

Struktura i funkcje białka Klotho

Structure and functions of Klotho protein

AGNIESZKA SZYMCZYK, EWA FORMA

Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Gen Klotho, odkryty został w roku 1997, a jego nazwa wywodzi się od imienia greckiej bogini Klotho, która przędła nić ludzkiego żywota. Myszy z inaktywowanym genem Klotho wykazują cechy przedwczesnego starzenia się, natomiast nadekspresja Klotho skutkuje wydłużeniem czasu ich życia. Białko Klotho występuje w dwóch formach - transbłonowej oraz sekrecyjnej, którym przypisuje się odmienne funkcje. Najwyższą ekspresję transbłonowej formy Klotho obserwuje się w nerkach i splotach naczyniówkowych komórek mózgowych. Forma ta, funkcjonuje jako koreceptor dla czynnika wzrostu fibroblastów 23 (FGF23), który uczestniczy w utrzymaniu homeostazy fosforanowej oraz regulacji metabolizmu witaminy D. Sekrecyjna postać białka, której obecność wykazano w osoczu, płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w moczu, funkcjonuje jako czynnik humoralny. Reguluje ona aktywność kanałów jonowych, transporterów błonowych, a także receptorów dla czynników wzrostu. Poprzez modyfikację N-glikanów kanałów TRPV5, Klotho sekrecyjne bierze udział w utrzymaniu homeostazy jonów wapnia. Ponadto, sekrecyjna postać białka uczestniczy w hamowaniu szlaku insuliny/insulinopodobnego czynnika wzrostu. Ostatnie doniesienia sugerują, iż Klotho spełnia także rolę supresora procesu nowotworzenia. Obniżenie ekspresji genu Klotho wykazano m.in. w raku piersi, trzustki, żołądka, jelita grubego, płuc oraz w raku szyjki macicy. Spadek ekspresji genu Klotho skorelowany jest z bardziej agresywnym fenotypem badanych nowotworów. Wśród mechanizmów leżących u podstaw obniżenia ekspresji Klotho wyróżnia się m.in. hipermetylację wysp CpG w obrębie regionu promotorowego oraz deacetylację histonów.

Adres do korespondencji: dr Ewa Forma, Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki;
90-236 Łódź, ul. Pomorska 141/143; e-mail: eforma@biol.uni.lodz.pl;
Tel.:+ 48 42 635 4371, Fax: +48 42 6354484

Słowa kluczowe: białko Klotho, TRPV, wapń, fosfor, witamina D, czynniki wzrostu fibroblastów, nowotwory.

Abstract

Klotho gene was identified in 1997, and named after a Greek goddess Klotho, who spun the thread of life. The inactivation of Klotho gene in mice leads to a syndrome resembling aging, whereas the overexpression of Klotho extends their life span. Protein Klotho exists in two forms: membrane and secreted Klotho which play different functions. The highest expression of transmembrane form of Klotho is observed in the kidney and choroid plexus in the brain. The transmembran form of Klotho acts as a coreceptor for fibroblast growth factor 23 (FGF23) and regulates phosphate homeostasis band vitamin D metabolism. The secreted form of Klotho, which was detected in plasma, cerebrospinal fluid and urine functions as a humoral factor that regulates the activity of several ion channels, transporters, and growth factor receptors. Moreover, this form of Klotho protein can modify N-glycans of TRPV5 channel and regulate calcium homeostasis. The secreted Klotho can also inhibit the insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) pathways. Last data suggest that Klotho can act as a tumor supressor gene. The decrease of Klotho expression was observed in the breast, pancreas, stomach, colon, lung and cervical cancer. Moreover, the decrease of Klotho expression was correlated with the more aggressive phenotype of examined cancers. Downregulation of Klotho gene was associated with CpG hypermethylation of promoter region and histones deacetylation.

Key words: Klotho protein, TRPV, calcium, phosphorus, vitamin D, fibroblast growth factors, neoplasms.

Wstęp

Gen Klotho (KL, określany również jako α KL) został po raz pierwszy zidentyfikowany w 1997 roku u myszy transgenicznych, które otrzymano w wyniku przypadkowej insercji transgenu do fragmentu 5' regionu

promotorowego genu KL, co doprowadziło do jego inaktywacji [1]. Początkowo linia myszy $KL^{-/-}$ uważana była za bezużyteczną, gdyż wprowadzony do genomu myszy transgen nie powodował zmian fenotypowych. Pogląd ten uległ zmianie, gdy u myszy, które do 3-4 tygodnia życia rozwijały się prawidłowo, niemal tak samo jak heterozygoty $KL^{-/+}$ lub osobniki typu dzikiego, w kolejnych tygodniach obserwowano zahamowanie wzrostu oraz występowanie szeregu zmian charakterystycznych dla procesu starzenia, takich jak: miażdżycza tętnic, zwapnienie naczyń i tkanek miękkich, rozedma płuc, dysplazja gonad, bezpłodność, atrofia skóry, zaburzenia słuchu, przedwczesny zanik grasicy, osteopenia, sarkopenia, hipoglikemia oraz hiperfosfatemia. Myszy Klotho ($KL^{-/-}$) umierały przedwcześnie około 8-9 tygodnia życia [1-3]. Z kolei nadekspresja Klotho skorelowana jest ze zwiększeniem długości życia myszy. W odniesieniu do myszy typu dzikiego długość życia samców z nadekspresją Klotho ulega wydłużeniu o około 31%, zaś samic o około 19% [3, 4].

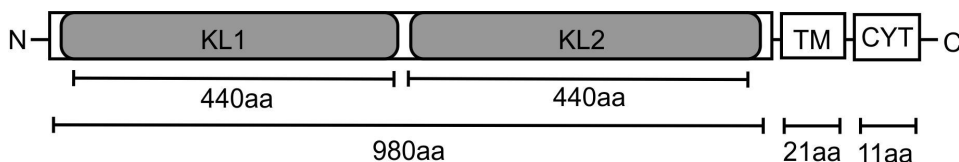
Struktura genu i białka Klotho

Nazwa genu i białka wywodzi się od greckiej bogini Klotho, która wraz z siostrami Lachesis i Atropos przędła nić ludzkiego życia i decydowała o jego długości [4, 6]. Gen KL człowieka obejmujący około 50 kpb zlokalizowany jest na chromosomie 13q12 (u myszy na chromosomie 5) i składa się z 5 eksonów [2, 7]. W regionie promotorowym genu KL nie stwierdzono obecności typowej kasety TATA oraz kasety CAAT, natomiast w regionie tym znajduje się pięć potencjalnych miejsc wiązania czynnika transkrypcyjnego Sp1, które często występują w promotorach nie zawierających kasety TATA [2; 8]. Ponadto w regionie obejmującym fragment sekwencji promotora oraz pierwszy ekson genu KL (łącznie 1304 pb) stwierdzono obecność wyspy CpG [8]. Na podstawie

podobieństwa sekwencji zidentyfikowano kolejne 2 geny należące do rodziny Klotho, tj. β Klotho oraz γ Klotho, który określany jest jako KLPH (ang. *KL lactase phlorizin hydrolase*) lub LCTL (ang. *lactase-like protein*) [9].

Analiza sekwencji cDNA KL wykazała istnienie dwóch transkryptów powstających w wyniku alternatywnego składania mRNA. Pierwszy transkrypt obejmujący otwartą ramkę odczytu (ORF, ang. *open reading frame*) o długości 3036 pz koduje białko transbłonowe składające się z 1012 reszt aminokwasowych. Drugi transkrypt KL różni się od pierwszego obecnością insercji o długości 50 pz zawierającej kodon STOP, który sprawia, że ORF jest krótsza (1647 pz), a powstające białko składa się z 549 reszt aminokwasowych. Jest to sekrecyjna forma białka Klotho (sKL). Miejsce alternatywnego składania znajduje się w obrębie 3 eksonu [2, 8, 10].

Transbłonowa forma białka Klotho człowieka składa się z 1012 aminokwasów i wykazuje 86% homologię w stosunku do białka myszy (1014 aa) [2]. Masa cząsteczkowa białka Klotho wynosi 130 kDa i na jej wartość ma wpływ N-glikozylacja. Traktowanie komórek CHO-TM2 N-glikozydazą oraz tunikamycyną, będącą inhibitorem procesu glikozylacji, pozwoliło na detekcję białka Klotho o masie cząsteczkowej 110 kDa, która wydaje się być zgodna z masą cząsteczkową przewidywaną na podstawie sekwencji aminokwasowej [11]. W strukturze białka KL wyróżnia się trzy domeny: krótką, wewnątrzkomórkową domenę C-końcową (11 aa), domenę transbłonową (21 aa), która tylko raz przebija błonę komórkową oraz długą, zewnątrzkomórkową domenę N-końcową (980 aa) [12]. W domenie zewnątrzkomórkowej wyróżnia się dwa powtórzenia sekwencji składające się z 440 aminokwasów każde, które określane są jako KL1 i KL2 (Ryc. 1).



Ryc. 1. Struktura białka Klotho, w którym wyróżnia się N-końcową domenę zewnątrzkomórkową z powtórzeniami KL1 i KL2, domenę transmembranową (TM) oraz cytoplazmatyczną (CYT).

Pomiędzy powtórzeniami KL1 i KL2 znajduje się odcinek łącznikowy (linkerowy), w obrębie którego znajduje się sekwencja Lys-Lys-Arg-Lys, stanowiąca potencjalne miejsce cięcia proteolitycznego [2, 8, 12].

Powtórzenia KL1 i KL2 wykazują aktywność enzymatyczną i na podstawie podobieństwa strukturalnego białko Klotho zostało zaliczone do rodziny 1 glikozydaz. Zarówno KL1 jak i KL2 charakteryzują się 20-40% podobieństwem do β -glukozydaz występujących u bakterii i roślin oraz do hydrolazy florydzynowej ssaków [4, 12]. Kluczową rolę dla aktywności β -glukozydaz pełnią dwie reszty kwasu glutaminowego. Pierwsza z nich funkcjonuje jako nukleofil, druga zaś spełnia rolę kwasu/zasady. W przypadku białka Klotho reszty te zostają jednak zastąpione resztami innych aminokwasów, przy czym w obu powtórzeniach zmiana dotyczy tylko jednej reszty kwasu glutaminowego. W przypadku KL1 reszta kwasu glutaminowego, pełniąca funkcję nukleofila, zastąpiona jest asparaginą, natomiast w KL2 kwas glutaminowy funkcjonujący jako kwas/zasada zastąpiony jest przez serynę. Wykazano, że hydrolizie przy udziale białka Klotho podlegają m.in. glukoronidy estradiolu, estronu i estriolu [12, 13]. Najwyższy poziom ekspresji transbłonowego białka Klotho obserwuje się w kanalikach nerkowych i splocie naczyńiówkowym w mózgu. Ponadto ekspresję Klotho wykazano w przysadce, uchu wewnętrznym, mózgu, przytarczycach, trzustce, jelicie grubym, mięśniach

szkieletowych, pęcherzu moczowym, jajnikach, jądrach oraz w komórkach nabłonkowych piersi [4, 14, 15].

Forma sekrecyjna białka Klotho, to druga obok transbłonowej postać tego białka [2, 8, 12, 16]. Powstaje ona w wyniku alternatywnego składowania i obejmuje 549 reszt aminokwasowych i odpowiada fragmentowi KL1 białka błonowego [2, 8]. Wykazano, że sKL może powstawać z transbłonowego białka Klotho w wyniku cięcia proteolitycznego, dzięki aktywności enzymów należących do rodziny ADAM (ang. *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein*), tj. ADAM10 i ADAM17. Białka te dokonują cięcia białka Klotho na dwa sposoby, które nazwane są cięciem α oraz β i generują odpowiednio fragmenty o masie cząsteczkowej 130 i 68 kDa. Cięcie α zachodzi tuż za domeną transbłonową białka Klotho a powstający w jego wyniku fragment zawiera zarówno KL1 jak i KL2. Cięcie β zachodzi natomiast w obrębie odcinka o łączącego fragment KL1 i KL2. Na skutek różnej wydajności obu procesów fragment powstający w wyniku cięcia α stanowi dominującą formę sKL. Obecność sekrecyjnego białka Klotho wykazano w osoczu, płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w moczu [17].

Funkcje sekrecyjnej formy białka Klotho

Udział białka Klotho w homeostazie jonów wapnia

Wapń pełni istotną rolę w skali całego organizmu. Funkcjonuje on zarówno jako czynnik zewnątrzkomórkowy, jak i wewnątrzkomórkowy [18]. Dorosły człowiek spożywa w ciągu dnia około 1000 mg wapnia. Resorpcja jonów wapnia przebiega w komórkach nabłonka jelita cienkiego, gdzie wchłaniane jest około 400 mg wapnia pobranego z pożywieniem oraz w dystalnych kanalikach nerkowych [19]. Wchłanianie jonów wapnia stanowi

proces trzystopniowy. Pierwszy etap obejmuje wniknięcie jonów Ca^{2+} przez błonę luminalną bądź apikalną zgodnie z gradientem stężeń. Pasywny transport jonów wapniowych odbywa się przy udziale selektywnych kanałów zmiennopotencjałowych receptorów waniloidowych (TRPV, ang. *transient receptor potential vanilloid*), tj. receptorów typu piątego (TRPV5) w nerkach oraz zlokalizowanych w jelicie cienkim receptorów typu szóstego (TRPV6). Jony wapniowe dyfundują następnie przez cytozol, gdzie wiążą się z białkami pomocniczymi: kalbindyną 28 ($\text{D}_{28\text{K}}$, ang. *calbindin D-28, vitamin D-dependent calcium-binding protein*) i kalbindyną 9 ($\text{D}_{9\text{K}}$, ang. *calbindin D-9*). Obecność kalbindyny $\text{D}_{28\text{K}}$ stwierdza się głównie w nabłonku nerek, natomiast kalbindyna $\text{D}_{9\text{K}}$ zlokalizowana jest przede wszystkim w jelicie. W ostatnim etapie jony wapnia przenoszone są do krwioobiegu przez błonę podstawną komórek nerek bądź jelita. Zachodzący wbrew gradientowi stężeń transport jonów Ca^{2+} , odbywa się w nerkach przy udziale białka NCX1 (ang. *$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger-1*), ponadto w nerkach i w jelicie w transport jonów wapnia zaangażowana jest ATPaza Ca^{2+} (PMCA1b, ang. *plasma membrane calcium-ATPase 1b*) [20-22].

Zmiennopotencjałowe receptory waniloidowe TRPV5 i 6 są białkami składającymi się z około 730 aminokwasów. Geny kodujące wyżej wymienione receptory zlokalizowane są u człowieka na chromosomie 7q35 i obejmują 15 eksonów [20, 22]. Receptory TRPV5 i 6 ulegają N-glikozylacji w obrębie odcinka łączącego domenę 1 i 2, znajdującego się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Miejsce glikozylacji stanowi asparagina w pozycji 358 oraz 357 [23]. W regionie N-końcowym białek TRPV5 i 6 odnotowano obecność powtórzeń ankirynowych, zaangażowanych w proces tworzenia tetrametrów, w postaci których kanały te spełniają swoje fizjologiczne funkcje [20]. Receptory TRPV5 i 6 są najbardziej selektywnymi kanałami dla

jonów wapnia, spośród wszystkich poznanych dotąd kanałów zmienno-potencjałowych. Właściwość ta uwarunkowana jest obecnością reszty kwasu asparaginowego w regionie formującym kanał jonowy. W przypadku TRPV5 reszta kwasu asparaginowego znajduje się w pozycji 542, natomiast w TRPV6 w pozycji 541 [20, 22, 24].

W nerkach poziom ekspresji TRPV5 podlega regulacji m.in. przez hormony kalcytropowe, tj. parathormon (PTH), kalcytriol oraz dostarczane z pożywieniem jony Ca^{2+} . Ekspresja TRPV5 kontrolowana jest również przez hormony płciowe (estrogeny, testosteron), a także równowagę kwasowo-zasadową [19, 22]. Oprócz wzrostu ekspresji TRPV5, parathormon może również stymulować transport jonów Ca^{2+} poprzez aktywację szlaku kinazy białkowej A (PKA, ang. *protein kinase A*). Uruchomienie tego szlaku sygnalizacyjnego prowadzi do zależnej od PTH fosforylacji TRPV5, w wyniku której dochodzi do zwiększenia aktywności kanałów. Parathormon poprzez szlak kinazy białkowej C (PKC, ang. *protein kinase C*) może również przyczyniać się do hamowania endocytozy TRPV5. Inhibicja endocytozy skutkuje z kolei zwiększeniem liczności kanałów na powierzchni komórek [19].

U myszy pozbawionych kanałów TRPV5, pomimo wysokiego stężenia kalcytriolu odnotowuje się obniżenie nerkowej resorpcji jonów wapnia, która z kolei jest po części rekompensowana przez jelita, na terenie których obserwuje się zwiększenie ekspresji TRPV6 oraz kalbindyny $\text{D}_{9\text{K}}$. Mimo to, myszy wykazują nieprawidłowości w strukturze kości, dochodzi u nich m.in. do zmniejszenia grubości kości korowej i beleczkowej. U myszy TRPV5^{-/-} obserwowano również obniżenie nerkowej ekspresji białka Klotho. Wspólna lokalizacja białka Klotho oraz TRPV5 na terenie kanalików dystalnych była podstawą sugestii, iż białko to zaangażowane jest w regulację gospodarki

wapniowej poprzez wpływ na aktywność kanałów TRPV [22, 24]. W wyniku traktowania komórek HEK293 (ang. *human embryonic kidney 293*) sekrecyjną formą białka Klotho dochodziło do nagromadzenia kanałów TRPV5 na powierzchni badanych komórek. W przypadku podstawienia, kluczowej dla N-glikozylacji TRPV5, reszty asparaginy innym aminokwasem nie obserwowano takiego efektu. [12, 24, 25]. Wykazująca aktywność β -glukuronidazy sekrecyjna forma białka Klotho, przyczynia się zatem do zwiększenia resorpcji jonów wapnia na terenie nerek. Białko Klotho uczestniczy w modyfikacji N-glikanów kanałów TRPV5 poprzez usuwanie reszt kwasu sjałowego. N-glikany glikoprotein takich jak TRPV5 składają się z nie więcej niż czterech ramion. Utworzenie owych ramion inicjowane jest poprzez dołączenie czterech cząsteczek N-acetyloglukozaminy do rdzenia pentasacharydowego Man3GlcNAc2 poprzez wiązania β 2-, β 4- i β 6-glikozydowe. W następnej kolejności dochodzi do przyłączenia reszt galaktozy i utworzenia disacharydów: galaktoza-N-acetyloglukozamina, określanych jako N-acetylolaktozamina (LacNAc, ang. *N-acetyl lactosamine*). W przypadku N-glikanów kanałów TRPV5 cząsteczkę końcową stanowi kwas sjałowy przyłączony do galaktozy wiązaniami α 2,3- bądź α 2,6-glikozydowym. Enzymami odpowiedzialnymi za syntezę wiązań są sialotransferazy: α 2,3- oraz α 2,6-sialotransferaza [12, 25].

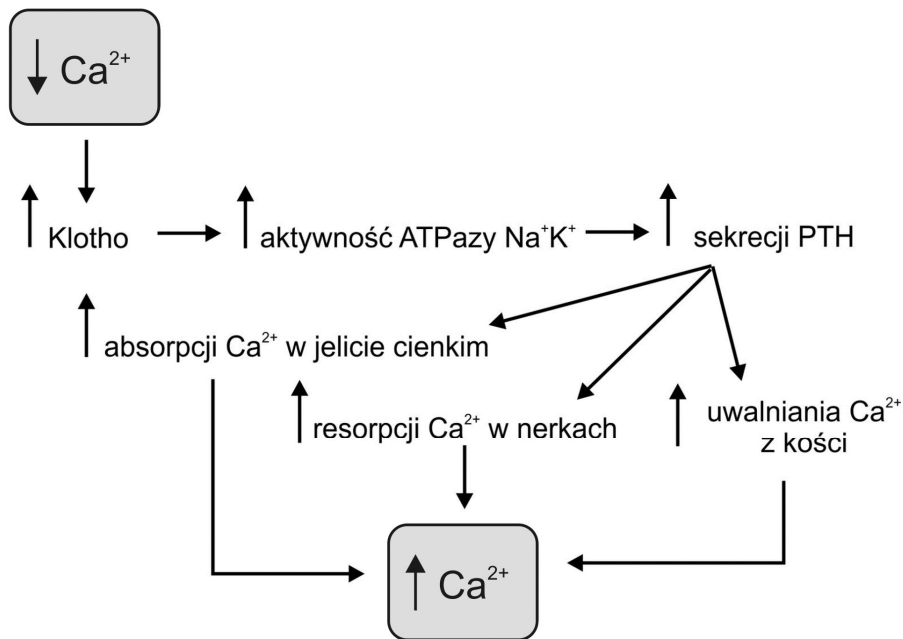
Modyfikację N-glikanów kanałów TRPV5 przez białko Klotho zaobserwowano m.in. w komórkach HEK293. W przypadku komórek CHO (ang. *chinese hamster ovary*), w których α 2,6-sialotransferaza nie ulega ekspresji endogennie, Klotho sekrecyjne nie wpływało na poziom ekspresji kanałów TRPV5 w błonie komórkowej. Wyniki te sugerują zatem, iż reszta kwasu sjałowego przyłączona do galaktozy wiązaniem α 2,6- a nie α 2,3-glikozydowym stanowi substrat dla białka Klotho [12, 25, 26].

Mechanizm, za sprawą którego modyfikacja N-glikanów prowadzi do zwiększenia liczby kanałów TRPV5 na powierzchni komórki wyjaśniony został przez Cha i wsp. [26]. Usunięcie reszty kwasu sjałowego z N-glikanów kanału TRPV5 przez białko Klotho umożliwia wiązanie się TRPV5 z galektyną 1. Substratem dla galektyny 1 jest N-acetylolaktozamina połączona z kwasem sjałowym wiązaniem α 2,3-glikozydowym. Usunięcie przez białko Klotho reszty kwasu sjałowego z N-glikanów TRPV5 prowadzi do odsłonięcia N-acetylolaktozaminy, stanowiącej substrat dla galektyny 1. Za sprawą galektyny 1 dochodzi następnie do sieciowania N-glikanów sąsiadujących kanałów TRPV5. Połączenie to ogranicza z kolei ich endocytozę, w konsekwencji czego dochodzi do zwiększenia retencji TRPV5 na powierzchni komórek [12, 25, 26]. Sugeruje się, że regulacja gospodarki wapniowej podlega również kontroli przez transbłonową formę białka. Klotho zaangażowane jest bowiem w regulację aktywności ATPazy sodowo-potasowej. ATPaza Na^+K^+ jest szeroko rozpowszechnionym enzymem stanowiącym integralny składnik błon wielu komórek. Białko to składa się z podjednostki α (ok. 113 kDa) oraz β (ok. 35 kDa). Podjednostka α odpowiada za transport jonów oraz aktywność katalityczną, natomiast podjednostka β zaangażowana jest w regulację aktywności podjednostki α [21]. ATPaza Na^+K^+ jest ważnym regulatorem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów sodu i potasu. Gradient sodowo-potasowy stanowi z kolei siłę napędową dla transportu wielu cząsteczek przez błonę komórkową. Sugeruje się, że wytwarzany przez ATPazę Na^+K^+ gradient jonów sodu zaangażowany jest również w regulację transepitelialnego transportu jonów wapniowych na terenie spłotów naczyńkowych, przytarczyc oraz nerek [21, 27]. Wykorzystując metodę frakcjonowania subkomórkowego udowodniono, iż ATPaza sodowo-potasowa ma zdolność

wiązania się z niedojrzałą formą białka Klotho (120 kDa) w obrębie siateczki śródplazmatycznej, natomiast w obrębie aparatu Golgiego i wczesnych endosomów ATPaza Na^+K^+ oddziałuje z dojrzałą formą białka Klotho o masie cząsteczkowej 135 kDa. Sugeruje się, że oddziaływanie ATPazy Na^+K^+ z białkiem Klotho umożliwia jej rekrutację do błony komórkowej [28].

Badania *in vitro* prowadzone na komórkach nabłonkowych spłotów naczyniówkowych dowiodły, iż aktywność ATPazy Na^+K^+ wzrasta w przypadku niedoborów jonów wapnia. Wykazano, że w wyniku obniżenia stężenia wapnia dochodziło do wzrostu ilości ATPazy Na^+K^+ w błonie komórkowej o około 12%. Wysoka podaż jonów Ca^{2+} skutkowała z kolei zmniejszeniem poziomu tego enzymu w błonie komórkowej o około 8% [21, 27]. Nie wykazano natomiast wpływu zewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia na poziom ekspresji ATPazy Na^+K^+ w błonie komórkowej komórek nabłonkowych spłotów naczyniówkowych myszy Klotho. Wydaje się to potwierdzać sugestię, iż białko Klotho jest kluczowym czynnikiem wpływającym na rekrutację ATPazy Na^+K^+ do błony komórkowej [21]. Sugeruje się, iż w odpowiedzi na spadek zewnątrzkomórkowego poziomu wapnia, Klotho wzmacnia rekrutację ATPazy Na^+K^+ do błony komórkowej, a wytwarzany przez enzym gradient jonów sodu i potasu stymuluje uwalnianie PTH w przytarczycach. W przypadku niedoboru jonów wapnia, hormon ten poprzez zwiększanie syntezy kalcytriolu w nerkach stymuluje wchłanianie wapnia w jelicie cienkim. Działając na komórki kości zwiększa również uwalniania wapnia z zasobów szkieletowych oraz wzmacnia ich resorpcję w nerkach (Ryc. 2) [21, 28]. Potwierdzeniem tezy, iż kompleks Klotho–ATPaza Na^+K^+ odpowiedzialny jest za stymulowanie uwalniania PTH może być fakt, iż obniżenie wydzielania PTH odnotowano m.in. u myszy, u których dochodziło do zaburzenia ekspresji bądź aktywności

białka Klotho. Podobny efekt uzyskano również po zastosowaniu inhibitora ATPazy sodowo-potasowej [21].



Ryc. 2. Rola białka Klotho i ATPazy Na^+K^+ w regulacji homeostazy wapniowej.

Udział białka Klotho w hamowaniu szlaku insuliny/insulinopodobnego czynnika wzrostu

Szlaki sygnalizacyjne inicjowane przez insulinę, insulinopodobny czynnik wzrostu1 (IGF-1, ang. *insulin-like growth factor 1*) oraz ich homologi odgrywają istotną rolę w kontroli starzenia się wielu organizmów. Wykazano związek mutacji wpływających na poziom ekspresji bądź aktywność biologiczną insuliny, IGF-1 i ich homologów u myszy, *Drosophila melanogaster* oraz nicieni z żywotnością tych organizmów [29]. Myszy z niedoborem białka Klotho

wykazują hipoglikemię i wysoką wrażliwość na insulinę, natomiast przy nadekspresji Klotho obserwowano umiarkowaną oporność na działanie insuliny i IGF-1. Mimo insulinooporności myszy te wykazują jednak prawidłowy poziom glukozy we krwi i nie chorują na cukrzycę. Dane te, były podstawą twierdzenia, iż białko Klotho zaangażowane jest w tłumienie szlaku insuliny/IGF-1 [4-5]. Należące do podrodziny kinaz tyrozynowych receptory insuliny oraz IGF-1 są tetramerycznymi białkami składającymi się z dwóch podjednostek α oraz dwóch β . Funkcjonują one jako enzymy allosteryczne, w których w przypadku braku liganda, podjednostki α hamują aktywność kinazową podjednostek β . W wyniku połączenia podjednostek α z ligandem, receptory te ulegają autofosforylacji w obrębie pętli aktywacyjnych. Aktywacja receptorów skutkuje również fosforylacją reszt tyrozynowych, stanowiących miejsce przyłączenia substratów. Jak dotąd zidentyfikowano co najmniej dziewięć substratów przyłączanych do aktywnego receptora dla insuliny/IGF-1. Cztery z nich należą do rodziny IRS (ang. *insulin-receptor substrate*), wśród pozostałych wyróżnić można substraty takie jak: Gab-1 (ang. *Grb2-associated binder 1*), p60^{dok} (ang. *p60 docking protein*), Cbl (ang. *casitas B-lineage lymphoma*), APS (ang. *adapter protein with pleckstrin homology and Src homology 2 domains*) oraz izoformy Shc (ang. *src homology/collagen homology*). Kolejnym komponentem na szlaku insuliny/IGF-1 jest 3-kinaza fosfatydyloinozytolu (PI3K). Kinaza ta składa się z podjednostki katalitycznej (110 kDa) oraz regulatorowej (85 kDa), w obrębie której znajdują się dwie domeny SH2 (ang. *SRC homology 2*) umożliwiające wiązanie z białkami IRS. PI3K katalizuje reakcję fosforylacji fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP2) do fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trisfosforanu (PIP3). PIP3 zaangażowany jest z kolei w aktywację trzech klas cząsteczek sygnalizacyjnych: serynowo-treoninowych

kinaz z podrodziny AGC (ang. *cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C*), białek Rho (ang. *Ras homologous*), a także kinaz tyrozynowych TEC (ang. *tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma*) [30]. Kinaza PI3K zaangażowana jest również w aktywację szlaku sygnalizacyjnego mTOR/FRAP (ang. *mammalian target of rapamycin kinase/FKBP12-rapamycin associated protein*). Jedną z najlepiej scharakteryzowanych kinaz AGC jest PDK1 (ang. *phosphoinositide-dependent kinase 1*). Aktywna kinaza PDK1 fosforyluje i aktywuje serynowo-treoninową kinazę Akt/PKB (ang. *protein kinase B*). Białko to nie jest zakotwiczone w błonie komórkowej, w związku z czym może ono swobodnie przemieszczać się fosforylując liczne białka docelowe. Białka aktywowane na szlaku PI3K/Akt zaangażowane są w regulację procesów związanych ze wzrostem, metabolizmem, przeżyciem oraz proliferacją komórek [30, 31]. Mutacje genów kodujących ortologi receptora insulinowego, jego substratów (IRS) oraz PI3K skutkowały wydłużeniem czasu przeżycia u *C. elegans* oraz *D. melanogaster* [32-35]. Występujący u nicieni i *D. melanogaster* pojedynczy szlak insuliny/IGF-1 w toku ewolucji u ssaków został rozdzielony na dwie ścieżki sygnalizacyjne. Pomimo, iż ich funkcje nakładają się, szlak inicjowany przez insulinę zaangażowany jest głównie w regulację metabolizmu, z kolei oś IGF-1/hormonu wzrostu (GH, ang. *growth hormone*) warunkuje wzrost, rozwój i prawdopodobnie długowieczność. Wpływ insuliny na metabolizm podlega kontroli przez hormony o działaniu przeciwnym. IGF-1 jest składową większego systemu, który obejmuje hormon wzrostu oraz liczne białka wiążące, biorące udział w regulacji funkcji oraz wzrostu komórek. Pomimo widocznych różnic w funkcji owych szlaków, mechanizm, za sprawą którego IGF-1 sprzyja długowieczności zależny jest w dużej mierze od prawidłowego metabolizmu insuliny [35]. Interesujących

danych dostarczyły m.in. badania przeprowadzone na karłowatych myszach szczepów Ames i Snell. W odniesieniu do myszy typu dzikiego, myszy z homozygotyczną mutacją w genach *Prop1* (ang. *prophet of Pit-1*) oraz *Pit-1* (ang. *POU domain, class 1, transcription factor 1*) były o 66% mniejsze, jednakże czas ich życia ulegał znacznemu wydłużeniu (42-70%). Myszy te cierpiały jednak na bezpłodność [36]. Na skutek zaburzeń wydzielania hormonu wzrostu przez przysadkę, karłowate myszy wykazywały niskie stężenie IGF-1 w surowicy krwi. Obserwowano u nich również obniżone stężenie insuliny, a także zwiększoną wrażliwość na insulinę podawaną egzogennie [34, 36]. Dłuższą przeżywalność odnotowano również u heterozygotycznych myszy pozbawionych genu receptora dla IGF-1. Myszy homozygotyczne pod względem tej mutacji umierały tuż po urodzeniu. W przypadku heterozygot wydłużenie czasu przeżycia uzależnione było od płci, w odniesieniu do myszy typu dzikiego samice żyły o 33% dłużej, natomiast samce o 16%. Myszy te nie wykazywały zmian metabolicznych, ani też zaburzeń płodności. U osobników dorosłych obserwowano jednak zwiększone stężenie IGF-1, które prawdopodobnie niwelowało efekty mutacji receptora dla tego czynnika wzrostu. Myszy wykazywały prawidłowy poziom glukozy na czczo, jednakże po posiłku w porównaniu do kontroli u samców poziom ten był o 12% wyższy, u samic z kolei obserwowano spadek o 4,4% [34, 37, 38]. Ciekawych spostrzeżeń dostarczyły również badania prowadzone na linii myszy FIRKO (ang. *fat-specific insulin receptor knockout mice*), u których dokonano wyłączenia ekspresji receptora insulinowego na terenie tkanki tłuszczowej. Myszy te charakteryzowały się niską masą ciała, mimo że spożywały więcej pokarmu. Ponadto wykazywały one mniejszą insulinemię i nie rozwijała się u nich związana z wiekiem insulinooporność. Długość życia myszy FIRKO

ulegała zwiększeniu o ok. 18% [36, 38, 39]. Fakt, iż szlaki aktywowane przez insulinę i IGF-1 są silnie zakonserwowane ewolucyjnie może sugerować, że odgrywają one istotną rolę w regulacji długowieczności u ludzi. Badania wykazały, iż wraz z wiekiem dochodzi do zmniejszenia wydzielania GH, a w konsekwencji obniżenie stężenia IGF-1. Fenotyp starzenia obejmuje m.in. zwiększenie tkanki tłuszczowej, insulinooporność, choroby układu krążenia (miażdżycę, nadciśnienie). Wszystkie spośród wyżej wymienionych cech obserwuje się również u osób z niedoborem GH [34]. U osób cierpiących na zespół Larona (niewrażliwość na GH) odnotowuje się wysokie stężenie hormonu wzrostu oraz niskie stężenia IGF-1. Chorych charakteryzuje niski wzrost, otyłość, opóźnienie umysłowe, a także nietolerancja glukozy. Fenotyp ten, nie skutkuje jednak krótkim czasem przeżycia, gdyż pacjenci z zespołem Larona dożywają sędziwego wieku (niekiedy ponad 90 lat) [34, 40]. Osoby cierpiące na akromegalię (nadprodukcja GH) mają zwiększone ryzyko zgonu z powodu rozwijających się u nich chorób układu krążenia, cukrzycy oraz nowotworów [34]. Ponadto terapia substytucyjna GH u osób z niedoborem tego hormonu prowadziła do rozwoju insulinooporności, nietolerancji glukozy, bólów stawów, obrzęków, retencji sodu oraz nadmiernej aktywacji mitogenów, skutkującej najprawdopodobniej rozwojem nowotworów [34]. Mechanizm, za sprawą którego sekrecyjna forma białka Klotho przyczynia się do inhibicji szlaku insuliny i IGF-1 nie został do końca poznany. Wiadomo jednak, że funkcja Klotho opiera się na hamowaniu autofosforylacji receptorów, nie zaś na blokowaniu ich interakcji z ligandem. Inhibicja autofosforylacji receptorów insuliny i IGF-1 skutkuje obniżeniem aktywności IRS, blokowaniem ich oddziaływań z PI3K, a w konsekwencji hamowaniem aktywacji dalszych białek szlaku. W badaniach *in vitro* udowodniono, iż białko to może również hamować

fosforylację receptorów uprzednio aktywowanych przez insulinę bądź IGF-1. Aktywność sekrecyjnego białka Klotho jest specyficzna dla receptorów dla insuliny i IGF-1, ponieważ nie wykazywało ono podobnego efektu w stosunku do receptorów płytkowego czynnika wzrostu (PDGF, ang. *platelet-derived growth factor*) i czynnika wzrostu naskórka (EGF, ang. *epidermal growth factor*), które również posiadają aktywność kinaz tyrozynowych [5].

Aktywność enzymatyczna Klotho, skłania również do sugestii, iż białko to może modyfikować N-glikany receptorów insuliny i IGF-1, wynikiem czego jest blokowanie ich aktywności lub/i zmniejszenie liczby tych receptorów na powierzchni komórek. Potwierdzeniem tej tezy może być fakt, iż traktowanie hodowli komórek sialidazą indukuje insulinooporność. Ponadto nadekspresja sialidazy na powierzchni komórek, skutkuje u myszy rozwojem insulinooporności oraz nietolerancji glukozy [4]. Sugeruje się, iż białko Klotho przyczynia się do przedłużenia żywotności dzięki dwóm współdziałającym ze sobą mechanizmom, tj. hamowaniu sygnalizacji IGF-1 oraz zwiększaniu oporności na stres oksydacyjny. Zablockowanie transmisji sygnału na szlaku zależnym od insuliny/IGF-1 prowadzi do zahamowania aktywacji kinazy Akt, która fosforyluje czynnik transkrypcyjny FOXO (ang. *forkhead transcription factor*). Nieufosforylowany czynnik FOXO zlokalizowany jest w jądrze komórkowym gdzie spełnia rolę czynnika transkrypcyjnego [4, 41]. Występujące u ssaków czynniki transkrypcyjne FOXO stanowią ortologi obecnego u *C. elegans* czynnika DAF-16 (ang. *abnormal dauer formation protein 16*). U gryzoni zidentyfikowano do tej pory cztery czynniki z rodziny FOXO: FOXO1, FOXO3a FOXO4 oraz FOXO6 [42]. W swej strukturze czynniki transkrypcyjne z rodziny *forkhead* posiadają silnie zakonserwowaną domenę wiążącą DNA (ang. *winged helix/forkhead domain*). Białka należące do

rodziny FOXO odgrywają istotną rolę w procesach różnicowania komórek, embriogenezie, nowotworzeniu oraz w regulacji metabolizmu [43]. Czynniki transkrypcyjne FOXO zaangażowane są w regulację ekspresji wielu genów, w tym enzymów antyoksydacyjnych takich jak katalaza czy mitochondrialna manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (SOD2, ang. *superoxide dismutase 2*). Enzymy te usuwając reaktywne formy tlenu przyczyniają się do redukcji stresu oksydacyjnego. Redukcja stresu oksydacyjnego może być zatem czynnikiem kluczowym w procesie hamowania starzenia się organizmów, u których doszło do inhibicji szlaku insuliny/IGF-1 [4].

W badaniach prowadzonych na komórkach HeLa wykazano, iż forma sekrecyjna białka Klotho zmniejsza peroksydację lipidów, powstającą na skutek traktowania komórek herbicydem generującym nadtlenuki (*paraquat*). Na przykładzie linii komórek HeLa oraz CHO udowodniono również, iż białko to może chronić komórki przed apoptozą indukowaną stresem oksydacyjnym [41]. Myszy z nadekspresją Klotho wykazują zwiększoną ekspresję SOD2 na terenie mięśni, a także niższy poziom fosforylacji czynników FOXO w porównaniu do myszy typu dzikiego. U myszy tych odnotowuje się również spadek stężenia w moczu 8-hydroksydeoksyguanozyny (8-OHdG, ang. *8-hydroxydeoxyguanosine*), będącej markerem oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Ponadto śmiertelna dla myszy typu dzikiego dawka paraquatu, nie okazała się być letalną dla myszy z nadekspresją Klotho, co wskazuje na udział Klotho w redukcji stresu oksydacyjnego [4, 41]. Antyapoptotyczna aktywność Klotho potwierdzona została również w badaniach na komórkach śródbłonna żyły pępowinowej człowieka (HUVEC, ang. *human umbilical vascular endothelial cells*). Apoptozę w komórkach HUVEC indukowano nadtlakiem wodoru. W odniesieniu do kontroli w komórkach HUVEC traktowanych Klotho obserwowano znacznie

niższą aktywność kaspazy 3 i kaspazy 9. Białko Klotho wykazywało również aktywność antyapoptotyczną w stosunku do komórek, którym podawano epoksyd (inhibitor topoizomerazy II), stymulujący cięcie DNA i kierujący komórki na drogę apoptozy. Przypuszcza się zatem, że obok inhibicji szlaku insuliny/IGF-1/SOD2 istnieje jeszcze inny mechanizm, za sprawą którego białko Klotho chroni komórki przed apoptozą [44].

Rola transbłonowej formy białka Klotho w homeostazie fosforanów

Fosfor stanowi ważne ogniwo w regulacji przemian śródkomórkowych organizmu. Zaangażowany jest on m.in. w biosyntezę nukleotydów, fosfolipidów oraz 2,3-difosfoglicerolu, który ułatwia uwalnianie tlenu z hemoglobiny. Fosfor odpowiedzialny jest również za utrzymywanie integralności morfologicznej i czynnościowej układu ruchu. Jest czynnikiem niezbędnym dla prawidłowego przebiegu wielu szlaków metabolicznych [45].

Dorosły człowiek spożywa w ciągu dnia około 1,5 g fosforu, z czego 2/3 wchłaniane jest w jelitach [45]. Fosfor w organizmie człowieka zgromadzony jest głównie w kościach (ponad 80%), mięśniach (około 9%). Około 10,9% fosforu obecne jest w innych tkankach, natomiast fosforany nieorganiczne (Pi) stanowią jedynie ok. 0,1% całkowitej puli fosforu [21]. Kluczową rolę w regulacji stężenia fosforanów w surowicy krwi odgrywają nerki. Około 90% fosforanów zawartych w osoczu podlega filtracji w kłębuszkach nerkowych, przy czym 15% z nich przy prawidłowej diecie wydalane zostaje z moczem. Resorpcja fosforanów ma miejsce głównie w kanalikach proksymalnych i zachodzi ona przy udziale dwóch kotransporterów sodowo-fosforanowych, tj. NaPi-2a (ang. *sodium-phosphate cotransporter*

type-2a) oraz NaPi-2c (ang. *sodium-phosphate cotransporter type-2c*) [45]. Prawidłowe stężenie fosforanów we krwi utrzymywane jest dzięki równowadze zachodzącej pomiędzy procesami wchłaniania fosforanów zawartych w diecie przez jelita, mobilizacją z kości oraz resorpcją i wydalaniem przez nerki. Procesy te z kolei regulowane są przez szereg czynników endokrynnych takich jak kalcytriol, parathormon, czy FGF23 (ang. *fibroblast growth factor 23*) [4, 16, 47, 49]. Dowodów na to, w jaki sposób białko Klotho wpływa na regulację gospodarki fosforanowej dostarczyły m.in. badania przeprowadzone na myszach pozbawionych genu FGF23. U myszy tych, podobnie jak u myszy Klotho, zaobserwowano wystąpienie przedwczesnych objawów przypominających starzenie się człowieka. U myszy FGF23^{-/-} obserwowano m.in. zahamowanie wzrostu, kifozę, osteopenię, atrofię gonad, inwolucję grasicy, rozedmę płuc, zaniki mięśniowe i skórne. Myszy FGF23^{-/-} wykazywały również nieprawidłową resorpcję fosforanów w nerkach, a także zwiększoną syntezę kalcytriolu. Przyczyną takiego stanu rzeczy okazał się fakt, iż transbłonowa forma białka Klotho stanowi koreceptor dla FGF23 [5, 9, 50]. Gen FGF23 został pierwotnie zidentyfikowany u pacjentów z autosomalną dominującą krzywicą hipofosfatemiczną (ADHR, ang. *autosomal dominant hypophosphatemic rickets*). U osób z ADHR stwierdzono występowanie mutacji zmiany sensu w genie FGF23, w wyniku której reszta argininy w pozycji 176 lub 179 zostaje zamieniona na glutaminę. Mutacja ta skutkuje opornością FGF23 na trawienie endopeptydazą, a w konsekwencji zwiększeniem jego stężenia w surowicy krwi. Zwiększony poziom FGF23 prowadzi natomiast do nadmiernej utraty fosforanów, rozwoju hipofosfatemii oraz krzywicy [3, 9, 16, 48, 51]. Kolejnym schorzeniem objawiającym się zwiększonym poziomem FGF23 w surowicy krwi jest hipofosfatemia sprzężona z chromosomem X (XLH ang. *X-linked*

hypophosphataemia). XLH występuje z częstością 1 na 20 000 żywych urodzeń i dziedziczona jest jako cecha dominująca sprzężona z chromosomem X. Jej przyczyną jest mutacja genu PHEX (ang. *phosphateregulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome*) kodującego endopeptydazę, która rozpoznaje motyw $_{176}RXXR_{179}$ w białku FGF23 i dokonuje jego proteolitycznej inaktywacji [51-53]. Czynnikiem wzrostu fibroblastów 23 jest białkiem o masie cząsteczkowej 32 kDa zbudowanym z 251 aminokwasów, który ulega ekspresji głównie w komórkach tkanki kostnej, tj. osteocytach i osteoblastach. Nieznaczną ekspresję odnotowano również w nerkach, wątrobie, tarczycy i przytarczycach, jelicie cienkim oraz mięśniach szkieletowych. W wyniku cięcia proteolitycznego pomiędzy resztą Arg¹⁷⁹ a Ser¹⁸⁰ białko to ulega rozszczepieniu na dwa fragmenty: osiągający masę cząsteczkową 18 kDa fragment N-końcowy oraz fragment C-końcowy o masie cząsteczkowej 12 kDa [45, 54].

FGF23 należy do rodziny 22 czynników wzrostu fibroblastów zgrupowanych w siedmiu podrodzinach określanych jako: FGF1, FGF4, FGF7, FGF8, FGF9, FGF11 oraz FGF19. FGF23 wraz z FGF19 i FGF21, należy do podrodziny FGF19 [21, 55]. Owe trzy czynniki określane są również mianem czynników endokrynych, gdyż w przeciwieństwie do pozostałych, klasycznych czynników wzrostu fibroblastów, działających w sposób auto- lub parakryny, funkcjonują one, jako czynniki dokrewne [16, 48]. Czynniki wzrostu fibroblastów pełnią swoje biologiczne funkcje po związaniu się z odpowiednim receptorem o aktywności kinazy tyrozynowej zlokalizowanym w błonie komórkowej. Aktywne receptory funkcjonują w formie dimerów. W strukturze receptorów dla czynników wzrostu fibroblastów (FGFR, ang. *fibroblast growth factor receptor*) wyróżnia się domenę zewnątrzkomórkową zawierającą trzy

pętle immunoglobulino-podobne (D1-D3), odcinek transbłonowy oraz wykazującą aktywność katalityczną domenę wewnątrzkomórkową [51, 55, 56]. Immunoglobulino-podobne pętle D2 i D3 stanowią miejsce wiązania ligandów. W obrębie odcinka linkerowego pomiędzy pętlą D1 a D2 znajduje się odcinek bogaty w aminokwasy kwaśne oraz reszty seryny określane jako AB (ang. *acid box*) [57, 58]. Wśród receptorów dla FGF wyróżnić można 7 izoform, tj. FGFR1b, FGFR1c, FGFR2b, FGFR2c, FGFR3b, FGFR3c oraz FGFR4. Izoformy b i c powstają na skutek alternatywnego składowania w obrębie eksonów kodujących trzecią z immunoglobulino-podobnych pętli [21, 45, 49, 55, 56]. Proces dimeryzacji receptorów dla FGF oraz stabilność kompleksu FGFR-FGF regulowane są przez siarczan heparanu (HS, ang. *heparan sulfate*) bądź heparynę. Czynniki wzrostu fibroblastów z podrodziny 19 (FGF19, 21, 23) w odróżnieniu od pozostałych FGF, wykazują małe powinowactwo do HS, w wyniku czego do aktywacji kinazy tyrozynowej i transdukcji sygnału wymagają dodatkowego koreceptora. Zmniejszenie powinowactwa do HS wynika ze zmian w obrębie domeny wiążącej proteoglikan (nie dochodzi w tym przypadku do utworzenia wiązań wodorowych pomiędzy siarczanem heparanu a aminokwasami domeny wiążącej). Dzięki tej właściwości czynniki te mogą przedostawać się do układu krążenia i funkcjonować jako hormony [47, 48, 55, 56, 59]. Z przeprowadzonych badań wynika, iż C-końcowy region FGF z podrodziny 19 odpowiada za oddziaływanie z koreceptorem (β -Klotho w przypadku FGF19 i FGF21, oraz Klotho w przypadku FGF23), natomiast poprzez N-koniec oddziałują one z odpowiednim receptorem FGFR [59]. Czynniki wzrostu fibroblastów mogą stanowić ligandy dla kilku izoform FGFR. FGF23 wykazuje powinowactwo do izoform FGFR1c, 3c oraz 4. Z owymi izoformami FGFR oddziałuje również białko Klotho, które poprzez tworzenie

binarnych kompleksów Klotho-FGFR zwiększa ich powinowactwo do FGF23 [5, 16, 21, 45, 47, 48]. FGF23 spełnia swoje biologiczne funkcje poprzez aktywację szlaku MAP kinaz (MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinase*), który uczestniczy w regulacji wzrostu i różnicowania komórek. Wykazujące aktywność kinazy tyrozynowej receptory FGFR po przyłączeniu ligandu (FGF23) w obecności Klotho, ulegają aktywacji i fosforylują kolejne białka. Na szlaku tym dochodzi do aktywacji małych białek Ras (ang. *rat sarcoma, Ras protein*). Małe białka Ras dokonują fosforylacji kinazy serynowo-treoninowej Raf (ang. *rapidly accelerated fibrosarcoma, Raf kinase*), która uruchamia kaskadę kinaz MAP, w wyniku czego dochodzi do aktywacji kinazy MEK (ang. *mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK*), a następnie fosforylacji ERK1/2 (ang. *extracellular signal regulated kinases 1/2*). Za sprawą białek Ras dochodzi również do aktywacji MEKK (ang. *MAP kinase kinase kinase, MAPKKK*), a w konsekwencji fosforylacji kinazy JNK (ang. *jun N-terminal kinase*), p38 (ang. *p38 mitogen-activated protein kinase*) oraz CREB (ang. *cAMP response element-binding*) [50]. Wykazano ponadto, że kompleks FGF23-FGFR1-Klotho aktywuje również szlak 3-kinazy fosfatydyloinozytolu, który prowadzi do aktywacji kinazy Akt, fosforylującej między innymi kinazę IKK (ang. *I kappa B kinase*) oraz GSK3 β (ang. *glycogen synthase kinase 3 β*). Szlak ten sprzyja przeżyciu komórek oraz zaangażowany jest w kontrolę ich proliferacji. Szlak PI3K przeciwdziała również apoptozie poprzez hamowanie indukowanej przez witaminę D aktywacji kaspaz [50].

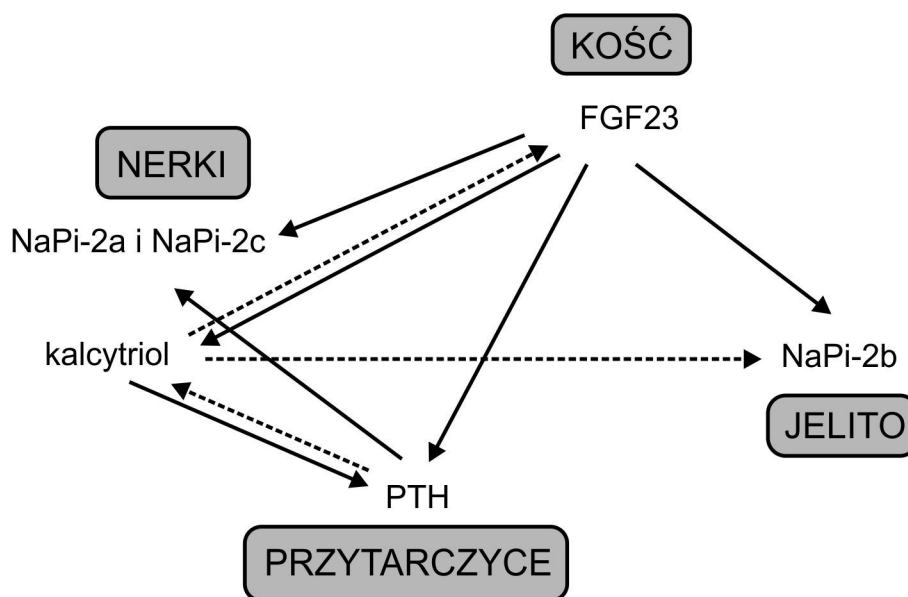
Przy udziale białka Klotho, FGF23 może pełnić funkcję czynnika fosfatycznego, którego aktywność polega na hamowaniu resorpcji fosforanów w jelitach i nerkach. Badania *in vivo* wykazały, że FGF23 jest jednym z głównych regulatorów metabolizmu witaminy D. Aktywna postać witaminy D

(1,25(OH)₂D₃, kalcytriol) syntetyzowana jest głównie przez nerki i odgrywa istotną rolę w regulacji gospodarki mineralnej organizmu. Miejscem działania kalcytriolu są jelita, gdzie promując ekspresję transportera sodowo-fosforanowego NaPi-2b stymuluje on wchłanianie wapnia i fosforu, wpływając tym samym na dodatni bilans fosforanów. W odpowiedzi na zwiększony poziom fosforanów, FGF23 reguluje ekspresję dwóch genów, tj. Cyp27b1 oraz Cyp24, których produkty białkowe uczestniczą w syntezie witaminy D. Gen Cyp27b1 koduje 1 α -hydroksylazę, która katalizując reakcję hydroksylacji 25(OH)D₃ prowadzi do powstania kalcytriolu. Poprzez zahamowanie ekspresji Cyp27b1, FGF23 hamuje syntezę 1,25(OH)₂D₃, ograniczając tym samym jelitową resorpcję fosforanów. Promuje on natomiast ekspresję genu Cyp24 kodującego 24-hydroksylazę. Enzym ten katalizuje reakcję hydroksylacji 25(OH)D₃ w pozycji 24, której produktem jest nieaktywna forma witaminy D [16, 47, 48, 60].

Utrzymywanie homeostazy fosforanowej odbywa się na zasadzie szeregu sprzężeń zwrotnych. FGF23 hamuje syntezę kalcytriolu, a aktywna postać witaminy D stymuluje ekspresję FGF23 (oś kości–nerki). Kalcytriol wiąże się z receptorem witaminy D (VDR, ang. *vitamin D receptor*), który tworzy heterodimer wraz z receptorem retinoidowym (RXR, ang. *retinoid X receptor*). Heterodimer VDR-RXR funkcjonuje jako czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję wielu genów w tym m.in. zwiększający ekspresję FGF23 w osteocytach [9]. Ponadto kalcytriol może być również zaangażowany w regulację ekspresji Klotho, gdyż w regionie promotorowym genu Klotho człowieka zidentyfikowano sekwencję VDRE (ang. *vitamin D responsive element*), z którą wiąże się VDR-RXR [60].

FGF23 hamuje również ekspresję i wydzielanie syntetyzowanego przez przytarczyce parathormonu. W celu utrzymania homeostazy mineralnej PTH wiąże się z receptorami PTH1R (ang. *parathyroid hormone 1 receptor*) zlokalizowanymi w komórkach kości (osteocyty, osteoblasty, chondrocyty) i kanalikach nerkowych [61]. Mechanizm działania PTH jest złożony i opiera się na promowaniu zarówno syntezy kalcytriolu, jak i wydalania fosforanów z moczem. W przeciwieństwie do kalcytriolu, PTH może zatem selektywnie zwiększać stężenie wapnia we krwi, nie przyczyniając się jednocześnie do wzrostu stężenia fosforanów. FGF23 poprzez oddziaływanie z kompleksem FGFR1c-Klotho w komórkach przytarczyc obniża ekspresję PTH, hamując tym samym nerkową biosyntezę $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Ekspresja PTH regulowana jest również przez kalcytriol, który na zasadzie sprzężenia zwrotnego (oś nerki-przytarczyce) przyczynia się do obniżenia stężenia parathormonu [4, 9, 45, 47, 61]. W badaniach przeprowadzonych na szczurach, Lavi-Moshayoff i wsp. [61] wykazali wpływ PTH na poziom ekspresji FGF23. Stwierdzono, iż PTH zwiększa ekspresję FGF23 w indukowanej doświadczalnie niewydolności nerek. U zwierząt, którym podawano pokarmy bogate w fosforany i adeninę obserwowano podwyższony poziom FGF23, który ulegał obniżeniu wraz z usunięciem przytarczyc [61]. FGF23 poprzez hamowanie ekspresji kotransporterów sodowo-fosforanowych (NaPi-2a i NaPi-2c) ogranicza również nerkową resorpcję fosforanów. Owe dwa transportery zlokalizowane są na biegunie apikalnym komórek cewkowych. Transportują one do wnętrza komórek kanalika proksymalnego jon wodorofosforanowy (HPO_4^{2-}) oraz jony sodowe. Transporter NaPi-2a przenosi trzy jony Na^+ , z kolei NaPi-2c dwa [45].

Z badań przeprowadzonych na myszach wynika, iż mechanizm hamowania ekspresji transporterów odbywa się głównie poprzez interakcje FGF23-Klotho-FGFR1c. Mniejsze znaczenie przypisuje się izoformie FGFR3, natomiast udział FGFR4 w tym procesie określa się jako niewielki [51]. Do obniżenia ekspresji NaPi-2a i 2c przyczynia się również pochodzący z przytarczyc PTH (Ryc. 3) [45]. Hamowanie nerkowej resorpcji fosforanów odbywa się również przy udziale sekrecyjnej formy białka Klotho. Białko to, dzięki aktywności β -glukuronidazy modyfikuje N-glikany transporterów NaPi-2a. W wyniku owej modyfikacji transportery te ulegają inaktywacji i kierowane są na drogę proteolitycznej degradacji [9, 62].



Ryc. 3. Regulacja gospodarki fosforanowej: oś sprzężeń zwrotnych kości – przytarczyc – nerki – jelito. Przerzywanymi liniami oznaczono wzrost, ciągłymi zaś spadek ekspresji określonego czynnika.

Klotho a nowotwory

Liczne badania kliniczne i laboratoryjne wskazują, iż u podstaw rozwoju wielu typów nowotworów leżą zaburzenia sygnalizacji inicjowanej przez insulinę, insulinopodobny czynnik wzrostu, a także czynniki wzrostu fibroblastów [63, 64]. Zdolność Klotho do regulacji owych szlaków, była podstawą sugestii, iż białko to może odgrywać znaczącą rolę w inhibicji procesu nowotworzenia [63]. Dane te potwierdzone zostały m.in. w badaniach prowadzonych na komórkach gruczolakoraka trzustki. U ludzi rak ten jest czwartą pod względem częstości przyczyną zgonów z powodu chorób nowotworowych w krajach zachodnich. Gruczolakorak trzustki należy do nowotworów o najgorszym rokowaniu, średni okres przeżycia od postawienia rozpoznania nie przekracza 6 miesięcy. Istotną rolę w rozwoju owego nowotworu przypisuje się szlakom sygnalizacyjnym inicjowanym przez insulinopodobny czynnik wzrostu oraz czynniki wzrostu fibroblastów. Nadmierna aktywacja receptora IGF-1 skutkuje transformacją nowotworową, wzrostem agresywności guza, a także hamowaniem procesu apoptozy. W nowotworach trzustki często odnotowuje się wzrost ekspresji insulinopodobnego czynnika wzrostu i jego receptora. Inhibicja ścieżki sygnalizacyjnej IGF-1 prowadzi natomiast do zahamowania wzrostu guza, a także zwiększa jego wrażliwość na promieniowanie jonizujące i chemioterapię. Szlak sygnalizacyjny FGF zaangażowany jest w regulację różnych etapów rozwoju nowotworów, tj. mitogenezy, różnicowania komórek czy angiogenezy. Zwiększoną ekspresję FGFR oraz ligandów takich jak FGF1, 2, 5 i 7 odnotowano zarówno w przypadku linii komórkowych, jak i komórek nowotworowych pobranych od pacjentów. Wysoka ekspresja FGF2, określanego także jako zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów

(bFGF, ang. *basic fibroblast growth factor*), powiązana była również ze stopniem zaawansowania nowotworu oraz krótszym czasem przeżycia chorych [63].

Wyniki badań przeprowadzonych przez zespół Wolfa, wykazały, że białko Klotho pełni funkcję supresora w procesie nowotworzenia trzustki. W odniesieniu do zdrowej tkanki, gruczolakoraki trzustki charakteryzowały się obniżonym poziomem ekspresji tego białka. Nadekspresja Klotho prowadziła natomiast do hamowania wzrostu komórek nowotworowych, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Sugeruje się, iż za ograniczenie aktywności białka Klotho w nowotworach trzustki odpowiadają dwa mechanizmy, tj. epigenetyczne wyciszenie genu KL oraz ekspresja białka o zmniejszonej aktywności [63]. Aktywność supresorowa białka Klotho uwarunkowana jest głównie jego zdolnością do inhibicji szlaku IGF-1. Przypuszcza się jednak, iż nie mniej istotną rolę może odgrywać także blokowanie przez niego ścieżki sygnalizacyjnej bFGF, mechanizm ten odnotowano m.in. w komórkach HEK293, komórkach raka trzustki, a także w nowotworach wywodzących się z innych tkanek [63]. Szlak sygnalizacyjny insuliny/IGF-1 odgrywa także znaczącą rolę w rozwoju raka piersi, który jest najczęstszym nowotworem złośliwym kobiet. Badania immunohistochemiczne wykazały, iż w odniesieniu do tkanki prawidłowej, komórki przedinwazyjnego oraz inwazyjnego przewodowego raka piersi wykazują znacznie niższy poziom ekspresji Klotho [4, 65]. Rubinek i wsp. [66] wykazali, iż obniżenie ekspresji Klotho w nowotworach piersi następuje w wyniku hipermetylacji wysp CpG zlokalizowanych w regionie promotora genu Klotho, a także deacetylacji białek histonowych. Liczne badania przeprowadzone m.in. na linii komórek raka piersi MCF-7 dowiodły, iż wyłączenie ekspresji Klotho skutkuje wzrostem proliferacji

komórek. Natomiast nadekspresja białka Klotho była związana z zahamowaniem fosforylacji receptora IGF-1 oraz kolejnych białek szlaku, czego skutkiem było ograniczenie proliferacji komórek nowotworowych. Następstwem wyciszenia szlaku IGF-1 przez Klotho w przypadku nowotworów piersi jest podwyższenie ekspresji czynników transkrypcyjnych C/EBP określanych również jako białka wiążące się z sekwencją CCAAT (ang. *CCAAT enhancer binding proteins, CCAAT binding factor*). Wykazano, że w przypadku nowotworów piersi czynniki te spełniają funkcję supresorów wzrostu [65]. Poziom ekspresji Klotho okazał się być także niezwykle istotny w przebiegu nowotworów płuc, tj. drobnokomórkowego raka płuc (SCLC, ang. *small cell lung cancer*) oraz wielkokomórkowego raka o cechach neuroendokrynych (LCNEC, ang. *large cell neuroendocrine carcinoma*). Nowotwory te, charakteryzuje krótki czas przeżycia, pięcioletnie prognozowane przeżycie chorych sięga średnio 40,3% w przypadku LCNEC oraz 35,7% w SCLC. Wyniki badań histochemicznych dowiodły, iż poziom ekspresji Klotho może spełniać rolę markera prognostycznego w przypadku pacjentów poddanych resekcji zmienionych nowotworowo tkanek. Ekspresja Klotho w guzach pierwotnych raków płuc, związana była bowiem z lepszym rokowaniem i dłuższym czasem przeżycia chorych. Ocena poziomu ekspresji Klotho, może zatem okazać się w przyszłości niezwykle pomocną w doborze terapii dla pacjentów z LCNEC i SCLC [67, 68]. Supresorową funkcję genu Klotho odnotowano również w komórkach raka żołądka, drugiego pod względem śmiertelności nowotworu na świecie. Udowodniono, iż w przypadku raka żołądka, obniżenie ekspresji Klotho następuje w wyniku hipermetylacji wysp CpG w regionie promotorowym tego genu (46% pacjentów). Ocena hipermetylacji promotora Klotho okazała się być również istotnym czynnikiem prognostycznym czasu przeżycia chorych na

nowotwory żołądka [64]. Obniżenie ekspresji Klotho, bądź też całkowite jej wyciszenie skorelowane jest również z rozwojem raka jelita grubego, stanowiącego trzecią pod względem częstości przyczynę zgonów z powodu chorób nowotworowych na świecie. Podobnie jak w innych typach nowotworów, zmiana ekspresji Klotho w komórkach tego nowotworu jest konsekwencją hipermetylacji wysp CpG. Metylację CpG odnotowano w przypadku 83,3% badanych linii komórkowych oraz 85% preparatów tkankowych jelita grubego. Nadekspresja białka Klotho poprzez indukcję apoptozy oraz zatrzymanie cyklu komórkowego powodowała zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych [69]. Nowe spojrzenie na mechanizmy leżące u podstaw supresorowej funkcji Klotho przyniosły badania przeprowadzone przez Lee i wsp. [70]. Wykazali oni, iż w przypadku raka szyjki macicy, który jest drugą najczęstszą przyczyną zgonów wśród kobiet na całym świecie, Klotho działa jako inhibitor kanonicznej ścieżki szlaku Wnt (ang. *wingless and Int-1*). Liczne badania epidemiologiczne wskazują, iż czynnikiem inicjującym rozwój tego nowotworu jest infekcja wirusem brodawczaka ludzkiego HPV (ang. *human papilloma virus*). Przyjmuje się, iż zależna od β -kateniny ścieżka szlaku Wnt może stanowić kolejny krok w wieloetapowym procesie karcynogenezy szyjki macicy [70]. Szlak Wnt zaangażowany jest w regulację wielu procesów biologicznych, takich jak: samoodnowa komórek macierzystych, proliferacja i różnicowanie komórek, ich migracja czy apoptoza. Aktywacja owego szlaku rozpoczyna się od związania liganda Wnt z obecnym w błonie komórkowej receptorem Fzd (ang. *Frizzled*) oraz koreceptorami w postaci białek LRP5 i LRP6 (ang. *low-density lipoprotein receptor-related proteins*). Połączenie liganda i receptora skutkuje fosforylacją cytoplazmatycznego białka Dishevelled oraz jego translokacją do błony

komórkowej. Dochodzi wówczas do zablokowania fosforylacji β -kateniny, dzięki czemu może ona ulec translokacji do jądra komórkowego, gdzie pełni rolę czynnika transkrypcyjnego. Przy nieobecności liganda Wnt, β -katenina fosforylowana jest przez kinazę kazeiny γ (CK1 γ , ang. *casein kinase 1 γ*) oraz kompleks białek takich jak GSK3 β , aksyna i białko APC (ang. *adenomatosis polyposis coli*). Ufosforylowana β -katenina rozpoznawana jest przez ligazę ubikwityny E3 β -TRCP (ang. *β -transducin repeat-containing protein*) oraz kierowana na drogę degradacji przez proteasomy [71]. Badania prowadzone na linii komórek nowotworowych szyjki macicy CaSki dowiodły, iż na skutek ektopowej ekspresji sKL dochodzi do zmniejszenia całkowitego poziomu β -kateniny, a także znacznej redukcji aktywnej formy białka. Nadekspresja Klotho prowadzi zatem do spadku ekspresji genów regulowanych przez β -kateninę, takich jak onkogen c-MYC, czy gen CCND1 (ang. *cyclin D1*) kodujący cyklinę D1 [70]. W przypadku wielu linii komórkowych raka szyjki macicy, a także w preparatach raka inwazyjnego odnotowano spadek poziomu mRNA Klotho. Zmian tych nie wykazano natomiast w raku przedinwazyjnym. Obserwowany spadek ekspresji Klotho był wynikiem metylacji wysp CpG (41%), a także deacetylacji histonów w obrębie regionu promotorowego genu KL. Badania prowadzone na liniach komórkowych raka szyjki macicy SiHa wykazały, że kluczową rolę w procesie epigenetycznego wyciszenia genu Klotho odgrywa deacetylacja histonu H3. Dane te sugerują, iż białko Klotho może stanowić w przyszłości cel w terapii raka szyjki macicy, oraz posłużyć jako marker prognostyczny u chorych na ten nowotwór [70].

Podsumowanie

Gen Klotho zaangażowany jest w regulację procesu starzenia u ssaków. Za sprawą istnienia dwóch form transbłonowej oraz sekrecyjnej tego białka uczestniczy ono w regulacji licznych procesów komórkowych. Spełnia ono m.in. rolę koreceptora dla FGF23, odgrywając istotną rolę w regulacji homeostazy fosforanów oraz metabolizmu witaminy D. Jest inhibitorem szlaku insuliny/insulinopodobnego czynnika wzrostu przez co przyczynia się m.in. do redukcji stresu oksydacyjnego. Dzięki aktywności enzymatycznej modyfikuje N-glikany kanałów TRPV5, zwiększając nerkową resorpcję jonów wapnia. Molekularny mechanizm działania Klotho nie został jednak do końca poznany. Jego przyszłe poznanie może przyczynić się do lepszego zrozumienia procesu starzenia się organizmów, a także umożliwić zapobieganie chorobom związanych z wiekiem. Ostatnie doniesienia o supresorowej funkcji Klotho w wielu typach nowotworów, sugerują, że białko to może posłużyć w przyszłości jako marker molekularny bądź też stać się nowym celem w terapii nowotworów.

Piśmiennictwo

1. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T i wsp. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390: 45-51.
2. Wang Y, Sun Z. Current understanding of Klotho. *Ageing Res Rev.* 2009; 8: 43-51.
3. Kurosu H, Kuro-o M. The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 299: 72-78.
4. Kuro-o M. Klotho and aging. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 1049-1058.
5. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P i wsp. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 2005; 309: 1829-1833.
6. Kuro-o M. Klotho and β Klotho. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 728: 25-40.

7. Manya H, Akasaka-Manya K, Endo T. Klotho protein deficiency and aging. *Geriatr Gerontol Int.* 2010; 10 Suppl 1: 80-87.
8. 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.
9. Kuro-o M. Klotho and aging process. *Korean J Intern Med* 2011; 26:113-122.
10. Forster RE, Jurutka PW, Hsieh JC, Haussler CA, Lowmiller CL, Kaneko I i wsp. Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 414: 557-562.
11. Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N i wsp. Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett.* 2004; 565: 143-147.
12. Huang CL. Regulation of ion channels by secreted Klotho: mechanisms and implications. *Kidney Int.* 2010; 77: 855-860.
13. Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, 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.
14. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M i wsp. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest.* 2007; 117: 4003-4008.
15. Kamemori M, Ohyama Y, Kurabayashi M, Takahashi K, Nagai R, Furuya N. Expression of Klotho protein in the inner ear. *Hear Res* 2002; 171: 103-110.
16. Kuro-o M. Klotho. *Pflugers Arch.* 2010; 459:333-343.
17. 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 U S A.* 2007; 104: 19796-19801.
18. Lewin E, Olgaard K. Klotho, an important new factor for the activity of Ca²⁺ channels, connecting calcium homeostasis, ageing and uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 1770-1772.
19. Dimke H, Hoenderop JG, Bindels RJ. Molecular basis of epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ transport: insights from the TRP channel family. *J Physiol.* 2011; 589: 1535-1542.
20. Hoenderop JG, Bindels RJ. Calcitropic and magnesiotropic TRP channels. *Physiology (Bethesda)* 2008; 23: 32-40.

21. Razzaque MS. Klotho and Na⁺,K⁺-ATPase activity: solving the calcium metabolism dilemma? *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 459-461.
22. van Abel M, Hoenderop JG, Bindels RJ. The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2005; 371: 295-306.
23. 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.
24. Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. The β-Glucuronidase Klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* 2005; 310: 490-493.
25. Huang CL, Moe OW. Klotho: a novel regulator of calcium and phosphorus homeostasis. *Pflugers Arch.* 2011; 462: 185-193.
26. Cha SK, Ortega B, Kurosu H, Rosenblatt KP, Kuro-O M, Huang CL. Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 9805-9810.
27. Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A i wsp. α-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science.* 2007; 316: 1615-1618.
28. Nabeshima Y, Imura H. α-Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis. *Am J Nephrol* 2008; 28: 455-464.
29. Bartke A. Long-lived Klotho mice: new insights into the roles of IGF-1 and insulin in aging. *Trends Endocrinol Metab.* 2006; 17: 33-35.
30. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806.
31. Krześlak A. Kinaza Akt: kluczowy regulator metabolizmu i progresji nowotworów. *Postępy Hig Med Dośw.* 2010; 64: 490-503.
32. Kaletsky R, Murphy CT. The role of insulin/IGF-like signaling in *C. elegans* longevity and aging. *Dis Model Mech.* 2010; 3: 415-419.
33. Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E i wsp. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science.* 2001; 292: 104-106.
34. Rincon M, Rudin E, Barzilai N. The insulin/IGF-1 signaling in mammals and its relevance to human longevity. *Exp Gerontol.* 2005; 40: 873-877.
35. Tatar M, Bartke A, Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science.* 2003; 299: 1346-1351.
36. Brown-Borg HM. Hormonal regulation of longevity in mammals. *Ageing Res Rev.* 2007; 6: 28-45.

37. Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Gélouën A, Even PC i wsp. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature*. 2003; 421: 182-187.
38. Klötting N, Blühera M. Extended longevity and insulin signaling in adipose tissue. *Exp Gerontol*. 2005; 40: 878-883.
39. Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB i wsp. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev. Cell* 2002; 3: 25–38.
40. Laron Z. The essential role of IGF-1: Lessons from the long-term study and treatment of children and adults with Laron syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84: 4397–4404.
41. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandu A, Kurosu H i wsp. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone Klotho. *J Biol Chem*. 2005; 280: 38029–38034.
42. Carter ME, Brunet A. FOXO transcription factors. *Curr Biol*. 2007; 17: R113-114.
43. Imae M, Fu Z, Yoshida A, Noguchi T, Kato H. Nutritional and hormonal factors control the gene expression of FoxOs, the mammalian homologues of DAF-16. *J Mol Endocrinol*. 2003; 30: 253-262.
44. Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K i wsp. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 339: 827-832.
45. Gattineni J, Baum M. Regulation of phosphate transport by fibroblast growth factor 23 (FGF23): conduplicatio for disorders of phosphate metabolism. *Pediatr Nephrol*. 2010; 25: 591-601.
46. Razzaque MS. FGF23-mediated regulation of systemic phosphate homeostasis: is Klotho an essential player? *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 296: F470-F476.
47. Kuro-o M. A potential link between phosphate and aging – lessons from. *Mech Ageing Dev*. 2010; 131: 270–275.
48. Kuro-o M. Overview of the FGF23-Klotho axis. *Pediatr Nephrol*. 2010; 25: 583-590.
49. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP i wsp. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho. *J Biol Chem*. 2006; 281: 6120-6123.

50. Medici D, Razzaque MS, Deluca S, Rector TL, Hou B, Kang K i wsp. FGF-23-Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 2008; 182: 459-465.
51. Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, L. Robinson M, Goetz R i wsp. 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.
52. Amatschek S, Haller M, Oberbauer R. Renal phosphate handling in human – what can we learn from hereditary hypophosphataemias? *Eur J Clin Invest.* 2010; 40: 552-560.
53. Perwad F, Portale A. Vitamin D metabolism in the kidney: Regulation by phosphorus and fibroblast growth factor 23. *Mol Cell Endocrinol.* 2011; 347: 17-24.
54. Mazzaferro S, Pasquali M, Pirrò G, Rotondi S, Tartaglione L. The bone and the kidney. *Arch Biochem Biophys.* 2010; 503: 95-102.
55. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L i wsp. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol.* 2010; 24: 2050-2064.
56. Goetz R, Beenken A, Ibrahim OA, Kalinina J, Olsen SK, Eliseenkova AV i wsp. Molecular insights into the Klotho-dependent, endocrine mode of action of FGF19 subfamily members. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 3417-3428.
57. Kalinina J, Dutta K, Ilghari D, Beenken A, Goetz R, Eliseenkova AV i wsp. The alternatively spliced acid box region plays a key role in FGF receptor autoinhibition. *Structure.* 2012; 20: 77-88.
58. Yie J, Wang W, Deng L, Tam LT, Stevens J, Chen MM, i wsp. Understanding the physical interactions in the FGF21/FGFR/β-Klotho complex: structural requirements and implications in FGF21 signaling. *Chem Biol Drug Des.* 2012; 79: 398-410.
59. Wu X, Lemon B, Li X, Gupte J, Weiszmann J, Stevens J, i wsp. C-terminal tail of FGF19 determines its specificity toward Klotho co-receptors. *J Biol Chem.* 2008; 283: 33304-33309.
60. Prie D, Friedlander G. Reciprocal Control of 1,25-dihydroxyvitamin D and FGF23 formation involving the FGF23/Klotho system. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 1717-1722.

61. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Manly T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299: F882-F889.
62. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, i wsp. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J.* 2010; 24: 3438-3450.
63. Abramovitz L, Rubinek T, Ligumsky H, Bose S, Barshack I, Avivi C i wsp. KLL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2011; 17: 4254-4266.
64. Wang L, Wang X, Wang X, Jie P, Lu H, Zhang S, i wsp. Klotho is silenced through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Am J Cancer Res.* 2011; 1: 111-119.
65. Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, Ligumsky H, Sredni B, Kanety H, i wsp. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene.* 2008; 27: 7094-7105.
66. Rubinek T, Shulman M, Israeli S, Bose S, Avraham A, Zundelevich A i wsp. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 133: 649-657.
67. Usuda J, Ichinose S, Ishizumi T, Ohtani K, Inoue T, Saji H i wsp. 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 i wsp. Klotho is a novel biomarker for good survival in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2011; 72: 355-359.
69. Pan J, Zhong J, Gan LH, Chen SJ, Jin HC, Wang X, Wang LJ. Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2011; 32: 729-735.
70. Lee J, Jeong DJ, Kim J, Lee S, Park JH, Chang B, i wsp. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer.* 2010; 9: 109.
71. Kharashvili G, Simkova D, Makharoblidze E, Trtkova K, Kolar Z, Bouchal J. Wnt signaling in prostate development and carcinogenesis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011; 155: 11-18.