Y, Sun Z. Current understanding of klotho. *Ageing Res Rev* 2009; **8**: 43-51.

[71] Yamazaki M, Ozono K, Okada T, Tachikawa K, Kondou H, Ohata Y, Michigami T. Both FGF23 and extracellular phosphate activate Raf/MEK/ERK pathway via FGF receptors in HEK293 cells. *J Cell Biochem* 2010; **111**: 1210-1221.

[72] Yang HC, Deleuze S, Zuo Y, Potthoff Sa, Ma LJ, Fogo AB. The PPARgamma agonist pioglitazone ameliorates aging-related progressive renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 2380-2388.

[73] Zhang H, Li Y, Fan Y, Wu J, Zhao B, Guan Y, Chien S, Wang N. Klotho is a target gene of PPAR-gamma. *Kidney Int* 2008; **74**: 732-739.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 16.10.2012
Przyjęto: 25.02.2013
Ewa Sokołowska
Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1
80-211 Gdańsk
tel.: (058) 349 14 79
e-mail: sokole@gumed.edu.pl