

OBSAH

1	Úvod	3
2	Cholesterol	4
2.1	Struktura a vlastnosti	4
2.2	Transport a metabolismus	5
3	Žlučové kyseliny (BA)	6
3.1	Struktura a vlastnosti	6
3.1.1	Primární a sekundární BA	7
3.1.2	Enterohepatální oběh	7
3.2	Syntéza.....	8
3.2.1	Klasická dráha	9
3.2.2	Alternativní dráha	9
3.2.3	Regulace syntézy	10
4	Cholesterol-7α-hydroxyláza (CYP7A1)	11
4.1	Funkce.....	11
4.2	Regulace.....	11
4.2.1	Elementy odpovídající na žlučové kyseliny	12
4.2.2	Farnesoidní X receptor (FXR).....	13
4.3	Regulační dráhy	15
4.3.1	FXR/SHP dráha	15
4.3.2	FXR/FGF19/FGFR4 dráha	17
4.3.3	Dráhy nezávislé na aktivaci FXR	18
4.3.4	Úloha glukózy, inzulínu a glukagonu v regulaci aktivity CYP7A1 ..	22
4.3.5	Diurnální variace	25

4.4	Úloha CYP7A1 v regulaci cholesterolemie	26
4.4.1	Úloha LXR α	27
4.4.2	Polymorfismus CYP7A1	27
5	Závěr	29
6	Seznam zkratk	30
7	Přehled použité literatury	32

1 Úvod

Cholesterol jako nezbytná komponenta buněčných membrán a prekurzor řady hormonů je životně důležitou součástí živočišného těla. Zvýšená hladina cholesterolu v krvi je jedním z nejdůležitějších rizikových faktorů kardiovaskulárních onemocnění, která způsobují více než polovinu úmrtí ve vyspělých zemích. Koncentrace cholesterolu je velmi efektivně regulována, významnou úlohu hraje v tomto směru přeměna cholesterolu na žlučové kyseliny. Ty jsou potřebné pro vstřebávání tuků z potravy a zároveň umožňují odstranění cholesterolu z těla. V tomto procesu hraje klíčovou roli enzym cholesterol-7 α -hydroxyláza, který katalyzuje první krok přeměny cholesterolu na žlučové kyseliny. Pochopení mechanismů, kterými je aktivita tohoto enzymu regulována, by tedy mohlo přispět k objevu nových cest v prevenci a terapii hypercholesterolemie a kardiovaskulárních onemocnění.

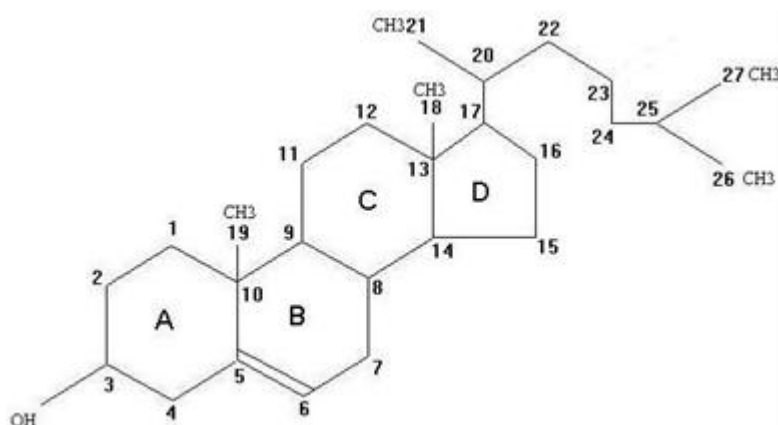
Cílem této práce je shrnout současný stav znalostí o regulaci aktivity tohoto klíčového enzymu syntézy žlučových kyselin.

2 Cholesterol

Cholesterol je jednou ze základních sloučenin pro živočišnou buňku. V organismu plní mnoho důležitých biologických funkcí. Cholesterol je hlavní strukturální součástí buněčných membrán ovlivňující jejich vlastnosti (permeabilitu a fluiditu) a je výchozí látkou pro syntézu steroidních hormonů, vitamínu D a žlučových kyselin (1).

2.1 Struktura a vlastnosti

Cholesterol se řadí do skupiny ve vodě nerozpustných lipidů. Jeho molekula je tvořena steroidním jádrem s navázanou hydroxylovou skupinou (OH) na 3. uhlíku (C₃) a rozvětveným alifatickým řetězcem o 8 uhlíkových atomech na C₁₇ (Obr. 1). Navázaná OH skupina mu poskytuje slabý amfipatický charakter. Cholesterol se v buňkách vyskytuje také esterifikovaný s navázanou mastnou kyselinou. Esterifikovaný cholesterol je transportní a zásobní formou cholesterolu a je absolutně hydrofobní.



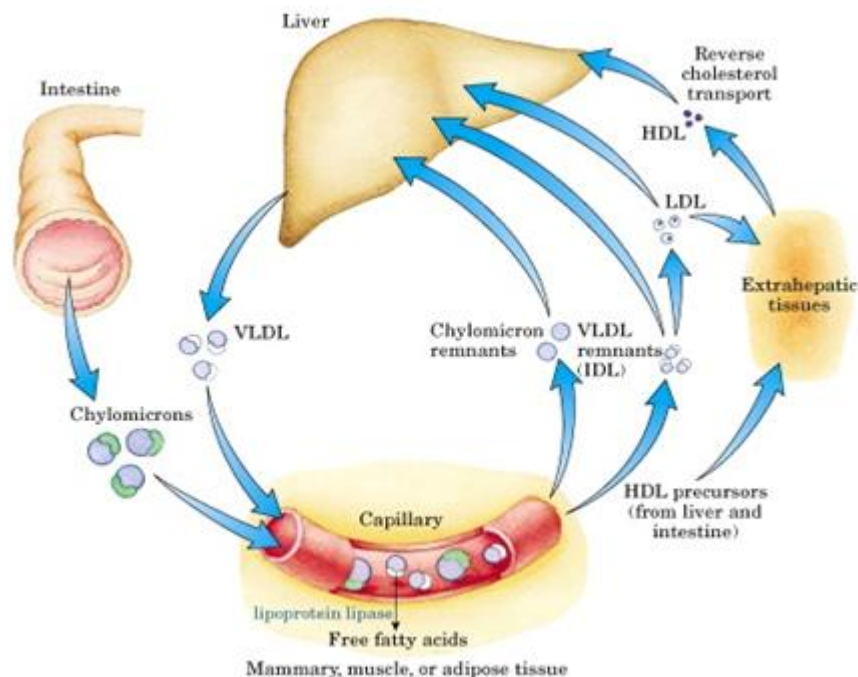
Obr. 1: Struktura cholesterolu.

Cholesterol v buňkách je původu exogenního (z potravy) a endogenního (syntéza). Syntéza cholesterolu *de novo* probíhá téměř ve všech tkáních, především pak v hepatocytech, nervové tkáni a enterocytech. Výchozí látkou pro jeho syntézu je acetyl-koenzym A a celá biosyntetická dráha se skládá z několika desítek kroků. Klíčovým enzymem biosyntézy cholesterolu je 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A-reduktáza (HMGR). Aktivita tohoto enzymu je regulována především zásobami cholesterolu v buňce. Při jeho dostatku je aktivita enzymu utlumena a naopak, je-li cholesterolu v buňce málo, je HMGR aktivována a začíná syntézu cholesterolu (2).

2.2 Transport a metabolismus

Cholesterol je v krevní plazmě transportován uvnitř lipoproteinových částic. Chylomikrony transportují exogenní cholesterol z tenkého střeva do jater. Lipoproteiny o velmi nízké (VLDL), střední (IDL) a nízké hustotě (LDL) přenášejí cholesterol z jater do periferních tkání, kde může být uskladněn nebo použit jako stavební komponenta membrán. LDL jsou internalizovány do buněk za pomoci LDL receptorů, které jsou přítomny také na povrchu jaterních buněk. Cirkulující LDL tedy mohou přenášet cholesterol také zpět do jater. Poslední skupinou jsou lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL), které přenášejí cholesterol z periferních tkání do jater (3).

V játrech je cholesterol vyloučen do žluče, která představuje hlavní cestu jeho vylučování z těla. Cholesterol je ve žluči přítomen ve dvou formách: nativní a metabolizovaný na žlučové kyseliny. Přibližně polovina cholesterolu ze žluče a většina žlučových kyselin je v tenkém střevě reabsorbována a vrací se do jater. Druhá polovina žlučového cholesterolu odchází z těla stolicí ve formě neutrálních steroidů. Enterohepatální oběh cholesterolu a BA má zásadní úlohu v regulaci syntézy cholesterolu v játrech a ovlivňuje jeho příjem exogenní cestou (2).



Obr. 1: Transport cholesterolu (převzato z (4)).

Vysvětlivky: HDL – lipoproteiny o vysoké hustotě, IDL – lipoproteiny o střední hustotě, LDL – lipoproteiny o nízké hustotě, VLDL – lipoproteiny o velmi nízké hustotě

3 Žlučové kyseliny

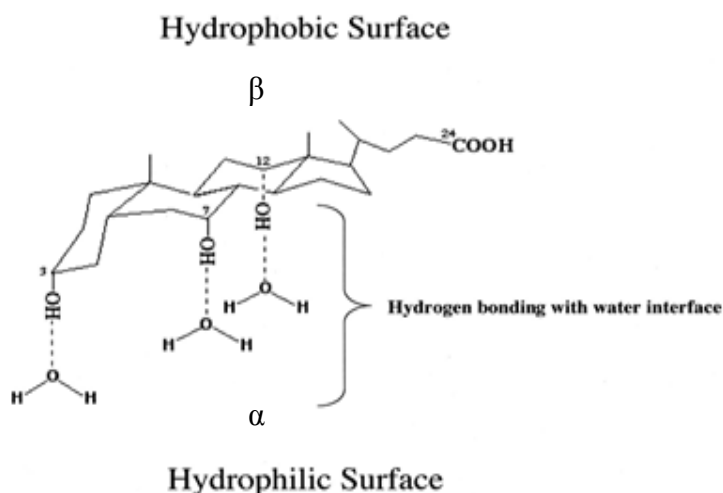
Žlučové kyseliny (BA) jsou kyselé steroidní sloučeniny vznikající oxidací cholesterolu v játrech. Jsou hlavní součástí žluči, která je nezbytná pro správné trávení tuků v tenkém střevě. BA hrají důležitou úlohu v odstraňování cholesterolu z těla a jeho metabolismu – jejich syntéza představuje hlavní katabolickou dráhu cholesterolu a rychlost jejich syntézy ovlivňuje cholesterolémii, důležitý faktor vzniku mnoha závažných onemocnění.

BA jsou také důležité signální molekuly. Mohou se vázat na různé receptory, aktivovat je a tím aktivovat celé signální dráhy zahrnuté v regulaci metabolismu lipidů a glukózy a detoxikačních reakcích.

3.1 Struktura a vlastnosti

BA jsou tvořeny 24 uhlíkovými atomy karboxylovou skupinou na C₂₄. Ke steroidnímu jádru jsou připojeny 2 až 3 OH skupiny – nejčastěji v pozicích 3 α , 7 α a 12 α . Všechny tyto OH skupiny jsou orientovány směrem na jednu stranu od jádra a vytváří tak hydrofilní povrch molekuly (α strana) oddělený od hydrofobního (β strana) (Obr 3).

BA stimulují sekreci žlučových lipidů a díky jejich amfipatické struktuře vytvářejí společně se žlučovými fosfolipidy a dalšími látkami tzv. „smíšené micely“. BA ve smíšených micelách umožňují solubilizaci cholesterolu a ostatních lipofilních sloučenin ve žluči a v tenkém střevě emulgují dietní tuky a v tucích rozpustné vitamíny a usnadňují tak jejich vstřebávání (5).

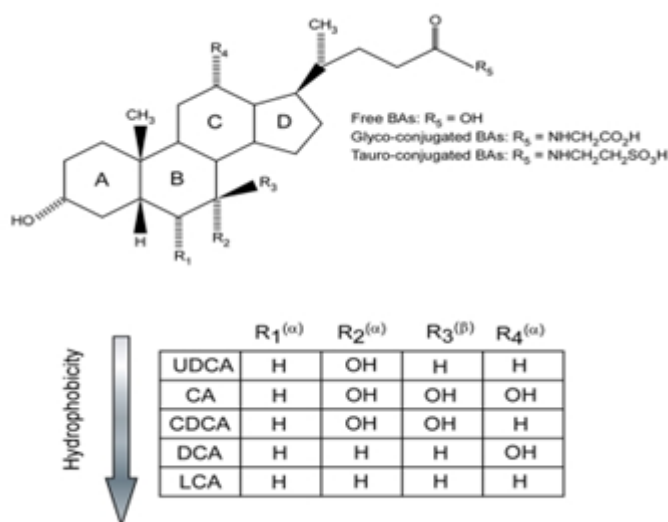


Obr. 3: Znázornění poloh OH skupin v molekule BA – α/β strana (upraveno dle (6)).

3.1.1 Primární a sekundární BA

BA vznikající z cholesterolu *de novo* v játrech jsou tzv. primární BA, kyselina cholová (CA) a chenodeoxylová (CDCA) (Obr. 4). Většina BA je konjugována s aminokyselinami glycinem nebo taurinem, což snižuje jejich toxicitu a zvyšuje jejich rozpustnost pro sekreci do žluče. Konjugované BA jsou v tenkém střevě působením střevních bakterií dekonjugovány a dehydroxylovány na pozici 7 α na tzv. sekundární BA, kyseliny deoxycholovou (DCA) a lithocholovou (LCA) (7).

CA a CDCA se běžně vyskytují u člověka. U různých živočišných druhů se mohou vyskytovat i jiné BA, které jsou pro ně specifické, lišící se hlavně v poloze OH skupin. Například myš a potkan produkuje významné množství kyseliny muricholové, která je hydrofilnější než CA, prase kyselinu hyocholovou a medvěd kyselinu ursodeoxycholovou (5, 8).



Obr. 4: Struktura a hydrofobicita nejběžnějších BA (převzato z (9)).

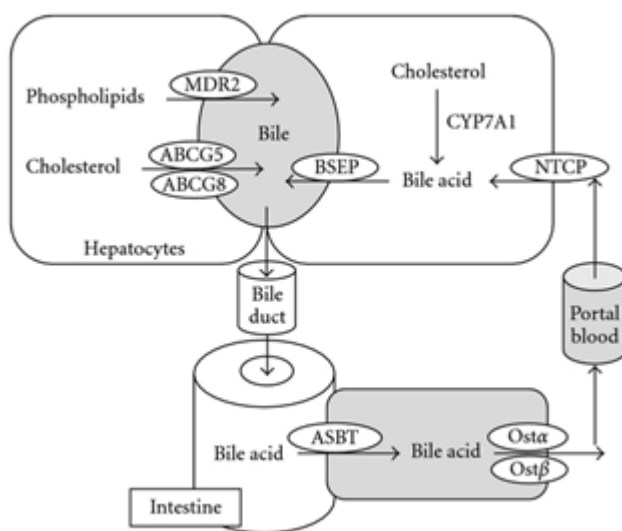
Vysvětlivky: CA – cholová kyselina, CDCA – chenodeoxycholová kyselina, DCA – deoxycholová kyselina, LCA – lithocholová kyselina, UDCA – ursodeoxycholová kyselina

3.1.2 Enterohepatální oběh

Konjugované BA jsou vyloučeny do žluče a uloženy v žlučníku. Část BA (některé nekonjugované BA) je absorbována hned ve žlučových cestách a transportována zpět do hepatocytů (= cholehepatální oběh). Po každém jídle dochází ke kontrakci žlučníku a uvolnění BA do tenkého střeva, kde jsou využity pro vstřebávání tuků a cholesterolu. BA jsou enterohepatálním oběhem transportovány různými přenašeči, které jsou

umístěny na apikální a bazolaterální membráně enterocytů a hepatocytů (Obr. 5). V ileu je 95% BA resorbováno a cirkulující portální krví jsou transportovány zpět do jater, kde regulují jejich vlastní syntézu z cholesterolu. CA, CDCA a DCA jsou resorbovány, zatímco většina LCA odchází stolicí z těla.

Celkový obsah BA v těle je okolo 3 g a jejich recyklace proběhne 4-12 krát za den. Ztráty BA stolicí (0,2 – 0,6 g/denně) nahrazuje jejich syntéza v játrech *de novo* (7).



Obr. 5: Enterohepatální oběh žlučových kyselin (převzato z (10)).

Vysvětlivky: ABCG5/8 – transportéry z rodiny ATP-vážících proteinů, ASBT – apikální Na⁺-dependentní transporter pro žlučové kyseliny, BSEP – exportní pumpa pro žlučové kyseliny, NTCP – Na⁺-taurocholátový kotransportující polypeptid, OST α / β – transporter pro žlučové kyseliny a další organické sloučeniny

3.2 Syntéza

BA jsou syntetizovány z cholesterolu v hepatocytu. Mohou vznikat dvěma různými biosyntetickými dráhami: 1) klasickou/neutrální dráhou z cholesterolu a 2) alternativní/kyselou dráhou z oxysterolů, které vznikají hydroxylací cholesterolu na postranním řetězci (Obr. 6). Iniciace alternativní dráhy probíhá i v jiných tkáních (například v mozku), pro konečnou syntézu BA pak musí být oxysteroly do jater transportovány (8).

Tyto dráhy se liší enzymy katalyzujícími reakce přeměny cholesterolu na BA a v poměru, kterým přispívají k tvorbě BA. Alternativní dráha u lidí představuje 10 % produkce BA, zatímco u myši je to 45 % (6).

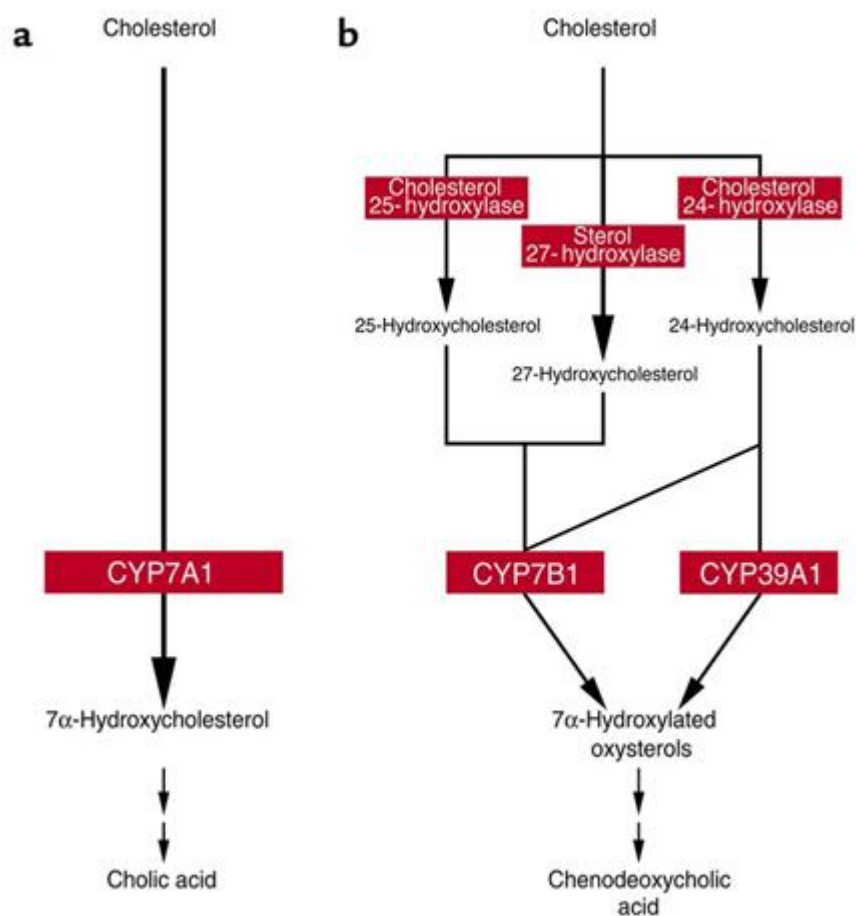
Na syntéze BA se podílejí enzymy lokalizované v různých buněčných kompartmentech. Modifikace steroidního jádra cholesterolu probíhá v cytosolu, endoplazmatickém retikulu a mitochondriích, zkrácení postranního řetězce v peroxizomech (8).

3.2.1 Klasická dráha

Klasickou dráhu syntézy BA aktivuje mikrozomální enzym cholesterol-7 α -hydroxyláza (CYP7A1), který uvnitř endoplazmatického retikula přidává OH skupinu na 7 α pozici cholesterolu za vzniku 7 α -hydroxycholesterolu. CYP7A1 je klíčový enzym klasické biosyntetické dráhy BA a je specifický pouze pro játra. Syntéza pokračuje hydroxylací 7 α -hydroxysterolu na pozici 12 α mikrozomálním enzymem sterol-12 α -hydroxylázou (CYP8B1). Následuje hydroxylace postranního řetězce na C₂₇, která je katalyzovaná mitochondriální sterol-27-hydroxylázou (CYP27A1) a vznikající intermediát je transportován do peroxizomů. Zde dochází k oxidačnímu štěpení postranního řetězce o 3 uhlíky a C₂₄ je konvertován na karboxylovou skupinu. Hlavní BA vznikající touto cestou je CA (7).

3.2.2 Alternativní dráha

V alternativní biosyntetické dráze dochází nejdříve k oxidaci cholesterolu na postranním řetězci a následně probíhají modifikace steroidního jádra. Prvním krokem alternativní biosyntetické dráhy je oxidace cholesterolu na 27-hydroxysterol, kterou katalyzuje CYP27A1 syntetizovaná v mnoha tkáních. Cholesterol může být oxidován také na 25-hydroxysterol a 24-hydroxysterol a to především v mozku cholesterol-24-hydroxylázou (CYP46A1). Další enzymy oxysterol-7 α -hydroxylázy CYP7B1 a CYP39A1 katalyzují hydroxylaci vznikajících oxysterolů. CYP7B1 je specifická pro tuto dráhu a přidává OH skupinu na pozici 7 α 25-hydroxysterolu a 27-hydroxysterolu, zatímco CYP39A1 hydroxyluje pouze 24-hydroxysterol. Všechny výše uvedené enzymy jsou exprimované v různých extrahepatálních tkáních, ale pouze játra jsou schopna kompletně dokončit syntézu BA a proto musí být oxidované metabolity pro konečnou přeměnu na BA do jater transportovány. Hlavním produktem této dráhy je CDCA (5).



Obr. 6: Biosyntéza BA, a- klasická dráha, b - alternativní dráha (převzato z (11)).

Vysvětlivky: CYP39A1 – 24-hydroxycholesterol-7 α -hydroxyláza, CYP7A1 – cholesterol-7 α -hydroxyláza, CYP7B1 – 25-hydroxycholesterol-7 α -hydroxyláza

3.2.3 Regulace syntézy

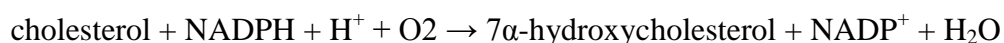
Syntéza BA podléhá zpětnovazebné inhibici. BA vracející se enterohepatálním oběhem do jater zpětnovazebně inhibují svoji vlastní syntézu především potlačením exprese a aktivity enzymu CYP7A1, který jak již bylo uvedeno, katalyzuje v klasické dráze biosyntézy BA první krok přeměny cholesterolu na BA hydroxylací na jeho 7 α pozici (7). Podobně jsou zpětnovazebně inhibovány i další enzymy biosyntézy BA, CYP8B1 a CYP27A1. Inhibice exprese genů pro tyto enzymy probíhá prostřednictvím jaderného receptoru pro žlučové kyseliny, farnesoidního X receptoru (5).

4 Cholesterol-7 α -hydroxyláza

CYP7A1 je protein kódovaný genem lokalizovaným na 8. chromozomu u lidí, na 4. chromozomu u myši a na 5. chromozomu u potkanů. U člověka se skládá z 504 aminokyselin, u hlodavců z 503 (12). Poprvé byl izolován vysoce purifikovaný protein CYP7A1 z jater potkana a následně byla úspěšně klonována cDNA genu pro CYP7A1. Od té doby byl gen *CYP7A1* sekvenován u mnoha živočišných druhů včetně člověka (13).

4.1 Funkce

CYP7A1 je mikrozomální monooxygenáza, člen rodiny cytochromů P450 (CYPs). Cytochromy P450 jsou hemoproteiny katalyzující oxidaci různých organických sloučenin využívající jako kosubstrát molekulární kyslík. Rozpoznávají specifické molekuly nebo funkční skupiny svých substrátů a spolupracují s NADPH: cytochrom P450 reduktázami, které dodávají elektrony pro oxidační reakce. Jsou to primárně membránově vázané proteiny lokalizované ve vnitřní membráně mitochondrií a endoplazmatického retikula (ER). CYPs jsou přítomné v mnoha tkáních těla a hrají důležitou roli v metabolismu hormonů, cholesterolu, vitamínu D a xenobiotik (8, 14). CYP7A1 je lokalizována na membráně ER v hepatocytech a katalyzuje hydroxylaci cholesterolu v pozici 7 α dle následující rovnice:



Tato reakce je první klíčovou reakcí přeměny cholesterolu na BA v játrech.

4.2 Regulace

Tato práce se zabývá regulací aktivity CYP7A1 u člověka. Diskutovány budou i výsledky získané na experimentálních modelech (myši, potkani), i když je známo, že v regulaci exprese existují významné mezidruhové rozdíly.

Enzymová aktivita CYP7A1 je regulována hlavně na transkripční úrovni a pozitivně koreluje s množstvím přepisované mRNA. Klíčovou roli v regulaci transkripce *CYP7A1* hrají jaderné receptory, které se po navázání příslušných ligandů aktivují a stávají se účinnými transkripčními faktory (TF). Hlavním TF, který hraje

centrální roli v regulaci transkripce *CYP7A1* je farnesoidní X receptor (FXR) a jeho hlavními ligandy jsou BA (7).

Aktivace FXR je jedním z možných způsobů, jak BA regulují expresi *CYP7A1* a svoji vlastní syntézu. BA mohou aktivovat také jiné jaderné receptory nezávisle na FXR nebo sekreci prozánětlivých cytokinů z jaterních makrofágů, které aktivují dráhy vedoucí k inhibici transkripce *CYP7A1*. Epigenetickými mechanismy (de/acetylace, methylace) může docházet také k remodelaci chromatinu v promotoru *CYP7A1* a změny v jeho struktuře inhibují transkripci (13).

4.2.1 Elementy odpovídající na žlučové kyseliny

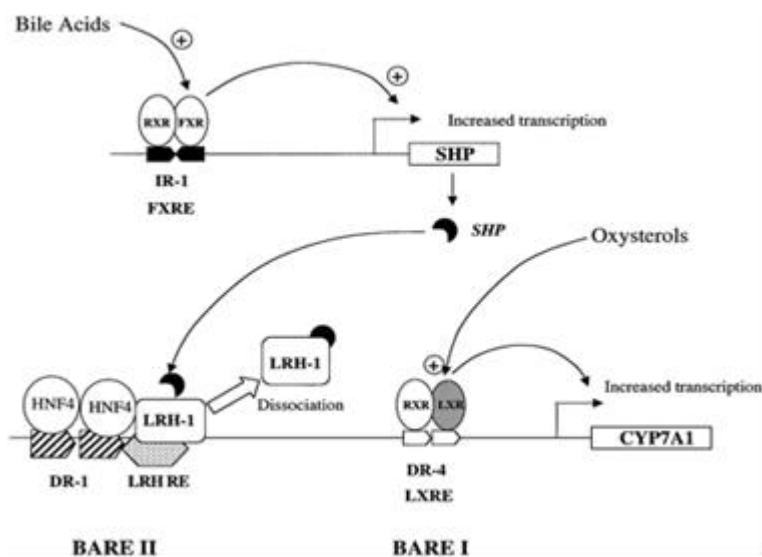
Promotor genu *CYP7A1* obsahuje dvě vysoce konzervované oblasti označované jako elementy odpovídající na žlučové kyseliny (BARE). BARE jsou esenciální pro bazální expresi *CYP7A1*. Jejich součástí jsou sekvence přímých repetitiv (DR), které jsou vazebnými místy pro TF účastníci se zpětnovazebné regulace *CYP7A1* žlučovými kyselinami (Obr. 7).

4.2.1.1 BAREII

BARE II je lokalizována v oblasti -149/-118 a obsahuje DR1 motiv, který je vazebným místem pro jaterní nukleární faktor 4 α (HNF4 α) (15). HNF4 α je hlavní transkripční aktivátor mnoha genů důležitých v metabolismu cholesterolu a glukózy v jaterních buňkách (například geny pro *CYP8A1*, fosfoenolpyruvátcarboxylázu a glukózo-6-fosfatázu). HNF4 α interaguje s „proliferací peroxizomu aktivovaným receptorem γ koaktivátorem 1 α “ (PGC-1 α) a transaktivuje promotorovou aktivitu těchto genů a *CYP7A1*. BARE II obsahuje také vazebné místo pro homolog jaterního receptoru (LRH-1), známého také jako transkripční faktor pro α -fetoprotein (FTF). Vazba HNF4 α nebo LRH-1/FTF je nezbytná pro bazální transkripci *CYP7A1* (7).

4.2.1.2 BAREI

U hlodavců byla v oblasti BARE I lokalizované v úseku -73/-55 identifikována sekvence nukleotidů označovaná jako DR4 motiv. DR4 je vazebným místem pro jaterní X receptor α (LXR α), který je aktivovaný intermediárními produkty metabolismu cholesterolu – oxysteroly. LXR α aktivuje transkripci *CYP7A1* a tím umožňuje hlodavcům zvyšovat syntézu BA. (6) Podrobněji bude úloha LXR α popsána v kapitole 4.4.1. DR4 motiv se nevyskytuje v lidském promotoru *CYP7A1*, odpovídající oblast obsahuje vazebné místo pro jaterní nukleární faktor 1 α (HNF1 α).



Obr. 6: BARE elementy (převzato z (6)).

Vysvětlivky: BARE – elementy odpovídající na žlučové kyseliny, CYP7A1 – cholesterol-7 α -hydroxyláza, DR – přímá repetice, FXR – farnesoidní X receptor, FXRE – element odpovídající na FXR, HNF4 α – jaterní nukleární faktor 4 α , IR – invertovaná repetice, LRH-1 – homolog jaterního receptoru 1, LRH RE – element odpovídající na LRH, LXR – jaterní X receptor, LXRE – element odpovídající na LXR, RXR – retinoidní X receptor, SHP – malý heterodimerní partner

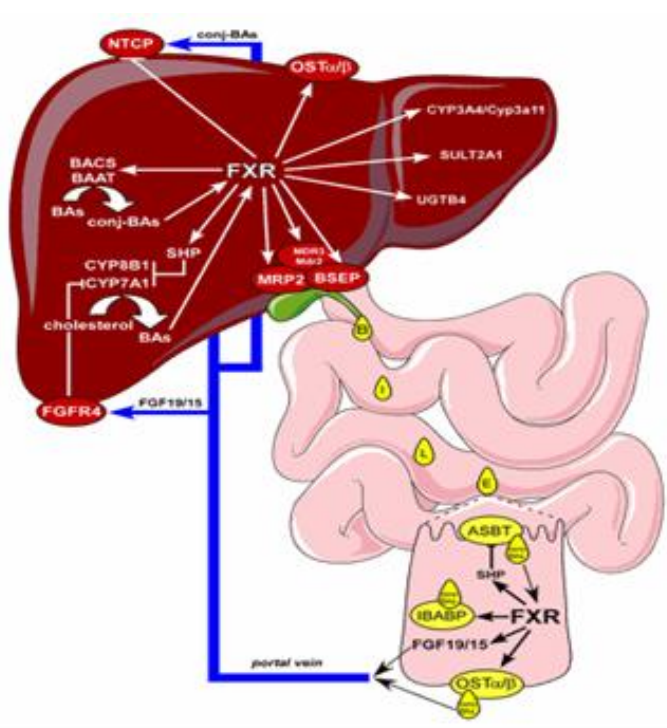
4.2.2 Farnesoidní X receptor

FXR je jaderný receptor původně popsán jako receptor aktivovaný farnesolem za suprafyziologických podmínek. Na konci minulého století bylo prokázáno, že nejefektivnějšími endogenními ligandy aktivujícími FXR jsou primární hydrofobní BA, například CA a CDCA, zatímco hydrofilní kyseliny muricholová a ursodeoxycholová, vyskytující se běžně u hlodavců, FXR neaktivují. Volné i konjugované BA se váží do odpovídající vazebné domény FXR, který vytváří heterodimer s retinoidním X receptorem (RXR). Vznikající heterodimer se váže do elementu odpovídajícího na FXR (FXRE) v promotoru cílových genů a stimuluje jejich transkripci (7).

FXR je klíčovým regulátorem udržování homeostáze BA. Kromě regulace syntézy hraje FXR důležitou roli také v regulaci jejich sekrece a transportu. Ovlivňuje expresi genů pro přenašeče BA jak v jaterních buňkách tak v enterocytech a tím celou enterohepatální cirkulaci. FXR indukuje geny pro Na⁺-dependentní taurocholátový kotransportující polypeptid (NTCP) pro příjem BA do jater, protein exportující žlučové kyseliny (BSEP) pro jejich sekreci přes kanalikulární membránu do žluče, protein

vázající BA ve střevě (IBABP) a další (Obr. 7). FXR ovlivňuje také expresi řady genů zahrnutých v metabolismu lipidů, glukózy a energetického metabolismu (7, 10).

Promotor *CYP7A1* ale neobsahuje vazebné místo pro FXR. Mechanismy, kterými FXR inhibuje transkripci *CYP7A1* se proto uskutečňují nepřímo. FXR indukuje expresi jiného jaderného receptoru, označovaného jako malý heterodimerní partner (SHP), který funguje jako výsledný represor v promotoru *CYP7A1*. FXR aktivuje syntézu BA také nezávisle na produkci SHP, neboť dochází k aktivaci růstových faktorů, které signalizují k výsledné inhibici *CYP7A1* (7).



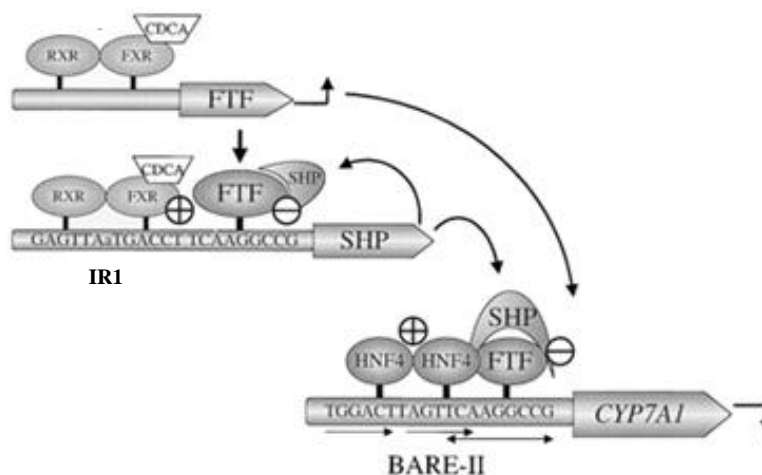
Obr. 7: Působení FXR na geny zahrnuté v metabolismu BA (převzato z (9)).

Vysvětlivky: ASBT – apikální Na^+ -dependentní transporter pro žlučové kyseliny; BAAT – „bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase“, BACS – „bile acid CoA synthetase“ (enzymy odpovědné za konjugaci BA s aminokyselinami); BAAs – žlučové kyseliny; BSEP – exportní pumpa pro žlučové kyseliny; conj-BAAs – konjugované žlučové kyseliny; CYP7A1 – cholesterol-7 α -hydroxyláza; CYP8B1 – sterol-12 α -hydroxyláza; IBABP – protein vázající žlučové kyseliny ve střevě; FGF19/15 – fibroblastový růstový faktor 19/15; FGFR4 – receptor pro FGF; MRP2 – „multidrug resistance-associated protein“; NTCP – Na^+ -taurocholátový kotransportující polypeptid; OST α/β – transportér pro žlučové kyseliny a další organické sloučeniny; SHP – malý heterodimerní partner; SULT2A1 – sulfotransferáza, UGTB4 (enzymy II. fáze detoxikačních reakcí v játrech, které přidávají sulfátovou skupinu na BA pro snížení jejich toxicity)

4.3 Regulační dráhy

4.3.1 FXR/SHP dráha

BA vracející se enterohepatálním oběhem do jater aktivují FXR v hepatocytech. FXR interaguje s RXR a aktivovaný FXR:RXR heterodimerní komplex se váže do IR1 elementu (invertovaná repetice oddělená jedním nukleotidem) v promotoru genu, který kóduje SHP a aktivuje jeho expresi. SHP interaguje s LRH-1 v BARE v promotoru *CYP7A1* a inhibuje jeho transkripční aktivitu (Obr. 8). SHP může interagovat také s HNF4 α a bránit jeho interakci s PGC-1 α a v důsledku toho dochází také k inhibici transkripce *CYP7A1*. Vazebná místa pro HNF4 α a LRH-1 se v promotoru *CYP7A1* částečně překrývají a oba tyto TF o vazbu na BARE soutěží (7).



Obr. 8: FXR/SHP dráha (převzato z (17)).

Vysvětlivky: BARE II – element odpovídající na žlučové kyseliny, CDCA – chenodeoxycholová kyselina, *CYP7A1* – cholesterol-7 α -hydroxyláza, FXR – farnesoidní X receptor, FTF – transkripční faktor pro α -fetoprotein (= LRH-1– homolog jaterního receptoru 1), HNF4 α – jaterní nukleární faktor 4 α , RXR - retinoidní X receptor, SHP – malý heterodimerní partner

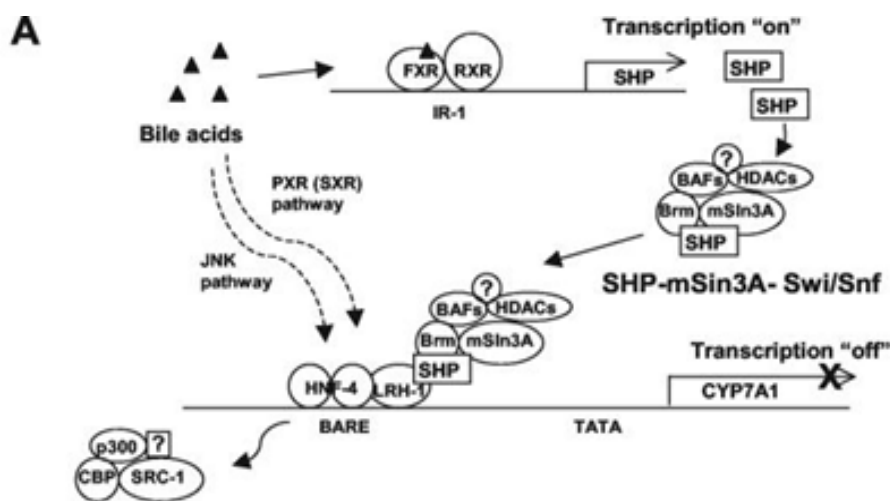
4.3.1.1 SHP

SHP je jaderný receptor, který nemá DNA vazebnou doménu. Má dimerizační doménu, kterou interaguje se svými ligandy - dalšími jadernými receptory a inhibuje jejich transkripční aktivitu v promotorech cílových genů. SHP tak funguje jako pleiotropní regulátor, který ovlivňuje geny zahrnuté v různých biologických procesech, jako je například energetický metabolismus, stresová odpověď, kontrola buněčného cyklu, reprodukce a mnoho dalších. V regulaci metabolismu cholesterolu a BA, SHP funguje jako transkripční represor genů pro transport, konjugaci a syntézu BA a genů pro vychytávání a tvorbu cholesterolu.

Represní mechanismy, kterými SHP ovlivňuje transkripci cílových genů závisí na vlastnostech promotoru konkrétního genu. SHP brání interakci jaderných receptorů s jejich koaktivátory (např. HNF4 α a PGC-1 α) nebo může zprostředkovat „nasměrování“ remodelačního komplexu do promotoru cílového genu, který způsobí změny ve struktuře chromatinu a dochází k inhibici transkripce (18, 19).

4.3.1.2 Remodelace chromatinu

SHP může rovněž interagovat s mSin3A-Swi/Snf remodelačním komplexem obsahujícím histon deacetylázy (HDACs) a navádět ho do promotoru *CYP7A1* (Obr. 9). Swi/Snf komplex se uplatňuje v mnoha buněčných procesech a jeho součástí je ATPáza označovaná jako Brm. Swi/Snf komplex katalyzuje remodelaci chromatinu za využití energie z hydrolýzy ATP. To vede k disociaci koaktivátorů a histonacyltransferáz (HATs) z promotoru *CYP7A1*. Deacetylace katalyzovaná HDAC1 a následná dimethylace methyltransferázou G9a na Lys-9 histonu 3 společně se sníženou acetylací a přítomnost dalších korepresorů a histon modifikujících enzymů způsobují inhibici transkripce *CYP7A1* (19, 20).



Obr. 9: Působení SHP na remodelaci chromatinu *CYP7A1* (upraveno dle (19)).

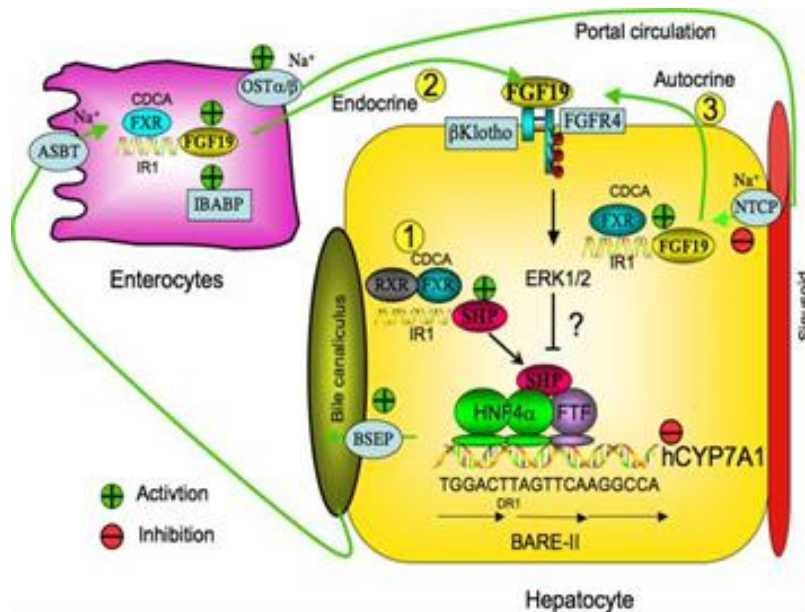
Vysvětlivky: BAFs – faktory asociované s Brm; BARE – element odpovídající na žlučové kyseliny; Brm – ATPáza asociovaná s Swi/Snf remodelačním komplexem; *CYP7A1* – cholesterol-7 α -hydroxyláza; HATs – histonacyltransferázy; HDACs – histondeacetylázy; HNF4 α – jaterní nukleární faktor 4 α ; IR-1 – invertovaná repetice oddělená jedním nukleotidem, JNK – c-Jun terminální kináza; LRH-1 – homolog jaterního receptoru; mSin3A – transkripční korepresor; p300, CBP, SRC-1 – transkripční koaktivátory; PXR (SXR) – pregnanový X receptor (receptor pro steroidy a xenobiotika), SHP – malý heterodimerní partner

4.3.2 FXR/FGF19/FGFR4 dráha

Další cestou inhibice exprese *CYP7A1* je signalizace prostřednictvím růstových faktorů nezávislá na expresi SHP. BA aktivují FXR nejen v játrech, ale také v tenkém střevě. Aktivovaný FXR indukuje expresi fibroblastového růstového faktoru 19 (FGF19, u myši FGF15), který je produkován v menším množství také v primárních jaterních buňkách. Fibroblastové růstové faktory (FGFs) jsou mitogenetické cytokiny, které hrají důležitou roli v buněčné signalizaci, angiogenezi, buněčném růstu, diferenciaci a migraci, tkáňových opravách a metabolické regulaci.

FGF19 produkován v enterocytech je uvolňován do krevního oběhu, když BA vstupují do ilea. FGF19 je transportován z tenkého střeva do jater a interaguje s receptorem FGFR4 v membráně jaterních buněk. Aktivace FGFR4 vyžaduje přítomnost koreceptoru, na membránu vázané glykosidázy β -Klotho, která je exprimována společně s FGFR4 v hepatocytech. β -Klotho indukuje mitogenem aktivovanou proteinkinázu ERK1/2, která spouští signalizační dráhu, která vede k inhibici transkripce *CYP7A1* (Obr. 10). Žlučové kyseliny a FGF19/FGFR4 signalizace aktivují také c-Jun terminální kinázu (JNK) fosforylující transkripční faktor c-Jun, který ruší transaktivační aktivitu HNF4 α a dochází k inhibici exprese *CYP7A1*. Signalizace FGF19/FGFR4 představuje spojení mezi játry a tenkým střevem ve zpětnovazebné inhibici syntézy BA a chrání před akumulací toxických BA v játrech.

FGF19 produkován v játrech slouží také jako parakrinní faktor, který inhibuje *CYP7A1* signalizací na okolní jaterní buňky a jako autokrinní faktor, který přímo aktivuje vnitrobuněčné signalizační dráhy vedoucí k inhibici transkripce *CYP7A1* a tím inhibici syntézy BA v játrech (7, 21).



Obr. 10: FXR/FGF19/FGFR4 signalizace (převzato z (7)).

Vysvětlivky: ASBT – apikální Na^+ -dependentní transporter pro žlučové kyseliny, BARE II – element odpovídající na žlučové kyseliny II, BSEP – exportní pumpa pro žlučové kyseliny, CDCA – chenodeoxycholová kyselina, CYP7A1 – cholesterol-7 α -hydroxyláza, ERK1/2 – extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza, FGF19 – fibroblastový růstový faktor 19, FGFR4 – receptor pro FGF, FXR – farnesoidní X receptor, FTF (= LRH-1) – transkripční faktor pro α -fetoprotein (= homolog jaterního receptoru 1), HNF4 α – jaterní nukleární faktor 4 α , IBABP – protein vázající žlučové kyseliny ve střevě, IR1 – invertovaná repetice oddělená jedním nukleotidem, NTCP – Na^+ -taurocholátový kotransportující polypeptid, RXR – retinoidní X receptor, SHP – malý heterodimerní partner

4.3.3 Dráhy nezávislé na aktivaci FXR

Existuje několik způsobů regulace exprese *CYP7A1*, které nezávisí na aktivaci FXR. Tyto mechanismy se uplatňují v ochraně jater před potenciálními toxickými vlastnostmi BA (7).

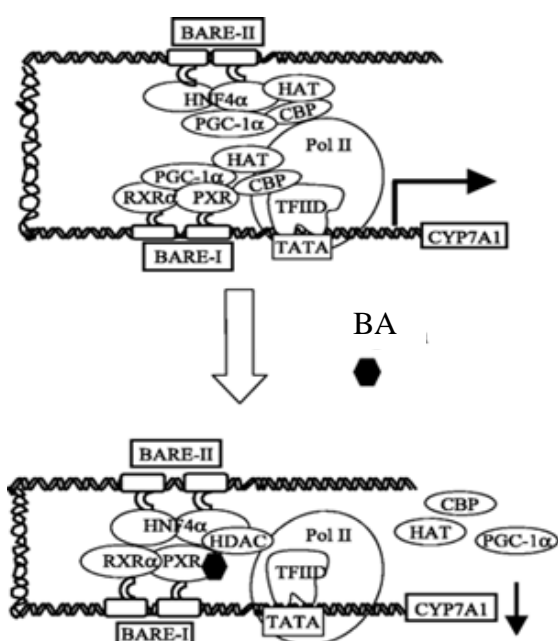
BA mohou být i přes své prospěšné účinky zdraví škodlivé, jsou-li v játrech přítomny ve vysokých koncentracích. LCA je sekundární BA, která vzniká v tenkém střevě z primární CDCA 7 α -dehydroxylací střevními bakteriemi. LCA vracející se do jater je toxická – způsobuje zhoršení toku žluči, akumulaci BA a žlučových toxinů. Akumulace toxických BA v játrech může způsobit jaterní cholestázu, cirhózu jater a rakovinu tlustého střeva (16).

4.3.3.1 Pregnanový X receptor

Sekundární LCA je ligandem pro pregnanový X receptor (PXR) a receptor pro vitamin D (VDR) (7). PXR je jaderný receptor, který chrání organismus před

škodlivými účinky endogenních a cizorodých sloučenin. Váže široké spektrum ligandů jako jsou antibiotika, protinádorové léky a antidepresiva a aktivuje množství genů zapojených v metabolismu léčiv a steroidních sloučenin. PXR reguluje také transkripci genů zahrnutých v biosyntéze, transportu a detoxikaci BA a genů zahrnutých v glukoneogenezi (16).

Aktivovaný PXR se váže do BARE I elementu v promotoru *CYP7A1* a interaguje s HNF4 α vázaným v BARE II. PXR zabraňuje interakci HNF4 α s jeho koaktivátorem PGC-1 α , což vede k disociaci PGC-1 α z promotoru a v důsledku toho k inhibici transkripce *CYP7A1* (22) (Obr. 11).



Obr. 11: Zpětnovazebná inhibice exprese *CYP7A1* zprostředkovaná BA (upraveno dle (22)).

Vysvětlivky: BARE – element odpovídající na BA, CBP – protein vázající CREBP (transkripční koaktivátor; CREBP – protein vázající element odpovídající na cAMP), *CYP7A1* – cholesterol-7 α -hydroxyláza, HAT – histonacyltransferáza, HDAC – histondeacetyláza, HNF4 α – jaterní nukleární faktor 4 α , PGC-1 α – proliferací peroxizomů aktivovaný receptor γ koaktivátor 1 α , Pol II – RNA polymeráza II, PXR – pregnanový X receptor, RXR – retinoidní X receptor, TFIID – TATA vázající protein transkripčního faktoru DII

4.3.3.2 Receptor pro vitamin D

VDR je cytosolický receptor a jeho hlavním ligandem je aktivní forma vitamínu D3. VDR hraje zásadní roli v udržování homeostázy vápníku a fosfátu a je důležitý pro správný vývoj kostí. LCA účinně aktivuje VDR při nižších koncentracích než PXR. VDR je lokalizován v cytosolu a po navázání ligandu je translokován do jádra. V jádře

vytváří heterodimerní komplex s RXR, který se váže do promotoru *CYP7A1* a inhibuje jeho transkripci. Bylo navrženo několik možných mechanismů, kterými k inhibici dochází: VDR se může vázat do BARE I elementu a interagovat s HNF4 α vázaným v BARE II, čímž brání interakci s jeho koaktivátory; VDR může soutěžit s HNF4 α o vazbu do BARE II; VDR může soutěžit s HNF4 α o vazbu koaktivátorů; VDR může navádět do promotoru *CYP7A1* korepresory, které mohou měnit konformaci chromatinu a inhibovat transkripci *CYP7A1*.

VDR aktivuje také sulfotransferázu 2A1, která detoxikuje LCA a modifikovaná LCA může být sekretována do žluče (23).

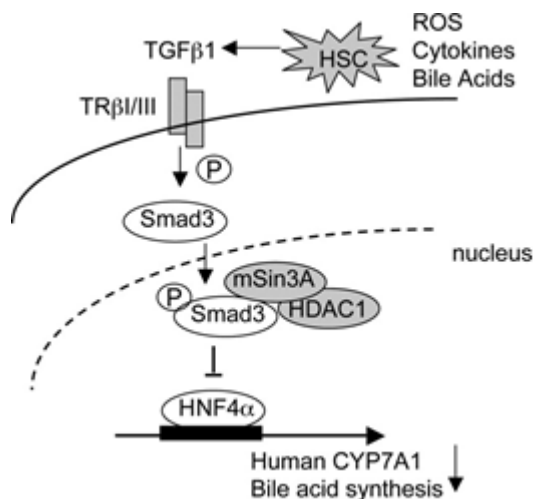
4.3.3.3 Úloha Kupfferových buněk a cytokinů

Kupfferovy buňky jsou rezidentní makrofágy, které sídlí v játrech na rozhraní mezi cirkulací a parenchymatickými buňkami. Produkci cytokinů aktivují vrozenou imunitní odpověď na vstup bakterií nebo bakteriálních produktů do trávicího traktu.

Kupfferovy buňky fungují jako senzory relativní koncentrace BA vstupujících do jater portální krví přes enterohepatální cirkulaci. Vysoké koncentrace BA, které se objevují např. při cholestáze, indukují expresi prozánětlivých cytokinů interleukinu 1 β (IL-1 β) a tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF α) v Kupfferových buňkách. Ty jsou následně uvolněny do jaterních sinusoidů a na povrchu parenchymatických buněk rozpoznávány vysokoafinitními receptory. TNF α a IL-1 β aktivují TNF receptor, který signalizuje aktivaci MAPK/JNK dráhy. JNK fosforyluje transkripční faktor c-Jun, který interaguje s HNF4 α , což vede k inhibici transkripce *CYP7A1* (6, 7) (Obr. 13).

Během akutní fáze odpovědi na poškození jaterních buněk žlučovými kyselinami produkují Kupfferovy buňky a hepatocyty velké množství cytokinů a reaktivních volných radikálů, které aktivují klidové jaterní hvězdicovité buňky (HSC). HSC prochází transdiferenciací v myofibroblasty, které produkují cytokiny, mnoho komponentů extracelulární matrix a aktivují fibrogenzi v játrech. Aktivované HSC uvolňují transformační růstový faktor β 1 (TGF β 1), který hraje důležitou roli v aktivaci a proliferaci HSC. TGF β 1 je produkován také Kupfferovými buňkami a aktivuje „Toll-like receptor 4“ na povrchu HSC a sekreci TGF β 1. BA také stimulují v hepatocytech produkci thrombospondinu 1, který aktivuje latentní TGF β 1 v HSC, což vede k jejich aktivaci. TGF β 1 aktivuje svůj receptor TR β II na povrchu jaterních parenchymatických buněk a aktivuje SMAD signalizační dráhu. TR β II je serin/threoninová kináza, která fosforyluje a aktivuje transkripční faktor Smad3. Smad3 vstupuje do jádra, interaguje

s HNF4 α a zároveň navádí korepresory mSin3 a HDAC1 do chromatinu v promotoru *CYP7A1*. Dochází k inhibici transaktivační aktivity HNF4 α a deacetylaci histonů, která vede k inhibici transkripce *CYP7A1* (7, 24) (Obr. 12).

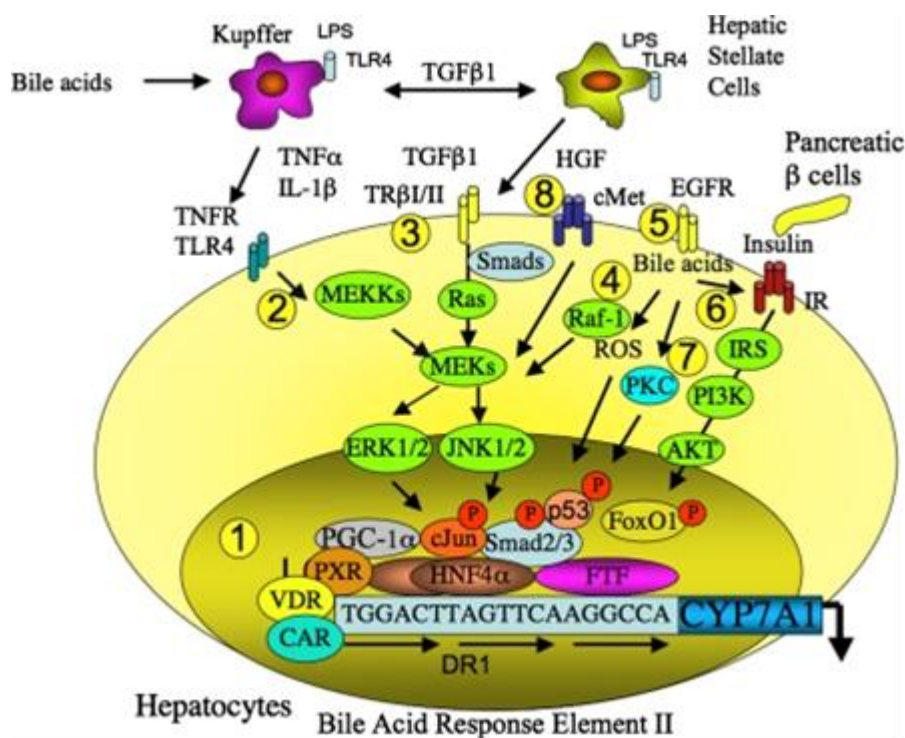


Obr. 12: Aktivace HSC a působení TGFβ1 na transkripci *CYP7A1* (převzato z (24)).

Vysvětlivky: *CYP7A1* – cholesterol-7-hydroxyláza, HDAC – histodeacetyláza 1, HNF4 α – jaterní nukleární faktor 4 α , HSC – jaterní hvězdicovité buňky, mSin3 – transkripční korepresor, ROS – reaktivní volné radikály, TGFβ1 – tumor růstový faktor βI, TRβI/III – receptor pro TGFβI/III, Smad3 – transkripční faktor

TGFβ1 a BA aktivují také Ras/MAPK/JNK dráhu, která vede k fosforylaci transkripčního faktoru p53. Fosforylovaný p53 inhibuje transaktivační aktivitu HNF4 α a dochází k inhibici transkripce *CYP7A1*. BA aktivují také protein kinázu C (PKC), která fosforyluje c-Jun. Fosforylovaný c-Jun rovněž inhibuje aktivitu HNF4 α a tím blokuje transkripci *CYP7A1*. Během akutní fáze odpovědi na poranění jater je z HSC také uvolňován jaterní růstový faktor (HGF), který aktivuje svůj receptor cMet a MAPK dráhu, která inhibuje *CYP7A1* a syntézu BA (7, 25).

Mechanismů inhibice *CYP7A1* cytokiny a růstovými faktory existuje celá řada a přesné molekulární mechanismy nejsou doposud zcela známé (Obr. 13). Schopnost BA indukovat expresi regulačních cytokinů je dána typem BA a její koncentrací v portální krvi. Vlastnosti BA vracejících se do jater také rozhodují o tom, který represní mechanismus se bude uplatňovat (26).



Obr. 13: Zpětnovazebná inhibice *CYP7A1* (převzato z (7)).

Vysvětlivky: AKT – protein kináza B, CAR – konstitutivní receptor pro androstan, cMet – receptor pro HGF, *CYP7A1* – cholesterol-7 α -hydroxyláza, DR1 – přímá repetice oddělená jedním nukleotidem, EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor, ERK – extracelulárním signálem regulovaná protein kináza (MAPK - mitogenem aktivovaná protein kináza), FTF (= LRH-1) – transkripční faktor pro α -fetoprotein, HGF – jaterní růstový faktor, HNF4 α – jaterní nukleární faktor 4 α , IL-1 β – interleukin 1 β , IR – receptor pro inzulin, IRS – substrát pro IR, JNK – c-Jun N-terminální kináza (MAPK), LPS – lipopolysacharid, MEKs – kinázy aktivující ERK, MEKKs – kinázy aktivující MEK/ERK dráhu, PGC-1 α – proliferaci peroxizomů aktivovaný receptor γ koaktivátor 1 α , PI3K – fosfoinositid-3-kináza, PKC – protein kináza C, PXR – pregnanový X receptor, Raf-1 – protoonkogen serin/threonin-protein kináza, Ras – malá monomerní GTP-áza, TGF β 1 – tumor růstový faktor β 1, TLR4 – „Tool-like receptor 4“, TNFR – receptor pro TNF, TR β I/II – receptor pro TGF β I/II, VDR – receptor pro vitamin D; c-Jun, FoxO1, p53, Smad2/3 – transkripční faktory

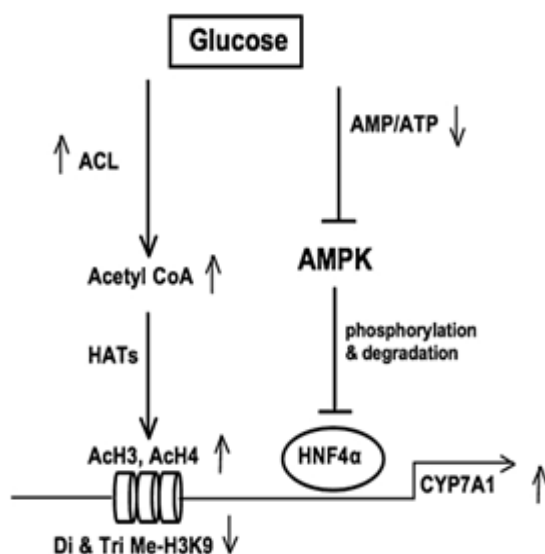
4.3.4 Úloha glukózy, inzulinu a glukagonu v regulaci aktivity *CYP7A1*

Syntéza BA se zvyšuje během postprandiální periody a klesá během lačnění. Během postprandiální periody je zvýšena produkce glukózy a inzulinu jako odpověď na příjem potravy a energie, na rozdíl od glukagonu, který je produkován v průběhu lačnění. Glukóza i inzulin mají schopnost aktivovat expresi *CYP7A1*, zatímco glukagon vykazuje opačný efekt.

4.3.4.1 Glukóza

Organismus odpovídá na zvýšený příjem glukózy aktivací transkripce genů zahrnutých v glykolýze a lipogenezi. V hepatocytech glukóza inhibuje AMP-aktivovanou proteinkinázu (AMPK), která funguje jako metabolický přepínač pro adaptaci buňky na měnící se výživové a energetické podmínky. Má-li buňka hodně energie (glukózy) zvyšuje se koncentrace ATP a snižující se poměr AMP/ATP vede k inhibici AMPK. To vede k aktivaci řady biosyntetických drah. Inaktivace AMPK rovněž brání fosforylaci HNF4 α a umožňuje jeho navázání do promotoru *CYP7A1* a aktivaci transkripce genu.

Glukóza také zvyšuje aktivitu jaderného enzymu ATP-citrátlyázy, který zvyšuje obsah acetyl-CoA v jádře. Acetyl-CoA je substrátem pro histonacyltransferázy, které acetylují histon 3 a histon 4 v chromatinu *CYP7A1*a stimulují tak transkripci genu. Glukóza navíc brání di- a tri- methylaci H3K9 methyltransferázou G9a, která je známým represorem transkripce *CYP7A1* (27) (Obr. 14).



Obr. 14: Regulace transkripce *CYP7A1* glukózou (převzato z (27)).

Vysvětlivky: AcH – acetylovaný histon, ACL – ATP-citrátlyáza, AMP – adenosinmonofosfát, AMPK – AMP-aktivovaná proteinkináza, ATP – adenosintrifosfát, *CYP7A1* – cholesterol-7 α -hydroxyláza, HATs – histonacyltransferázy, HNF4 α – jaterní nukleární faktor 4 α , Me-H3K9 – methylovaný histon 3 na Lys9

4.3.4.2 Inzulín

Inzulín je hormon produkovaný B-buňkami pankreatu, který podporuje vychytávání glukózy z krevního oběhu ve svalech a játrech a v tukové tkáni stimuluje tvorbu tuků. Inzulín je jedním z efektorů, který ovlivňuje transkripci *CYP7A1* a může se tak významným způsobem podílet na regulaci syntézy BA. Bylo prokázáno, že inzulín má dvojitý efekt na expresi *CYP7A1*: za fyziologických koncentrací rychle stimuluje expresi *CYP7A1*, zatímco dlouhodobé působení inzulínu má za následek inhibici exprese genu. Tento dvojitý efekt je zprostředkován dvěma TF citlivými na inzulín: FoxO1 (inzulínem regulovaný forkhead box O1) a SREBP-1c (protein vážící se na element regulovaný steroly). Inzulín stimuluje rychlou fosforylaci FoxO1, která vede k jeho odstranění z jádra a dochází k aktivaci transkripce *CYP7A1*, zatímco dlouhodobé působení inzulínu indukuje expresi SREBP-1c, který následně inhibuje transkripci *CYP7A1*.

FoxO1 je jaderný TF, který se váže do elementů odpovídajících na inzulín (IRE) v promotorech cílových genů. V přítomnosti inzulínu dochází k aktivaci Akt/protein kinázy B, která fosforyluje FoxO1. Fosforylovaný FoxO1 je odstraňován z jádra a degradován v proteazomu. U potkana se FoxO1 váže do IRE elementu v promotoru *CYP7A1* a přímo reguluje jeho expresi. V promotoru lidského genu *CYP7A1* nebyl odpovídající IRE element identifikován a FoxO1 funguje jako korepresor inhibující *CYP7A1*. V nepřítomnosti inzulínu FoxO1 interaguje s HNF4 α v promotoru *CYP7A1* a zabraňuje tak interakci HNF4 α s jeho koaktivátorem PGC-1 α . V přítomnosti inzulínu se FoxO1 se uvolňuje z HNF4 α , PGC-1 α může interagovat s HNF4 α a dochází k rychlé stimulaci exprese *CYP7A1* (28).

Inzulín rovněž stimuluje aktivitu proteinů vážících se na element regulovaný steroly (SREBPs) v promotoru cílových genů, ve kterých fungují jako TF. Existují tři formy SREBP označované jako SREBP-1a, SREBP-1c a SREBP2. SREBP-1a a SREBP-1c vznikají alternativním sestřihem jako produkty jednoho genu a fungují jako aktivátory exprese klíčových genů syntézy mastných kyselin a triglyceridů. SREBP 2 je kódovaný jiným genem a slouží jako aktivátor genů zahrnutých v biosyntéze cholesterolu (29).

SREBP-1c může fungovat také jako represor nezávislý na vazbě do promotorové DNA. Dlouhodobým působením inzulínu indukované SREBP-1c inhibuje transaktivaci *CYP7A1* zabráněním interakce HNF4 α s PGC-1 α (28).

4.3.4.3 Glukagon

Glukagon je hormon produkovaný A-buňkami pankreatu působící proti účinkům inzulínu. Je-li v krvi nedostatek glukózy, aktivuje v játrech odbourávání glykogenu na glukózu, která je následně rozvedena do tkání. Glukagon je uvolňován z pankreatu během lačnění a inhibuje transkripci genu pro *CYP7A1*.

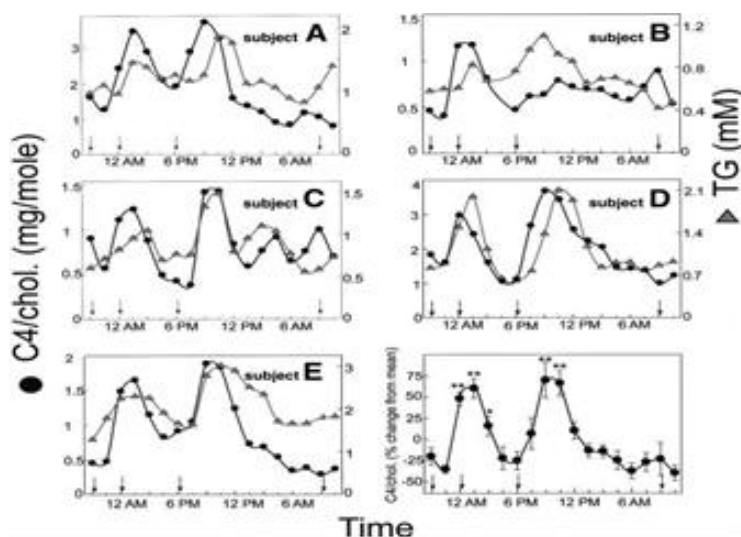
Glukagon zvyšuje prostřednictvím proteinkinázy A (PKA) fosforylaci HNF4 α . Fosforylované HNF4 α se neváže do promotoru *CYP7A1* a transkripce a syntéza BA je inhibována. Glukagon indukuje fosfoenolpyruvátkarboxykinázu (PEPCK, enzym glukoneogeneze) a přispívá tak k udržování postprandiální hladiny glukózy a předchází poklesu hladiny glukózy v krvi. Po požití potravy produkce glukagonu klesá, exprese *CYP7A1* je reaktivována a dochází k syntéze BA, aby mohly být využity pro absorpci tuků v tenkém střevě. V játrech BA aktivují FXR/SHP dráhu, která inhibuje PEPCK a brání vzniku hyperglykémie.

Regulace exprese *CYP7A1* prostřednictvím glukagon/cAMP/PKA signalizace a inzulínu je jedním z mechanismů udržování homeostáze glukózy a energetického metabolismu (30).

4.3.5 **Diurnální variace**

Aktivita enzymu *CYP7A1* a tudíž i syntéza BA vykazují diurnální rytmicitu. Při studiu změn aktivity *CYP7A1* se jako marker používá měření koncentrace 7 α -hydroxycholest-4-en-3-onu (C4), intermediárního produktu při syntéze BA (31). C4 je transportován v krvi lipoproteinovými částicemi přenášejícími cholesterol, proto se pro přesnější stanovení používá poměr C4/cholesterol (C4/chol). C4/chol vykazuje v průběhu dne dva rozdílné vrcholy (dvou až čtyřnásobný vzrůst oproti bazální hladině). Při pravidelné konzumaci jídla (v devět hodin ráno, v poledne a v šest hodin večer) byly nejvyšší koncentrace C4 stanoveny krátce po poledni a kolem deváté hodiny večer (Obr. 15). V průběhu noci se koncentrace C4 snižuje a do rána se navrácí na bazální hladinu. Koncentrace BA v krvi roste po přijetí potravy, tedy v postprandiální periodě, za kterou se dá u lidí považovat většina dne, kdy je aktivně přijímána potrava. Vrcholy C4/chol byly stanoveny v době, kdy je koncentrace BA vracejících se portální krvi je nejvyšší, což je v rozporu s tím, že v této době by měla převládat inhibice způsobená BA. Tento rozpor nebyl dosud zcela vysvětlen – regulace syntézy BA je velmi komplexní proces a není také například známo, zda ke změnám koncentrace C4 v plazmě nedochází později než ke změnám koncentrace enzymu *CYP7A1* v játrech (32, 33).

Syntéza BA u člověka tedy v průběhu dne kolísá s nejvýraznější aktivitou kolem poledne a v pozdních večerních hodinách a je nezávislá na syntéze cholesterolu. Je zajímavé, že u hlodavců, kteří požívají potravu především v noci, CYP7A1 i klíčový regulační enzym syntézy cholesterolu, HMGR, vykazují nejvyšší aktivitu kolem půlnoci. Jejich aktivita poté postupně klesá k minimu v poledne. Tato synchronní regulace zřejmě souvisí s tím, že u hlodavců je rychlost syntézy BA v porovnání s produkcí cholesterolu 5 – 6 krát vyšší než u lidí a vysoký stupeň syntézy BA má tudíž větší nároky na množství nově syntetizovaného cholesterolu. Relativně pomalá konverze cholesterolu na BA u lidí tak může mít zvláštní význam v rozdílné homeostáze cholesterolu mezi těmito druhy. Stejně tak může být významným faktorem v rozvoji onemocnění jako jsou hypercholesterolemie a ateroskleróza u lidí, zatímco u hlodavců se tyto nemoci nevyskytují (32).



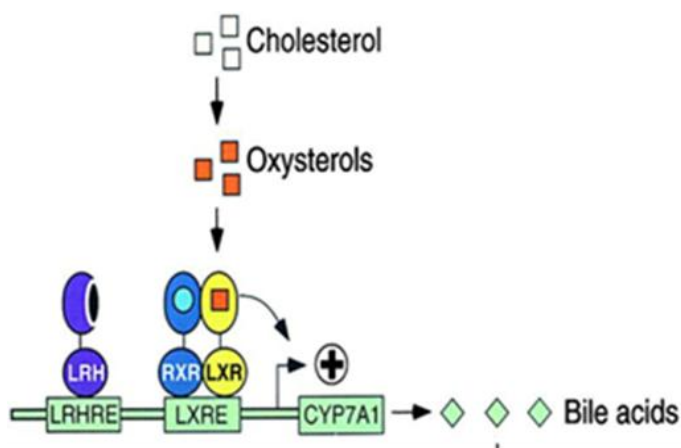
Obr. 15: Diurnální variace aktivity CYP7A1 (převzato z (32)).

4.4 Úloha CYP7A1 v regulaci cholesterolémie

Homeostáze cholesterolu je v organismu udržována třemi hlavními metabolickými dráhami. Dostatečné zásobení buněk cholesterolem zajišťuje syntéza cholesterolu *de novo* v játrech. Buňky mohou rovněž získávat cholesterol internalizací LDL částic přenášejících cholesterol krví do tkání a zpět do jater. Třetí neméně důležitou dráhou přispívající k udržování optimální hladiny cholesterolu v organismu je degradace cholesterolu na BA (13).

4.4.1 Úloha LXR α

Je známo, že CYP7A1 hraje důležitou roli v udržování cholesterolémie u myši a potkanů. Po podání dietního cholesterolu se cholesterolémie u těchto zvířat nemění, neboť dochází k aktivaci LXR α , který se váže do DR4 motivu v BARE I v promotoru CYP7A1, aktivuje jeho transkripci a cholesterol je odbouráván na BA (6) (Obr. 16). U kmene myši, který na podání cholesterolu odpovídal vzestupem cholesterolémie bylo zjištěno, že nedochází ke zvýšení transkripce CYP7A1 (34).



Obr. 16: Aktivace LXR α oxysteroly (upraveno dle (35)).

Vysvětlivky: LRH – homolog jaterního receptoru, LXR – jaterní X receptor, RXR – retinoidní X receptor

LXR α je jaderný receptor, který je aktivován oxysteroly vznikajícími v mitochondriích jako odpověď na vysoké koncentrace cholesterolu v buňce. U člověka se podílí na udržování cholesterolémie tím, že funguje jako transkripční faktor genů pro ABC přenašeče, které jsou spojeny s exportem cholesterolu z buněk (ABC1, ABG1, ABG5 a ABCG8). LXR α vytváří heterodimerní komplex s RXR, který se váže do elementů odpovídajících na LXR α (LXRE) v promotoru cílových genů a aktivuje jejich expresi. U člověka nebyl DR4 motiv v odpovídající oblasti promotoru *CYP7A1* identifikován a LXR α transkripci neovlivňuje (6).

4.4.2 Polymorfismus CYP7A1

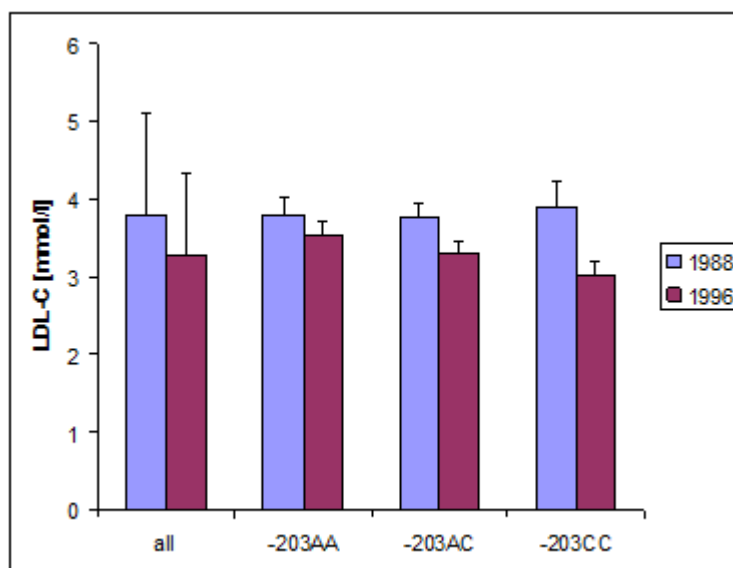
V 90. letech minulého století bylo demonstrováno, že promotor genu pro CYP7A1 u člověka vykazuje variabilitu – byly popsány 2 běžné varianty, které se liší přítomností A/C nukleotidů v pozici -203. Bylo prokázáno, že existuje vztah mezi

hladinou LDL-cholesterolu (LDL-C) a tímto promotorovým polymorfismem. Varianta C je spojena s vyšší hladinou LDL-C a celkového cholesterolu (36, 37).

Při analýze dat kohorty 121 mužů z české populace, u kterých mezi rokem 1988 a 1996 klesl cholesterol o 0,8 mmol/l bylo zjištěno, že pokles cholesterolémie byl nejvýraznější u jedinců homozygotních pro -203C alelu a nejnižší u jedinců homozygotních pro alelu -203 A (Obr. 16). Vzhledem k tomu, že v tomto období došlo v české populaci k dramatické změně stravovacích návyků (pokles spotřeby živočišných tuků a zvláště tuků živočišných, zvýšená spotřeba ovoce a zeleniny), autoři uzavřeli, že tento polymorfismus pravděpodobně rozhoduje o tom, jak reagujeme na příjem dietního tuku a cholesterolu. (38). K podobnému závěru dospěli také holandsští autoři (39).

Ve studii na zdravých dobrovolnících bylo ukázáno, že podání diety s nízkým obsahem tuku a cholesterolu je spojeno s významným poklesem cholesterolémie u homozygotních nositelů varianty -203C, nikoli u homozygotů pro variantu pro -203A (40).

Metodou duální luciferázové eseje bylo prokázáno, že alela -203C může být v HepG2 buňkách exprimována až 5 krát více než alela -203A (41). Z toho lze usoudit, že jedinci, kteří jsou homozygotními nositeli alely C mohou vytvářet více proteinu CYP7A1 a efektivněji přeměňují cholesterol na BA. To by mohlo vysvětlit, proč nositelé této varianty genu odpovídají na změnu dietního příjmu cholesterolu výraznější změnou cholesterolémie.



Obr. 17: Polymorfismus -203A/C genu *CYP7A1* a změna LDL-C – populační studie (upraveno dle (38)).

5 Závěr

CYP7A1 hraje důležitou úlohu v udržování homeostáze cholesterolu a žlučových kyselin. Aktivita CYP7A1 v hepatocytech je regulována na transkripční úrovni a závisí na mnoha faktorech, které souvisí se zdravotním, hormonálním a nutričním stavem jedince. Klíčovou úlohu zde hraje zpětnovazebná inhibice CYP7A1 zprostředkovaná žlučovými kyselinami, které se vracejí do jater v enterohepatálním oběhu. Tento návrat žlučových kyselin do jater aktivuje různé jaderné receptory, proteinkinázy a transkripční faktory, které vytvářejí komplikované signalizační dráhy vedoucí k inhibici transkripce *CYP7A1* a regulují tak biosyntézu žlučových kyselin z cholesterolu.

I když byla charakterizována celá řada regulačních drah, jejich kvantitativní příspěvek k regulaci aktivity enzymu nebyl dosud jednoznačně určen. Stejně tak není známo, které mechanismy jsou klíčové pro regulaci diurnální variace CYP7A1 u člověka – aktivita enzymu je paradoxně nejvyšší v době, kdy se do jater vrací žlučové kyseliny. Málo je rovněž známo o tom, jak přispívá regulace aktivity CYP7A1 k regulaci cholesterolemie u člověka.

Detailní vysvětlení regulace tohoto enzymu by mohlo přispět k účinnější prevenci kardiovaskulárních onemocnění a k terapii hypercholesterolemie.

6 Seznam zkratek

ABC	ATP - binding cassette	ATP - vazebná kazeta
AMPK	AMP-activated protein kinase	AMP-aktivová proteinkináza
ASBA	Apical sodium-dependent bile acid transporter	Apikální Na ⁺ - dependentní transportér pro žlučové kyseliny
BA	Bile acids	Žlučové kyseliny
BARE	Bile acid response element	Element odpovídající na žlučové kyseliny
BSEP	Bile salt export pump	Pumpa exportující žlučové soli
CA	Cholic acid	Cholová kyselina
CDCA	Chenodeoxycholic acid	Chenodeoxycholová kyselina
c-Jun	Activator protein 1	Aktivační protein 1 - TF
CYP27A1	Sterol 27-hydroxylase	Sterol-27-hydroxyláza
CYP39A1	24-hydroxycholesterol 7 α -hydroxylase	24-hydroxycholesterol-7 α -hydroxyláza
CYP7A1	Cholesterol 7 α -hydroxylase	Cholesterol-7 α -hydroxyláza
CYP7A1	Cholesterol 7 α -hydroxylase gene	Gen pro cholesterol-7 α -hydroxylázu
CYP7B1	25-hydroxycholesterol 7 α -hydroxylase	25-hydroxycholesterol-7 α -hydroxyláza
CYP8B1	Sterol 12 α -hydroxylase	Sterol-12 α -hydroxyláza
CYPs	Cytochrome P450	cytochromy P450
DCA	Deoxycholic acid	Deoxycholová kyselina
DR	Direct repeats	Přímá repetice
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Receptor pro epidermální růstový faktor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	Extracelulárním signálem regulovaná proteinkináza
FGF19	Fibroblast growth factor 19	Fibroblastový růstový faktor 19
FGFR4	Fibroblast growth factor receptor	Receptor pro FGF 19
FOXO1	Forkhead box protein O1	Inzulínem regulovaný TF
FTF	α -fetoprotein transcription factor	Transkripční faktor pro α -fetoprotein
FXR	Farnesoid X receptor	Farnesoidní X receptor
FXRE	FXR response element	Element odpovídající na FXR
HAT	Histone acyltransferase	Histonacyltransferáza
HDAC	Histone deacetylase	Histondeacetyláza
HGF	Hepatocyte growth factor	Jaterní růstový faktor
HMGR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A-reduktáza
HNF4α	Hepatocyte nuclear factor 4 α	Jaterní nukleární faktor 4 α
HSC	Hepatic stellate cell	Jaterní hvězdicovité buňky
IBABP	Intestinal bile acid binding protein	Protein vázající žlučové kyseliny ve střevě
IL-1β	Interleukin 1 β	Interleukin 1 β
IR	Inverted repeats	Invertovaná repetice

JNK	c-Jun N-terminal kinase	C-Jun N-terminální kináza
LCA	Lithocholic acid	Litocholová kyselina
LDL	Low density lipoprotein	Lipoprotein o nízké hustotě
LDL-C	Low density lipoprotein-cholesterol	LDL-cholesterol
LRH-1	Liver receptor homologue-1	Homolog jaterního receptoru 1
LXRE	LXR response element	Element odpovídající na LXR
LXRα	Liver X receptor α	Jaterní X receptor α
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
MCA	Murocholic acid	Muricholová kyselina
NTCP	Na ⁺ -dependent taurocholate cotransporting polypeptide	Na ⁺ - taurocholátový kotransportující polypeptid
p53	Cellular tumor antigen p53	Buněčný tumorový antigen p53
PGC-1α	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α	Proliferací peroxizomů aktivovaný receptor γ koaktivátor 1 α
PXR	Pregnane X receptor	Pregnanový X receptor
Ras	Small G-protein Ras	Malý G-protein Ras
RXR	Retinoid X receptor	Retinoidní X receptor
SHP	Small heterodimer partner	Malý heterodimerní partner
Smad	Mothers against DPP homologue	Transkripční faktor
SREBP	SRE-binding protein	Protein vázající SRE
TF	Transcription factor	Transkripční faktor
TGFβI	Tumor growth factor β	Tumor růstový faktor β I
TNFα	Tumor necrosis factor α	Tumor nekrotizující faktor α
VDR	Vitamin D receptor	Receptor pro vitamin D

7 Přehled použité literatury

1. Voet, D., Voet, J.G. 2004. Biochemistry John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
2. Soška, V. 2001. Poruchy metabolismu lipidů : diagnostika a léčba. 1 ed. Grada, Praha.
3. Pikuleva, I. A. 2008. Cholesterol-metabolizing cytochromes P450: implications for cholesterol lowering. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4: 1403-1414.
4. <http://medicinewbie.blogspot.com/2011/02/vldl-are-precursors-of-ldl.html>
5. Monte, M. J., J. J. Marin, A. Antelo, and J. Vazquez-Tato. 2009. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 15: 804-816.
6. Davis, R. A., J. H. Miyake, T. Y. Hui, and N. J. Spann. 2002. Regulation of cholesterol-7alpha-hydroxylase: BAREly missing a SHP. *J Lipid Res* 43: 533-543.
7. Chiang, J. Y. 2009. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 50: 1955-1966.
8. Vance, D. E., Vance, J. E. 2008. Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes. 5th ed. Elsevier, Amsterdam.
9. Modica, S., R. M. Gadaleta, and A. Moschetta. 2010. Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl Recept Signal* 8: e005.
10. Li, T., and J. Y. Chiang. 2012. Bile Acid signaling in liver metabolism and diseases. *J Lipids* 2012: 754067.
11. <http://www.jci.org/articles/view/16076/figure/1>
12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=cyp7a1>
13. Gilardi, F., N. Mitro, C. Godio, E. Scotti, D. Caruso, M. Crestani, and E. De Fabiani. 2007. The pharmacological exploitation of cholesterol 7alpha-hydroxylase, the key enzyme in bile acid synthesis: from binding resins to chromatin remodelling to reduce plasma cholesterol. *Pharmacol Ther* 116: 449-472.
14. Guengerich, F. P. 2008. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 21: 70-83.
15. Crestani, M., A. Sadeghpour, D. Stroup, G. Galli, and J. Y. Chiang. 1998. Transcriptional activation of the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A) by nuclear hormone receptors. *J Lipid Res* 39: 2192-2200.
16. Bhalla, S., C. Ozalp, S. Fang, L. Xiang, and J. K. Kemper. 2004. Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1alpha. Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism. *J Biol Chem* 279: 45139-45147.

17. Chen, W., E. Owsley, Y. Yang, D. Stroup, and J. Y. Chiang. 2001. Nuclear receptor-mediated repression of human cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription by bile acids. *J Lipid Res* 42: 1402-1412.
18. Boulias, K., N. Katrakili, K. Bamberg, P. Underhill, A. Greenfield, and I. Talianidis. 2005. Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP. *EMBO J* 24: 2624-2633.
19. Kemper, J. K., H. Kim, J. Miao, S. Bhalla, and Y. Bae. 2004. Role of an mSin3A-Swi/Snf chromatin remodeling complex in the feedback repression of bile acid biosynthesis by SHP. *Mol Cell Biol* 24: 7707-7719.
20. Fang, S., J. Miao, L. Xiang, B. Ponugoti, E. Treuter, and J. K. Kemper. 2007. Coordinated recruitment of histone methyltransferase G9a and other chromatin-modifying enzymes in SHP-mediated regulation of hepatic bile acid metabolism. *Mol Cell Biol* 27: 1407-1424.
21. Song, K. H., T. Li, E. Owsley, S. Strom, and J. Y. Chiang. 2009. Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression. *Hepatology* 49: 297-305.
22. Li, T., and J. Y. Chiang. 2005. Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor inhibition of human cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G74-84.
23. Han, S., and J. Y. Chiang. 2009. Mechanism of vitamin D receptor inhibition of cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 37: 469-478.
24. Li, T., and J. Y. Chiang. 2007. A novel role of transforming growth factor beta1 in transcriptional repression of human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Gastroenterology* 133: 1660-1669.
25. Myung, S. J., J. H. Yoon, G. Y. Gwak, W. Kim, J. I. Yang, S. H. Lee, J. J. Jang, and H. S. Lee. 2007. Bile acid-mediated thrombospondin-1 induction in hepatocytes leads to transforming growth factor-beta-dependent hepatic stellate cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 353: 1091-1096.
26. Miyake, J. H., S. L. Wang, and R. A. Davis. 2000. Bile acid induction of cytokine expression by macrophages correlates with repression of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Biol Chem* 275: 21805-21808.

27. Li, T., D. Chanda, Y. Zhang, H. S. Choi, and J. Y. Chiang. 2010. Glucose stimulates cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *J Lipid Res* 51: 832-842.
28. Li, T., X. Kong, E. Owsley, E. Ellis, S. Strom, and J. Y. Chiang. 2006. Insulin regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase expression in human hepatocytes: roles of forkhead box O1 and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem* 281: 28745-28754.
29. Ponugoti, B., S. Fang, and J. K. Kemper. 2007. Functional interaction of hepatic nuclear factor-4 and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α in CYP7A1 regulation is inhibited by a key lipogenic activator, sterol regulatory element-binding protein-1c. *Mol Endocrinol* 21: 2698-2712.
30. Song, K. H., and J. Y. Chiang. 2006. Glucagon and cAMP inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene expression in human hepatocytes: discordant regulation of bile acid synthesis and gluconeogenesis. *Hepatology* 43: 117-125.
31. Axelson, M., I. Bjorkhem, E. Reihner, and K. Einarsson. 1991. The plasma level of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one reflects the activity of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase in man. *FEBS Lett* 284: 216-218.
32. Galman, C., B. Angelin, and M. Rudling. 2005. Bile acid synthesis in humans has a rapid diurnal variation that is asynchronous with cholesterol synthesis. *Gastroenterology* 129: 1445-1453.
33. Kovar, J., M. Lenicek, M. Zimolova, L. Vitek, M. Jirsa, and J. Pitha. 2010. Regulation of diurnal variation of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) activity in healthy subjects. *Physiol Res* 59: 233-238.
34. Boone, L. R., P. A. Brooks, M. I. Niesen, and G. C. Ness. 2011. Mechanism of resistance to dietary cholesterol. *J Lipids* 2011: 101242.
35. Lu, T. T., M. Makishima, J. J. Repa, K. Schoonjans, T. A. Kerr, J. Auwerx, and D. J. Mangelsdorf. 2000. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6: 507-515.
36. Wang, J., D. J. Freeman, S. M. Grundy, D. M. Levine, R. Guerra, and J. C. Cohen. 1998. Linkage between cholesterol 7 α -hydroxylase and high plasma low-density lipoprotein cholesterol concentrations. *J Clin Invest* 101: 1283-1291.
37. Couture, P., J. D. Otvos, L. A. Cupples, P. W. Wilson, E. J. Schaefer, and J. M. Ordovas. 1999. Association of the A-204C polymorphism in the cholesterol 7 α -

hydroxylase gene with variations in plasma low density lipoprotein cholesterol levels in the Framingham Offspring Study. *J Lipid Res* 40: 1883-1889.

38. Hubacek, J. A., J. Pitha, Z. Skodova, R. Poledne, V. Lanska, D. M. Waterworth, S. E. Humphries, and P. J. Talmud. 2003. Polymorphisms in CYP-7A1, not APOE, influence the change in plasma lipids in response to population dietary change in an 8 year follow-up; results from the Czech MONICA study. *Clin Biochem* 36: 263-267.

39. Hofman, M. K., R. M. Weggemans, P. L. Zock, E. G. Schouten, M. B. Katan, and H. M. Princen. 2004. CYP7A1 A-278C polymorphism affects the response of plasma lipids after dietary cholesterol or cafestol interventions in humans. *J Nutr* 134: 2200-2204.

40. Kovar, J., P. Suchanek, J. A. Hubacek, and R. Poledne. 2004. The A-204C polymorphism in the cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene determines the cholesterolemia responsiveness to a high-fat diet. *Physiol Res* 53: 565-568.

41. De Castro-Oros, I., S. Pampin, M. Cofan, P. Mozas, X. Pinto, J. Salas-Salvado, J. C. Rodriguez-Rey, E. Ros, F. Civeira, and M. Pocovi. 2011. Promoter variant -204A > C of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene: association with response to plant sterols in humans and increased transcriptional activity in transfected HepG2 cells. *Clin Nutr* 30: 239-246.