

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů



Kateřina Ziková

REGULACE METABOLISMU CHOLESTEROLU V HEPATOCYTU

Regulation of cholesterol metabolism in hepatocytes

Bakalářská práce

Praha 2011

Vedoucí práce: Ing. Miluše Zimolová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis

Kateřina Ziková

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Miluši Zimolové a RNDr. Janu Kovářovi, CSc. za odbornou pomoc, trpělivost a projevený zájem při vypracovávání této bakalářské práce. Poděkování patří i mé rodině a přátelům za podporu a porozumění nejen při psaní závěrečné práce.

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce je shrnout současné poznatky o metabolismu cholesterolu a jeho regulaci v játrech.

První část popisuje transport cholesterolu mezi tkáněmi, který je zajišťován lipoproteiny.

Druhá část práce se zabývá popisem metabolických drah podílejících se na přeměnách cholesterolu – jak buňky získávají a metabolizují cholesterol. Téměř všechny buňky mohou cholesterol syntetizovat a zároveň jej přijímat z cirkulace. Nadbytečného cholesterolu se buňky zbavují několika mechanismy – přeměňují jej na cholesterylestery, které mohou být uskladněny v tukových kapénkách, konvertují jej na oxysteroly, které snáze unikají z buňky, anebo jej exportují prostřednictvím ATP-vazebných (ABC) přenašečů. Specializované tkáně (nadledviny, gonády) přeměňují cholesterol na steroidní hormony. Pouze játra dokážou cholesterol odstranit z těla ve fyziologicky významném množství – secernují ho do žluči buď přímo nebo po přeměně na žlučové kyseliny.

Třetí část této bakalářské práce se detailně zabývá regulací metabolismu cholesterolu v hepatocytu. Klíčovou roli zde hrají tři transkripční faktory – protein vázající steroly regulovaný element (SREBP), jaterní X receptor (LXR) a farnesoidní X receptor (FXR). Jejich aktivita je závislá na koncentraci buněčného cholesterolu, případně jeho metabolitů – oxysterolů, žlučových kyselin. SREBP v neaktivním stavu setrvává v endoplazmatickém retikulu, uvolňuje se v odpověď na pokles koncentrace buněčného cholesterolu a poté reguluje transkripci genů kódujících lipoproteinové receptory a enzymy biosyntézy cholesterolu. Ligandy LXR jsou oxysteroly, které vznikají v mitochondriích, má-li buňka cholesterolu nadbytek. LXR stimuluje expresi genů ovlivňujících export cholesterolu z buňky (ABC přenašeče). Na vzestup koncentrace žlučových kyselin v hepatocytu reagují FXR zpětnovazebnou inhibicí jejich syntézy, a tak rovněž ovlivňují metabolickou přeměnu cholesterolu.

Klíčová slova:

Cholesterol, hepatocyt, aktivní cholesterol, oxysterol, žlučové kyseliny, SREBP, LXR, FXR

ABSTRACT

This thesis summarizes current data about cholesterol metabolism and its regulation in the liver.

First part describes cholesterol transport among tissues by lipoproteins.

Second part of this work deals with description of metabolic pathways of cholesterol conversion – how the cells obtain and metabolise cholesterol. Almost all cells can synthesize cholesterol or take it up from the circulation. The cells dispose of abundant cholesterol by several mechanisms – they convert cholesterol to cholesteryl esters that can be stored in lipid droplets; they turn cholesterol into oxysterols that can escape easier from the cell; or they export cholesterol through ATP-binding cassette (ABC) transporters. Specialized tissues (adrenal, gonads) transform cholesterol to steroid hormones. However, only the liver can remove cholesterol from the body in physiologically significant amount – it secretes cholesterol into the bile either directly or after conversion to bile acids.

Third section deals with regulation of cholesterol metabolism in hepatocyte. Three transcription factors – sterol regulatory element binding protein (SREBP), liver X receptor (LXR), and farnesoid X receptor (FXR) – play the main role in regulation. Their activities are determined by concentration of cellular cholesterol or its metabolites – oxysterols and bile acids. Inactive SREBP resides in the endoplasmic reticulum; if cholesterol concentration in the cell decreases, SREBP is released and regulates transcription of genes involved in cholesterol uptake and biosynthesis. If cholesterol is abundant, oxysterols are produced in mitochondria and serve as the ligands for LXR that activates the expression of genes which induce cholesterol efflux (ABC). FXR responds to the increase of bile acid concentration by inhibition of their synthesis and thus influences the metabolic conversion of cholesterol.

Keywords:

Cholesterol, hepatocyte, active cholesterol, oxysterol, bile acid, SREBP, LXR, FXR

OBSAH

1 ÚVOD	3
2 CHOLESTEROL V TĚLE ŽIVOČICHŮ	4
3 TRANSPORT CHOLESTEROLU V CÍRKULACI	5
3.1 LIPOPROTEINY	5
3.2 EXOGENNÍ DRÁHA	6
3.3 ENDOGENNÍ DRÁHA	6
3.4 REVERZNÍ TRANSPORT CHOLESTEROLU (RCT).....	7
3.4.1 Cyklus lipoproteinů o vysoké hustotě (Cyklus HDL)	7
3.4.2 Úloha CETP v reverzním transportu cholesterolu.....	8
4 METABOLISMUS CHOLESTEROLU	9
4.1 CHOLESTEROL V MEMBRÁNÁCH.....	9
4.2 INTRACELULÁRNÍ TRANSPORT CHOLESTEROLU	10
4.3 SKLADOVÁNÍ CHOLESTEROLU	10
4.4 ZDROJE CHOLESTEROLU	11
4.4.1 Biosyntéza.....	11
4.4.2 Hydrolýza cholesterylesterů	12
4.4.3 Receptory v metabolismu cholesterolu.....	12
4.4.3.1 LDL receptor (LDLR).....	12
4.4.3.2 „LDL receptor příbuzný protein“ (LRP).....	13
4.4.3.3 „Scavenger“ receptory	13
4.5 ODBOURÁVÁNÍ CHOLESTEROLU	14
4.5.1 Transport cholesterolu z jater do žluči.....	14
4.5.2 Transport prostřednictvím lipoproteinů.....	14
4.5.3 ABC přenašeče	15
4.5.4 Cholesterol jako prekurzor.....	15
4.5.4.1 Cholesterylestery.....	15
4.5.4.2 Žlučové kyseliny	16
4.5.4.2.1 Klasická dráha biosyntézy žlučových kyselin	17
4.5.4.2.2 Alternativní dráha biosyntézy žlučových kyselin.....	17
4.5.4.3 Oxysteroly.....	17
4.5.4.4 Jiné deriváty cholesterolu.....	18

5 REGULACE METABOLISMU CHOLESTEROLU V HEPATOCYTU	19
5.1 AKTIVNÍ CHOLESTEROL	19
5.2 ROLE SREBP V REGULACI METABOLISMU CHOLESTEROLU	21
5.2.1 Proprotein konvertasa subtilisin-like/kexin typ 9 (PCSK9)	23
5.2.2 „Gen indukovaný insulinem“ (Insig).....	23
5.3 JATERNÍ X RECEPTOR (LXR)	23
5.4 FARNESOIDNÍ X RECEPTOR (FXR).....	25
5.5 DALŠÍ TRANSKRIPČNÍ FAKTORY V REGULACI METABOLISMU CHOLESTEROLU	26
5.6 INTEGRACE BUNĚČNÉ ODPOVĚDI NA ZMĚNU KONCENTRACE CHOLESTEROLU.....	26
6 ZÁVĚR	28
7 SEZNAM ZKRATEK	29
8 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	31

1 ÚVOD

Cholesterol je základním materiálem pro stavbu přirozené bariéry buňky – plazmatické membrány (PM) a jiných membránových kompartmentů. Zároveň je prekurzorem řady hormonů nezbytných k udržování celkové homeostáze. Podobně jako jiné esenciální látky (např. O₂) se ale i cholesterol může proměnit v zabijáka.

Vysoká hladina cholesterolu v krvi je jednou z příčin kardiovaskulárních chorob, které se v České republice podílí na celkové mortalitě zhruba z poloviny. V roce 2008 zde zemřelo na kardiovaskulární choroby asi 45 % mužů a 51 % žen [1]. Proto je hypercholesterolémii a její léčbě věnována značná pozornost.

Hypercholesterolémie vzniká v důsledku genetických predispozic, případně v důsledku nezdravého životního stylu. K pochopení této poruchy nelze dospět, aniž bychom porozuměli mechanismům, které koncentraci cholesterolu v těle udržují na žádoucí úrovni.

Všechny jaderné buňky mohou cholesterol syntetizovat nebo získat z krevního oběhu. Na druhé straně, pouze omezené množství buněk dokáže cholesterol metabolizovat nebo z těla vyloučit. Klíčovým orgánem v metabolismu cholesterolu jsou játra, která jako jediný orgán umí cholesterol z těla odstranit.

Cíle práce

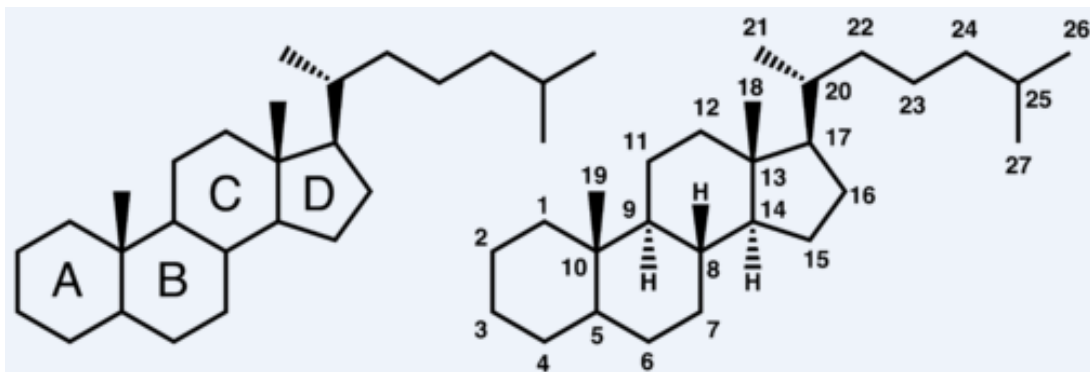
Cílem mé bakalářské práce je shrnutí současných poznatků o regulaci metabolismu cholesterolu, zvláště pak v hepatocytu, neboť játra představují klíčový orgán z hlediska regulace homeostázy cholesterolu.

2 CHOLESTEROL V TĚLE ŽIVOČICHŮ

Cholesterol, molekula s rigidním steroidním jádrem a jednou hydroxylovou skupinou, je přírodní steroid, který patří do skupiny lipidů a je ve vodě nerozpustný. Hydroxylová skupina mu však dodává amfipatický charakter (Obr. 1).

V těle živočichů plní mnoho funkcí a je nezbytný pro život. Je esenciální složkou buněčných membrán, kam je začleněn díky svému amfipatickému charakteru. Zároveň je prekurzorem řady jiných steroidních látek jako jsou hormony, žlučové kyseliny, kalcitriol a oxysteroly.

Vedle cholesterolu jako takového, který je někdy označován jako volný (FC), nacházíme v buňkách i hydrofóbní cholesterylestery (CE). CE jsou v buňce ukládány v tukových kapénkách. V cirkulaci je cholesterol transportován sérovými lipoproteiny, jejichž jádro může být tvořeno právě CE.

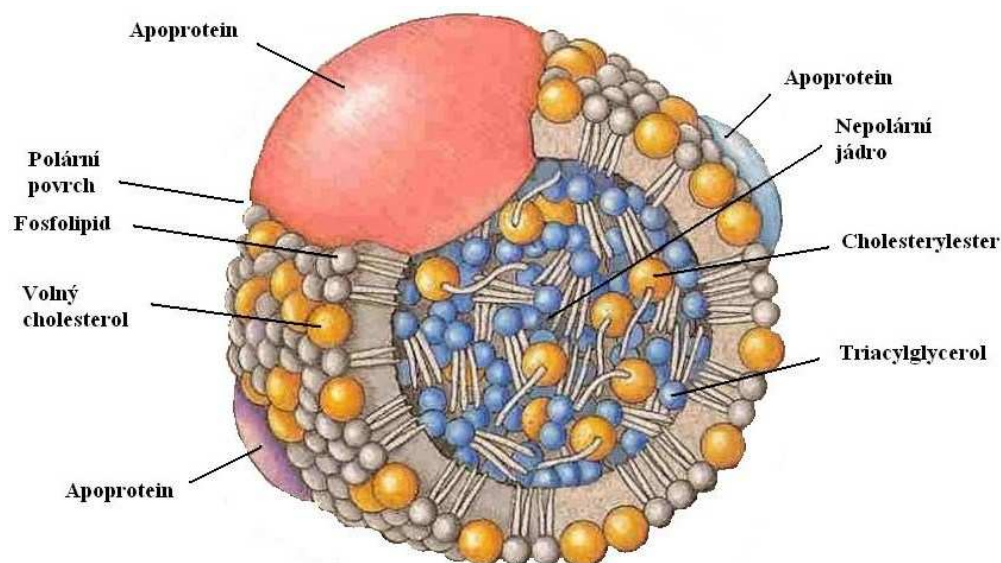


Obr. 1. Struktura cholesterolu [2].

3 TRANSPORT CHOLESTEROLU V CIRKULACI

3.1 LIPOPROTEINY

Veškeré lipidy, přijaté i nasyntetizované, musí být transportovány mezi buňkami. Transport lipidů v cirkulaci zajišťují lipoproteiny, které jsou tvořeny lipidovou a proteinovou složkou. Na povrchu těchto částic se nacházejí polární lipidy (FC, fosfolipidy - PL) a proteinová složka zvaná apoproteiny (apolipoproteiny), zatímco lipoproteinové jádro tvoří lipidy nepolární (CE a triacylglyceroly - TG) (Obr. 2).



Obr. 2: Struktura lipoproteinu (upraveno podle Grundy [3]).

Lipoproteiny třídíme do několika základních skupin: chylomikrony, lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL), lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL) (Tab. 1).

Tab. 1: Lipoproteiny (upraveno podle Gotto [4]).

Lipoproteiny	Velikost [nm]	Relativní hustota	% Podíl lipidů	% Podíl proteinů	Hlavní lipidová složka	Hlavní apoprotein	Pohyblivost na gelu
Chylomikron	90-1000	< 0,95	98-99	1-2	TG	B-48, C, E	start
VLDL	30-90	0,95-1,006	90-93	7-10	TG	B-100, C	pre-β
IDL*	25-30	1,006-1,019	89	11	cholesterol, TG	B-100	pre-β
LDL	20-25	1,019-1,063	79	21	cholesterol	B-100	β
HDL2	10-20	1,063-1,125	67	33	cholesterol	A, C, E	α
HDL3	7,5-10	1,125-1,210	43	57	cholesterol	A, C, E	α

* IDL – lipoprotein o střední hustotě

3.2 EXOGENNÍ DRÁHA

Metabolická dráha transportu, kterou jsou primárně transportovány TG přijaté v potravě, je označována jako dráha exogenní. Lipoproteiny zprostředkovávající tento transport se nazývají chylomikrony. Vznikají ve střevních mukózních buňkách, jsou secernovány do lymfy a následně skrz *ductus thoracicus* do krve. Lipoproteinová lipasa, enzym na povrchu endoteliálních buněk mimojaterních tkání, katalyzuje hydrolýzu TG. Uvolněné mastné kyseliny (FA) jsou následně vychytávány příslušnou tkání. Objem i povrch chylomikronu se v průběhu hydrolýzy TG zmenšují, přičemž nadbytečné povrchové komponenty (FC, PL, apo A, apo C) jsou přesouvány do HDL. V cirkulaci poté pokračuje reziduální lipoprotein zvaný chylomikronový „remnant“, který ve svém jádře obsahuje především CE [3]. Tyto „zbytkové“ chylomikrony jsou vychytávány jaterními buňkami pomocí „proteinů příbuzných LDL receptoru“ (LRP) [5].

3.3 ENDOGENNÍ DRÁHA

Endogenní dráha představuje transport TG syntetizovaných hepatocyty do mimojaterních tkání. Je zajišťována lipoproteiny zvanými VLDL (IDL a LDL). Nascentní VLDL vznikají v játrech a putují krevním oběhem, kde získávají apo C a apo E z HDL. Takto maturované VLDL interagují, stejně jako chylomikrony, s lipoproteinovou lipasou na povrchu buněk mimojaterních tkání. Hydrolýzou TG se uvolňují FA, které jsou následně vychytávány buňkami příslušné tkáně. Apoproteiny C a E se rovněž uvolňují z VLDL a přesouvají se na povrch HDL. VLDL „remnanty“ neboli IDL zůstávají v cirkulaci, dokud nejsou zachyceny játry. V játrech jsou zhruba dvě třetiny IDL vychytány pomocí povrchových buněčných receptorů a zbývající IDL jsou transformovány na LDL působením jaterní lipasy. Hydrofobní jádra částic LDL tvoří převážně CE a slouží k distribuci cholesterolu mimojaterním tkáním. Většina LDL částic je ale z cirkulace odstraněna játry. LDL jsou vychytávány buňkami prostřednictvím povrchových LDL receptorů (LDLR), anebo může být část z nich odstraněna mechanismy nescifickými [3].

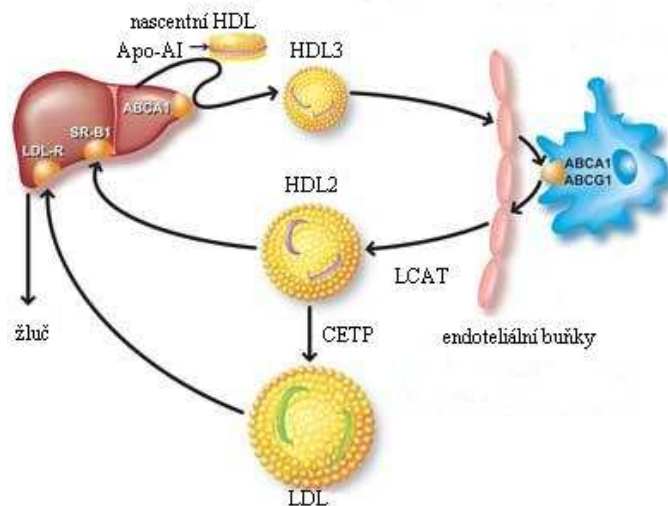
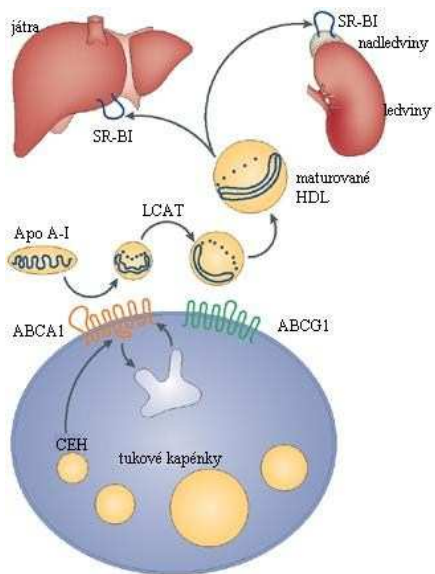
3.4 REVERZNÍ TRANSPORT CHOLESTEROLU (RCT)

Reverzní transport cholesterolu (RCT) je děj, při kterém je cholesterol uvolňovaný mimojaterními tkáněmi dopravován do jater. Tento proces přispívá k ochraně cévní stěny před ukládáním cholesterolu a tím brání rozvoji aterosklerosy. Zásadní roli v RCT hrají HDL a protein transportující cholesterylestery (CETP) [4].

3.4.1 Cyklus lipoproteinů o vysoké hustotě (Cyklus HDL)

HDL jsou vyráběny a secernovány především jaterními buňkami, ale jejich maturace je dokončena až v cirkulaci. Klíčová molekula pro vznik HDL, apo A-I, je syntetizována v hepatocytech a enterocytech. Bezprostředně poté, co je apo A-I secernován z buňky, interaguje s transmembránovým proteinem z rodiny Adenosintrifosfát-vazebných kazet (ABC přenašečů, ABC) ABCA1 a získává FC a PL. Vzniká tak diskoidální HDL. Částice kulovitého tvaru, kterou označujeme jako HDL₃, vzniká působením plazmatického enzymu lecithin:cholesterolacyltransferasy (LCAT), kdy je FC esterifikován [6], a tudíž přesouván z povrchu do hydrofobního jádra lipoproteinu. Protein ABCG1 participuje na maturaci (zvětšování) HDL tím, že transportuje další buněčné lipidy (FC, PL) na formující se sférickou částici HDL (Obr. 3). Z cirkulujících HDL jsou selektivně vychytávány CE pomocí „scavenger“ receptorů třídy B typu I (SR-BI) jaterními a steroidogenními buňkami [6].

HDL částice rozlišujeme podle velikosti na větší HDL₂ a menší HDL₃. HDL₃ se mění na HDL₂ působením LCAT a CETP, který vyměňuje CE z HDL za TG z VLDL a chylomikronů (Obr. 4). TG a PL z takto modifikovaných HDL₂ jsou potom hydrolyzovány jaterní TG-hydrolasou za vzniku HDL₃. HDL zároveň plní funkci zásobního zdroje apoproteinů C a E, které jsou nezbytné pro katabolismus chylomikronů a VLDL.



Obr. 3: Vznik HDL (Ikonen, [6]).

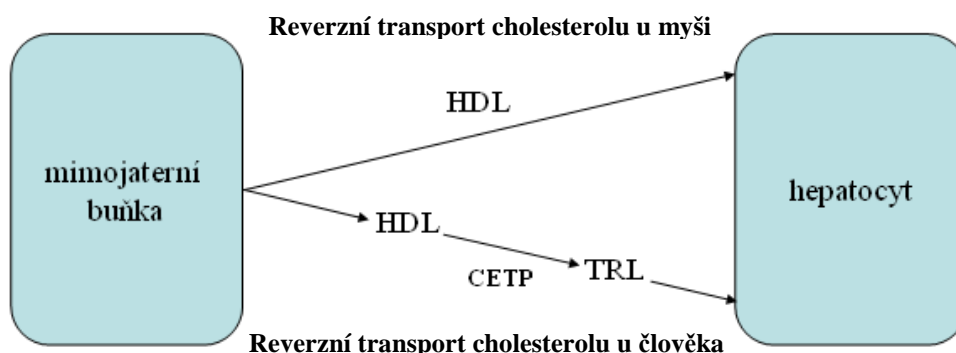
Obr. 4: Konverze HDL (upraveno dle [7]).

Vysvětlivky k obrázkům 3 a 4: ABCA1, ABCG1 – ATP-vazebné kazety, Apo-AI – apoprotein AI, CEH - cholesterylesterhydrolasa ,CESTP – protein přenášející cholesterylestery, HDL – lipoprotein o vysoké hustotě, LCAT – lecithin:cholesterylacyltransferasa, LDL – lipoprotein o nízké hustotě, LDLR – LDL receptor, SR-BI – „scavenger“ receptor třídy B typ I.

3.4.2 Úloha CETP v reverzním transportu cholesterolu

Reverzní transport cholesterolu u myší, potkanů ad. zprostředkovávají pouze částice HDL. U člověka je situace poněkud složitější. Zahrnuje činnost CETP, který zajišťuje distribuci CE, TG a v menší míře i PL mezi lipoproteiny (Obr. 5).

CETP přesouvá část CE z HDL do lipoproteinů bohatých na TG (VLDL, IDL) a do LDL, které jsou poté transportovány do jater. Na druhou stranu transportuje také TG z VLDL do LDL a HDL [8]. CETP hraje roli i při samotné konverzi částic HDL [9].



Obr. 5: Reverzní transport cholesterolu u myši a člověka.

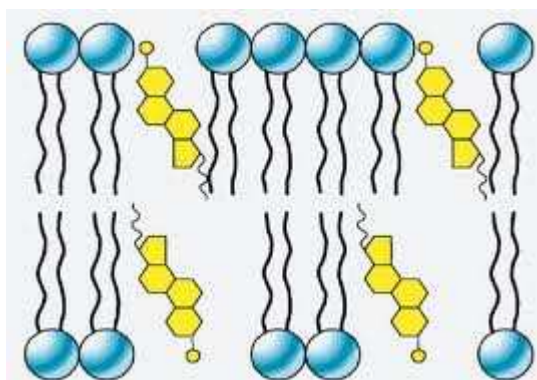
Vysvětlivky: CETP – protein přenášející cholesterylestery, HDL – lipoprotein o vysoké hustotě, TRL – lipoprotein bohatý na triglyceridy.

4 METABOLISMUS CHOLESTEROLU

Koncentrace volného cholesterolu v buňce je velmi přísně regulována. FC je základní složkou buněčných membrán a svou koncentrací zásadně ovlivňuje její fyzikální vlastnosti. Aby si buňka udržela konstantní koncentraci cholesterolu, využívá těchto homeostatických mechanismů: přeměňuje FC na metabolity (CE, oxysteroly), nebo jej transportuje pomocí ABC přenašečů do cirkulace. V játrech konvertuje FC na žlučové kyseliny, které jsou společně s cholesterolem transportovány do žluče. Steroidogenní tkáně metabolizují FC ještě na hormony.

4.1 CHOLESTEROL V MEMBRÁNÁCH

Cholesterol je neodmyslitelnou složkou všech buněčných membrán (Obr. 6). Nejvíce je zastoupen v membráně plazmatické. FC interaguje se sfingolipidy, fosfatidylcholiny (PC) a fosfatidylseriny [11]. Přednostně vytváří komplexy s PL, které mají navázanou dlouhou nasycenou FA. V současné době je věnována značná pozornost úloze cholesterolu v tzv. lipidových raftech.



Obr. 6:

Orientace cholesterolu v membráně [10].

V membráně je hydroxylová skupina cholesterolu orientována ven a nachází se v sousedství polárních skupin fosfolipidů. Zatímco plochá struktura s postranním řetězcem směřuje dovnitř dvojvrstvy stejně jako hydrofobní řetězce okolních fosfolipidů.

Lipidové rafty jsou malé membránové domény bohaté na sfingolipidy a FC. Jsou-li rafty aktivované, mohou se shlukovat a umožnit tak interakci proteinů, které se v raftech nacházejí. Tyto dynamické útvary hrají ústřední roli v mnoha buněčných dějích – transportu, polarizaci buňky, signální transdukci i alergické reakci [12].

Plazmatická membrána má charakteristický podíl FC a PL. Pokud je koncentrace cholesterolu vyšší, a tudíž kapacita PM v utváření komplexů FC/PL dosáhne bodu saturace, přebývající cholesterol zůstává v membráně. Nachází se však v novém stavu, který je charakterizován zvyšující se tendencí cholesterolu k úniku či chemickou aktivitou. Takovýto cholesterol je označován jako aktivní [11].

4.2 INTRACELULÁRNÍ TRANSPORT CHOLESTEROLU

Obsah FC se v buněčných membránách liší a mezi jednotlivými membránovými kompartmenty je intenzivně vyměňován. Transport FC probíhá kombinací vesikulární (sekretorické) a nevesikulární cesty (Obr. 7). Nevesikulární cestou rozumíme transport zprostředkovaný proteinovými nosiči, přímým kontaktem membrán či kombinací obého. Např. nově syntetizovaný FC je transportován sekretorickou cestou jen minoritně, velká část sterolu se na povrch buňky dostává nevesikulárním způsobem [13].

Intracelulárními transportními molekulami lipidů (nevesikulárního typu) jsou proteiny obsahující doménu START (StAR, protein přenášející fosfatidylcholin aj.), které jsou lokalizovány v cytosolu, na membránách i v jádře. StAR zajišťuje transport FC z vnější membrány mitochondrie do membrány vnitřní [14]. Součástí vnější membrány mitochondrie je také periferní benzodiazepinový receptor, který se rovněž účastní importu FC do mitochondrie [6].

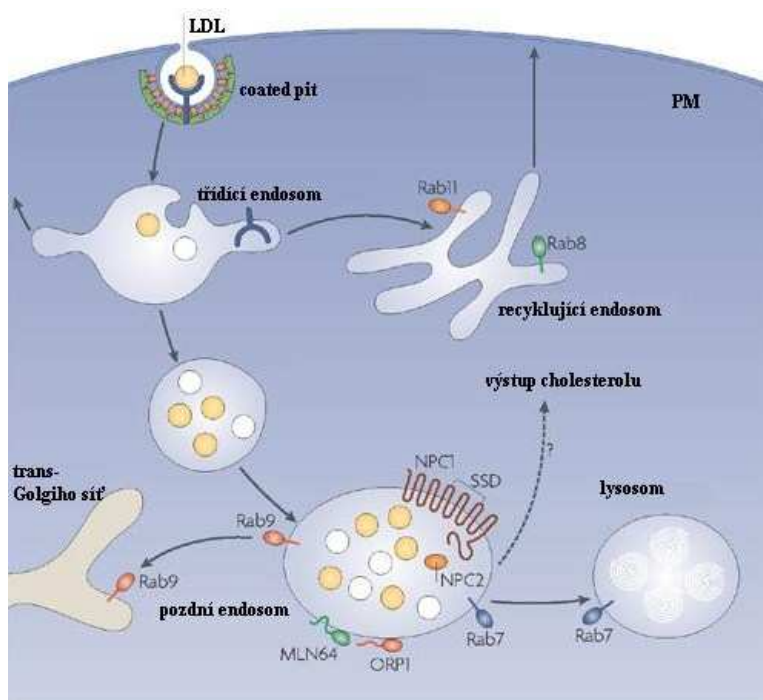
Po internalizaci receptorů s navázanými lipoproteiny je FC z endosomu přesouván přímo nebo prostřednictvím Golgiho komplexu (GA) na PM, anebo je transportován do ER. Transport z endosomu zprostředkovávají dva proteiny - Niemann-Pick typ C1 a C2 (NPC1, NPC2) [6].

Dalšími transportními molekulami pro steroly jsou tzv. proteiny vázající oxysteroly a proteiny jim příbuzné (ORP). Existuje ovšem ještě mnoho přenašečů z různých rodin podílejících se na transportu FC (NPC1L1, SCP2 ad.) [14].

Cholesterol je nejen přesouván mezi membránami v rámci jedné buňky, ale je také exportován z buňky ven. Tento způsob odstraňování FC zajišťují transportní přenašeče z rodiny ABC.

4.3 SKLADOVÁNÍ CHOLESTEROLU

Nadměrná akumulace volného cholesterolu v buňce může být toxická, proto její buňka konvertuje na CE [14]. Společně s jinými neutrálními lipidy jsou CE uskladněny ve formě tukových kapének. Tukové kapénky vznikají na mikrosomálních membránách, ale pravděpodobně mohou vznikat i z membrány plazmatické. Jsou specifické tím, že jejich povrch tvoří pouze jedna vrstva PL. Větší tukové kapénky vznikají fúzí několika menších [15].



Obr. 7: Transport cholesterolu mezi membránami (upraveno podle Ikonen [6]).

NPC1 a NPC2 se podílí na odstraňování cholesterolu z pozdního endosomu. Součástí endosomálního transportu jsou také GTPasy Rab. Další proteiny vázající steroly (MLN64 a ORP1) se podílí na organizaci dopravy v pozdním endosomu. Vysvětlivky: LDL – lipoprotein o nízké hustotě, PM – plazmatická membrána, SSD – doména sensitivní na steroly.

4.4 ZDROJE CHOLESTEROLU

Buňka získává cholesterol různými způsoby – vlastní syntézou, hydrolýzou cholesterylesterů anebo jej může přijmout z cirkulace.

4.4.1 Biosyntéza

Biosyntéza cholesterolu probíhá v cytosolu a částečně v endoplazmatickém retikulu (ER) – děje se účastní solubilní i transmembránové proteiny. Může být rozdělena do pěti fází:

1. syntéza mevalonátu z acetyl-CoA,
2. tvorba jednotek isoprenu,
3. vznik skvalenu,
4. cyklizace skvalenu,
5. vznik cholesterolu.

Syntéza mevalonátu probíhá v cytosolu i ER. Nejprve kondenzují dvě molekuly acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-CoA katalyzovaného thiolasou. Ten interaguje s další molekulou acetyl-CoA a vytváří 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA).

Působením mikrosomálního enzymu, HMG-CoA-reduktasy (HMGR) je HMG-CoA transformován na mevalonát. Mevalonát je poté fosforylován, dochází k dekarboxylaci a výsledkem jsou aktivní jednotky isoprenu, isopentenylidifosfáty. Kondenzací tří isopentenylidifosfátů vzniká farnesyldifosfát, jenž interaguje s další molekulou farnesyldifosfátu a utváří tak skvalen. Skvalen je přetvářen v ER vlivem skvalenepoxidasy na skvalen-2,3-oxid. Methylové skupiny jsou v rámci molekuly přesouvány pomocí oxidoskvalenlanosterolcyklasy. V membráně ER probíhá další přeměna lanosterolu na cholesterol [15].

4.4.2 Hydrolýza cholesterylesterů

CE neustále podléhají hydrolýze a reesterifikaci. V případě, že buňka potřebuje cholesterol, může jej uvolnit z CE uložených v tukových kapénkách. Reakci katalyzuje cholesterylesterhydrolasa [14]. Takto získaný FC může být rovněž exportován z buňky cestou reverzního transportu [16].

4.4.3 Receptory v metabolismu cholesterolu

Příjem cholesterolu z cirkulace může být zajišťován specifickými (receptorovými) i nespecifickými mechanismy (např. pinocytózou).

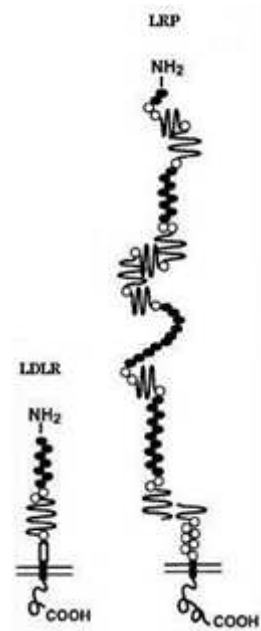
Receptory zprostředkovávající vychytávání lipoproteinů z oběhu dělíme do dvou základních rodin. LDL receptorová rodina obsahuje celou řadu receptorů, pro které jsou charakteristické tyto znaky: mají jednu transmembránovou doménu, krátkou cytoplazmatickou část a *N*-konec směřující do extracelulárního prostředí (Obr. 8). Patří sem nejlépe prozkoumaný LDLR, LRP, VLDL receptor, apo E receptor 2 a gp330/megalin. U mnohých z těchto receptorů není známá primární funkce. Většina z nich je schopná vázat i jiné ligandy než jen lipoproteiny [5]. Dalšími lipoproteinovými receptory jsou receptory tzv. „scavengerové“ (SR-A, SR-B ad.).

4.4.3.1 LDL receptor (LDLR)

Prekurzor LDL receptoru je syntetizován v drsném ER. Sekretorickou drahou se maturovaný receptor (160 kDa) dostává na povrch buňky, kde se shromažďuje s ostatními LDLR v tzv. „coated pits“ (potažené jamky). Ty se poté transformují na endocytické váčky, jejichž následnou fúzí se utváří endosom s nízkým pH, které je zásadní pro disociaci LDL od receptoru. Zatímco LDL pokračuje do lysosomu, LDLR

je recyklován zpět na povrch buňky. Každý LDLR prochází tímto cyklem každých 10 minut nezávisle na tom, jestli má nebo nemá navázaný lipoprotein [17].

LDLR interaguje se dvěma apoproteiny: apoproteinem B-100, charakteristickým pro LDL, a apoproteinem E, vyskytujícím se „v remnantech“ chylomikronů, IDL a některých HDL [17]. LDLR je nejvíce exprimován v játrech, gonádách a nadledvinách. LDLR zásobují buňky cholesterolem a zároveň odstraňováním LDL z krevního oběhu předcházejí akumulaci lipoproteinů bohatých na cholesterol [18]. V degradaci LDLR hrají roli transkripční faktory a produkty genů, které ovlivňují: jaterní X receptor (LXR) a protein vázající element regulovaný steroly (SREBP).



Obr. 8: LDL receptor a jemu příbuný receptor LRP (upraveno dle Willnow [5]).

4.4.3.2 „LDL receptor příbuzný protein“ (LRP)

LRP je heterodimer složený z 515kDa extracelulární a 85kDa transmembránové podjednotky (Obr. 8). Vzniká proteolytickým štěpením 600kDa prekurzoru. LRP zprostředkovává buněčné vychytávání lipoproteinů obsahujících apo E nebo lipoproteinovou lipasu, tj. např. chylomikronové „remnanty“. Účastní se různých buněčných dějů, neboť je schopný vázat mnoho jiných ligandů (např. α -2-makroglobulin, thyroglobulin aj.) Vyskytuje se hlavně na membránách hepatocytů, neuronů a fibroblastů [5].

4.4.3.3 „Scavenger“ receptory

„Scavenger“ receptor třídy A (SR-A) je trimerní glykoprotein procházející membránou, který váže negativně nabitě ligandy [19]. Protein má dvě isoformy SR-AI a SR-AII, které vznikají alternativním sestřihem. SR-A je důležitý pro vychytávání modifikovaných LDL makrofágy. Váže a degraduje nejen acetylované, ale i vysoce oxidované LDL [20].

CD36 patří mezi „scavengerové“ receptory třídy B. Váže acetylované a oxidované LDL, ale významně se podílí pouze na degradaci oxidovaných. SR-A a CD36 jsou nenahraditelné ve vychytávání modifikovaných LDL částic [20].

Zvláštním „scavengerovým“ receptorem je SR-BI z třídy B, který je exprimován především v játrech a steroidogenních tkáních. V závislosti na koncentračním gradientu

stimuluje obousměrný tok cholesterolu mezi buňkou a HDL. Zároveň zajišťuje selektivní vychytávání CE z HDL, které nezahrnuje internalizaci celé lipoproteinové částice [13]. Sníží-li se exprese SR-BI, množství cholesterolu v plazmě se zvýší [21]. Z toho vyplývá, že SR-BI je hlavním mediátorem v procesu vychytávání CE játry.

4.5 ODBOURÁVÁNÍ CHOLESTEROLU

Nadměrné množství cholesterolu může být pro buňku toxické, proto je nutné se ho určitými způsoby zbavovat. Dosáhne-li koncentrace cholesterolu kritické výše, plazmatická membrána se stává rigidní – ztrácí svou fluiditu a přestává plnit funkce (např. signalizace), což může vést k vyvolání apoptotické smrti [22].

Degradace cholesterolu je komplikovaná, neboť jej nelze prostě rozštěpit na jednoduché molekuly. Cholesterol je proto odbouráván na jiné, již lépe degradovatelné, látky. Fyziologicky významnými mechanismy degradace jsou transport FC do žluči a přeměna FC na žlučové kyseliny, přičemž oba děje probíhají v játrech. Mimojaterní tkáň využívají transportu FC do cirkulace a současné konverze FC na různé metabolity.

4.5.1 Transport cholesterolu z jater do žluči

Významnou drahou degradace cholesterolu je jeho transport spolu s PL, BA a jinými látkami do žluči i přesto, že velká část FC a BA je ve střevě znovu resorbována. Hnací silou transportu FC a PL je sekrece žlučových kyselin [23]. Na transportu FC, PL a BA do žluči se podílí několik membránových proteinů z rodiny ABC přenašečů. Ty jsou lokalizovány na kanalikulární straně hepatocytu.

Heterodimer ABCG5/ABCG8 zajišťuje přímou sekreci sterolů do žluči. Opačně působí protein Niemann-Pick C1-like-1 (NPC1L1), který snižuje sekreci FC do žluči [6]. Pro transport FC do žluči je nezbytný další přenašeč z rodiny ABC, ABCB4. Ten se sám transportu FC přímo neúčastní, nýbrž přemísťuje fosfatidylcholinu z vnitřní strany kanalikulární membrány do vnější [21].

4.5.2 Transport prostřednictvím lipoproteinů

Transport lipidů v lipoproteinech je nejen způsob distribuce lipidů po těle, ale také způsob, jak se buňka může zbavovat nadbytečného cholesterolu. Lipoproteiny vznikají v enterocytech, hepatocytech a v malém množství dokonce i v kardiomyocytech [24].

Pro vznik lipoproteinů je nezbytný mikrosomální protein přenášející TG, který v játrech a střevě do vznikajících částic lipoproteinů transportuje CE, TG a PC [25].

Pro tvorbu lipoproteinů je důležitá funkce acyl-CoA:cholesterolacyltransferas (ACAT) – při reakci jsou vznikající CE inkorporovány do formujících se lipoproteinů.

4.5.3 ABC přenašeče

Transport různých molekul přes membránu zajišťuje velká rodina ABC přenašečů, které využívají energii uvolněnou hydrolýzou ATP. Řada ABC přenašečů hraje důležitou roli v exportu sterolů. Patří sem např. již zmíněný heterodimer ABCG5/ABCG8. Dalšími přenašeči podílejícími se na metabolismu cholesterolu jsou ABCA1, ABCG1, ABCG4 ad.

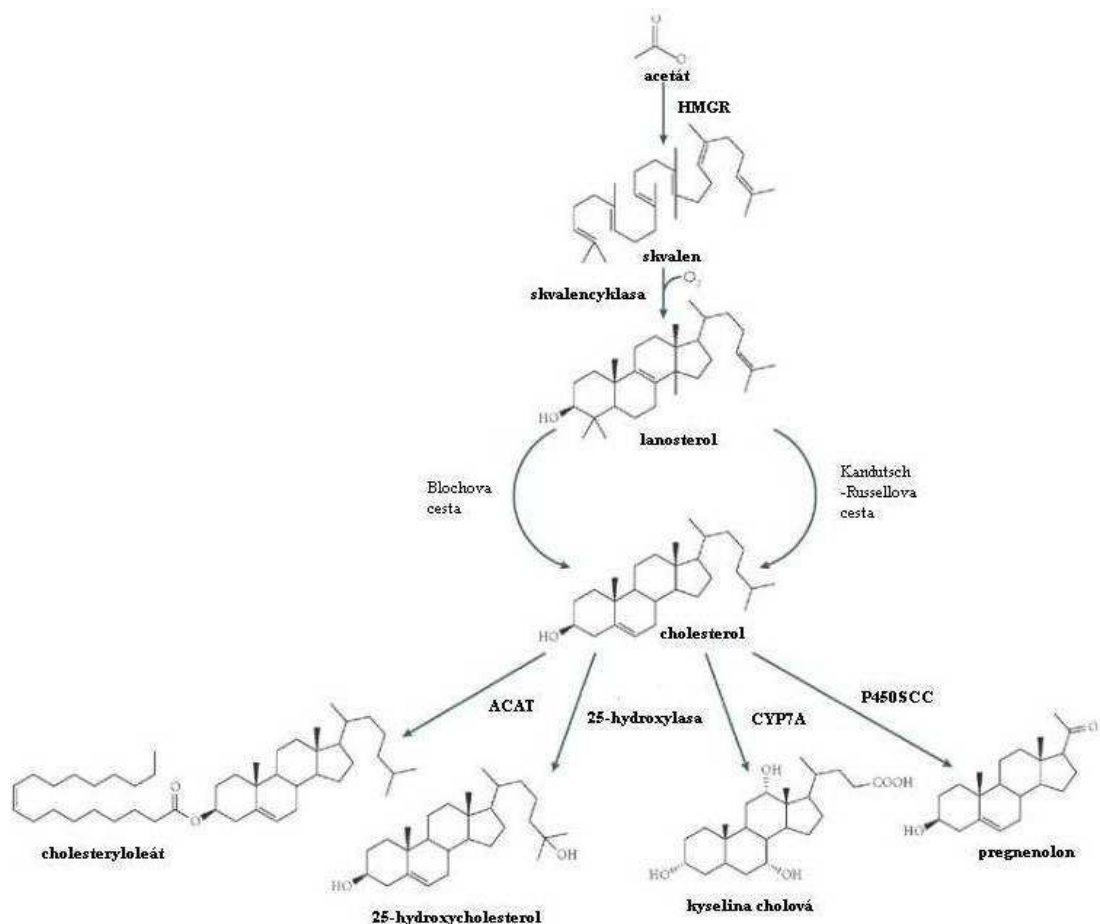
Pro reverzní transport je zásadní funkce ABCA1, který zprostředkovává export FC a PL z buňky, a tím napomáhá formování nascentního HDL. V RCT je významná funkce i ABCG1, který usnadňuje transport FC do HDL. V makrofázích je dokonce jeho činnost zcela nezbytná z hlediska ochrany před vznikem aterosklerosy. ABCG1 může společně s ABCG4 vytvářet heterodimery, které rovněž napomáhají exportu FC z buňky do HDL [26].

4.5.4 Cholesterol jako prekurzor

4.5.4.1 Cholesterylestery

Cholesterylestery jsou ukládány v tukových kapénkách jako zásobní zdroj FC, anebo cirkulují v krevním oběhu uvnitř sérových lipoproteinů. Intracelulárně vznikají působením ACAT tak, že je esterifikována hydroxylová skupina FC (Obr. 9). Produkované CE jsou odstraňovány z membrány ER a vytvářejí v cytoplazmě lipidové kapénky. V hepatocytu se CE přesouvají do ER a stávají se z nich společně s TG hydrofobní lipidová jádra v procesu skládání VLDL.

Existují dva isoenzymy ACAT – ACAT1 a ACAT2. Oba jsou součástí ER. ACAT1 je hlavní isoformou v kůži, nadledvinách, gonádách a makrofázích, převažujícím isoenzymem střevních mukózních buněk je ACAT2. U myši je ACAT2 hlavním isoenzymem i v hepatocytech. Aktivita ACAT se vůči ostatním sterolům zvyšuje, je-li předtím sama aktivována cholesterolem [14].



Obr. 9: Metabolismus cholesterolu (upraveno dle Ikonen [6]).

Vysvětlivky: ACAT – acylCoA:cholesterolacyltransferasa, CYP7A – 7 α -hydroxylasa, HMGR – 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktasa, P450_{SCC} – protein štěpící postranní řetězec cholesterolu.

4.5.4.2 Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny jsou steroidní kyseliny s karboxylovou skupinou v pozici C₂₄. Na steroidní jádra mají navázány 2 až 3 hydroxylové skupiny. Žlučové kyseliny vznikají v játrech z cholesterolu (Obr. 9) a jsou skladovány v žlučníku společně s dalšími látkami ve formě žluči. BA dělíme na primární a sekundární.

Primární BA jsou syntetizovány v játrech z cholesterolu *de novo* (kyseliny cholová a chenodeoxycholová). Sekundární BA (kyseliny deoxycholová a lithocholová) vznikají částečnou dehydroxylací ve střevě. Po resorpci ze střeva se vracejí do jater tzv. enterohepatálním oběhem. Protože je většina BA resorbována ve střevě, syntéza *de novo* se uplatňuje v menší míře, ale i přesto je stále kvantitativně významnou v odstraňování FC. Žluč je nezbytná pro trávení, transport a vstřebávání tuků. Žlučí se vylučuje FC a některá žlučová barviva (bilirubin). Téměř všechny BA jsou secernovány játry konjugované s taurinem, nebo glycinem. Přeměna FC na žlučové kyseliny může

probíhat dvěma způsoby – klasickou drahou, tzv. neutrální, anebo drahou alternativní, tzv. acidickou.

4.5.4.2.1 Klasická dráha biosyntézy žlučových kyselin

Klasická dráha syntézy BA začíná uvnitř ER hepatocytu, kde vzniká působením cholesterol-7 α -hydroxylasy (CYP7A1) 7 α -hydroxycholesterol. Ten je poté hydroxylován mikrosomálním enzymem sterol-12 α -hydroxylasou, přičemž na vedlejším řetězci probíhají další hydroxylace. Na C₂₇ přidává hydroxylovou skupinu mitochondriální cytochrom P450 enzym CYP27 a na C₂₄ peroxisomální multifunkční protein-2. U člověka je touto cestou produkováno cca 90 % všech žlučových kyselin, zatímco u myši pouze 55 % [27].

4.5.4.2.2 Alternativní dráha biosyntézy žlučových kyselin

Syntéza BA může být v alternativní dráze zahájena hydroxylací oxysterolů v pozici 7 α , katalyzovanou dvěma enzymy: oxysterol-7 α -hydroxylasou (CYP7B1) a 24-hydroxycholesterol-7 α -hydroxylasou (CYP39A1). CYP7B1 takto hydroxyluje např. 25-hydroxycholesterol a 27-hydroxycholesterol (27-HC), zatímco CYP39A1 reaguje pouze s 24-hydroxycholesterolem [27].

4.5.4.3 Oxysteroly

Cholesterol je prekurzorem řady oxidovaných sterolů, které vznikají v malém množství činnostmi různých hydroxylas. Oxysteroly jsou vyráběny téměř všemi buňkami, mají obrovský význam v regulaci metabolismu cholesterolu a jejich produkce v mozku je zcela zásadní. Na rozdíl od cholesterolu mohou totiž oxysteroly procházet hematoencefalickou bariérou.

24S-hydroxycholesterol je nejvíce zastoupeným oxysterolem v mozku, vzniká činnostmi cholesterol-24-hydroxylasy. Je transportován do jater, kde je přeměněn na BA. V mitochondriích mnoha tkání je cholesterol konvertován působením CYP27 na 27-HC (Obr. 9). 27-HC se hojně vyskytuje v lidské a myší plazmě. V játrech slouží jako alternativní substrát pro syntézu BA. 25-hydroxycholesterol může sloužit jako meziprodukt syntézy BA [14].

4.5.4.4 Jiné deriváty cholesterolu

Mezi steroidní látky patří různé hormony regulující základní metabolické pochody. Patří sem hormony kůry nadledvin (tzv. kortikoidy) a hormony pohlavní. Na začátku syntézy všech hormonů je přeměna FC na pregnenolon katalyzovaná mitochondriálním P450_{SCC} – cytochrom-P-450 postranní řetězec odštěpujícím enzymem (Obr. 9) [15].

Mezi kortikoidy zařazujeme mineralokortikoidy a glukokortikoidy vznikající v různých vrstvách kůry nadledvin. Prvním krokem syntézy kortikoidů je hydroxylace progesteronu, který je odvozen z pregnenolonu.

Pohlavní hormony (androgeny a estrogeny) jsou syntetizovány převážně v pohlavních orgánech, ale v malém množství i v kůře nadledvin.

Dalším významným metabolitem vznikajícím z cholesterolu je cholekalciferol. Vzniká v kůži působením UV záření z prekurzoru 7-dehydrocholesterolu. Cholekalciferol podléhá hydroxylaci nejprve v játrech a poté v ledvinách za vzniku 1,25-dihydroxyvitamínu D₃, aneb kalcitriolu – aktivního vitamínu D [13]. Vitamín D je v tucích rozpustný a ovlivňuje resorpci vápníku a fosfátu ze střeva. Podílí se také na kalcifikačních procesech.

5 REGULACE METABOLISMU CHOLESTEROLU V HEPATOCYTU

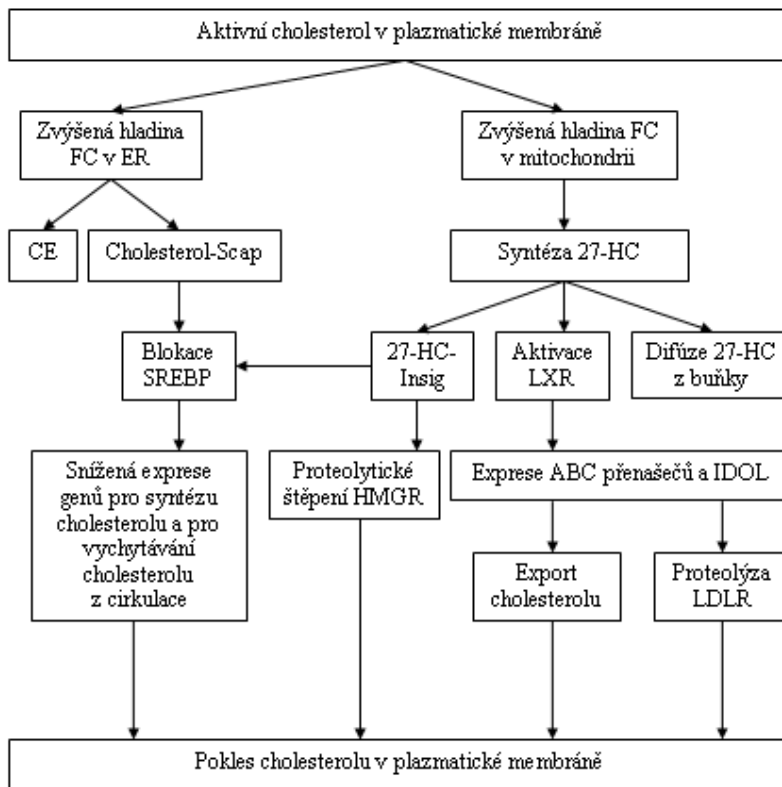
Centrální úlohu v regulaci metabolismu cholesterolu hrají játra, která jsou jediným orgánem v těle schopným nadbytečný cholesterol z těla eliminovat. Koncentrace cholesterolu v buňce je jemně regulována zpětnovazebným systémem. Pokles koncentrace cholesterolu v hepatocytu stimuluje biosyntézu cholesterolu a zvýšení počtu LDLR na povrchu buňky. Vzestup koncentrace cholesterolu aktivuje metabolické dráhy, které vedou k jeho odstranění z buňky. Určitou výjimku tvoří produkce žlučových kyselin – ta totiž není závislá na koncentraci cholesterolu v buňce, nýbrž na tom, zda je organismus potřebuje.

Metabolismus cholesterolu a jeho regulace je velmi komplexní. Podílí se na něm celá řada systémů kontrolovaných transkripčními faktory (SREBP, LXR, farnesoidní X receptor – FXR ad.), které budou popsány níže. Tyto systémy reagují na koncentraci cholesterolu v buňce.

5.1 AKTIVNÍ CHOLESTEROL

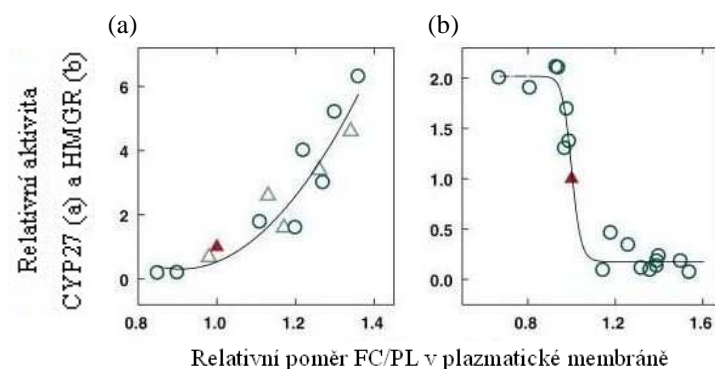
Primárním regulátorem metabolismu cholesterolu je jeho vlastní koncentrace v buňce, která je za normálních podmínek udržována konstantní. Zvýší-li se množství cholesterolu v PM, aktivní FC je snáze uvolňován a přesouván do ER a mitochondrií.

Nárůst koncentrace cholesterolu v organelách je signálem pro systémy, které spouští mechanismy odstraňující cholesterol z buňky až do doby, dokud není dosaženo původní koncentrace cholesterolu (Obr. 10) [11]. Vzroste-li například obsah cholesterolu v ER, je inhibována jeho syntéza. Podobně, vzroste-li koncentrace FC v mitochondriích, vzroste produkce oxysterolů (Obr. 11) [28].



Obr. 10: Regulace metabolismu cholesterolu - odpověď na vzestup koncentrace cholesterolu (upraveno dle Steck, Lange [11])

Vysvětlivky: ABC – ATP-vazebné kazety, CE – cholesterylester, ER – endoplazmatické retikulum, FC – volný cholesterol, 27-HC – 27-hydroxycholesterol, HMGR – 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktasa, IDOL – indukovatelný protein odpovědný za degradaci LDLR, LDLR – LDL receptor, LXR – jaterní X receptor, Scap – protein aktivující štěpení SREBP, SREBP – protein vázající steroly regulovaný element.



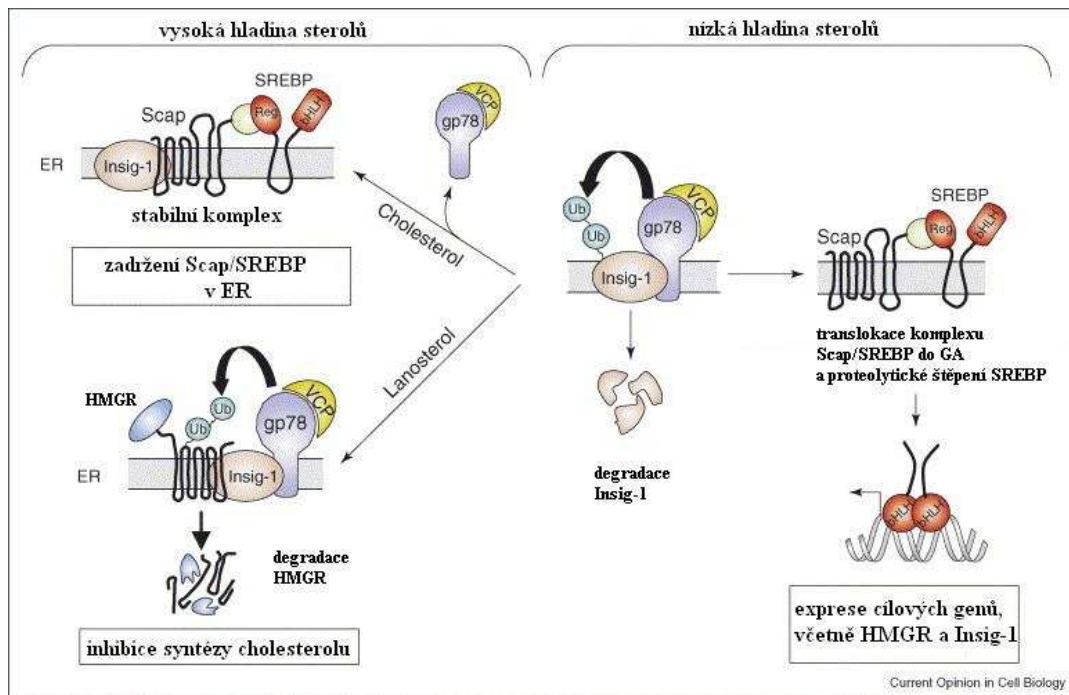
Obr. 11: Závislost aktivity enzymů CYP27 a HMGR na poměru FC/PL v plazmatické membráně (upraveno dle Steck, Lange [11]). (a) aktivace CYP27 v mitochondriích (○ kontrola, △ fibroblast bez NPC1), (b) inaktivace HMGR v ER.

5.2 ROLE SREBP V REGULACI METABOLISMU CHOLESTEROLU

„Protein vázající steroly regulovaný element“ (SREBP) je jeden z nejdůležitějších transkripčních faktorů kontrolujících metabolismus cholesterolu a lipidů. Vyskytuje se ve třech různých isoformách, kódovaných pouze dvěma geny: *SREBP1* (isoformy 1a a 1c) a *SREBP2*. Jelikož SREBP2 je klíčovým transkripčním faktorem genů v regulaci metabolismu cholesterolu (*LDLR*, *PCSK9*, *HMGR* a dalších genů kódujících enzymy biosyntézy cholesterolu a rovněž *SREBP2*) [29], bude mu věnována větší pozornost.

V membráně ER je ukotven neaktivní SREBP, resp. jeho prekurzor, který se skládá ze tří domén. *N*-terminální doména obsahuje transaktivační doménu, kterou představuje oblast s basic-helix-loop-helix-leucine-zipper (bHLH-LZ) motivem nezbytným pro dimerizaci dvou *N*-terminálních domén, tj. dvou SREBP, a vazbu DNA v jádře. Druhou doménu prekurzoru tvoří dva hydrofobní transmembránové segmenty s krátkou smyčkou směřující do lumen ER. Třetí, *C*-terminální doména je doména regulační. Tato doména interaguje v ER s proteinem aktivujícím štěpení SREBP (Scap) (Obr. 12). Maturace SREBP a její regulace probíhá na třech úrovních: na úrovni transkripce, proteolytického štěpení a posttranslační modifikace [30].

Transkripce *SREBP2* je závislá na množství cholesterolu v buňce. Aktivace SREBP v ER je rovněž podmíněna koncentrací cholesterolu. Má-li buňka dostatek cholesterolu, je komplex Scap/SREBP vázán v membráně ER na protein Insig [31]. Pokud však koncentrace FC v membráně ER klesne, změní se konformace Scap (nemá navázaný FC na doméně citlivé pro steroly – SSD) a uvolňuje se z vazby na Insig. Scap se poté váže na proteiny COPII vaku (Sar1 a Sec23/24) a zprostředkovává transport komplexu Scap/SREBP do Golgiho aparátu. V Golgiho aparátu probíhá štěpení prekurzoru dvěma specifickými proteasami (S1P a S2P). Při druhém štěpení je *N*-terminální doména SREBP uvolněna do cytoplazmy a vstupuje do jádra. Maturovaný, transkripčně aktivní SREBP se v jádře váže ve formě homodimeru na steroly regulovaný element (SRE) cílových promotorů a spouští transkripci výše zmíněných genů (Obr. 12) [31].



Obr. 12: Regulace pomocí Scap/SREBP (upraveno dle Bengoechea-Alonso [31]).

Vysvětlivky: bHLH – basic-helix-loop-helix-leucinový zip, ER – endoplazmatické retikulum, GA – Golgiho aparát, gp78 - ubikvitinligasa, HMGR – 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktasa, Scap – protein aktivující štěpení SREBP, SREBP – protein vázající steroly regulovaný element, Ub – ubikvitin, VCP – protein obsahující valosin.

Uvnitř jádra je transkripční aktivita SREBP regulována modifikacemi či interakcemi s jinými proteiny. Kupříkladu fosforylace *N*-terminální domény SREBP2 proteinkinasami aktivovanými mitogeny podporuje transkripční kapacitu faktoru [29]. Pro úspěšné spuštění transkripce genů vyžaduje SREBP interakci s koaktivátory (p300, CBP ad.) [30, 31]. Na závěr svého působení je SREBP ubikvitinylován a degradován v proteasomu [30].

25-hydroxycholesterol, podobně jako Insig, interaguje s komplexem Scap/SREBP a potlačuje tak proces zrání SREBP [14].

Zatímco SREBP2 hraje zásadní úlohu v regulaci koncentrace cholesterolu, isoformy SREBP1a a SREBP1c regulují především lipogenesi. Tyto isoformy vznikají alternativním sestřihem. SREBP1a má delší *N*-terminální doménu a vyšší transkripční potenciál než SREBP1c. Dominantní isoformou ve většině lidských a myších tkáních je ale SREBP1c. Zvláště vysoké zastoupení SREBP1c je v játrech, bílé tukové tkáni, kosterních svalech, v nadledvinách a mozku [30, 31].

Expresce *SREBP1a* je stejně jako *SREBP2* regulována koncentrací cholesterolu v buňce. Transkripce *SREBP1c* může být indukována insulinem i aktivací LXR. Expresi

SREBP1c buňka snižuje pomocí pomocí proteinkinas aktivovaných Adenosinmonofosfátem, nebo účinkem glukagonu [30].

5.2.1 Proprotein konvertasa subtilisin-like/kexin typ 9 (PCSK9)

Proprotein konvertasa subtilisin-like/kexin typ 9 (PCSK9) zprostředkovává degradaci LDL receptoru. Autokatalytické štěpení prekurzoru PCSK9 probíhá během jeho cesty na povrch buňky, kde již jako zralý protein interaguje s LDLR. Zdá se, že PCSK9 umí zabránit i samotnému vstupu LDLR na plazmatickou membránu. Protože část PCSK9 koluje v krvi, může vázat LDLR i extracelulárně.

Pro degradaci LDLR je nezbytná C-terminální doména PCSK9, která buď váže další protein, který doprovodí LDLR do lysosomu, anebo zabráni vazbě proteinu zprostředkovávajícího recyklaci LDL receptoru na PM.

PCSK9 je nejvíce exprimován v játrech, střevě a ledvinách. Proč ovšem PCSK9 degraduje LDLR preferenčně v hepatocytech, není zatím jasné [32].

5.2.2 „Gen indukovaný insulinem“ (Insig)

Insig je residentní protein ER vyskytující se v několika isoformách: převažující Insig-1 a Insig-2 (2a a 2b). Insig-2, na rozdíl od Insig-1, není regulován SREBP a je exprimován v malém množství.

Pokud je v buňce málo cholesterolu, interaguje Insig s ubikvitinligasou gp78 a je degradován. Pokud je ale cholesterolu v buňce hodně, závisí osud Insig na proteinech, které s ním interagují (HMGR, Scap). V případě, že je na Insig navázána HMGR, pak je ubikvitinylována právě HMGR. V případě, že je na Insig navázán Scap, vytěsňuje gp78 z vazby s Insig (Obr. 12). Míra ubikvitinylace Insig je tedy závislá na kompetici mezi ubikvitinligasou a Scap [31].

5.3 JATERNÍ X RECEPTOR (LXR)

Dalším transkripčním faktorem nezbytným pro regulaci je jaterní X receptor (LXR). Byly identifikovány dva typy receptorů - LXR α a LXR β . LXR α je exprimován v játrech, ledvinách, střevě [33], tukové tkáni a makrofázích, zatímco LXR β se vyskytuje téměř ve všech tkáních [34]. LXR patří do skupiny receptorů, u kterých dlouho nebyl znám ligand. Koncem 90. let 20. století bylo prokázáno, že aktivaci LXR spouští oxysteroly [35].

Na zvýšenou koncentraci cholesterolu může buňka reagovat aktivací CYP27 v mitochondriích (Obr. 13), která oxiduje FC a chrání tak buňky před cholesterolovým přetížením dvěma mechanismy. První využívá zvýšené rozpustnosti produktů hydroxylasy (27-HC a kyseliny cholestenové), které jsou snadněji vylučovány z buňky. Druhý mechanismus zahrnuje stimulaci LXR vznikajícími oxysteroly a zároveň tak podporuje reverzní transport cholesterolu [36].

Po navázání ligandu – oxysterolu – vytváří LXR společně s retinoidním X receptorem (RXR) funkční dimer. Interakce dimeru LXR/RXR s elementem DNA, který této vazbě odpovídá (LXRE), zahajuje transkripci genů spojených s transportem sterolů – ABC přenašečů (*ABCA1*, *ABCG1*, *ABCG5*, *ABCG8*) [37] a apo E [38]. LXR tudíž ovlivňuje absorpci cholesterolu ve střevě, jeho exkreci do žluči, export mimojaterními tkáněmi do cirkulace a metabolismus lipoproteinů (*CETP* [39], gen kódující lipoproteinovou lipasu [40]). LXR rovněž řídí biosyntézu FA (*SREBP1c*) [41] a u hlodavců dokonce biosyntézu BA (*Cyp7a1*) [35].

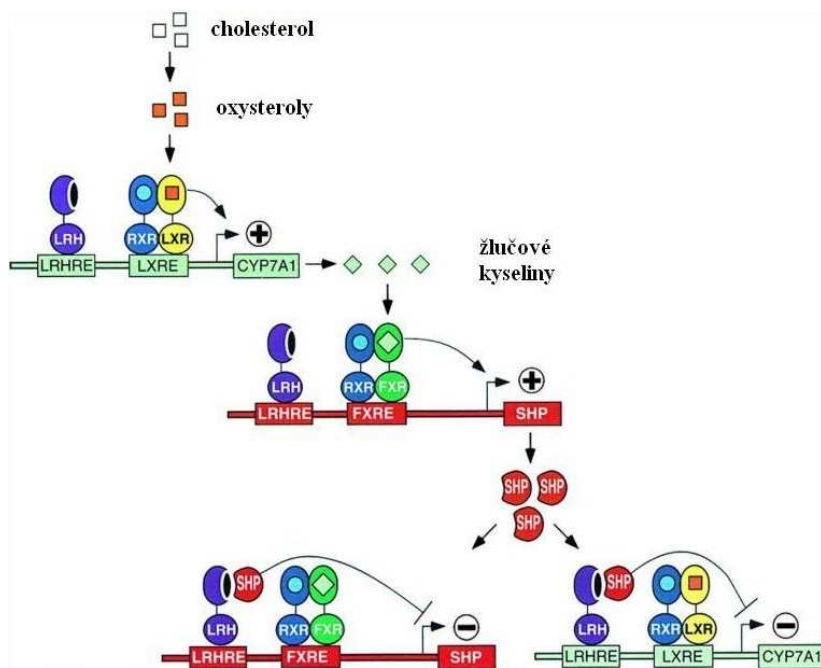
Zvýšená exprese *ABCA1*, *ABCG5* a *ABCG8* ve střevě zprostředkovaná LXR limituje absorpci sterolů tím, že vznikající proteiny podporují eflux cholesterolu z enterocytů do lumen [37].

LXR, nezávisle na SREBP, ovlivňuje vychytávání LDL. Indukuje transkripci proteinů odpovědných za degradaci LDLR (Idol), které selektivně označují právě LDL receptory pro degradaci. Idol může ubiquitinylovat i prekurzor LDLR a to již v endoplazmatickém retikulu. Je konstitutivně transkribován v játrech, ale na rozdíl od PCSK9 je nejvíce aktivní v tkáních mimojaterních (makrofágy, střevo, nadledviny) [42].

5.4 FARNESOIDNÍ X RECEPTOR (FXR)

Velmi specifickou úlohu v regulaci metabolismu cholesterolu hraje transkripční faktor FXR. Tento nukleární receptor reguluje přeměnu FC na žlučové kyseliny, které jsou zároveň jeho ligandem.

Po navázání ligandu, podobně jako LXR, tvoří farnesoidní X receptor společně s RXR funkční dimer, který se váže na element DNA odpovídající této vazbě (FXRE). Spouští se transkripce malého heterodimerního proteinu (SHP). Tento specifický nukleární receptor poté interaguje s homologem jaterního receptoru (LRH), který je navázaný na sekvenci LRHRE, rovněž lokalizované v promotorové oblasti. SHP touto interakcí potlačují transkripci vlastní i transkripci *CYP7A1*, klíčového enzymu syntézy BA (Obr. 13) [43].



Obr. 13: Zpětnovazebná regulace homeostázy žlučových kyselin (upraveno dle Lu [43]).

Vysvětlivky: *Cyp7a1* – gen pro cholesterol-7 α -hydroxylasu, FXR – farnesoidní X receptor, FXRE – úsek DNA odpovídající na vazbu FXR, LRH – homolog jaterního receptoru, LRHRE – úsek DNA odpovídající na vazbu LRH, LXR – jaterní X receptor, LXRE – úsek DNA odpovídající na vazbu LXR, RXR – retinoidní X receptor, SHP – malý heterodimerní protein.

Vedle syntézy BA reguluje FXR i vychytávání BA z plazmy prostřednictvím pump NTCP a OATP (Na⁺-dependentní taurocholátový kotransportující polypeptid a polypeptid transportující organické anionty) a jejich export do žluči přes BSEP

a MRP2 (žlučové soli exportující protein a „multidrug resistance-associated protein–2“) [44].

FXR má důležitou funkci v ochraně buněk a orgánů (zejména pak jater a střeva) před toxicitou vlastní žlučovým kyselinám. Aktivované komplexy FXR/RXR inhibují syntézu, vychytávání BA a pomáhají odstraňování BA z hepatocytů. Detoxikace BA je rovněž regulována FXR [44].

5.5 DALŠÍ TRANSKRIPČNÍ FAKTORY V REGULACI METABOLISMU CHOLESTEROLU

Regulace metabolismu cholesterolu se účastní mnoho dalších faktorů (RXR, LRH aj.), ale jejich úloha je pouze minoritní. Retinoidní X receptor tvoří dimery s mnoha transkripčními faktory a tím zahajuje transkripci řady genů. Jeho ligandem je kyselina retinová. Homolog jaterního receptoru (LRH) je exprimován v játrech a participuje na homeostáze žlučových kyselin. Váže se v promotorové oblasti ke specifické sekvenci LRHRE. Zesiluje odpověď dimeru LXR/RXR na steroly v buňce a ovlivňuje transkripci *CETP*. Jeho transkripční aktivita je inhibována SHP [45].

5.6 INTEGRACE BUNĚČNÉ ODPOVĚDI NA ZMĚNU KONCENTRACE CHOLESTEROLU

Pokud v buňce klesne množství cholesterolu pod určitou úroveň, a především pokud klesne hladina FC v ER, spustí se regulační mechanismy aktivující syntézu cholesterolu *de novo*, případně syntézu receptorů vychytávajících lipoproteiny s vysokým obsahem CE. Klesne-li koncentrace cholesterolu v ER, změní se konformace Scap a komplex Scap/SREBP se uvolní od Insig a interaguje s proteiny COPII váčku. Komplex Scap/SREBP putuje do GA, kde dochází k aktivaci SREBP štěpením. SREBP poté v jádře aktivuje transkripci genů, jejichž produkty zvyšují hladinu FC v buňce [6]. Mezi tyto produkty patří proteiny regulující vychytávání LDL částic (LDLR a PCSK9) a proteiny katalyzující biosyntézu cholesterolu.

Pokud v buňce vzroste koncentrace cholesterolu nad určitou mez, spouštějí se mechanismy zajišťující odbourávání cholesterolu. Odpovídající metabolické dráhy jsou aktivovány funkcí transkripčních faktorů (LXR, FXR), resp. vazbou jejich ligandů. Vzroste-li koncentrace cholesterolu v PM, aktivní cholesterol směřuje do extracelulárního či intracelulárního prostoru. V cílových kompartmentech potom spouští svou vazbou na oblast sensitivní vůči sterolům odpovídající reakci. V mitochondriích jsou ve zvýšené míře syntetizovány oxysteroly, které aktivují LXR. U hlodavců je na

rozdíl od člověka LXRE přítomen i v promotoru *Cyp7a1* a dochází tedy i ke zvýšení produkce BA [27].

Hepatocyt odstraňuje nadbytečný FC tak, že jej transportuje do žluči buď přímo, nebo již přeměněný na BA (aktivace FXR). Ostatní buňky mohou využít funkce ACAT2 a vyrábět CE, které mohou být uloženy v tukových kapénkách, anebo mohou být transportovány uvnitř VLDL. Oxysteroly aktivují LXR, které spouští transkripci ABC přenašečů, SHP, Idol ad. (popsány výše). I když ve většině tkání nemá přeměna FC na oxysteroly kvantitativní význam pro katabolismus cholesterolu, je zásadní formou eliminace cholesterolu v mozku.

Probíhající biosyntéza FC, je inhibována ubikvitinylací, resp. degradací HMGR. Aktivace LXR indukuje snižování koncentrace cholesterolu v buňkách a podporuje RCT[6].

6 ZÁVĚR

Koncentrace cholesterolu v buňce, resp. v jednotlivých buněčných kompartmentech, je udržována ve velmi úzkém rozmezí řadou regulačních mechanismů. Tyto mechanismy ovlivňují metabolické dráhy, kterými buňka cholesterol přijímá i odstraňuje. To svědčí o velkém významu cholesterolu v udržování homeostáze buňky i celého těla.

Centrální úlohu mezi těmito regulačními mechanismy mají tři transkripční faktory – SREBP, LXR a FXR. SREBP odpovídá na pokles koncentrace cholesterolu v endoplazmatickém retikulu (a tedy v celé buňce) aktivací syntézy cholesterolu a jeho vychytávání z cirkulace. LXR zprostředkovává odpověď na vzestup koncentrace buněčného cholesterolu tím, že aktivuje systémy, které odsouvají cholesterol z buňky. FXR reaguje na množství žlučových kyselin v jaterní buňce a napomáhá tak udržování jejich konstantní hladiny v těle.

I když jsou jednotlivé regulační dráhy poměrně dobře charakterizovány, dosud není známo téměř nic o tom, jak tyto jednotlivé metabolické dráhy ovlivňují množství cholesterolu v cirkulaci u člověka. Vysoká koncentrace cholesterolu v krvi je spojena se zvýšeným rizikem rozvoje kardiovaskulárních onemocnění. Lze předpokládat, že genetické varianty celé řady genů regulujících metabolismus cholesterolu v buňce mohou mít vliv i na koncentraci cholesterolu v krvi. Je známo, že u většiny pacientů se zvýšenou hladinou cholesterolu hrají genetické faktory významnou úlohu, ale příslušné geny nebyly až na několik výjimek (*LDLR*, *PCSK9*, apod.) dosud jednoznačně identifikovány.

7 SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-binding cassette	ATP-vazebná kazeta
ACAT	Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase	Acyl-CoA:cholesterolacyltransferasa
ATP	Adenosintriphosphate	Adenosin trifosfát
BA	Bile acid	Žlučová kyselina
bHLH-LZ	Basic-helix-loop-helix-leucine-zipper	Basic-helix-loop-helix-leucinový zip
BSEP	Bile salt export protein	Protein exportující žlučové soli
CBP	cAMP-binding protein	Protein vázající cAMP
CD36	Scavenger receptor class B	"Scavenger" receptor třídy B
CE	Cholesteryl ester	Cholesterylester
CEH	Cholesteryl ester hydrolase	Cholesterylesterhydrolasa
CETP	Cholesteryl ester transfer protein	Protein přenášející cholesterylestery
COPII	Coat protein II	Plášťový protein II
CYP27	Sterol-27-hydroxylase	Sterol-27-hydroxylasa
CYP39A1	24-hydroxycholesterol-7 α -hydroxylase	24-hydroxycholesterol-7 α -hydroxylasa
CYP7A1	Cholesterol-7 α -hydroxylase	Cholesterol-7 α -hydroxylasa
CYP7B1	Oxysterol-7 α -hydroxylase	Oxysterol-7 α -hydroxylasa
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
ER	Endoplasmic reticulum	Endoplazmatické retikulum
FA	Fatty acid	Mastná kyselina
FC	Free cholesterol	Volný cholesterol
FXR	Farnesoid X receptor	Farnesoidní X receptor
FXRE	FXR response element	Element odpovídající na FXR
GA	Golgi apparatus	Golgiho aparát
Gp78	Ubiquitin ligase	Ubikvitinligasa
27-HC	27-hydroxycholesterol	27-hydroxycholesterol
HDL	High density lipoprotein	Lipoprotein o vysoké hustotě
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
HMGR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktasa
IDL	Intermediate density lipoprotein	Lipoprotein o střední hustotě
Idol	Inducible degrader of the LDLR	Indukovatelný protein odpovědný za degradaci LDLR
Insig	Insulin induced gene	"Gen indukovaný insulinem"
LCAT	Lecithin:cholesterol acyltransferase	Lecithin:cholesterolacyltransferasa
LDL	Low density lipoprotein	Lipoprotein o nízké hustotě
LDLR	LDL receptor	LDL receptor
LRH	Liver receptor homolog	Homolog jaterního receptoru
LRHRE	LRH response element	Element odpovídající na LRH
LRP	LDLR related protein	Protein příbuzný LDLR
LXR	Liver X receptor	Jaterní X receptor
LXRE	LXR response element	Element odpovídající na LXR
MLN64	Metastatic lymph node 64 protein	Protein metastatické mízní uzliny 64
MRP2	Multidrug resistance-associated protein-2	Multidrug resistance-associated protein-2
MTP	Microsomal TG transfer protein	Mikrosomální protein přenášející TG
NPC1 (C2)	Niemann-Pick type C1 (C2)	Niemann-Pick typ C1 (C2)
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like-1	Niemann-Pick C1-like-1
NTCP	Na ⁺ -dependent taurocholate cotransporting polypeptide	Na ⁺ -dependentní taurocholátový kotransportující polypeptid
OATP	Organic anion transporting polypeptide	Polypeptid transportující organické anionty
ORP	Oxysterol-binding protein-related protein	Protein příbuzný proteinům vázajících oxysteroly

p300	E1A-binding protein	Protein vázající E1A
P450_{SCC}	Cholesterol side-chain cleavage enzyme	Cytochrom-P-450 postranní řetězec odštěpující enzym
PC	Phosphatidylcholin	Fosfatidylcholin
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	Proprotein konvertasa subtilisin/kexin typ 9
PM	Plasma membrane	Plazmatická membrána
PL	Phospholipid	Fosfolipid
Rab	Monomeric GTPase Rab	Monomerní GTPasa Rab
RCT	Reverse cholesterol transport	Reverzní transport cholesterolu
RXR	Retinoid X receptor	Retinoidní X receptor
S1P, S2P	Site 1 (2) protease	Proteasa 1 (2)
Sar1	Monomeric GTPase Sar1	Monomerní GTPasa Sar1
Scap	SREBP cleavage activating protein	Protein aktivující štěpení SREBP
SCP2	Sterol carrier protein-2	Protein přenášející steroly 2
Sec23 (24)	Protein transport protein	Transportní protein pro proteiny
SHP	Small heterodimer partner	Malý heterodimerní protein
SR-A	Scavenger receptor class A	"Scavenger" receptor třídy A
SR-B1	Scavenger receptor class B type 1	"Scavenger" receptor třídy B typ 1
SRE	Sterol regulatory element	Element regulovaný steroly
SREBP	SRE-binding protein	Protein vázající SRE
SSD	Sterol-sensing domain	Doména sensitivní na steroly
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein	Steroidogenní regulující protein
START	StAR-related lipid-transfer	Přenašeč lipidů příbuzný StAR
TG	Triglyceride	Triacylglycerol
TRL	TG-rich lipoprotein	Lipoprotein bohatý na TG
VCP	Valosin-containing protein	Protein obsahující valosin
VLDL	Very low density lipoprotein	Lipoprotein o velmi nízké hustotě

8 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Cifkova R, Skodova Z, Bruthans J *et al.* Longitudinal trends in cardiovascular mortality and blood pressure levels, prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the Czech population from 1985 to 2007/2008. *J Hypertens* 2010; 28:2196-203.
- [2] http://en.wikipedia.org/wiki/File:Steroid_numbering.png, 27.4.2011.
- [3] Grundy SM. Atlas of lipid disorders. New York: Gower Medical Publishing; 1990.
- [4] Gotto AM, Jr., Pownall, H. Manual of Lipid Disorders. Reducing the Risk for Coronary Heart Disease. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2003.
- [5] Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J Mol Med* 1999; 77:306-15.
- [6] Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:125-38.
- [7] Remaley AT, Warnick, G. R. HDL-C. The changing testing paradigm. In: *Clinical Laboratory News*. American Association for Clinical Chemistry; 2007. http://www.aacc.org/publications/cln/2007/dec/Pages/series_1207.aspx, 27.4.2011.
- [8] Barter PJ, Brewer HB, Jr., Chapman MJ *et al.* Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:160-7.
- [9] Lagrost L, Gambert P, Dangremont V *et al.* Role of cholesteryl ester transfer protein (CETP) in the HDL conversion process as evidenced by using anti-CETP monoclonal antibodies. *J Lipid Res* 1990; 31:1569-75.
- [10] http://www-3.unipv.it/webbio/anatcomp/freitas/2007-2008/biocell_BT07-08.htm, 27.4.2011.
- [11] Steck TL, Lange Y. Cell cholesterol homeostasis: mediation by active cholesterol. *Trends Cell Biol* 2010; 20:680-7.
- [12] Simons K, Eehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 2002; 110:597-603.
- [13] Ikonen E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol Rev* 2006; 86:1237-61.
- [14] Chang TY, Chang CC, Ohgami N, Yamauchi Y. Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22:129-57.
- [15] Voet D, Voet, J.G. *Biochemistry*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2004.

- [16] Ghosh S, St Clair RW, Rudel LL. Mobilization of cytoplasmic CE droplets by overexpression of human macrophage cholesteryl ester hydrolase. *J Lipid Res* 2003; 44:1833-40.
- [17] Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232:34-47.
- [18] Schneider WJ, Nimpf J, Brandes C, Drexler M. The low-density lipoprotein receptor family: genetics, function, and evolution. *Curr Atheroscler Rep* 1999; 1:115-22.
- [19] Matsumoto A, Naito M, Itakura H *et al.* Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:9133-7.
- [20] Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA *et al.* Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* 2002; 277:49982-8.
- [21] Varban ML, Rinninger F, Wang N *et al.* Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:4619-24.
- [22] Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest* 2002; 110:905-11.
- [23] Dikkers A, Tietge UJ. Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC. *World J Gastroenterol* 2010; 16:5936-45.
- [24] Boren J, Veniant MM, Young SG. Apo B100-containing lipoproteins are secreted by the heart. *J Clin Invest* 1998; 101:1197-202.
- [25] Wetterau JR, Zilversmit DB. A triglyceride and cholesteryl ester transfer protein associated with liver microsomes. *J Biol Chem* 1984; 259:10863-6.
- [26] Vaughan AM, Oram JF. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res* 2006; 47:2433-43.
- [27] Davis RA, Miyake JH, Hui TY, Spann NJ. Regulation of cholesterol-7 α -hydroxylase: BAREly missing a SHP. *J Lipid Res* 2002; 43:533-43.
- [28] Lange Y, Steck TL, Ye J *et al.* Regulation of fibroblast mitochondrial 27-hydroxycholesterol production by active plasma membrane cholesterol. *J Lipid Res* 2009; 50:1881-8.

- [29] Kotzka J, Muller-Wieland D, Roth G *et al.* Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade. *J Lipid Res* 2000; 41:99-108.
- [30] Eberle D, Hegarty B, Bossard P *et al.* SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004; 86:839-48.
- [31] Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19:215-22.
- [32] Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl:S172-7.
- [33] Willy PJ, Umesono K, Ong ES *et al.* LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 1995; 9:1033-45.
- [34] Li AC, Glass CK. PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res* 2004; 45:2161-73.
- [35] Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB *et al.* Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 1997; 272:3137-40.
- [36] Fu X, Menke JG, Chen Y *et al.* 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem* 2001; 276:38378-87.
- [37] Muscat GE, Wagner BL, Hou J *et al.* Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors. *J Biol Chem* 2002; 277:40722-8.
- [38] Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB *et al.* LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:507-12.
- [39] Luo Y, Tall AR. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J Clin Invest* 2000; 105:513-20.
- [40] Zhang Y, Repa JJ, Gauthier K, Mangelsdorf DJ. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *J Biol Chem* 2001; 276:43018-24.
- [41] Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M *et al.* Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol Cell Biol* 2001; 21:2991-3000.
- [42] Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 2009; 325:100-4.

- [43] Lu TT, Makishima M, Repa JJ *et al.* Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 2000; 6:507-15.
- [44] Rader DJ. Liver X receptor and farnesoid X receptor as therapeutic targets. *Am J Cardiol* 2007; 100:n15-9.
- [45] Luo Y, Liang CP, Tall AR. The orphan nuclear receptor LRH-1 potentiates the sterol-mediated induction of the human CETP gene by liver X receptor. *J Biol Chem* 2001; 276:24767-73.