

Rola 7 α -hydroksylazy cholesterolu i genu CYP7A1 w fizjologii i patologii człowieka

Role of the cholesterol 7 α -hydroxylase and CYP7A1 gene in human physiology and pathology

Tomasz Iwanicki, Anna Balcerzyk, Iwona Żak

STRESZCZENIE

Zakład Biochemii i Genetyki Medycznej
Śląski Uniwersytet Medyczny

7 α -hydroksylaza cholesterolu (CYP7A1) jest enzymem należącym do dużej rodziny cytochromu p450. Znaczenie biologiczne 7 α -hydroksylazy cholesterolu związane jest z rozpoczęciem szeregu przemian cholesterolu do kwasów żółciowych. Powinowactwo CYP7A1 do cholesterolu determinowane jest unikalną budową białka, odmienną od reszty białek rodziny cytochromu p450. Enzym ten kodowany jest przez gen *CYP7A1*, którego *locus* znajduje się na ramieniu krótkim chromosomu ósmego. Ekspresja tego genu może być regulowana przy udziale farnazylogowego receptora X (FXR), bądź zachodzić poprzez szereg kinaz białkowych, modulujących zdolność przyłączania się swoistych receptorów jądrowych do promotora *CYP7A1*. Warianty polimorficzne i mutacje, występujące w regionie promotorowym, wpływają na właściwości jakościowe enzymu. Gen *CYP7A1*, kodując kluczowy enzym w katabolizmie cholesterolu, jest głównym kandydatem do badań jego związku ze zmianami w osoczowym poziomie lipoprotein. Obecność wariantów genetycznych w promotorze genu *CYP7A1* może być związana ze zmienionym poziomem cholesterolu całkowitego, triacylogliceroli czy LDL (*Low-Density Lipoprotein*). Polimorfizm promotora genu kodującego kluczowy enzym szlaku syntezy kwasów żółciowych i usuwania cholesterolu z organizmu jest głównym kandydatem do badań asocjacyjnych z takimi jednostkami chorobowymi, jak kamica żółciowa, nowotwory jelita grubego i woreczka żółciowego czy choroby o podłożu miażdżycowym.

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

mgr Tomasz Iwanicki
Zakład Biochemii i Genetyki Medycznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Medyków 18, Katowice
tel. +48 32 252 84 32
e-mail: t_iwanicki@wp.pl

Ann.Acad.Med.Siles. 2010, 64, 2, 48-57
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ISSN 0208-5607

SŁOWA KLUCZOWE

CYP7A1, polimorfizm, kwasy żółciowe, cholesterol

ABSTRACT

Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) belongs to the big family of cytochrome p450. Biological significance of cholesterol 7 α -hydroxylase is associated with beginning of cholesterol transformation to the bile acids. CYP7A1 affinity to the cholesterol is determined by its unique protein structure, different from the other proteins of cytochrome p450 family. CYP7A1 enzyme is encoded by *CYP7A1* gene localized in short arm of chromosome 8. Expression of *CYP7A1* gene could be regulated by farnesoid X receptor (FXR) or by kinases, which modulate nuclear receptor's binding abilities to the gene promoter. Polymorphic variants and mutations present in the promoter region impact on the quality properties of the enzyme. *CYP7A1* gene, encoding key enzyme of the cholesterol catabolic pathway is a main candidate to the research of its association with changes of serum lipids levels. Presence of genetic variants can be associated with changed levels of total cholesterol, triglycerides and Low-density lipoproteins (LDL). Promoter polymorphism of CYP7A1 is also main candidate for the research of association with such disease entities as gallbladder stone formation, colon cancer, gallbladder cancer or atherogenic-based diseases.

KEY WORDS

CYP7A1, polymorphism, bile acids, cholesterol

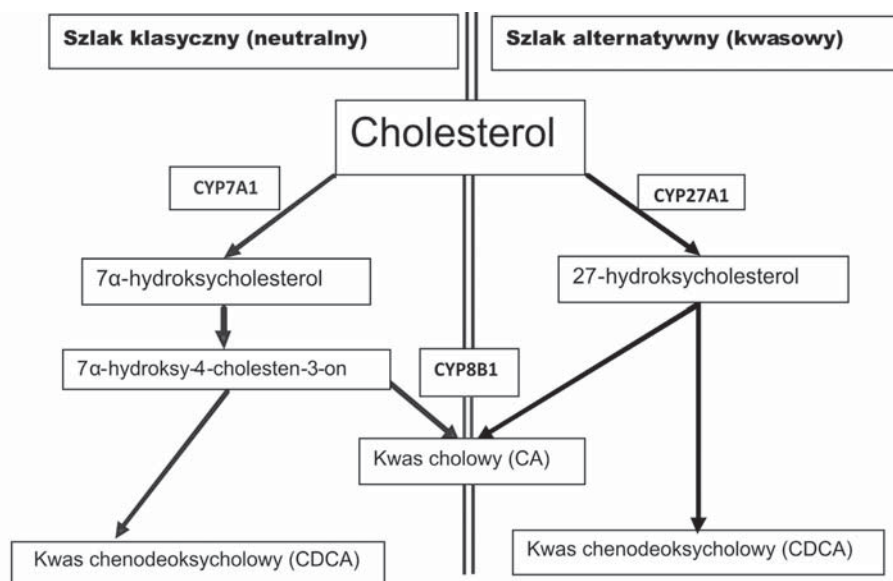
WSTĘP

7 α -hydroksylaza cholesterolu (CYP7A1, EC 1.14.13.17) jest enzymem występującym w wątrobie, należącym do dużej rodziny cytochromu p450. Inicjuje szlak biochemicznych przemian cholesterolu w kierunku kwasów żółciowych, co stanowi główny sposób usuwania nadmiaru cholesterolu z organizmu. Cholesterol jest substratem do produkcji wielu związków o kluczowym znaczeniu dla poprawnego funkcjonowania ludzkiego organizmu. Z produktów jego przemian powstają hormony gliko- i mineralokortykosteroidowe, a także hormony płciowe. Cholesterol jest także ważnym składnikiem błon komórkowych, nadającym im sztywność i wytrzymałość. Nadmiar cholesterolu może jednak prowadzić do wielu chorób, m.in. o podłożu miażdżycowym. Równie ważna jest ilość produkowanych kwasów żółciowych, które z jednej strony są niezbędne do prawidłowego trawienia i absorpcji hydrofobowych pokarmów, z drugiej jednak strony zbyt wysoki ich poziom może swoim toksycznym działaniem powodować patologie jelita grubego. Z tego też względu zarówno enzym CYP7A1, jak i gen, który go koduje, znajdują się w kręgu zainteresowań wielu badaczy. Enzym CYP7A1 przeprowadza reakcję hydroksylacji węgla w pozycji 7 α cholesterolu. Reakcja ta jest etapem ograniczającym szybkość prze-

kształcania cholesterolu oraz głównym miejscem regulacji syntezy kwasów żółciowych w wątrobie. CYP7A1 jest enzymem inicjującym tzw. szlak „klasyczny” lub inaczej „neutralny” przemian cholesterolu do kwasów żółciowych (Ryc. 1), będący również najważniejszą drogą usuwania nadmiaru cholesterolu z organizmu [1]. W odróżnieniu od szlaku alternatywnego, zachodzącego z udziałem enzymu CYP27A1, szlak klasyczny jest regulowany poprzez kwasy żółciowe na zasadzie pętli sprzężenia zwrotnego [2]. W warunkach fizjologicznych w hepatocytach szlak klasyczny dominuje nad szlakiem alternatywnym. Za pośrednictwem enzymów klasycznej drogi powstaje 50–60% całkowitej puli kwasów żółciowych. Szlak alternatywny odpowiedzialny jest za wytwarzanie ok. 30% naturalnych detergentów, natomiast około 5-10% kwasów żółciowych jest wytwarzanych w tkankach pozawątrobowych.

1. Budowa białka i genu *CYP7A1*

Białko CYP7A1 wykazuje pofałdowanie charakterystyczne dla cytochromu p450, jednak reszty aminokwasów położone blisko hemu tworzą unikalną strukturę ważną dla aktywności katabolicznej enzymu. Struktura ta w przeciwieństwie do reszty przedstawicieli dużej rodziny cytochromu p450 nie posiada aktywności metabolicznej względem kse-



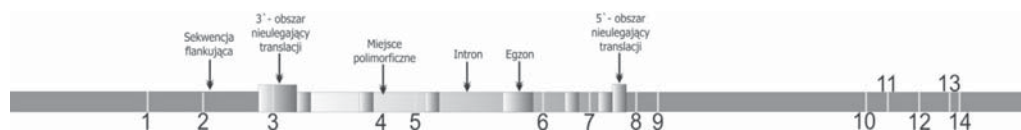
Ryc. 1. Szlaki powstawania kwasów żółciowych (CYP7A1 – cytochrom P450, rodzina 7, podrodzina a, polipeptyd 1; CYP8B1 – Cytochrom P450, rodzina 8, podrodzina b, polipeptyd 1; CYP27A1 – cytochrom P450, rodzina 27, podrodzina a, polipeptyd 1).

Fig. 1. Pathways of bile acids synthesis.

nobiotyków i testosteronu [3]. Hydrofobowy region zawierający reszty 214- 227 zlokalizowany na powierzchni cząsteczki cytochromu służy jako miejsce wiązania z błoną, uzupełniając N - końcowe wiązanie błonowe. Po usunięciu N - końcowego zakotwiczenia białko nadal pozostaje związane z błoną. Umożliwiają to reszty aminokwasowe 30- 45 przed helisą A, reszty 60 - 69 następujące po helisie A, reszty 276 - 379 i 201 - 210 odpowiadające β skrętowi 2- 2 i COOH - koniec pętli F- G. Pętla pomiędzy helisami F i G i przylegające segmenty tych helis prawdopodobnie biorą udział w wiązaniu białka z błoną u organizmów eukariotycznych. Prawdopodobnie aminokwasy V214, H225 i M226 wchodzi w bezpośrednią interakcję z dwuwarstwą lipidową. Reszty V214, F215 i L218 zlokalizowane na powierzchni enzymu odgrywają kluczową rolę we wchodzeniu cholesterolu do miejsca aktywnego cytochromu. Reszty te przylegają do kanału wejściowego i są odpowiedzialne za rozpoznanie substratu, a także oddziaływanie cholesterolu z hydrofobowymi resz-

tami aminokwasów na powierzchni. Umożliwia to otwarcie kanału wejściowego i zmiany zamkniętej konformacji enzymu w otwartą [4]. Reszty L360, A358 i L485 położone powyżej pierścienia pirolowego A hemu definiują wielkość miejsca aktywnego. Wymuszają też hydroksylację cholesterolu w pozycji 7α [5]. Resztą mającą kluczowe znaczenie dla tworzenia wiązania cytochrom p450-cholesterol jest N288 położona w helisie I. Tworzy ona wiązanie między wodorem a grupą hydroksylową węgla 3β w pierścieniu steroidowym.

Gen kodujący CYP7A1 znajduje się w chromosomie 8q11, ma wielkość ok. 10 kb zasad i zawiera 6 egzonów, 5 intronów, 5'- obszar nieulegający translacji (UTR) i 3'- obszar nieulegający translacji (Ryc. 2). Miejsce promotora zawiera sekwencje TATA w pozycji -30 pz oraz sekwencję CAAT położoną w pozycji -92 od miejsca inicjacji transkrypcji. Gen CYP7A1 wykazuje unikalną strukturę w obrębie dużej rodziny cytochromów p450, chociaż wykazuje 30% zgodność sekwencji z resztą genów tej rodziny [6].



Ryc. 2. Budowa genu CYP7A1 z zaznaczonymi miejscami polimorficznymi (wg Nakamoto i in. 2006; zmienione)

Fig. 2. CYP7A1 gene structure with polymorphic variants.

W promotorze genu *CYP7A1* występują dwie sekwencje odpowiedzi na kwasy żółciowe: BARE I (*Bile Acids Response Element I*) oraz BARE II (*Bile Acids Response Element II*). BARE I jest położony w regionie (-74/-57). BARE II jest zlokalizowany w pozycji -149/-118 i posiada dwa powtórzenia proste sekwencji AGGTCA: DR-1 (-146/-134) oraz DR- 5 (-139/-123). Sekwencje BARE są wysoce konserwatywne, jednakże istnieją różnice pomiędzy gatunkami zwierząt doświadczalnych w budowie sekwencji BARE I. Miejsce BARE II u wszystkich gatunków wykazuje identyczną budowę.

2. Regulacja ekspresji genu *CYP7A1*

Ze względu na kluczowe znaczenie enzymu *CYP7A1* w metabolizmie cholesterolu i kwasów żółciowych jego aktywność podlega restrykcyjnej kontroli. Regulacja ekspresji genu *CYP7A1* zachodzi na zasadzie pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego i może przebiegać dwoma sposobami - z udziałem farnesyloвого receptora X (FXR) oraz poprzez mechanizm niezależny od niego (Ryc. 3). Ligandem dla receptora FXR są kwasy żółciowe, z których największe powinowactwo wykazuje kwas chenodeoksycholowy (CDCA). Przyłączenie kwasu żółciowego aktywuje receptor i wpływa na regulację aktywności genu *CYP7A1* [7]. Jest to jednak wpływ pośredni, ponieważ receptor FXR nie posiada miejsca wiązania w promotorze genu *CYP7A1*. Zaktywowany receptor FXR tworzy dimer z innym receptorem jądrowym RXR (*Retinoid X Receptor*). Heterodimer ten łączy się z sekwencją IR-1 w promotorze genu kodującego białko SHP (*Small Heterodimer Partner*), indukując jego transkrypcję. Białko SHP jest represorem transkrypcji genu *CYP7A1*. Wchodzi ono w interakcję z właściwym promotorowym czynnikiem transkrypcyjnym - LRH-I (*Liver Receptor Homolog-I*), powoduje jego oddysocjowanie od sekwencji odpowiedzi na kwasy żółciowe BARE II (*Bile Acids Response Element II*) w genie *CYP7A1* i w ten sposób hamuje transkrypcję. Czynnikiem LRH-I jest pozytywnym regulatorem transkrypcji, jednakże silniejsze działanie protranskrypcyjne wykazuje hepatocytowy czynnik jądrowy 4 α (HNF4 α). Czynnikiem ten może ulegać supresji przez białko PPAR α (*Peroxisome proliferator activated receptor α*), którego transkrypcja, podobnie jak w przypadku białka SHP, jest indukowana za pośrednictwem receptora FXR [8]. Istnieje kilka mechanizmów regulacji ekspresji *CYP7A1* niezależnych od receptora FXR.

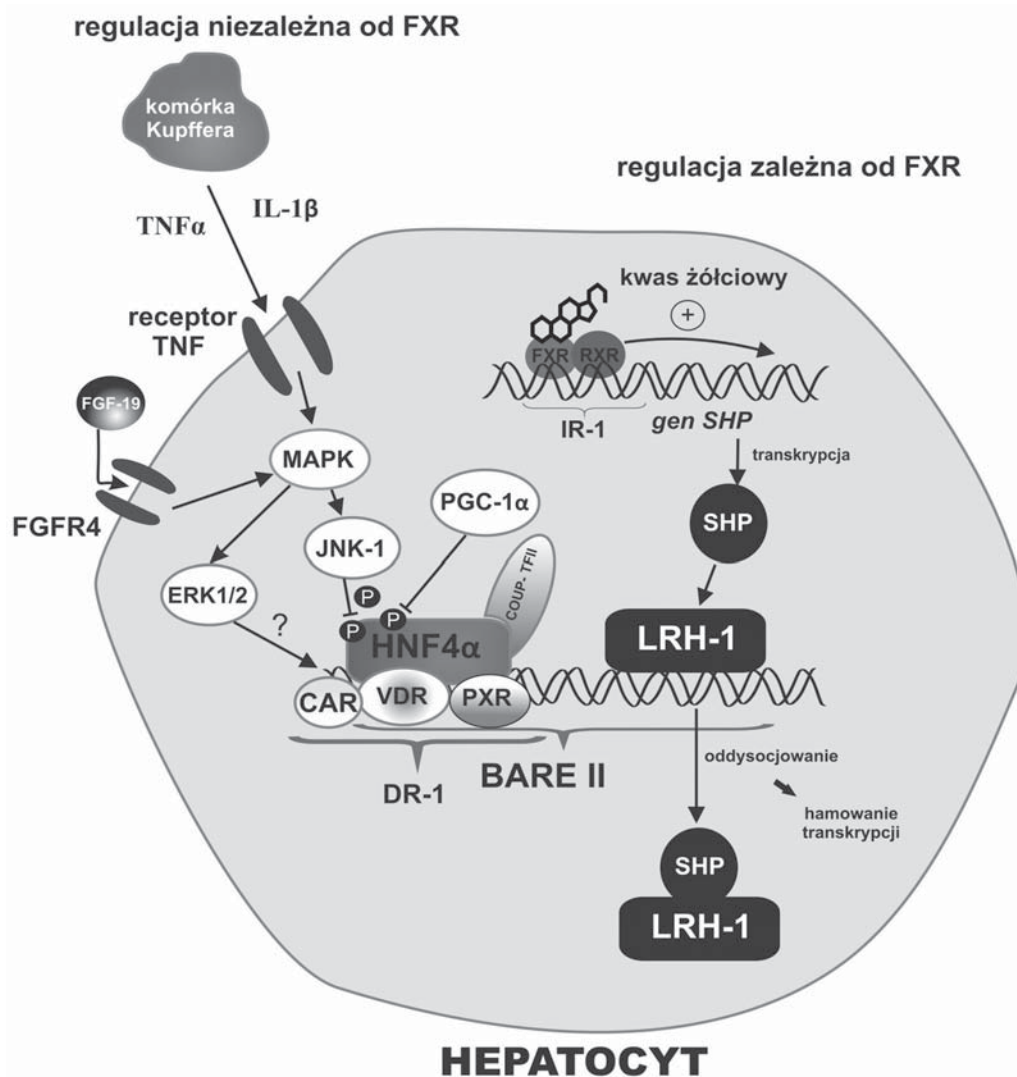
Jednym z nich jest wiązanie kwasu lithocholowego (LCA), będącego wtórnym kwasem żółciowym, z receptorami PXR (*Pregnane X Receptor*) lub VDR (*Vitamine D Receptor*). Wiążą się one z sekwencją BARE II w promotorze genu *CYP7A1*, hamując jego aktywność poprzez uniemożliwienie rekrutacji czynnika HNF4 α [9]. Inny jądrowy receptor CAR (*Constitutive Androstane Receptor*) wiąże się z motywem DR-1 w sekwencji BARE II i współzawodnicząc z HNF4 α o koaktywator PGC- 1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1*) hamuje transkrypcję genu *CYP7A1* [10]. PGC- 1 α jest koaktywatorem receptorów jądrowych i innych czynników biorących udział w wielu procesach metabolicznych. Dodatkowym czynnikiem działającym protranskrypcyjnie wraz z HNF4 α jest COUP- TFII (*Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor 2*). Synergiczne działanie tych dwóch czynników zwiększa ekspresję genu *CYP7A1* 80-krotnie [11].

Kolejny ważny szlak regulacyjny związany jest z komórkami Kupffera - makrofagami obecnymi w wątrobie. Interakcja kwasów żółciowych z komórkami Kupffera indukuje wydzielanie cytokin zapalnych, m.in. TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) oraz IL-1 β (*Interleukin 1 β*). Cytokiny te są rozpoznawane przez receptory na komórkach parenchymalnych, co w konsekwencji blokuje transkrypcję *CYP7A1* [11]. Zależna od cytokin negatywna regulacja zwrotna *CYP7A1* może być związana z odpowiedzią na szereg kinaz MAPK (*Mitogen- activated mitogen protein kinase* /JNK(*c-Jun N-terminal Kinase*), który zostaje aktywowany podczas kaskady reakcji w odpowiedzi na działanie TNF α i IL-1 β . Kwasy żółciowe oraz TNF α aktywują kinazę JNK, która fosforyluje czynnik HNF4 α , redukując zdolność tego protranskrypcyjnego białka do wiązania się z chromatyną oraz przyłączenia koaktywatora PGC-1 α [12].

Opisane procesy hamujące ekspresję genu *CYP7A1* dotyczą działania w obrębie pojedynczej komórki wątrobowej. Holt i wsp. [13] opisali czynnik, którego działanie może prowadzić do skoordynowanej regulacji ekspresji *CYP7A1* pomiędzy hepatocytami. FGF-19 jest czynnikiem syntetyzowanym w jelicie, którego wydzielanie indukowane jest pod wpływem kwasów żółciowych. FGF-19 jest ważnym czynnikiem ograniczającym poziom transkrypcji genu *CYP7A1* i syntezy kwasów żółciowych. Parakrynne działanie FGF-19 pomiędzy hepatocytami odbywa się bez podniesienia we-

wnątrzkomórkowego poziomu białka SHP, poprzez kaskadę kinaz MAPK/ERK1/2 (*Extra-cellular- signal- regulated kinase*). Dalsze etapy szlaku ograniczającego transkrypcję pozostają niezbadane [7].

od miejsca inicjacji transkrypcji (lub -278 A/C od miejsca rozpoczynającego translację). Ten powszechnie występujący wariant reprezentuje blok haplotypowy, który pokrywa znaczną część promotora i egzonu



Ryc. 3. Regulacja z udziałem receptora FXR i kinaz białkowych. Białko SHP łącząc się z czynnikiem protranskrypcyjnym LRH-1, powoduje jego oddysocjowanie, co wspólnie z kompetycją innych receptorów jądrowych z czynnikiem HNF4 α hamuje transkrypcję genu *CYP7A1*. Czynniki prozapalne wydzielane przez komórki Kupffera łączą się z receptorem błonowym, powodując aktywację kinaz. Fosforylowany przez nie czynnik HNF4 α obniża swoją aktywność protranskrypcyjną.

Fig. 3. Regulation FXR- dependent and by protein kinases.

3. Polimorfizm genu *CYP7A1* a aktywność enzymu i proces syntezy kwasów żółciowych
 W genie *CYP7A1* opisano dotychczas 9 wariantów polimorficznych w sekwencji flankującej gen oraz 5 polimorfizmów w sekwencji samego genu (regiony niekodujące). Najczęściej analizowanym polimorfizmem jest zamiana adeniny na cytozynę w pozycji -204

1 [14]. Wykrycie licznych związków (opisanych szerzej w dalszej części pracy) pomiędzy polimorfizmem -204 A/C a wskaźnikami biochemicznymi oraz chorobami stało się przesłanką do podjęcia badań nad funkcjonalnym znaczeniem powyższego wariantu allelicznego. Analiza 21 biopsji wątroby otrzymanych od pacjentów po cholecystektomii nie wyka-

zała związku pomiędzy polimorfizmem a aktywnością enzymu, koncentracją 7 α -hydroksy-4-cholesten-3-onu (będącego markerem aktywności CYP7A1) oraz parametrami syntezy kwasów żółciowych [15]. Na wynik eksperymentu niewątpliwie mógł mieć wpływ fakt, że przeprowadzono go na małej grupie badawczej, ze względu na konieczność biopsji. Dodatkowym utrudnieniem związanym z pomiarem aktywności enzymu jest rytmika dobową stężenia 7 α -hydroksylazy cholesterolu. Autorzy nie stwierdzili jednak również wpływu polimorfizmu na aktywność transkrypcyjną genu w metodzie *in vitro*, wykorzystując transfekcję z użyciem natywnego konstruktów promotora. Powyższe wyniki przy jednocześnie obserwowanym związku polimorfizmu z licznymi wskaźnikami biochemicznymi i chorobami mogą sugerować, że polimorfizm -204 A/C nie ma znaczenia funkcjonalnego, jednak może być w nierównowadze sprzężeń z innym polimorfizmem, mającym wpływ na aktywność enzymu. W dotychczasowych pracach nie opisano jednak takiego funkcjonalnego wariantu. Wyniki badań Lenicka i wsp. [16] wydają się rzucać dodatkowe światło na ten problem. Autorzy oceniali aktywność enzymu, na podstawie stosunku stężenia 7 α -hydroksy-4-cholesten-3-onu do cholesterolu całkowitego w grupie zdrowych wolontariuszy oraz pacjentów po resekcji dystalnej części okrężnicy, którzy charakteryzują się znacząco podwyższonym stężeniem soli żółciowych. U pacjentów stwierdzono podwyższoną aktywność enzymu, co prawdopodobnie związane jest z niedostatecznym poziomem czynnika FGF-19, pochodzącego głównie z okrężnicy. Czynnikiem ten odpowiedzialny jest za indukcję syntezy kinazy białkowej JNK, pośrednio hamującej transkrypcję CYP7A1. Aktywność enzymu w grupie osób po resekcji była ponadto zależna od genotypu CYP7A1. Osoby z genotypem AA, którym usunięto powyżej 70 cm jelita wykazywały wyższą aktywność enzymu w porównaniu z homozygotami CC (p=0,012). Nie wykazano natomiast żadnego związku polimorfizmu z aktywnością CYP7A1 u osób z grupy kontrolnej. Autorzy pracy sugerują, że w warunkach fizjologicznych rezerwa funkcjonalna CYP7A1 jest wystarczająca, aby przełamać wpływ polimorfizmu na aktywność enzymu. Jednak w sytuacji podwyższonej ekspresji enzymu (jak w przypadku pacjentów po resekcji) promotor -204C nie jest w stanie zwiększyć poziomu transkrypcji w takim stopniu, jak -204A.

4. Związek wariantów genu CYP7A1 ze zmianami wskaźników gospodarki lipidowej

Gen CYP7A1, kodując kluczowy enzym w katabolizmie cholesterolu, stał się ważnym genem kandydatem analizowanym w związku z poziomem lipoprotein w osoczu.

Wykazano, że utrata funkcji genu, będąca konsekwencją mutacji delecyjnej (1302-1303 delTT) prowadzi do hipercholesterolemii [17]. Na skutek mutacji następuje przesunięcie ramki odczytu, co powoduje odcięcie domeny białkowej wiążącej hem i utratę aktywności hydroksylazowej enzymu. Autorzy sugerują, że wskutek deficytu CYP7A1 następuje redukcja przekształcania cholesterolu w kwasy żółciowe, to natomiast powoduje podwyższenie poziomu cholesterolu w wątrobie, obniżenie ekspresji receptorów dla LDL na powierzchni błon komórkowych hepatocytów, a w konsekwencji hipercholesterolemię.

Również polimorfizm -278A/C genu CYP7A1 wydaje się mieć związek z poziomem lipidów w osoczu. W badaniach rodzin ustalono, że udział polimorfizmu genu CYP7A1 w dziedzicznej zmienności poziomu lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) wynosi 15% i jest porównywalny z efektem polimorfizmu epsilon genu APOE (11%), który należy do najsilniejszych czynników genetycznych wpływających na poziom lipidów osocza (Wang, 1998). Autorzy ocenili całkowitą odziedziczalność poziomu LDL na 50%, a więc dziedziczna zmienność byłaby aż w połowie warunkowana przez dwa powyższe geny. Przeprowadzona przez tych samych autorów analiza związku polimorfizmu -278A/C genu CYP7A1 z poziomem LDL u osób niespokrewnionych wykazała znacząco wyższy jego poziom u homozygot CC w porównaniu z osobnikami o genotypie AA. W podgrupie kobiet z genotypem CC obserwowano o 15% wyższy poziom LDL w porównaniu z homozygotami AA (p<0,01), natomiast w podgrupie mężczyzn różnica wynosiła 9% (p<0,05).

Wyniki te zostały częściowo potwierdzone w badaniach populacyjnych Framingham Offspring Study, przeprowadzonych na grupie 1139 mężczyzn i 1191 kobiet [18]. Istotnie statystycznie różnice w poziomie LDL pomiędzy nosicielami allelu C a homozygotami AA stwierdzono jednak tylko w podgrupie mężczyzn (p=0,029). Nosiciele allelu C charakteryzowali się o 4,7% wyższym poziomem LDL niż osoby z genotypem AA. Róż-

nica ta pozostawała istotna statystycznie także po uwzględnieniu wieku, BMI, palenia tytoniu, spożywania alkoholu, przyjmowania leków z grupy beta-blokerów czy genotypu *APOE*. Wydaje się więc, że polimorfizm genu *CYP7A1* ma pewien wpływ na stężenie LDL, jednak nie jest on tak silny, jak oceniono to we wcześniejszych badaniach. Według Couture i wsp. odpowiada on tylko za 1% zmienności w poziomie tej lipoproteiny. Nie stwierdzono podobnej zależności w grupie kobiet, jednak wykazano u nich związek pomiędzy genotypem CC a obniżonym stężeniem triacylogliceroli ($p=0,0145$). Różnice te autorzy tłumaczą zależną od płci regulacją hormonalną genu *CYP7A1*. Związek polimorfizmu -278A/C z poziomem triacylogliceroli wykazano jednak również wśród mężczyzn [19]. Analizując osoby normolipidemiczne oraz pacjentów z hiperlipidemiami, zaobserwowano, że zdrowi mężczyźni będący nosicielami allelu C mieli o 34% niższy poziom triacylogliceroli w porównaniu z homozygotami AA ($p=0,036$). Różnica ta była jednak istotna statystycznie tylko w podgrupie mężczyzn mających równocześnie genotyp $\epsilon\epsilon\epsilon$ genu *APOE*. Niższy poziom triacylogliceroli obserwowano również u nosicieli allelu C w grupie pacjentów z hipertriglicerydemią ($p=0,039$). Osoby te miały ponadto niższe stężenie cholesterolu całkowitego ($p=0,006$), cholesterolu frakcji VLDL ($p=0,05$) i triacylogliceroli frakcji VLDL ($p=0,039$). Po uwzględnieniu dodatkowych czynników, takich jak BMI, płeć i wiek, istotna statystycznie pozostawała jedynie różnica w stężeniu cholesterolu całkowitego (+23%; $p=0,005$), natomiast pozostałe były na granicy istotności statystycznej.

Genotyp *CYP7A1* wpływa także na zmiany wskaźników lipidowych w odpowiedzi na zastosowany rodzaj diety. Kovař i wsp. [20] wykazali, że u homozygot CC, u których zastosowano dietę wysokotłuszczową, po trzech tygodniach nastąpił znaczący wzrost poziomu LDL ($p<0,01$) i cholesterolu całkowitego ($p<0,05$) w porównaniu do osób żywionych niskotłuszczowo. Podobnych zmian we wskaźnikach lipidowych nie zaobserwowano u homozygot AA, u których zastosowano identyczny rodzaj diety. Autorzy sugerują, że nosiciele allelu C nie są zdolni do zwiększenia aktywności enzymu *CYP7A1* w odpowiedzi na wysoką zawartość tłuszczów i cholesterolu w diecie w takim stopniu, jak homozygoty AA.

Inne badania wykazały, że polimorfizm -278A/C moduluje również odpowiedź organizmu na dietę niskotłuszczową. Barcelos i wsp. [21], badając osoby dyslipidemiczne, stwierdzili, że u nosicieli allelu C po 6–8 tygodniach od rozpoczęcia diety następowała większa redukcja poziomu triacylogliceroli niż u homozygot AA ($p=0,04$).

Hubacek i wsp. [22] zaobserwowali natomiast, że w grupie 131 mężczyzn osoby z genotypem CC charakteryzowały się znaczącym obniżeniem poziomu cholesterolu całkowitego w odpowiedzi na dietę ze zredukowaną ilością tłuszczu. Wydaje się więc, że obecność allelu C związana jest z silniejszą odpowiedzią na dietę zarówno bogato-, jak i ubogotłuszczową. Autorzy sugerują, że nosicielstwo allelu -204C powoduje zwiększoną odpowiedź na działanie czynników regulujących transkrypcję genu *CYP7A1*.

Również badania dotyczące modulującego wpływu polimorfizmu -204A/C na odpowiedź organizmu na leczenie statynami dają pozytywne wyniki. Leki z grupy statyn hamują reduktazę 3-hydroksy-3-metylo-glutarylokoenzymu A (HMG-CoA) – enzymu odpowiedzialnego za syntezę kwasu mewalonowego, będącego pierwszym substratem w szlaku syntezy cholesterolu. U osób z genotypem CC stwierdzono mniejszy stopień redukcji stężenia LDL po zastosowaniu atorwastatyny niż u nosicieli allelu A ($p=0,009$). Ponadto deficyt enzymu *CYP7A1* spowodowany mutacją 1302-1303 delTT obserwowano wśród osób z hipercholesterolemią oporną na statyny [17].

Chociaż mechanizm wpływu wariantów allelicznych genu *CYP7A1* na poziom wskaźników lipidowych oraz odpowiedź organizmu na dietę i środki farmakologiczne nie jest do końca poznany, wydaje się, że rosnąca wiedza na ten temat może mieć w przyszłości praktyczne znaczenie w indywidualizacji postępowania z pacjentami hiperlipidemicznymi.

5. Polimorfizm -204 A/C genu *CYP7A1* w wybranych jednostkach chorobowych

Ze względu na kluczową rolę *CYP7A1* w pozbywaniu się nadmiaru cholesterolu z organizmu poprzez przekształcanie go w kwasy żółciowe, polimorfizm genu, kodującego ten enzym, jest głównym kandydatem do badań nad jego związkiem z takimi chorobami, jak kamica żółciowa, choroby jelita oraz choroby o podłożu miażdżycowym.

Kamica żółciowa (cholesterolowa) jest chorobą polegającą na tworzeniu się złożeń w wo-

reczku żółciowym wskutek zaburzeń składu produkowanej przez wątrobę żółci, czyli nieprawidłowych proporcji kwasów żółciowych, cholesterolu i lecytyny. Wzajemny stosunek kwasów żółciowych i cholesterolu jest w dużej mierze zależny od aktywności 7 α -hydroksylazy cholesterolu, ta natomiast może mieć związek z polimorfizmem -204A/C w miejscu promotorowym genu *CYP7A1*. Badania Jianga i wsp. [23] na populacji chińskiej wydają się potwierdzać hipotezę o związku powyższego polimorfizmu z kamicą żółciową. W badaniach tych obserwowano znacząco wyższą częstość allelu A w grupie osób chorych w porównaniu z grupą kontrolną (0,63 vs. 0,54; $p < 0,05$), a ryzyko wystąpienia choroby u nosicieli tego allelu było prawie półtora razy wyższe niż u homozygot CC (OR= 1,48; $p < 0,05$). Analiza populacji polskiej nie potwierdziła jednak związku polimorfizmu -278A/C z występowaniem kamicy żółciowej [24]. Częstości allelu C w grupie chorych i grupie kontrolnej były zbliżone (45% vs. 48%). Związku takiego nie stwierdzono również w populacji indyjskiej [25], gdzie obserwowano nawet tendencję do występowania wyższej częstości homozygot CC w grupie chorych ($p = 0,051$). Prawdopodobnie podstawową przyczyną tak zróżnicowanych wyników były różnice etniczne pomiędzy pacjentami objętymi powyższymi badaniami.

Występowanie kamieni żółciowych wykazuje ścisłą korelację z rozwojem nowotworu pęcherzyka żółciowego. Badania wskazują na obecność kamieni u 65–90% osób chorych na nowotwór [26]. Przypuszcza się, że nieprawidłowy skład żółci wykazuje niekorzystne działanie na komórki nabłonka gruczołowego wyścielającego światło pęcherzyka żółciowego i może w ten sposób predysponować do częstszego występowania chorób nowotworowych. Z tego też względu Srivastava i wsp. [25] podjęli także badania nad związkiem polimorfizmu w genie *CYP7A1* z ryzykiem nowotworu. Badania wykazały, że genotyp CC występował znacznie częściej u pacjentów niż w grupie kontrolnej (23,4% vs. 14,5%; $p = 0,005$). Również częstość allelu C była wyższa w grupie chorych niż u osób zdrowych (48,9% vs. 39,8%; $p = 0,008$). Analiza logistyczna wykazała, że ryzyko nowotworu u osób z genotypem CC jest blisko 3-krotnie wyższe niż u osób z genotypem AC lub AA (OR=2,78). Związek polimorfizmu genu *CYP7A1* z występowaniem raka woreczka żółciowego był silniejszy

w przypadku kobiet oraz osób, u których stwierdzono chorobę w zaawansowanym wieku. Autorzy przypuszczają, że komórki raka mogą się rozwijać wskutek genotoksycznego działania związków powstających podczas peroksydacji lipidów.

Ci sami autorzy analizowali również inny polimorfizm promotora genu *CYP7A1* – polimorfizm -469 T/C [27]. Badania te nie wykazały niezależnego związku polimorfizmu z nowotworem pęcherzyka żółciowego, jednak równoczesna analiza obu polimorfizmów wykazała, że haplotypy C,C oraz C, T predysponują do rozwoju choroby nowotworowej (kolejno $p = 0,0001$, OR=3.10, 95% CI: 1.6-6.0 i $p = 0,045$, OR=1.84, 95% CI: 1.0-3.3).

Kwasy żółciowe w dalszych częściach układu pokarmowego (jelito grube) są przekształcane przez enzymy bakteryjne we wtórne kwasy żółciowe (kwas lithocholowy i dezoksycholowy). Powstają one na drodze utleniania pierwotnych kwasów żółciowych. Droga ta rozpoczyna się od przekształcenia cholesterolu w 7 α -hydroksycholesterol, a dalej w kwas cholowy i wtórne kwasy żółciowe. Uważa się, że z toksycznością wtórnych kwasów żółciowych związana jest patogeneza raka okrężnicy [28]. W związku z tym genotyp *CYP7A1*, wpływając na aktywność 7 α -hydroksylazy cholesterolu, może predysponować do częstszego występowania chorób nowotworowych jelita grubego. Badania Hagiwary i wsp. [29], w których analizowano związek polimorfizmu -204A/C z chorobą, wykazały, że istnieje zależność pomiędzy występowaniem genotypu CC a zmniejszonym ryzykiem zachorowania na raka proksymalnej części okrężnicy (OR= 0.63 95% CI: 0.36-1.10,). Nie stwierdzono takiej zależności w przypadku części dystalnej okrężnicy i odbytnicy. Podobne wyniki uzyskał Tabata i wsp. [30]. Wykazano ochronne działanie genotypu CC przed występowaniem nowotworów w części proksymalnej okrężnicy, lecz nie w części dystalnej i odbytnicy (OR=0.56 ,95% CI: 0.34-0.95). Autorzy obu prac tłumaczą wyniki swoich badań związkiem genotypu CC z mniejszą aktywnością enzymu odpowiedzialnego za syntezę kwasów żółciowych.

Genotyp CC genu *CYP7A1*, determinując niższą aktywność enzymu względem cholesterolu, może decydować o ochronnym działaniu w przypadku raka jelita grubego. Jednak słabsze usuwanie cholesterolu z krwi może z kolei prowadzić do gromadzenia się złogów tego związku w endotelium naczyń krwionośnych,

będąc podstawą do rozwoju chorób miażdżycowych. Hofman i wsp. [19] analizowali wpływ polimorfizmu -204A/C genu *CYP7A1* na rozwój zmian miażdżycowych i wystąpienie klinicznych przypadków choroby naczyń wieńcowych. Wyniki badań prospektywnych na grupie 715 pacjentów pokazały, że polimorfizm genu *CYP7A1* ma związek z ryzykiem pojawienia się nowych przypadków klinicznych tej choroby. U osób posiadających genotyp CC dwukrotnie częściej (OR=1,93 95% CI: 1,11-3,36) stwierdzano epizody choroby wieńcowej w porównaniu do osób posiadających genotyp AA. Genotyp CC okazał się być także długoterminowym markerem pozwalającym przewidzieć możliwy rozwój choroby.

Związek pomiędzy polimorfizmem -204A/C genu *CYP7A1* a zmianami miażdżycowymi stwierdzili również Lambrinoudaki i wsp. [31], badając grupę 84 kobiet w okresie postmenopauzalnym. Wykazali oni istotną statystycznie zależność pomiędzy polimorfizmem -204A/C a występowaniem blaszki miażdżycowej ($p=0,004$) i grubością intima-media tętnicy szyjnej ($p=0,047$). W badaniach populacyjnych grupy 1191 kobiet i 1139 mężczyzn (Couture i wsp. 1999) obserwowano również tendencję do częstszego występowania choroby niedokrwiennej serca u osób z genotypem CC, jednak po uwzględnieniu dodatkowych czynników, takich jak: wiek, BMI, palenie czy wartość ciśnienia krwi, różnica ta nie była istotna statystycznie. Autorzy sugerują, że może to być związane ze stosunkowo niewielką liczbą chorych w badanej przez nich młodej kohorcie.

Analizy związków pomiędzy polimorfizmem genu *CYP7A1* a różnymi chorobami, podobnie jak inne badania pojedynczych wariantów polimorficznych genów kandydatów, często dostarczają niejednoznacznych wyników. Przyczyną może być wieloczynnikowość chorób, która sprawia, że udział pojedynczych czynników genetycznych jest stosunkowo niewielki, a także heterogenność genetyczna, która powoduje, że różne grupy pacjentów mogą posiadać różny zestaw czynników genetycznych i środowiskowych predysponujących do danej choroby. Dlatego warianty polimorficzne silnie związane z chorobą w jednej populacji mogą wykazywać słaby związek u innej. Stąd każdy obraz patologii powinien być rozpatrywany w szerszym ujęciu, uwzględniającym zarówno liczne czynniki genetyczne, jak i środowiskowe.

PODSUMOWANIE

Badania nad wpływem wariantów genetycznych genów kodujących kluczowe białka szlaków usuwających cholesterol z organizmu mogą się przyczynić do ulepszenia metod terapeutycznych stosowanych w wielu chorobach, co pozwoli na dokładniejsze dobranie dawek leków, bez nadmiernego obciążania organizmu ksenobiotykami. Zrozumienie wzajemnego oddziaływania czynników środowiskowych i genetycznych może stanowić o podjętym kierunku leczenia i podejmowanych czynnościach terapeutycznych.

PIŚMIENNICTWO:

1. Russell D.W. The enzymes, regulation and genetics of bile acid synthesis *Annu Rev Biochem.* 2003;72:137-74.
2. Björkhem I., Wikvall K., Araya Z., Rudling M., Angelin B., Einarsson C. Differences in the Regulation of the Classical and the Alternative Pathway for Bile Acid Synthesis in Human Liver. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 30:26804- 26807.
3. Ogishima T., Deguchi S., Okuda K. Purification and characterization of cholesterol 7 α -hydroxylase from rat liver microsomes: *J. Biol. Chem.* 1987; 262:16 7646- 7650
4. Nakayama K., Puchkaev K., Pikuleva I. Membrane Winding and substrate access merge in cytochrome p450 7A, a key enzyme in degradation of cholesterol *J. Biol. Chem.* 2001; 17,276(33):31459-65.
5. Pikuleva I. Cholesterol- metabolizing cytochromes p450 *Drug Metabolism and Disposition* 2006; 34:513- 520.
6. Noshiro M., Okuda K. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human cholesterol 7 α -hydroxylase *FEBS Lett.* 1990; 268(1):137-40.
7. Chiang J.Y.L. Bile acids: regulation and synthesis; *J. Lipid Res.* 2009; 50: 1955-1966.
8. Li T., Chiang J.Y.L. Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs; *PPAR Res.* vol. 2009; ID- 501739.
9. Li T., Chiang J.Y. Mechanism of Rifampicin and Pregnane X Receptor (PXR) inhibition of Human Cholesterol 7 α -Hydroxylase *Gene Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2004; 288:G74- G84.
10. Miao J.S., Fang S., Bae Y., Kemper J.K. Functional inhibitory crosstalk between car and HNF-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR-1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1 α . *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 14537-14546.
11. Davis R., Miyake J.H., Hui T.Y., Spann N.J. Regulation of cholesterol-7 α -hydroxylase: BAREly missing SHP; *J. Lipid Res.* 2002; 43: 533- 543.
12. Li T., Jahan., A, Chiang J.Y.L. Bile acids and cytokines inhibit the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene via the JNK/c-jun pathway in human liver cells: *Hepatology* 2006; 43: 1202- 1210.
13. Holt J.A., Luo G., Billin A.N., Bisi J., McNeill Y.Y., Kozarsky K.F., Donahee M., Wang D.Y., Mansfield T.A., Kliewer S.A., Goodwin B., Jones S.A. Definition of novel growth factor- dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis: *Gen. Develop.* 2003; 17: 1581- 1591.
14. Nakamoto K., Wang S., Jenison R.D., Guo G.L., Klaassen C.D., Wan Y-J Y., Zhong X-b Linkage disequilibrium blocks, hap-

- lotype structure, and htSNPs of human CYP7A1 gene *BMC Genet.* 2006; 7:29.
15. Abrahamsson A., Krapivner S., Gustafsson U., Muhrbeck O., Eggertsen G., Johansson I., Persson I., Angelin B., Ingelman-Sundberg M., Björhem I., Einarsson C., van't Hooft F.M. Common polymorphisms in the CYP7A1 gene do not contribute to variation in the rates of the bile acids synthesis and plasma LDL cholesterol concentration *Atherosclerosis* 2005; 182:37-45.
 16. Leniček M., Komárek V., Zimolová M., Kovař J., Jirsa M., Lukaš M., Vitek L. CYP7A1 promoter polymorphism -203A/C affects bile salt synthesis rate in the patients after ileal dissection *J. Lipid Res.* 2008; 49(12):2664-7.
 17. Pullinger C., Eng C., Salen G., Shefer S., Batta A.K., Erickson S.K., Verhagen A.G., Rivera C.R., Mulvihill S.J., Malloy M.J., Kane J.P. Human 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype *J. Clin. Invest.* 2002; 110:109-117.
 18. Couture P., Otvos J.D., Cupples A., Wilson P.W.F., Schaefer E.J., Ordovas J.M. Association of the A-204C cholesterol 7 α -hydroxylase gene with variations in plasma low density lipoprotein cholesterol levels in the Framingham Offspring Study *J. Lipid Res.* 1999 40: 1883- 1889.
 19. Hofman M., Princen H. M. G., Zwinderman A. H., Jukemans W. Genetic variation in the rate limiting enzyme in cholesterol catabolism (cholesterol 7 α -hydroxylase) influences the progression of atherosclerosis and risk of new clinical events; *Clin. Sci.* 2005; 108; 539- 545.
 20. Kovař J., Suchanek P., Hubáček J.A., Poledne R. The A-204C polymorphism in the cholesterol 7 α -hydroxylase determines in cholesterolemia responsiveness to a high-fat diet *Physiol. Res.* 2004; 53(5):565-8.
 21. Barcelos A.L.V., Chies R., Almeida S.E.M., Fiegenbaum M., Schweigert ID., Chula F.G.L., Rosetti M.L., Silva C.M.D. Association of CYP7A1 -278A>C polymorphism and the response of plasma triglyceride after dietary intervention in dyslipidemic patients *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2009; 42: 487- 493.
 22. Hubáček J.A., Pistulková H., Skodová Z., Lánská V., Poledne R. Polymorphism in the regulatory part of cholesterol 7 α -hydroxylase gene in the children with high and low levels of cholesterol *Cas. Lek. Cesk.* 2003;142(7):423-6.
 23. Jiang Z.Y., Han T.Q., Suo G.J., Feng D.X., Chen S., Cai X.X., Jiang Z.H., Shang J., Zhang Y., Jiang Y., Zhang S.D. Polymorphisms at cholesterol 7 α -hydroxylase, apolipoproteins B and E and low density lipoprotein receptor genes in patients with gallbladder stone disease; *World J. Gastroenterol.* 2004; 10(10):1508-1512.
 24. Juzyszyn Z., Kurzawski M., Lener A., Modrzejewski A., Pawlik A., Drożdżik M. Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) c.-278A>C promoter polymorphism in gallstone disease patients *Genet. Test.* 2008; 12(1):97-100.
 25. Srivastava A., Pandey S.N., Choudhuri G., Mittala B. Role of genetic variant A-204C of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) in susceptibility to gallbladder cancer. *Mol Genet. Metab.* 2008; 94(1):83-9.
 26. Misra S., Chaturvedi A., Misra N.C. and I.D. Sharma, Carcinoma of the gallbladder, *Lancet Oncol* 2003; 4: 167–176.
 27. Srivastava A., Choudhuri G., Mittala B. CYP7A1 (-204 A>C; rs3808607 and -469 T>C; rs3824260) promoter polymorphisms and risk of gallbladder cancer in North Indian population; *Metabolism* 14 December 2009.
 28. Milovic V., Teller I.C., Faust D., Caspary W.F., Stein J. Effects of deoxycholate on human colon cancer cells: apoptosis or proliferation. *Eur. J. Clin. Invest.* 2002; 32:29–34.
 29. Hagiwara T., Kono S., Yin G., Toyomura K., Nagano J., Mizoue T., Mibu R., Tanaka M., Kakeji Y., Maehara Y., Okamura T., Ikejiri K., Futami K., Yasunami Y., Maekawa T., Takenaka K., Ichimiya H., Imaizumi N., Genetic Polymorphism in Cytochrome P450 7A1 and Risk of Colorectal Cancer: The Fukuoka Colorectal Cancer Study; *Cancer Res.* 2005; 65(7): 2979-82.
 30. Tabata S., Yin G., Ogawa S., Yamaguchi K., Mineshita M., Kono S. Genetic polymorphism of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) and colorectal adenomas: Self Defense Forces Health Study; *Cancer Sci.* 2006; 97(5):406-10.
 31. Lambrinou I.V., Kaparos G.I., Vlachou S.A., Stamatelopoulou K.S., Georgiopoulos G.A., Sergentanis T.N., Panoulis C.P., Christodoulakos G.E., Alexandrou A.P., Kouskouni E.E., Creata M.G., Papamichael C.M. CYP A-204C polymorphism is associated with subclinical atherosclerosis in postmenopausal women *Menopause* 2008; 5(6):1163-8.