

BOŻENA WIECZOREK i JADWIGA GNIOT-SZULŻYCKA

Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Gagarina 7, 87-100 Toruń
e-mail: jgsz@biol.uni.torun.pl

HMG-CoA REDUKTAZA — KLUCZOWY ENZYM W BIOSYNTEZIE IZOPRENOIDÓW I CHOLESTEROLU

WSTĘP

Cholesterol jest związkiem nieodzownym dla prawidłowej czynności komórek eukariotycznych. Jako składnik błon biologicznych uczestniczy w regulacji ich struktury i funkcji poprzez wpływ na aktywność wielu enzymów błonowych oraz decyduje o ich płynności i przepuszczalności. Cholesterol jest ponadto prekursorem wszystkich innych steroidów, takich jak: hormony steroidowe, witamina D, kwasy żółciowe. Transport cholesterolu zachodzi z udziałem lipoprotein osocza krwi (VLDL, LDL, HDL). W ostatnich latach wykazano również, iż cholesterol odgrywa bardzo istotną i ważną rolę w prawidłowej embriogenezie (FARESE i HERZ 1998). Szczególna rola cholesterolu związana jest z tworzeniem struktur i utrzymaniem prawidłowej funkcji centralnego układu nerwowego (WEHR 1980, BROWN i GOLDSTEIN 1986, MOTULSKY 1986, RUSSELL 1992, HINSON i współaut. 1997, LAUFSA i współaut. 1997a,b, BELLOSTA i współaut. 1998, FARESE i HERZ 1998, FU i współaut. 1998).

Cholesterol komórek eukariotycznych pochodzi z dwóch źródeł, a mianowicie z wewnątrzkomórkowej syntezy *de novo* oraz cholesterolu dostarczonego z zewnątrz drogą endocytozy. Włączanie i rozprowadzanie cholesterolu zachodzi z udziałem lipoprotein (LDL) osocza.

U człowieka synteza *de novo* wynosi 700–800 mg dziennie. Z pożywieniem dostarczane jest przeciętnie 300–500 mg cholesterolu dziennie. Jego dzienny metaboliczny obrót jest następujący: 400 mg przekształcane jest w kwasy żółciowe, 50 mg w hormony steroidowe i włączane w błony podczas czynnego podziału komórki, 600 mg jest wydalane. W większości komórek ssaków zachodzi endogenna synteza cholesterolu, niemniej jednak głównym miejscem jego syntezy są: wątroba, jelito i mięśnie szkieletowe (SZNAJDERMAN i MICHAJLIK 1979, RUSSELL 1992, LOIRDIGHI i współaut. 1997, FARESE i HERZ 1998, ACCAD i FARESE 1998).

Każda komórka organizmu człowieka i kręgowców dysponuje szeregiem mechanizmów dla utrzymania homeostazy wewnątrzkomórkowego stężenia cholesterolu. Z uwagi na zmienną dostawę cholesterolu z zewnątrz, wynikającą z różnego spożycia cholesterolu w diecie, system syntezy *de novo* w komórce podlega precyzyjnej regulacji przez układ sprzężeń zwrotnych na poziomie transkrypcji, translacji i bezpośredniej regulacji aktywności kluczowych enzymów szlaku biosyntezy. Proces włączania endogennego cholesterolu dodatkowo podlega regulacji poprzez wpływ na syntezę białek receptorowych, system białek zaangażowa-

Stosowane skróty: AA — kwas askorbinowy, CHO — komórki jajnika chomików chińskich, DHA — kwas dehydroaskorbinowy, ER — retikulum endoplazmatyczne, HDL — lipoproteiny o dużej gęstości, LDL — lipoproteiny o małej gęstości, MDH — kwas monodehydroaskorbinowy, NADP⁺ — fosforan dinukleotydu nikotynamindoadeninowego, forma utleniona, NADPH — fosforan dinukleotydu nikotynamindoadeninowego, forma zredukowana, NOS — syntaza tlenu azotu, reduktaza HMG-CoA - reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA, SCAP — białko aktywujące proteolityczne rozszczepienie SREBP (SREBP cleavage activating protein), SRE — element regulatorowy wrażliwy na sterol (sterol regulatory element), SREBPs — białka wiążące się z SRE (sterol regulatory element binding protein), VLDL — lipoproteiny o bardzo małej gęstości.

nych w proces transportu oraz endocytozy (WEHR 1980, MOTULSKY 1986, BROWN i GOLDSTEIN 1986, FIELDING i FIELDING 1997).

Wielorakość oddziaływań cholesterolu na funkcję komórek organizmów zwierzęcych w warunkach nieprawidłowej homeostazy prowadzi do szeregu schorzeń, w szczególności do dysfunkcji systemu naczyniowego, nieprawidłowego wydalania żółci, zaburzeń embriogene-

zy, nieprawidłowej proliferacji komórek (nowotwory), zaburzeń w funkcji układu nerwowego (choroba Niemann-Picka, Alzheimer, psycho-patie i choroby depresyjne) (RUDLING i współaut. 1997, SAKAI i współaut. 1997, YASUNOBU i współaut. 1997, BUCHER i współaut. 1998, GRIFFIN i współaut. 1998, HERNANDEZ-PERERA i współaut. 1998, WOOD i współaut. 1999).

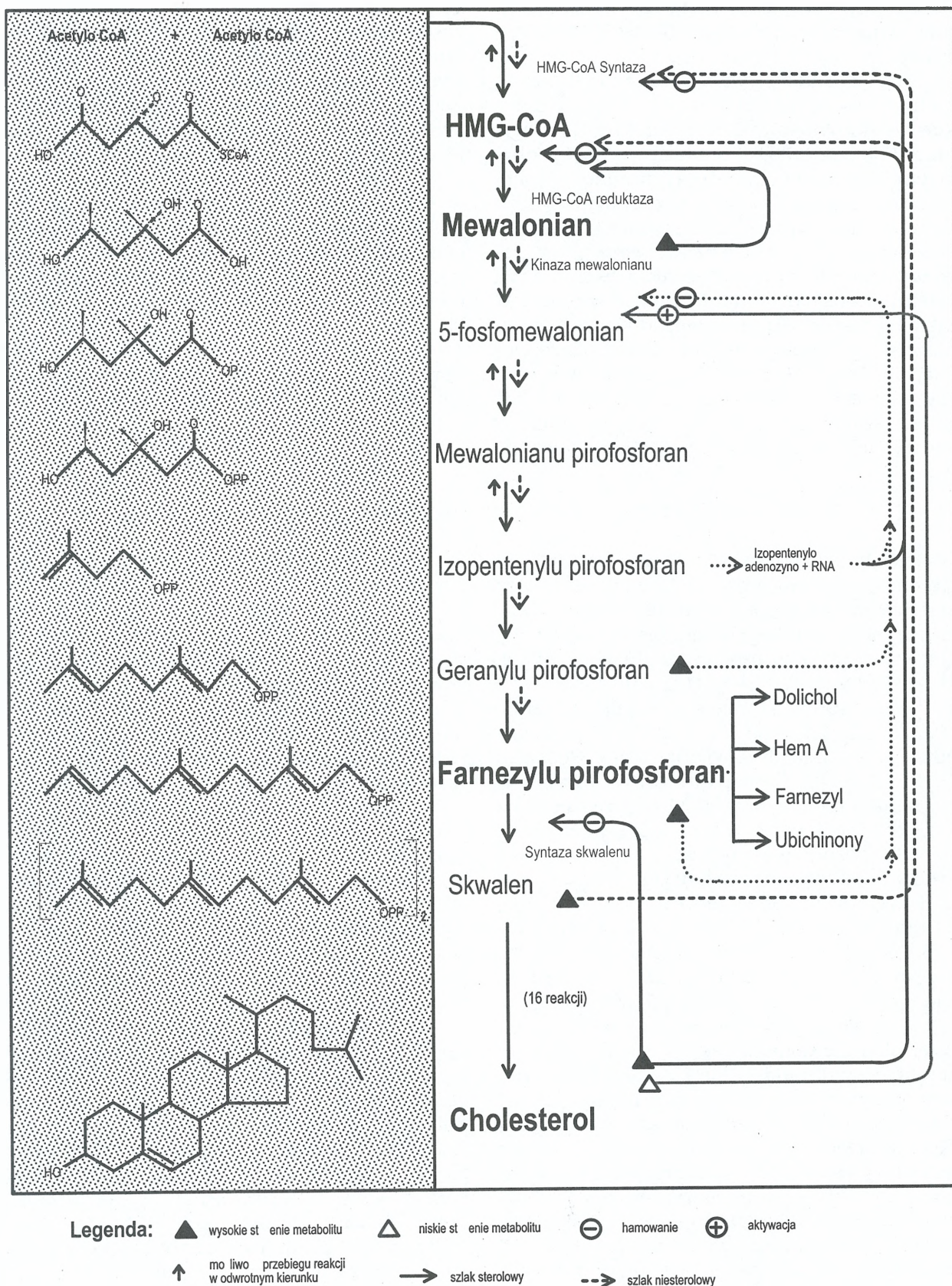
BIOSYNTeza CHOLESTEROLU

Synteza cholesterolu (Schemat 1) odbywa się w siateczce śródplazmatycznej i cytosolu komórki. Substratem wyjściowym jest acetylo-CoA. Reakcję biosyntezy zapoczątkowuje enzym cytozolowy — tiolaza, kondensacją dwóch cząsteczek acetylo-CoA z utworzeniem acetoacetylo-CoA. W wyniku kondensacji acetoacetylo-CoA z kolejną cząsteczką acetylo-CoA katalizowaną przez syntazę 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (syntaza HMG-CoA), powstaje 3-hydroksy-3-metylo-glutarylo-CoA (HMG-CoA). HMG-CoA jest przekształcany w dwuetapowej reakcji redukcji z udziałem NADPH i mikrosomalnego enzymu reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (reduktaza HMG-CoA). Reakcja ta, której produktem jest mawalonian, podlega wielorakiej kontroli poprzez układ sprzężeń zwrotnych, jak również poprzez modyfikację kowalencyjną. Mawalonian podlega procesowi fosforylacji, w wyniku czego powstaje kilka aktywnych związków pośrednich, jak: 5-fosforan mawalonianu, 5-pirofosforan mawalonianu i 3-fosfo-5-pirofosforan mawalonianu. Etapy fosforylacji katalizowane są przez kinazy: mawalonianową i fosfomawalonianową. W kolejnej reakcji dekarboksylacji mawalonianu, katalizowanej przez dekarboksylazę pirofosfomawalonianową, powstaje aktywna jednostka izoprenoidowa — izopentenylopirofosforan (IPP). Następnie zachodzi izomeryzacja izopentenylopirofosforanu przez izomerazę izopentenylo-pirofosforanową, w czasie której dochodzi do przesunięcia wiązania podwójnego i wytworzenia pirofosforanu dimetyloalilu. Pirofosforan dimetyloalilu kondensuje z drugą cząsteczką izopentenylopirofosforanu i powstaje 10-węglowy związek pośredni — pirofosforan geranylu (GPP). Reakcję katalizuje *cis*-prenylotransferaza. Następuje kolejna kondensacja z izopentenylopirofosforanem (IPP) prowadząca do powstania pirofosforanu farnezyli (FPP). Po wytworzeniu pirofosforanu farnezyli (FPP) izoprenoidowa droga biosyntezy rozgałęzia się na szlak syntezy związków steroidowych oraz *trans*- i *cis*-izoprenoidowych.

W szlaku steroidowym, w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek FPP przy końcu pirofosforanowym, powstaje związek 30-węglowy — skwalen. Reakcję katalizuje enzym siateczki śródplazmatycznej — syntaza skwalenu. Kolejna reakcja cyklizacji katalizowana jest przez lanosterocyklazę 2,3-oksydoskwalenową, grupa metylowa przy C₁₄ zostaje przeniesiona do C₁₃, a grupa metylowa z C₈ do C₁₄ i powstaje lanosterol. Przekształcenie lanosterolu w cholesterol (16 reakcji) zachodzi również w błonach siateczki śródplazmatycznej i obejmuje zmiany w pierścieniu steroidowym oraz w łańcuchu bocznym. Pośrednimi związkami są między innymi: zymosterol i desmosterol. Końcową reakcją w syntezie cholesterolu jest redukcja podwójnego wiązania w łańcuchu bocznym (SZNAJDERMAN i MICHAJLIK 1979, ASHBY i EDWARDS 1989, RUSSELL 1992, TANAKA i współaut. 1990, STRYER 1997, BISHOP i współaut. 1998, HENCK i współaut. 1998, HONDA i współaut. 1998a, b, LOPEZ i współaut. 1998).

Przedstawiony w uproszczeniu szlak biosyntezy cholesterolu w tkankach zwierząt, poza syntezą sterolowego produktu końcowego w szlaku steroidowym, dostarcza również nieodzownych związków dla prawidłowego funkcjonowania komórki w szlaku przemian niesteroidowych. Produktami przemian szlaku niesteroidowego są: dolichol, łańcuchy izoprenowe dla syntezy hemu A i ubichinonów, farnezyli i geranyli oraz izopentenylo-adenozyno-tRNA.

U roślin, niezależnie od biosyntezy izoprenoidów i steroli drogą mawalonianową (JANISZOWSKA 1972, TUROWSKA 1972, ŚLIWOWSKI 1974, CZERPAK 1993, BAJGUZ i CZERPAK 1995), funkcjonuje niedawno wykryty szlak biosyntezy niezależny od mawalonianu. Substratami wyjściowymi w procesach biosyntezy izoprenoidów są: produkt dekarboksylacji kwasu pirogronowego — hydroksyetylopirofosforan tiaminy i aldehyd 3-fosfoglicerynowy, które w kolejnych reakcjach ulegają przekształceniu w izopentenylopirofosforan (RAEDERSTORFF i ROHMER 1998, ROHMER i współaut. 1993, SCHWENDER i



Schemat 1. Biosynteza i przemiany mewalonianu — z oznaczeniem ważniejszych układów regulacyjnych przez sprzężenie zwrotne.

współaut. 1996). Szlak ten po raz pierwszy został wykryty i opisany przez Rohmera i współpracowników w 1988 roku (FLESCH i ROHMER 1988).

Z badań nad wpływem poziomu LDL osocza na homeostazę cholesterolu w hodowlach tkankowych fibroblastów szczurzych i ludzkich wynika, iż o prawidłowej syntezie związków obydwu dróg przemian decydują kumulatywne mechanizmy regulacyjne aktywności syntazy i reduktazy mewalonianu realizowane z udziałem cholesterolu LDL i cholesterolu syntetyzowanego *de novo*, jak również stężenie mewalonianu i produktów jego przemian. Przykładowo związki takie jak: farnesylu pirofosforan i izopentenylu pirofosforan hamują aktywność kinazy mewalonianu. Cholesterol LDL hamuje również syntazę skwalenu, aktywność jej jednak nie jest zahamowana całkowicie i enzym, działając w warunkach niepełnego wysycenia, zapewnia

syntezę cholesterolu dla prawidłowego przebiegu syntezy hormonów steroidowych, dla odnowy i budowy struktur błonowych komórki. Poza tym, wyższe powinowactwo enzymów kluczowych w szlaku niesteroidowym do farnesylu pirofosforanu zapewnia stały dopływ związków syntetyzowanych szlakami niesteroidowymi. Mechanizmy regulacji aktywności reduktazy i innych enzymów szlaku przemian mewalonianu polegają na bezpośredniej modulacji aktywności enzymów poprzez modyfikację kowalencyjną polegającą na fosforylacji i defosforylacji, jak i efekty allosteryczne, a także na drodze oddziaływań na procesy transkrypcji i translacji.

Różnorodny wpływ czynników na aktywność kluczowego enzymu przemian mewalonianu, reduktazy HMG-CoA przedstawiony zostanie w następnym rozdziale.

BUDOWA REDUKTAZY 3-HYDROKSY-3-METYLOGLUTARYLO KOENZYMU A

Reduktaza HMG-CoA (EC 1. 1. 1. 34) jest glikoproteiną związaną z błonami retikulum endoplazmatycznego. Enzym ten odgrywa kluczową rolę w regulacji tempa biosyntezy cholesterolu i związków izoprenoidowych (WEHR 1980, ROITELMAN i SHECHTER 1984, LISCUM i współaut. 1985, EDWARDS i współaut. 1985, LUSKEY i STEVENS 1985, PEFFLEY i SINENSKY 1985, WOODWARD i współaut. 1988, RUSSELL 1992, LOIRDIGHI i współaut. 1997). Jak do tej pory, tylko rodopsyna i HMG-CoA reduktaza z komórek jajnika chomika są glikoproteinami z w pełni poznaną strukturą pierwszorzędową (cyt. za WOODWARD i współaut. 1988).

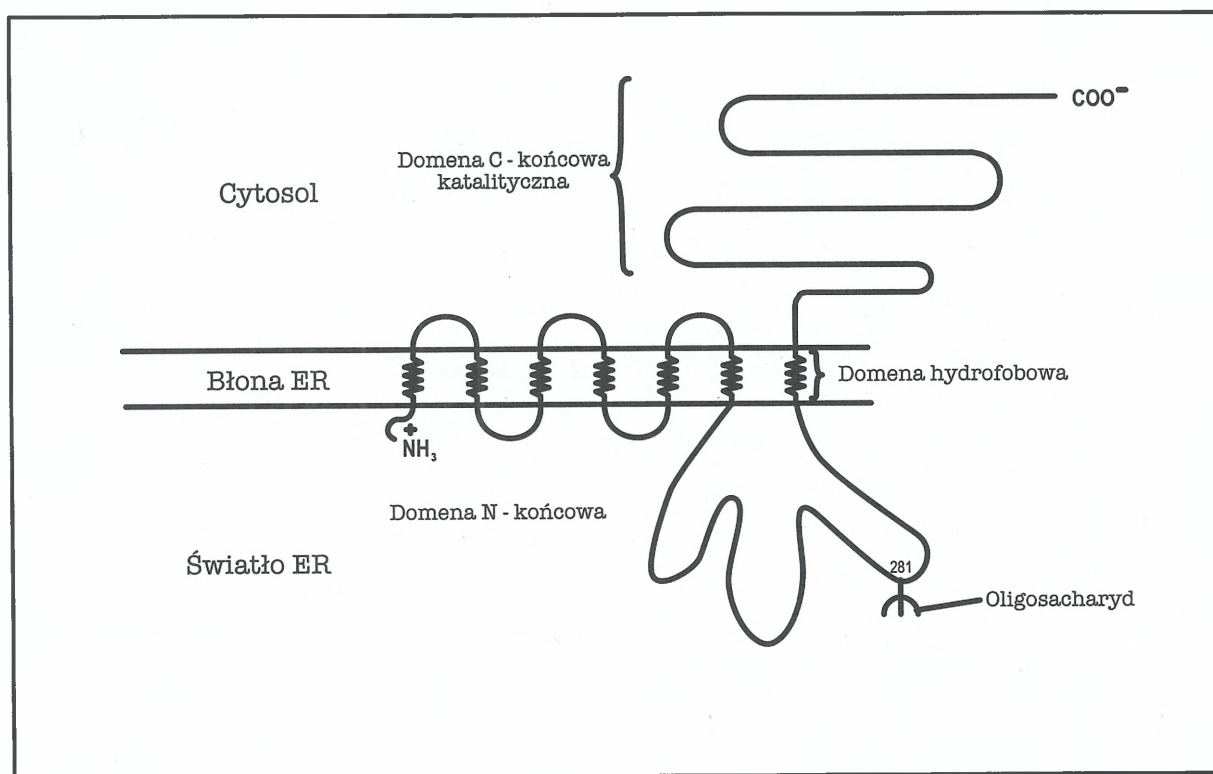
Enzym z komórek jajnika chomika (CHO) (LISCUM i współaut. 1985, EDWARDS i współaut. 1985) składa się z 888 aminokwasów. Domena N-terminalna części luminarnej retikulum endoplazmatycznego łączy się z hydrofilną, cytozolową siedmioma pętlami transbłonowymi. C-terminalna domena (450–888) z regionem katalitycznym znajduje się w cytozolu komórki. Obie domeny łączy region łącznikowy (linker) składający się z 110 aminokwasów (340–449) (Ryc. 1 przedstawia schematycznie strukturę reduktazy HMG-CoA). Masa cząsteczkowa enzymu wynosi 97 kDa. Enzymatyczną aktywność wykazuje również fragment reduktazy o masie 62 kDa, który może być uwolniony z błon retikulum endoplazmatycznego przez endogenne proteazy. Dalsze trawienie egzogennymi proteazami prowadzi do wytworzenia rozpuszczalnego fragmentu o masie 53 kDa, bez utraty aktywności enzymatycznej. Enzym jest glikozy-

lowany w N-terminalnym fragmencie na 281 asparaginie.

Badania sekwencji cDNA u innych gatunków zwierząt i u człowieka sugerują, że struktura obu domen — błonowej i cytoplazmatycznej jest wysoce konserwatywna.

Ludzka reduktaza wyizolowana z nadnerczy płodu (LUSKEY i STEVENS 1985) zbudowana jest również z 888 aminokwasów. N-końcowa domena błonowa wykazuje 69% homologii z chemicznym enzymem i pośredniczy w regulacji degradacji enzymu w obecności steroli. Katalityczna domena C-końcowa jest również wysoce konserwatywna i wykazuje 61% homologii z odpowiednią partią chemicznego enzymu. Odcinek łącznikowy cechują większe różnice i najniższy stopień homologii — 51%. N-glikozylowana jest podobnie jak HMG-CoA reduktaza jajników chomika na 281 asparaginie.

Reduktaza HMG-CoA oocytów jeźowca (WOODWARD i współaut. 1988) zbudowana jest natomiast z 932 aminokwasów. N-terminalny odcinek błonowy (1–340), silnie hydrofobowy, jest połączony z odcinkiem cytoplazmatycznym (537–932, 395 reszt aminokwasowych) hydrofilnym linkerem (341–536, 196 reszt aminokwasowych). N-terminalna i C-terminalna część wykazują odpowiednio 61% i 65% homologii z odpowiednimi partiami reduktazy chomika. Dla domeny linkera stopień homologii wynosi 30%; część ta wykazuje najwyższą hydrofilność i jest bogata w sekwencje PEST, co czyni enzym bardzo podatnym na działanie proteaz. HMG-CoA reduktaza oocytów jeźowca zawiera



Ryc. 1. Schematyczna struktura reduktazy HMG-CoA (według LISKUMA i współaut. 1985).

trzy potencjalne miejsca N-glikozylacji w regionie C-terminalnym w pozycji 850, 886 i 930 oraz jedną na asparaginie odcinka N-terminalnego w pozycji 279 (WOODWARD i współaut. 1988). Reszta glikozylowa we wszystkich HMG-reduktazach zwrócona jest do światła błon retikulum endoplazmatycznego.

Okres półtrwania HMG-reduktazy związanej ze strukturą błon wynosi 2–4 godziny. Enzym strukturalnie związany z błonami jest wrażliwy na regulacyjne oddziaływanie steroli i na procesy jego degradacji. Według badań GIL i współaut. (1985) enzym(y) proteolitycznie zdegradowany i uwolniony do cytozolu, o masie

cząsteczkowej 60 kDa, wykazuje przedłużony okres półtrwania wynoszący 24 godziny i nie jest już podatny na dalszą proteolizę. Z procesami degradacji związana jest również zmniejszona transkrypcja mRNA HMG-CoA reduktazy (LUSKEY i STEVENS 1985). Według EDWARDSA i współpr. (1985) funkcjonalny i strukturalnie związany z błonami enzym reduktazy HMG-CoA z wątroby szczura jest dimerem o masie cząsteczkowej 204 kDa.

Homologie w budowie HMG-CoA reduktazy z komórek jajnika chomika, nadnerczy płodu człowieka i oocytów jeżowca przedstawiono na Ryc. 2.

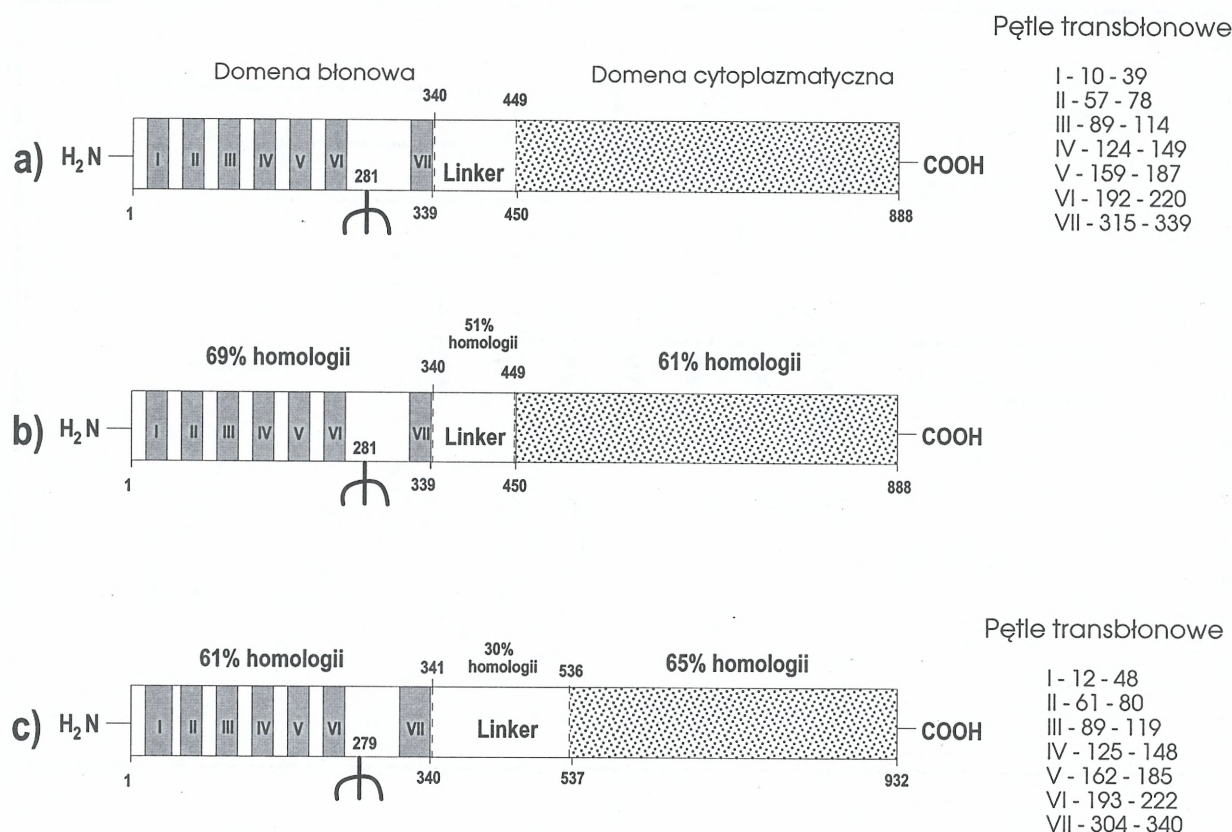
MECHANIZMY REGULACJI AKTYWNOŚCI REDUKTAZY HMG-CoA

Reduktaza HMG-CoA jest centralnym punktem kontroli biosyntezy cholesterolu i podlega regulacji na poziomie: transkrypcji genu reduktazy, stabilności mRNA reduktazy, translacji i degradacji białka reduktazy. Aktywność enzymu jest regulowana również (cyt. za RUSSELL 1992, LOPEZ i współaut. 1997) płynnością błon retikulum endoplazmatycznego. Modulacja aktywności białka enzymatycznego zachodzi z udziałem systemu hormonalnego (w tym cykl zmian aktywności dobowej) oraz poprzez modyfikację konformacji enzymu (efekty allosterycz-

ne) przez końcowy produkt przemian mewalanianu — cholesterol metabolity pośrednie. Enzym pozostaje również pod kontrolą statusu oksydacyjno-redukcyjnego komórki i aktywności enzymów proteolitycznych.

Zbiórny obraz mechanizmów regulacyjnych przedstawiono na Ryc. 3.

Hormonalny układ regulacyjny związany jest z cAMP-zależną modyfikacją kowalencyjną przez fosforylację i defosforylację. Formą aktywną enzymu jest nieufosforylowane białko enzymatyczne, nieaktywną jest enzym ufosforylowa-



Ryc. 2. Homologie w budowie reduktazy-3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA

a) chomik (komórki jajnika) (według LISCUMA i współaut. 1985, EDWARDSA i współaut. 1985), b) człowiek (nadnercza płodu) (według LISKEYA i STEVENSA 1985), c) jeżowiec (oocyty) (według WOODWARDA i współaut. 1988).

ny. Aktywacji i inaktywacji przez cAMP -zależną fosforylację podlega również fosfokinaza aktywująca fosforylację HMG-CoA reduktazy (RUSSELL 1992, GRIFFIN i współaut. 1998).

Pierwsze doniesienia o mechanizmach regulacji aktywności enzymu poprzez modyfikację kowalencyjną fosforylacji pochodzą z przełomu lat 70. i 80. (BROWN i współaut. 1975, 1978, 1979; BROWN i GOLDSTEIN 1980).

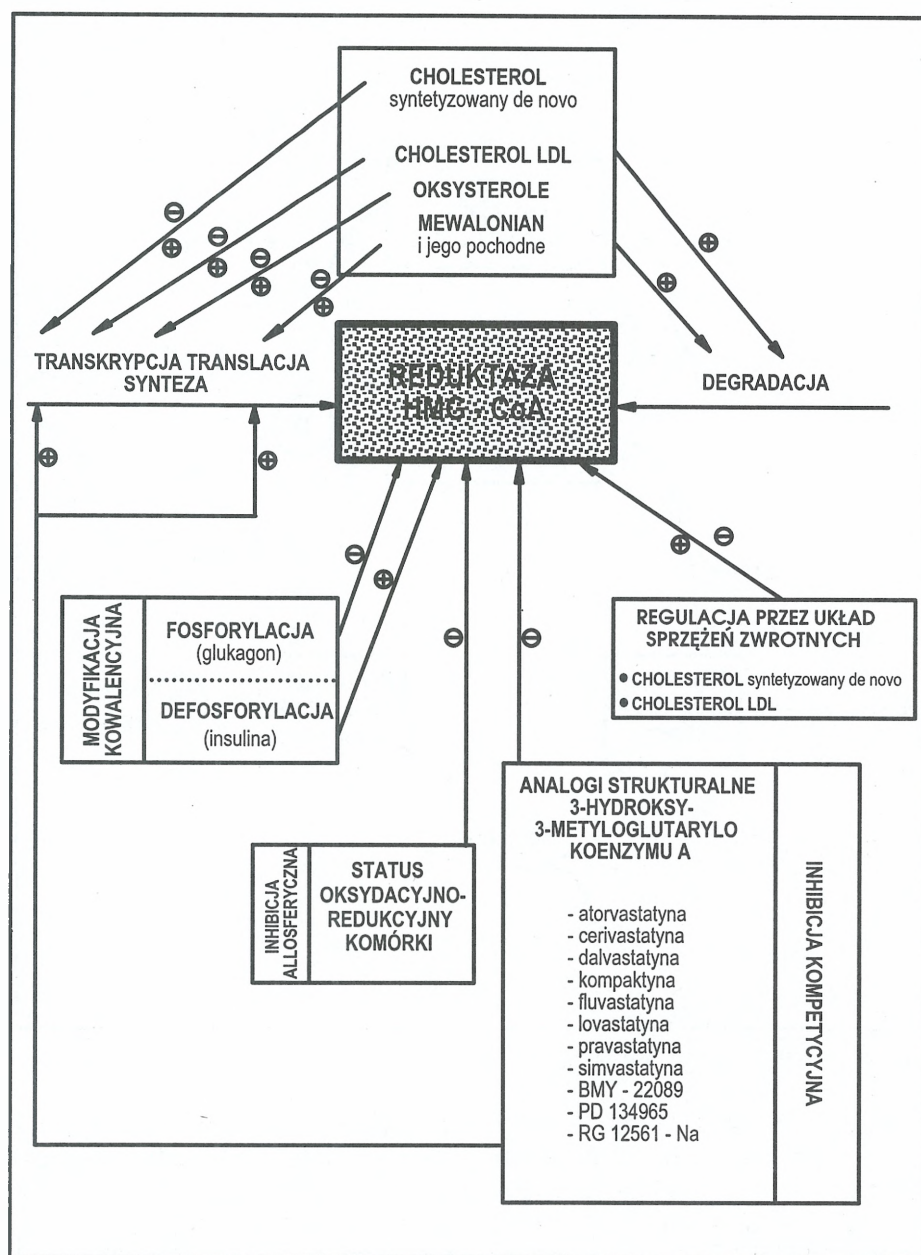
Ryc. 4 przedstawia mechanizm fosforylacji i defosforylacji kinazy reduktazy HMG-CoA i reduktazy HMG-CoA. Hormonami wpływającymi na aktywność enzymu są insulina, glukagon i glukokortykoidy.

Na aktywność enzymu wpływa również status oksydacyjno-redukcyjny komórki. Enzym wyizolowany z mikrosomów kultur komórek limfatycznych lub świeżych leukocytów jest silnie hamowany przez kwas askorbinowy (AA) i jego utlenioną pochodną — kwas dehydroaskorbinowy (DHA). Najprawdopodobniej aktywną formą odpowiedzialną za inhibicję reduktazy HMG-CoA jest kwas monodehydroaskorbinowy (MDH). Inhibicja reduktazy zachodzi przy fizjologicznych stężeniach kwasu askorbinowego i dehydroaskorbinowego (0,2–1,72 mM), co świadczy, że związki te mogą

odgrywać ważną rolę w regulacji endogennej syntezy cholesterolu (HARWOOD i współaut. 1986). Ogólnie wiadomo, że niedobór askorbinianu powoduje wzrost stężenia cholesterolu w surowicy i wątrobie poprzez obniżenie katabolizmu cholesterolu w szlaku przemian prowadzących do syntezy kwasów żółciowych (SZNAJDERMAN i MICHAJLIK 1979).

U człowieka wysokie dawki witaminy C (500–4000 mg dziennie) obniżają stężenie cholesterolu i lipoprotein o małej gęstości (LDL) u osób chorych na hypercholesterolemię (HARWOOD i współaut. 1986). Według prac Hayski i współpracowników oraz Finamore i współpracowników, które ukazały się w latach 1974–1977, obniżenie poziomu cholesterolu w surowicy królików zachodzi również po podaniu w diecie 2-wodorosiarczany kwasu askorbinowego (cyt. za GNIOT-SZULŻYCKA 1982).

Wpływ monodehydroaskorbinianu na aktywność reduktazy HMG-CoA można wyjaśnić tym, że askorbinian i dehydroaskorbinian są kompetycyjnymi inhibitorami enzymów mikrosomalnych wykorzystujących w procesach redukcyjnych NADPH (HARWOOD i współaut. 1986). Reduktaza HMG-CoA wątroby szczura jest allosterycznie hamowana przez utworzenie



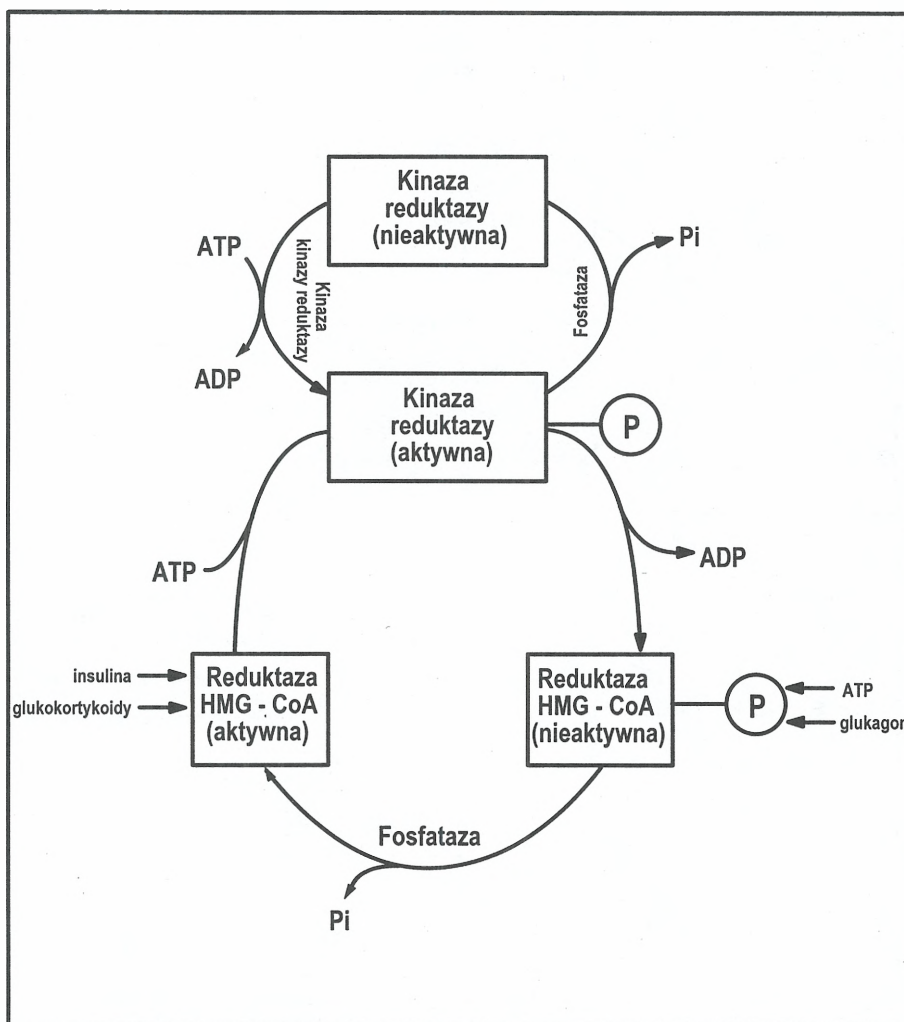
Ryc. 3. Typy regulacji aktywności reduktazy HMG-CoA poprzez wpływ na transkrypcję, translację, trwałość oraz modyfikację białka enzymatycznego.

mostków disulfidowych pomiędzy grupami hydrosulfidowymi enzymu, co wywołuje efekt allosteryczny ze zmianą konformacji enzymu i kinetyki na typ sigmoidalny względem NADPH. Redukcja mostków disulfidowych przez fizjologiczne stężenia glutationu lub ditiotreitolu powoduje reaktywację enzymu przez zmianę kinetyki na hiperboliczną względem NADPH.

W konwersji dehydroaskorbinianu do monodehydroaskorbinianu uczestniczy glutation, stąd mechanizmy regulacji stężenia glutationu w formie utlenionej i zredukowanej oraz stosunek NADPH/ NADP są włączone również w procesy modulacji aktywności reduktazy HMG-CoA i biosyntezy cholesterolu (ROTELMAN i SHECHTER 1984, HARWOOD i współaut. 1986).

Estrogeny i ich syntetyczne pochodne (stilbestrol, *trans*-stilben) obniżają poziom cholesterolu w surowicy krwi i aktywność reduktazy HMG-CoA w wątrobie szczurów. Efekt ten jest prawdopodobnie spowodowany wzmocnieniem transportu cholesterolu z osocza do wątroby za pośrednictwem receptora LDL. Cholesterol uwolniony z lipoprotein LDL zahamowuje reduktazę HMG-CoA i wątrobową steroidogenezę (BROWN i GOLDSTEIN 1986, BOGUSŁAWSKI i ŁAPKOWSKA 1990, ŁAPKOWSKA i BOGUSŁAWSKI 1997).

Najlichniesza grupa prac z ostatnich lat dotyczy badań nad regulacją aktywności reduktazy HMG-CoA i leczenia hypercholesterolemii, hyperlipidemii oraz arteriosklerozy (ALAUPOVIC i współaut. 1997, BISGAIER i współaut.



Ryc. 4. Regulacja reduktazy HMG-CoA przez procesy fosforylacji i defosforylacji.

1997, BISHOFF i współaut. 1997, HUFF i BURNET 1997, JOHNSTON i PALMER 1997a,b, MURAMATSU i współaut. 1997, NAOUMOVA i współaut. 1997, OOI i współaut. 1997, SAKAI i współaut. 1997, YASUNOBU i współaut. 1997, BELLOSTA i współaut. 1998, BERGLUND i współaut. 1998, BOCAN i współaut. 1998, BUCHER i współaut. 1998). Od dawna wiadomo, że obniżenie poziomu cholesterolu w surowicy krwi ludzi zmniejsza ryzyko zachorowalności na chorobę wieńcową, miażdżycę naczyń i udar mózgu.

Regulacyjna rola cholesterolu będącego produktem przemian mewalonianu znana jest już od sześćdziesięciu lat. W 1933 roku Schoenheimer wraz z współpracownikami (SCHOENHEIMER i BREUSCH 1933), po raz pierwszy wykazali, że synteza cholesterolu zwiększa się u myszy karmionych dietą niskocholesterolową. Następnie w latach 50. GOULD i współaut. (1953) wykazali, iż inkorporacja [^{14}C] octanu przez skrawki pobrane z tkanek psów i królików zmniejsza się do 2% w stosunku do wartości kontrolnych, po suplementacji diety zwierząt cholesterollem.

System zahamowania aktywności enzymatycznej HMG-CoA reduktazy przez końcowy produkt szlaku przemian — cholesterol, jest jednym z pierwszych poznanych mechanizmów regulacji przez sprzężenie zwrotne. Obecnie wiadomo, że zarówno cholesterol z syntezy endogennej, jak i dostarczony komórkom wraz z LDL lipoprotein włączony drogą endocytozy, odpowiada za układ zahamowania syntezy steroli w komórce przez zmniejszenie aktywności HMG-CoA reduktazy, syntazy HMG-CoA i syntazy skwalenu (Schemat 1). Przy stężeniu LDL wynoszącym 30–50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ w hodowlach ludzkich fibroblastów stwierdzono tylko 2% wyjściowej aktywności HMG-CoA reduktazy. Enzym nie ulegał jednak nigdy 100% zahamowaniu (DIETSCHY i SIPERSTEIN 1967, ENDO i współaut. 1976, BROWN i współaut. 1978, GOLDSTEIN i BROWN 1990, LOPEZ i współaut. 1997, BOCAN i współaut. 1998). Aktywność enzymu jest również hamowana przez siarczan cholesterolu (WILLIAMS i współaut. 1985), lecz mechanizm hamowania nie jest znany.

Zahamowanie szlaku biosyntezy steroli z mewalonianu na poziomie reduktazy HMG-CoA i syntazy skwalenu następuje również z udziałem skwalenu (Schemat 1). Przy 0,8 mM stężeniu skwalenu notowano 80% hamowanie aktywności HMG-CoA reduktazy. Zachowana aktywność enzymów HMG-CoA reduktazy oraz syntazy skwalenu pozostaje jednak wystarczającą dla podtrzymania procesów komórek kodowych uwarunkowanych dopływem izoprenoidów i steroli. Związki te są nieodzowne dla utrzymania prawidłowej struktury błon, wykorzystywane są w procesach syntezy hormonów steroidowych, ubichinonów, w prenylacji białek i w syntezie glikoprotein.

W układ sprzężeń zwrotnych włączone są również metabolity szlaku biosyntezy izoprenoidów. Kluczowym enzymem w mechanizmach regulacyjnych zachodzących z ich udziałem jest cytozolowa kinaza mewalonianu (TANAKA i współaut. 1990, HINSON i współaut. 1997, BISHOP i współaut. 1998). Inhibitorami kinazy mewalonianu są: pirofosforan geranylu, pirofosforan izopentenylu i pirofosforan adenozynotRNA (Schemat 1). Działanie wyżej wymienionego związków polega na przyłączeniu się ich do miejsca wiążącego ATP przez kinazę, co w konsekwencji uniemożliwia jej działanie. Niski poziom cholesterolu uaktywnia kinazę mewalonianu (BISHOP i współaut. 1998). Regulacja szlaków przemian mewalonianu przez sprzężenie zwrotne ma miejsce głównie w wątrobie (LOPEZ i współaut. 1997), w innych tkankach jej brak lub też ma odmienny przebieg (DIETSCHY i SIPERSTEIN 1967, BOCAN i współaut. 1992). W szczególnych przypadkach (nowotwory wątroby) mechanizm sprzężeń zwrotnych nie funkcjonuje (BROWN i współaut. 1973, SIPERSTEIN 1984, LOPEZ i współaut. 1997).

Sterole roślinne (sitosterol, kampesterol, stigmasterol, avenosterol) są absorbowane z pożywienia w ilości poniżej 5% i prawdopodobnie nie odgrywają ważnej roli jako inhibitory sprzężenia zwrotnego w regulacji enzymów szlaku biosyntezy cholesterolu u osób zdrowych. Sitosterol gromadzi się w dużej ilości w osoczu i tkankach osób z sitosterolemią (ok. 10–15% całkowitej ilości steroli). U pacjentów tych aktywność i ilość białka reduktazy HMG-CoA jest znacznie zredukowana (JONES 1997, HONDA i współaut. 1998b).

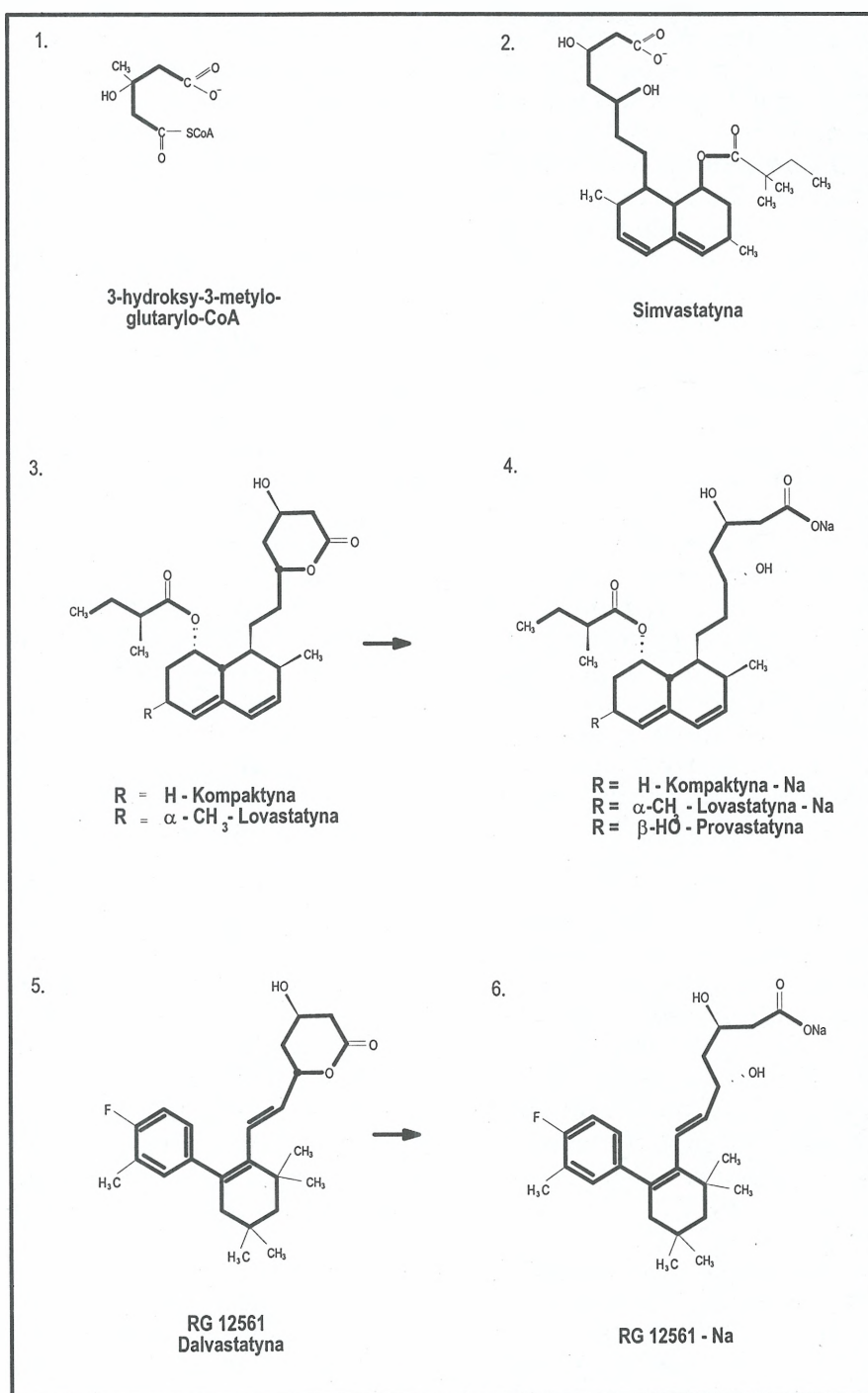
Do całkowitego zahamowania reduktazy HMG-CoA dochodzi w obecności kompetycyjnych inhibitorów tego enzymu będących analogami strukturalnymi HMG-CoA. Pierwszym poznany był kompaktyna. Wzory strukturalne, nazwy i synonimy kilku inhibitorów HMG-CoA reduktazy będących analogami strukturalnymi

HMG-CoA podano na Ryc. 5. 98% zahamowanie aktywności HMG-CoA reduktazy zachodzi już przy 2 μ M stężeniu kompaktyny, a 40 μ M stężenie całkowicie hamuje aktywność, niemniej jednak metodami immunologicznymi w obecności kompaktyny lub innych analogów strukturalnych HMG-CoA stwierdza się wzrost syntezy mRNA HMG-CoA reduktazy i wzrost ilości białka enzymatycznego, choć jego aktywność nie ujawnia się (BROWN i GOLDSTEIN 1980, BISGAIER i współaut. 1997, NESS i współaut. 1998a). Według BISGAIERA i współaut. (1997) zawartość mRNA dla HMG-CoA reduktazy w wątrobie szczurzych samic po diecie z atorwastatyną wzrasta 17,2-krotnie, lovastatyną 10,7-krotnie, simvastatyną 4,1-krotnie, pravastatyną 2,5-krotnie.

Możliwość zahamowania syntezy endogenego cholesterolu przez analogi strukturalne HMG-CoA były impulsem do poszukiwania związków wykazujących działanie hypolipidemiczne i antysklerotyczne. Stwierdzono, iż inhibitory tej grupy wywołują swe efekty poprzez oddziaływanie na genom, na przykład: przez wzmożoną ekspresję receptora LDL, redukcję syntezy LDL-apoB, w wyniku której zmniejsza się konwersja VLDL-apoB w LDL (NEGRE-AMINOU i współaut. 1997) przez wpływ na ekspresję acylo-CoA: cholesterol acylotransferazę (ACAT) i system białek uczestniczących w endocytozie.

Badania oddziaływań kilkunastu inhibitorów reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA przeprowadzono zarówno w hodowlach tkankowych (BROWN i współaut. 1978, BROWN i GOLDSTEIN 1980), jak i na zwierzętach (AMIN i współaut. 1993, BISCHOFF i współaut. 1997, LOPEZ i współaut. 1997, LOPEZ i NESS 1997, YASUNOBU i współaut. 1997, BOCAN i współaut. 1998, NESS i współaut. 1998b); niektóre z nich są już stosowane w terapii hyperlipidemii, hypercholesterolemii i nadciśnienia tętniczego u ludzi (ALAUPOVIC i współaut. 1997, MURAMATSU i współaut. 1997, NAOUMOVA i współaut. 1997, OOI i współaut. 1997, BERGLUND i współaut. 1998, HERNANDEZ-PERERA i współaut. 1998).

Atorwastatyna (OOI i współaut. 1997, ALAUPOVIC i współaut. 1997) nie wykazuje efektów toksycznych u ludzi w dawkach dziennych wynoszących 10–20 mg i może być stosowana w leczeniu hypercholesterolemii i hyperlipidemii z pozytywnym skutkiem. Obniżenie stężenia cholesterolu po zastosowaniu atorwastatyny i lovastatyny waha się w granicach 27–33%. W badaniach na zwierzętach wykazano, iż atorwastatyna normalizuje stężenie cholesterolu zarówno w surowicy, jak i w wątrobie (LOPEZ i współaut.



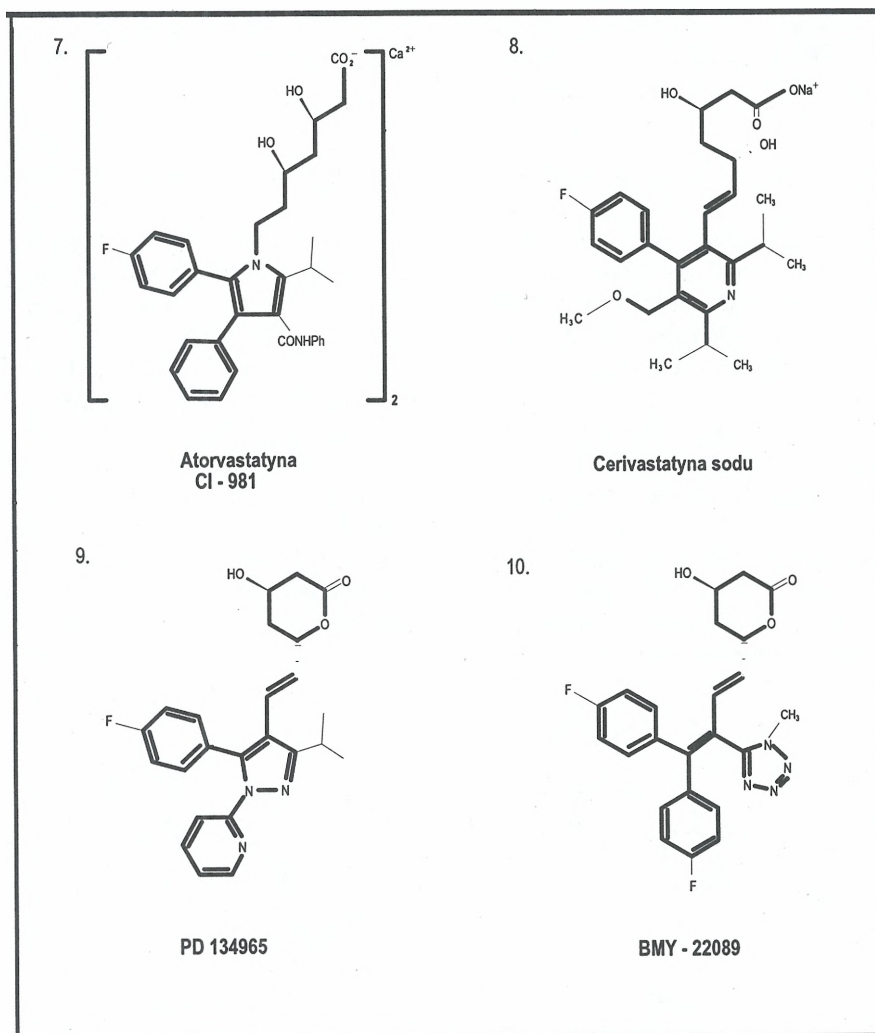
Ryc. 5. 1-6.

1997). W warunkach wysokiej podaży cholesterolu w diecie, poziom jego w surowicy często utrzymuje się w normie, lecz w wątrobie jest znacznie podwyższony.

Innym efektem farmakologicznym niektórych inhibitorów HMG-CoA reduktazy jest efekt hypotensyjny, wynikający z wpływu na ekspresję syntazy tlenku azotu (NOS) i endoteliny. Atorvastatyna (HERNANDEZ-PERERA i współaut. 1998) i simvastatyna (LAUFS i współaut. 1997a, b), które aktywują odpowiednio ekspresję endo-

teliny ET-1 i NOS, znalazły zastosowanie w leczeniu nadciśnienia tętniczego.

Jak do tej pory, najefektywniejszym (z uwagi na możliwość stosowania bardzo niskich stężeń) w leczeniu hypercholesterolemii i hyperlipidemii wydaje się być syntetycznie uzyskana cervastatyna, której efekty farmakologiczne ujawniają się już w dawce 2 μ g/kg wagi zwierzęcia. Dla porównania podobne działanie lovastatyna wywołuje w dawce 0,3 mg/kg wagi zwierzęcia (BISCHOFF i współaut. 1997).



Ryc. 5. 7–10. Wzory strukturalne, nazwy i synonimy kilku inhibitorów kompetycyjnych reduktazy HMG-CoA

Na uwagę zasługuje również antyproliferacyjne działanie niektórych inhibitorów reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA.

W komórkach mięśni gładkich w obecności inhibitorów kompetycyjnych reduktazy HMG-CoA zachodzi zahamowanie procesów proliferacji. Efekty te ujawniają się już w stężeniach subhypolipidemicznych (NEGRE-AMINOU i współaut. 1997, BELLOSTA i współaut. 1998). Aktywności antyproliferacyjne inhibitorów HMG-CoA reduktazy są różne (NEGRE-AMINOU i współpr. 1997). Najniższym indeksem antyproliferacyjnym dla komórek mięśni gładkich, badanych w hodowlach tkankowych cechuje się pravastatyna, $IC_{25} \approx 38 \mu M$, najwyższym cerivastatyna, $IC_{25} \approx 0,02 \mu M$. Pośrednie wartości indeksu ustalono dla lovastatyny, simvastatyny, atorvastatyny, fluvastatyny, dla których IC_{25} waha się w zakresie $0,2\text{--}1,0 \mu M$ (IC_{25} to stężenie inhibitora, które wywołuje zahamowanie proliferacji w 25%). Wszystkie wymienione vastatyny wykazują podobne działanie hypolipidemiczne, lecz zawsze w wyższych stęże-

niach od ustalonych dla ujawnienia efektów antyproliferacyjnych.

Działanie antyproliferacyjne inhibitorów HMG-CoA reduktazy może być wykorzystane w leczeniu arterosklerozy. Zastosowanie terapii musi być jednak poprzedzone badaniami modelowymi z użyciem kultur tkankowych i dokładnie przetestowane na zwierzętach z uwagi na ewentualną toksyczność tych związków. Niektóre ze znanych inhibitorów oprócz efektów hypolipidemicznych i antyproliferacyjnych wykazują właściwości teratogenne. Przykładem vastatyny z właściwościami teratogennymi jest lovastatyna (cyt. za HENCK i współaut. 1998). Inne związki, takie jak: simvastyna i fluvastyna choć nie wykazują właściwości teratogennych wpływają jednak niekorzystnie na rozwój i przeżywalność płodów szczurów, stąd inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA winny być stosowane z wielką ostrożnością w szczególności w czasie ciąży.

Brak zahamowania biosyntezy izoprenoidów i steroli wobec mevinoliny u roślin i bakterii

doprowadził do wykrycia niezależnego od mewalonianu szlaku biosyntezy izoprenoidów, o czym wspomniano już we wstępie niniejszej

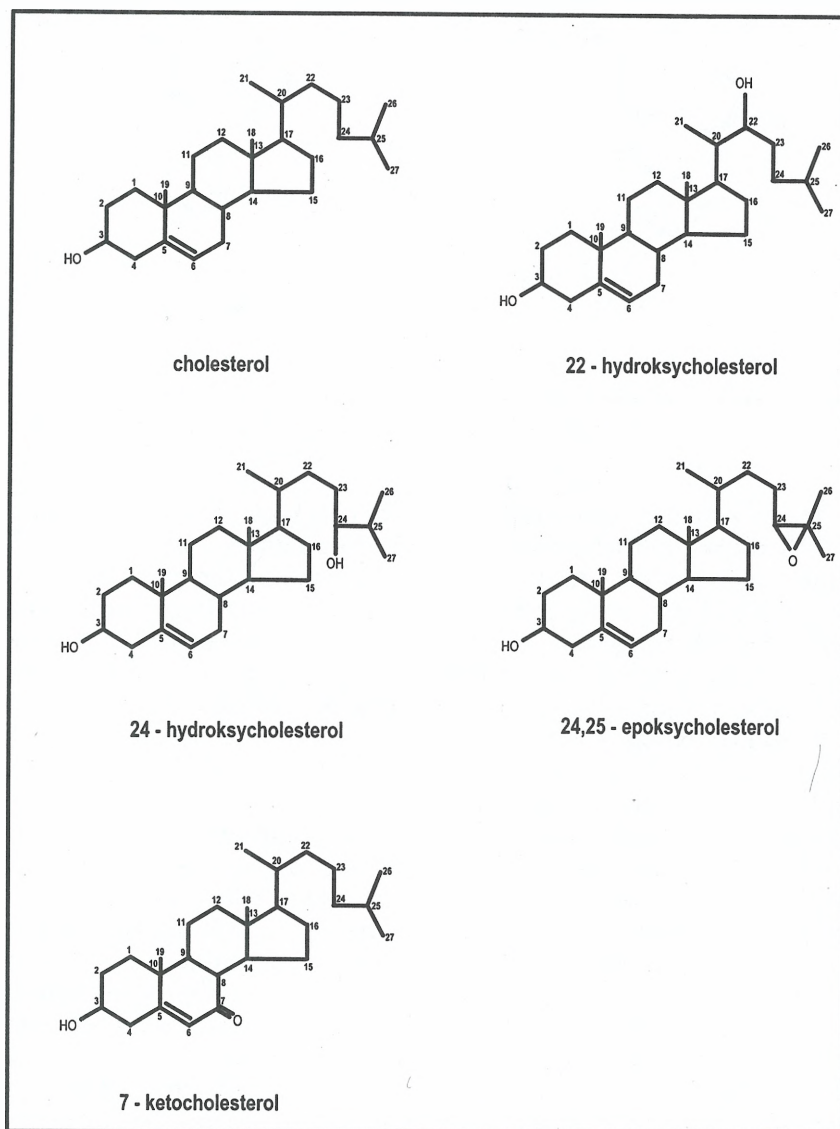
pracy (ROHMER i współaut. 1993, SCHWENDER i współaut. 1996).

REGULACJA TRANSKRYPCJI GENU I TRANSLACJI mRNA REDUKTAZY HMG-CoA

Transkrypcyjna regulacja reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA przez główny produkt końcowy — cholesterol była przedmiotem intensywnych badań. Większość tych badań przeprowadzona została na komórkach jajników chomików chińskich (CHO). Dodanie cholesterolu do środowiska hodowlanego komórek znacznie obniża poziom mRNA reduktazy HMG-CoA, co wskazuje na transkrypcyjną kontrolę aktywności genu reduktazy tych komórek (LOPEZ i współaut. 1997) przez cholesterol, końcowy produkt szlaku jego biosyntezy. Stwierdzono również, że nadmiar cholesterolu

pochodzący z pożywienia znacząco zahamowuje biosyntezę cholesterolu w wątrobie (ACCAD i FARESE 1988, CHAMBERS i NESS 1998, HONDA i współaut. 1998a,b).

Koniecznym dla wywarcia hamującego efektu wymogiem strukturalnym jest niezestryfikowana grupa w pozycji 3 pierścienia steroidowego. Obecność grupy ketonowej lub hydroksylowej w pozycji 6, 7 lub 25 zwiększa znacznie efekt. Wysunięto stąd przypuszczenie, że utlenione pochodne cholesterolu występujące w śladowych ilościach razem z cholesterolem są właściwymi inhibitorami transkrypcji reduktazy



Ryc. 6. Wzory cholesterolu i ważniejszych oksysteroli — stosowanych w badaniach nad indukcją syntezy mRNA dla reduktazy HMG-CoA.

zy HMG-CoA (cyt. za WEHR 1980). Późniejsze badania wykazały, że oksysterole: 22-hydroksycholesterol, 24-hydroksycholesterol, 24,25-epoksycholesterol i 7-ketocholesterol (Ryc.6) są skuteczniejszymi inhibitorami niż sam cholesterol w regulacji jego biosyntezy (ACCAD i FARESE 1998, CHRISTENSON i współaut. 1998).

Za zależną od steroli regulację transkrypcji odpowiedzialny jest region otaczający sekwencję 5 końca genu reduktazy HMG-CoA. Zawiera on 1 lub wiele kopii ośmio nukleotydowej sekwencji 5-CACCC^CGCAC-3 określanej terminem sterolowy element regulatorowy 1 (SRE 1, ang. sterol regulatory element) (OSBORNE i współaut. 1988, SMITH i współaut. 1988, HONDA i współaut. 1998a, CHAMBERS i NESS 1998, NESS i współaut. 1998). Podobny element występuje również w promotorze genu receptora dla lipoprotein o małej gęstości (receptor LDL) (OSBORNE i współaut. 1988, SMITH i współaut. 1988, LAUFSA i współaut. 1997, LOPEZ i NESS 1997), syntazy HMG-CoA (EC 4.1.3.5) (SMITH i współaut. 1988, HONDA i współaut. 1998a) i kinazy mewalonianu (EC 2.7.1.36) (TANAKA i współaut. 1990, HINSON i współaut. 1997, BISHOP i współaut. 1998).

W ostatnich latach zidentyfikowano białka SREBPs (ang. sterol regulatory element binding proteins), które są związane z błonami endoplazmatycznego retikulum (ER) i występują w przybliżeniu w tej samej ilości w większości tkanek. Spadek poziomu cholesterolu indukuje dwuetapowy proces proteolityczny, który uwalnia NH₂-końcową część białka o masie 68 kDa z błony ER, zawierającą motyw kierujący do jądra. SREBP migruje do jądra i wiąże się z SRE-1 aktywując transkrypcję genu syntazy, reduktazy HMG-CoA, kinazy mewalonianowej i receptora LDL (SMITH i współaut. 1988, TANAKA i współaut. 1990, LOPEZ i NESS 1997). Proteolityczna aktywacja SREBP jest regulowana przez inne związane z błoną białko — SCAP (ang.

SREBP cleavage activating protein). SCAP prawdopodobnie zawiera domenę wrażliwą na sterol, która kontroluje stężenie sterolu w błonie. Przypuszcza się, że zmiany poziomu cholesterolu w błonie zmieniają interakcję pomiędzy SREBP i SCAP. Kiedy poziom sterolu jest niski, SREBP jest rozszczepiane przez proteiny, a część z końcem aminowym migruje do jądra (BROWN i GOLDSTEIN 1997, ACCAD i FARESE 1998). W obecności dostatecznej ilości steroli białka regulatorowe nie są aktywne i transkrypcja genu reduktazy HMG-CoA spada do poziomu podstawowego (SMITH i współaut. 1988).

Wykazano poza tym, że cholesterol pochodzący z pożywienia obniża również skutecznie translację mRNA reduktazy HMG-CoA przez konwersję kompleksu aktywnie translacjonowanej formy polisomalnej do nieaktywnej translacyjnie formy monosomalnej (LOPEZ i współaut. 1997).

Niesterolowe związki — pochodne mewalonianu hamują również translację mRNA reduktazy HMG-CoA oraz przyspieszają degradację białka reduktazy HMG-CoA (SIMONET i NESS 1989, CANEDELLE 1997, HINSON i współaut. 1997). Obniżenie syntezy mewalonianu powoduje zmniejszenie się poziomu izoprenylowanych białek, które uczestniczą w regulacji procesu translacji i degradacji białka reduktazy HMG-CoA (RUSSELL 1992).

Przedstawione w tym artykule procesy regulacji aktywności reduktazy HMG-CoA są elementem wielorakich mechanizmów zaangażowanych w kontrolę komórkowej homeostazy stężenia cholesterolu. Godnym podkreślenia jest, iż różne tkanki dysponują odrębnymi zestawami procesów regulacyjnych, a dokładne ich poznanie umożliwia stosowanie środków farmakologicznych (inhibitory kompetycyjne reduktazy HMG-CoA) w leczeniu niektórych schorzeń wynikających z nieprawidłowego metabolizmu cholesterolu.

HMG-CoA REDUCTASE — A KEY ENZYME IN BIOSYNTHESIS OF ISOPRENOIDS AND CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS

Summary

3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase catalyzes the rate limiting step in cholesterol and isoprenoid biosynthesis in eucariotic cells. The regulation of HMG-CoA reductase activity occurs at the transcription, and translation steps, and the enzyme activity modulation at the cellular level. The most important regulatory mechanisms are: covalent modification by phosphorylation and dephosphorylation and allosteric interactions with various

metabolites of the mevalonate pathway. The enzyme activity appeared to be regulated also by proteolysis and the redox status of the cell. In this paper the influence of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase, analogues of HMG-CoA (e.g. cerivastatin, lovastatin, atorvastatin, etc.), on the enzyme activity in pathological conditions are also described.

LITERATURA

- ACCAD M., FARESE R. V., 1998. Cholesterol homeostasis: A role for oxysterols. *Current Biology*, 8, R 601-604.
- ALAPOVIC P., HEINONEN T., SHURZINSKE L., BLACK D. M., 1997. Effect of a new HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, on lipids apolipoproteins and lipoprotein particles in patients with elevated serum cholesterol and triglyceride levels. *Atherosclerosis*, 133, 123-133.
- AMIN D., GUSTAFSON S. K., WAINACHT J. M., CORNELL S. A., NEUENSCHWANDER K., KOSMIDER B., SCOTSE A. C., REGAN J. R., PERRONE M. H., 1993. RG 12561 (Daltvastatin): a novel synthetic inhibitor of HMG-CoA reductase and cholesterol lowering agent. *Pharmacology*, 46, 13-22.
- ASHBY M. N., EDWARDS P. A., 1989. Identification and regulation of a rat liver cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* 264, 635-640.
- BAJGUZ A., CZERPAK R., 1995. Występowanie i aktywność biologiczna brassinosteroidów — nowych hormonów roślin. *Kosmos* 44, 129-144.
- BELLOSTA S., BERNINI F., FERRI N., QUARANTO P., CANAVESI M., ARNABOLDI L., FUMAGALLI R., PAOLETTI R., CORSINI A., 1998. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis*, 137, S101-S109.
- BERGLUND L., WITZTUM J. L., GALEANO N. F., KHOUW A. S., GINSBERG H. N., RAMAKRISHNAN R., 1998. Three-fold effect of lovastatin treatment on low density lipoprotein metabolism in subject with hyperlipidemia: increase in receptor activity, decrease in apoB production, and decrease in particle affinity for the receptor. Results from a novel triple-tracer approach. *J. Lipid Res.* 39, 913-934.
- BISCHOFF H., ANGERBAUER R., BENDER J., BISCHOFF E., FAGGIOTTO A., PETZINNA D., PFITZNER J., PORTER M. C., SCHMIDT D., THOMAS G., 1997. Cerivastatin: pharmacology of a novel synthetic and highly active HMG-CoA reductase inhibitor. *Atherosclerosis*, 135, 119-130.
- BISGAIER CH. L., ESSENBERG A. D., AUERBACH B. J., PAPE M. E., SEKERKE C. S., GEE A., WOLLE S., NEWTON R. S., 1997. Attenuation of plasma low density lipoprotein cholesterol by select 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in mice devoid of low density lipoprotein receptors. *J. Lipid Res.* 38, 2502-2515.
- BISHOP R. W., CHAMBLISS K. L., HOFFMANN G. F., TANAKA R. D., GIBSON K. M., 1998. Characterization of the mevalonate kinase 5'-untranslated region provides evidence for coordinate regulation of cholesterol biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 242, 518-524.
- BOCAN T. M. A., FERGUSON E., McNALLY W., UHLENDORF P. D., MUELLER S. B., DEHART P., SLISKOVIC D. R., ROTH B. D., KRAUSE B. R., NEWTON R. S., 1992. Hepatic and nonhepatic sterol synthesis and tissue distribution following administration of a liver selective HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981: comparison with selected HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem. Biophys. Acta*, 1123, 133-144.
- BOCAN T. M. A., MUELLER S. B., BROWN E. Q., LEE P., BOCAN M. J., REA T., PAPE M. E., 1998. HMG-CoA reductase and ACAT inhibitors act synergistically to lower plasma cholesterol and limit atherosclerotic lesion development in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis*, 139, 21-30.
- BOGUSLAWSKI W., ŁAPKOWSKA H., 1990. Effect of stilbestrol on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity and cholesterol biosynthesis in rat liver. *Polish J. Endocrinol.* 41, 107-112.
- BROWN M. S., DANA S. E., DIETSCHY J. M., SIPERSTEIN M. D., 1973. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* 248, 4731-4738.
- BROWN M. S., BRUNSCHEDA G. Y., GOLDSTEIN J. L., 1975. Inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vitro: an adenine nucleotide dependent reaction catalyzed by a factor in human fibroblast. *J. Biol. Chem.* 250, 2502-2509.
- BROWN M. S., FAUST J. R., GOLDSTEIN J. L., KANECKO J., ENDO A., 1978. Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblast incubated with compactin (ML-23613), a competitive inhibitor of the reductase. *J. Biol. Chem.* 253, 313-321.
- BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L., DIETSCHY J. M., 1979. Active and inactive forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the liver of the rat. *J. Biol. Chem.* 254, 5144-5149.
- BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L., 1980. Multivalent feedback regulation of HMG-CoA reductase: a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* 21, 505-517.
- BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L., 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.
- BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L., 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.
- BUCHER H. C., DRIFFITH L. E., GUYATT G. H., 1998. Effect of HMGCoA reductase inhibitors on stroke. *Ann. Intern. Med.* 128, 89-95.
- CENEDELLA R. J., 1997. Posttranscriptional regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in lens epithelial cells by mevalonate-derived nonsterols. *Exp. Eye Res.* 65, 63-72.
- CHAMBERS CH. M., NESS G. C., 1998. Dietary cholesterol regulates hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in rats primarily at the level of translation. *Arch. Biochem. Biophys.* 354, 317-322.
- CHRISTENSON L. K., McALLISTER J. M., MARTIN K. O., JAVIT N. B., OSBORNE T. F., STRAUSS III J. F., 1998. Oxysterol regulation of steroidal acute regulatory protein gene expression. *J. Biol. Chem.* 273, 30729-30735.
- CZERPAK R., 1993. Występowanie i aktywność biologiczna hormonów zwierzęcych i związków pokrewnych u roślin. *Kosmos* 42, 613-636.
- DIETSCHY J. M., SIPERSTEIN M. P., 1967. *J. Lipid Res.* 8, 97-104.
- EDWARDS P. A., KEMPNER E. S., LAN S., EICSON S. K., 1985. Functional size of rat hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase as determined by radiation inactivation. *J. Biol. Chem.* 260, 10278-10282.
- ENDO A., KUTODA M., TONZAWA K., 1976. Competitive inhibition by ML-236A and ML-263B fungal metabolites having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* 72, 323-326.
- FARESE R. V., HERZ J., 1998. Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends in Genetics* 14, 115-120.
- FIELDING CH. J., FIELDING P. E., 1997. Intracellular cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 38, 1503-1521.
- FLESCH G., ROHMER M., 1988. Procaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units two distinct acetate pools and a novel type of carbon-carbon linkage a triterpene and D-ribose. *Eur. J. Biochem.* 175, 405-411.
- FU Q., GOODRUM J. F., HAYES C., HOSTETTLER J. D., TOEWS A. D., MORELL P., 1998. Control of cholesterol biosynthesis in Schwann cells. *J. Neurochem.* 71, 549-555.
- GIL G., FAUST J. L., CHIN D. J., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S., 1985. Membrane-bound domain of HMG-CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell* 41, 249-258.

- GNIOT-SZULŻYCKA J., 1982. 2-Wodorosiarczazan kwasu askorbinowego. *Postępy Biochemii* 28, 137–143.
- GOULD R. G., TAYLOR C. B., HAGERMAN J. S., WARNER I., CAMPBELL D. J., 1953. *Cholesterol metabolism: effect of dietary cholesterol on the synthesis of cholesterol in dog tissue in vitro*. *J. Biol. Chem.* 201, 519–528.
- GRIFFIN M., FRAZER A., JOHNSON A., COLLINS P., OWENS D., TOMKIN G. H., 1998. Cellular cholesterol synthesis - The relationship to post-prandial glucose and insulin following weight loss. *Atherosclerosis* 138, 313–318.
- GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S., 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425–430.
- HARWOOD H. J., GREENE Y. J., STACPOOLE P. W., 1986. Inhibition of human leukocyte 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity by ascorbic acid. *J. Biol. Chem.* 261, 7127–7135.
- HENCK J. W., CRAFT W. R., BLACK A., COLGIN J., ANDERSON J. A., 1998. Pre- and postnatal toxicity of HMG-CoA reductase inhibitor atorvastatin in rats. *Toxicol. Sci.* 41, 88–99.
- HERNANDEZ-PERERA O., PEREZ-SALA D., NAVARRO-ANTOLIN J., SANCHEZ-PASCUALA R., HERNANDEZ G., DIAZ C., LAMAS S., 1998. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 101, 2711–2719.
- HINSON D. D., CHAMBLISS K. L., TOTH M. J., TANAKA R. D., GIBSON K. M., 1997. Post-translational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways. *J. Lipid Res.* 38, 2216–2223.
- HONDA A., SALEN G., NGUYEN L. B., XU G., TINT G. S., BATT A. K., SHEFER S., 1998a. Regulation of early cholesterol biosynthesis in rat liver: effects of sterols, bile acid, lovastatin, and BM 15.766 on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and acetoacetyl coenzyme A thiolase activities. *Hepatology* 27, 154–159.
- HONDA A., SALEN G., NGUYEN L. B., XU G., TINT G. S., BATT A. K., SHEFER S., 1998b. Down-regulation of cholesterol biosynthesis in sitosterolemia: diminished activities of acetoacetyl-CoA thiolase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, reductase, squalene synthase, and 7-dehydrocholesterol Δ^7 -reductase in liver and mononuclear leukocytes. *J. Lipid Res.* 39, 44–50.
- HUFF M., BURNET J. R., 1997. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and hepatic apolipoprotein B secretion. *Current Opinion in Lipidology* 8, 138–145.
- JANISZOWSKA W., 1972. Biosynteza kardenolidów i bufadienolidów. *Postępy Biochemii* 18, 489–500.
- JOHNSTON T. P., PALMER W. K., 1997a. Effect of poloxamer 407 on the activity of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 29, 580–585.
- JOHNSTON T. P., PALMER W. K., 1997b. The effect of pravastatin on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase obtained from poloxamer 407-induced hyperlipidemic rats. *Pharmacotherapy* 17, 342–347.
- JONES P., 1997. Regulation of cholesterol biosynthesis by diet in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 66, 438–446.
- LAUFS U., BOHM M., LIAO J. K., 1997a. Neue Erkenntnisse über die Wirkung von HMG-CoA-reduktase-hemmern. *Dtsch. Med. Wschr.* 122, 1255–1259.
- LAUFS U., LA FATA V., LIAO J. K., 1997b. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase block hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 272, 31725–31729.
- LISCUM L., FINER-MOORE J., STROUD R. M., LUSKEY K. L., BROWN M. S., 1985. Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 260, 522–530.
- LOIRDIGHI N., MENARD D., DELVIN E., LEVY E., 1997. Ontogeny and location of HMG-CoA reductase, ACAT, and MGAT in human small intestine. *Am. J. Physiol.* 273, G62–G67.
- LOPEZ D., CHAMBERS CH. M., NESS G. C., 1997. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors unmask cryptic regulatory mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 343, 118–122.
- LOPEZ D., NESS G. C., 1997. Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase unmask transcriptional regulation of hepatic low-density lipoprotein receptor gene expression by dietary cholesterol. *Arch. Biochem. Biophys.* 344, 215–219.
- LOPEZ D., CHAMBERS CH. M., KELLER R. K., NESS G. C., 1998. Compensatory responses to inhibition of hepatic squalene synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 351, 159–166.
- LUSKEY K., STEVENS B., 1985. Human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* 260, 10271–10277.
- ŁAPKOWSKA H., BOGUSŁAWSKI W., 1997. Comparison of the effect of trans-stilbene, cis-stilbene and stilbestrol on cholesterol biosynthesis in rat liver. *Polish J. Endocrinol.* 48, 233–236.
- MOTULSKY A. G., 1986. The 1985 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science* 231, 126–129.
- MURAMATSU J., KOBAYASHI A., HASEGAWA N., YOKOUCHI S., 1997. Hemodynamic changes associated with reduction in total cholesterol by treatment with the HMG-CoA reductase inhibitor pravastatin. *Atherosclerosis* 130, 179–182.
- NAOUMOVA R. P., DUNN S., RALLIDIS L., ABU-MUHANA O., NEUWIRTH C., RENDELL N. B., TAYLOR G. W., THOMPSON G. R., 1997. Prolonged inhibition of cholesterol synthesis explains the efficacy of atorvastatin. *J. Lipid Res.* 38, 1496–1500.
- NEGRE-AMINOU P., VLIET A. K., ERCK M., THIEL G. CH. F., LEEUWEN R. E. W., COHEN L. H., 1997. Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors; comparison with other human cell types. *Biochem. Biophys. Acta* 1345, 259–268.
- NESS G. C., CHAMBERS CH. M., LOPEZ D., 1998a. Atorvastatin action involves diminished recovery of hepatic HMG-CoA reductase activity. *J. Lipid Res.* 39, 75–84.
- NESS G. C., LOPEZ D., CHAMBERS CH. M., ZHAO Z., BEACH D. L., KO S. S., TRZASKOS J. M., 1998b. Effects of 15-oxa-32-vinyl-lanost-8-ene-3, 32 diol on the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and low density lipoprotein receptor in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 357, 259–264.
- OOI T. C., HEINONEN T., ALAUFPOVIC P., DAVIGNON J., LEITER L., LUPIN P. J., SNIDERMAN A. D., TAN M. H., TREMBLAY G., SORISKY A., SHURZINSKE L., BLACK D. M., 1997. Efficacy and safety of a new hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor, atorvastatin, in patients with combined hyperlipidemia: comparison with fenofibrate. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1793–1799.
- OSBORNE T. F., GIL G., GOLDSTEIN J. L., BROWN M. S., 1988. Operator constitutive mutation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoter abolishes protein binding to sterol regulatory element. *J. Biol. Chem.* 263, 3380–3387.
- PEFFLEY D., SINENSKY M., 1985. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase synthesis by a nonsterol mevalonate-derived product in Mev-1 cells. *J. Biol. Chem.* 260, 9949–9952.
- RAEDERSTORFF D., ROHMER M., 1988. Polyterpenoids as cholesterol and tetrahymanol surrogates in the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim. Biophys. Acta* 960, 190–199.
- ROHMER M., KNANI M., SIMONIN P., SUTTER B., SAHM H., 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for

- the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* 295, 517–524.
- ROITELMAN J., SHECHTER I., 1984. Regulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* 259, 870–877.
- RUDLING M., PARINI P., ANGELIN B., 1997. Growth hormone and bile acid synthesis. *J. Clin. Invest.* 99, 2239–2245.
- RUSSELL D., 1992. Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 6, 103–110.
- SAKAI M., KOBORI S., MATSUMURA T., BIWA T., SATO Y., TAKEMURA T., HAKAMATA H., HORIUCHI S., SHICHIRI M., 1997. HMG-CoA reductase inhibitors suppress macrophage growth induced by oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 133, 51–59.
- SCHOENHEIMER R., BREUSCH F., 1933. Synthesis and destruction of cholesterol in the organism. *J. Biol. Chem.* 103, 439–448.
- SCHWENDER J., SEEMANN M., LICHTENTHALER H. K., ROHMER M., 1996. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/ glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.* 316, 73–80.
- SIMONET W. S., NESS G. C., 1989. Post-transcriptional regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mRNA in rat liver. *J. Biol. Chem.* 264, 569–573.
- SIPERSTEIN M. D., 1984. Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. *J. Lipid Res.* 25, 1462–1468.
- SMITH J. R., OSBORNE T. F., BROWN M. S., GOLDSTEIN J. L., GIL G., 1988. Multiple sterol regulatory element in promoter for hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase. *J. Biol. Chem.* 263, 18480–18487.
- STRYER L., 1997. Biosynteza lipidów i steroidów błon komórkowych [W:] *Biochemia*. KRUCZYŃSKA K., ZIENKIWICZ I., (red.). PWN, Warszawa, str. 738–749.
- SZNAJDERMAN M., MICHAJLIK A., 1979. *Lipidy i lipoproteiny osocza*. PZWL, Warszawa.
- ŚLIWOWSKI J., 1974. Mechanizmy cyklizacji skwalenu do trójterpenów cztero- i pięciocyklicznych. *Postępy biochemii* 20, 281–303.
- TANAKA R. D., LEE L. Y., SCHAFER B. L., KRATUNIS V. J., MOHLER W. A., ROBINSON G. W., MOSLEY S. T., 1990. Molecular cloning of mevalonate kinase and regulation of its mRNA levels in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 2872–2876.
- TUROWSKA G., 1972. Biosynteza steroli roślinnych. *Postępy Biochemii* 18, 257–272.
- WEHR H., 1980. Niektóre aspekty współzależności metabolicznej lipoprotein osocza i Komórek. *Postępy Biochemii* 26, 139–159.
- WILLIAMS M. L., HUGHES-FULFORD M., ELIAS P. M., 1985. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and sterol synthesis by cholesterol sulfate in cultured fibroblasts. *Boichim. Biophys. Acta* 845, 349–355.
- WOOD W. G., SCHROEDER F., AVDULOV N. A., CHOCHINA S. V., IGBAVBOA U., 1999. Recent advances in brain cholesterol dynamics: transport, domains, and Alzheimers disease. *Lipids* 34, 225–234.
- WOODWARD H. D., ALLEN J. M. C., LLENNARZ W., 1988. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase of the sea urchin embryo. *J. Biol. Chem.* 263, 18411–18418.
- YASUNOBU Y., HAYASHI K., SHINGU T., NOMURA K., OHKURA Y., TANAKA K., KUGA Y., NOMURA S., OHTANI H., NISHIMURA T., MATSUURA H., KAJIYAMA G., 1997. Reduction of plasma cholesterol levels and induction of hepatic LDL receptor by cerivastatin sodium (CAS 143201-11-0, BAY w 6228), a new inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, in dogs. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 11, 567–574.