

CITOKROM P450 – OKSIDOREDUKTAZA (POR) V BIOSINTEZI HOLESTEROLA

CYTOCHROME P450 - OXIDOREDUCTASE (POR) IN THE BIOSYNTHESIS OF CHOLESTEROL

AVTORJA / AUTHORS:

prof. dr. Damjana Rozman

asist. dr. Klementina Fon Tacer, dr.vet.med.

Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Inštitut za biokemijo, Center za funkcijsko genomiko in bio-čipe, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: klementina.fon-tacer@mf.uni-lj.si

1 UVOD

Holesterol je pomemben gradnik membran živalskih celic, potreben tudi za nemoteno delovanje živčnega sistema in razvoj moških spolnih celic. Poleg strukturne vloge ima kolesterol pomembno vlogo kot izhodna spojina v biosintezi številnih biološko aktivnih molekul, kot so žolčne kisline in steroidni hormoni. Nenazadnje pa je kolesterol ključen tudi

POVZETEK

Holesterol ima številne fiziološke vloge v organizmu sesalcev in je ključen za razvoj zarodka. Genetske napake v biosintezi holesterola so vzrok različnih prirojenih napak. Patogeneza prirojenih napak je posledica tako pomanjkanja holesterola kot tudi škodljivih učinkov sterolnih intermediatov, ki se kopičijo. Lanosterol 14 α -demetilaza (CYP51) katalizira prvi korak poznega dela biosinteze holesterola. Za svoje delovanje potrebuje donorja elektronov, citokrom P450-oksidoreduktazo (POR). Pri nekaterih pacientih s sindromom podobnim Antley-Bixler-ju so ugotovili mutacije v genu *POR*. Poleg tega so podobne teratogene simptome opazili pri otrocih žensk, ki so med nosečnostjo uživale azole, močne inhibitorje glivnih CYP51, ki se uporabljajo pri zdravljenju sistemskih mikoz. Ugotovitvi nakazujeta, da pride do razvojnih motenj zaradi napak v biosintezi holesterola na ravni CYP51. Z našim delom smo želeli ugotoviti vpliv citokrom P450-oksidoreduktaze na biosintetsko pot holesterola v jetrih.

Z analizo HPLC smo določili sterolni profil (količino holesterola, lanosterola, 7-dehidroholesterola, lanosterola, FF-MAS in T-MAS) v jetrih miši, ki imajo tkivno-specifično izničen gen *POR* v jetrih. Ugotovili smo, da izničenje *Por* povzroči kopičenje lanosterola v jetrih, kjer je normalno lanosterola in ostalih sterolnih intermediatov razen holesterola zelo malo ali so celo pod mejo detekcije. Mutirane miši imajo v primerjavi s kontrolnimi živalmi 35-krat več lanosterola (397 μ g/g proti 11 μ g/g). Kljub velikemu kopičenju lanosterola se količina celokupnega holesterola v jetrih ni bistveno spremenila, ostali steroli pa so bili pod mejo detekcije v obeh skupinah. Naši rezultati kažejo, da je *POR* obvezni in nezamenljivi donor elektronov predvsem pri CYP51 posredovani reakciji. Brez *POR* se pretvorba lanosterola in najverjetneje tudi sinteza holesterola *de novo* ustavi. Kljub temu se količina holesterola v jetrih ne spremeni, saj homeostatski mehanizmi omogočijo uravnavanje koncentracije holesterola v jetrih s prevzemom LDL iz prehrane

KLJUČNE BESEDE:

holesterol, citokromi P450, CYP51, lanosterol, Antley-Bixler-jev sindrom

ABSTRACT

Cholesterol has several important physiological functions in mammals and is also indispensable during embryogenesis. Genetic defects of the cholesterol biosynthetic pathway lead to different inborn errors. The phenotypic abnormalities are caused by cholesterol deficiency and accumulation of intermediate sterols. Lanosterol 14 α -demethylase (CYP51) catalyses the first step following cyclization of squalene in cholesterol biosynthesis. CYP51 requires cytochrome P450 oxidoreductase (POR) that is the obligate electron donor for the reaction. Some patients with Antley-Bixler syndrome have mutations in the POR gene. A similar phenotype was also observed after early *in utero* exposure to azoles, which are inhibitors of fungal CYP51 used to treat systemic mycoses. The reason in both cases might be the inhibition of cholesterol biosynthesis on the level of CYP51. The aim of our work was to determine the effect of cytochrome P450-oxidoreductase on cholesterol biosynthesis in liver.

We used HPLC analysis to profile sterols (cholesterol, lanosterol, 7-dehydrocholesterol, lathosterol, FF-MAS and T-MAS) in the liver of wild mice and liver specific *Por* knock-out mice. We show that *Por* deletion caused strong accumulation of lanosterol. We observed 35-fold induction compared to wild type (397 μ g/g vs. 11 μ g/g).

Despite the buildup of lanosterol, the amount of total liver cholesterol did not change. Our results confirm POR as an obligate and unchangeable electron donor for CYP51 mediated reaction. POR deficiency inhibits lanosterol conversion to FF-MAS as well as cholesterol biosynthesis *de novo*. Homeostatic mechanisms are able to regulate cholesterol level, most probably through uptake of exogenous cholesterol from diet.

KEY WORDS:

cholesterol, cytochromes P450, CYP51, lanosterol, Antley-Bixler syndrome

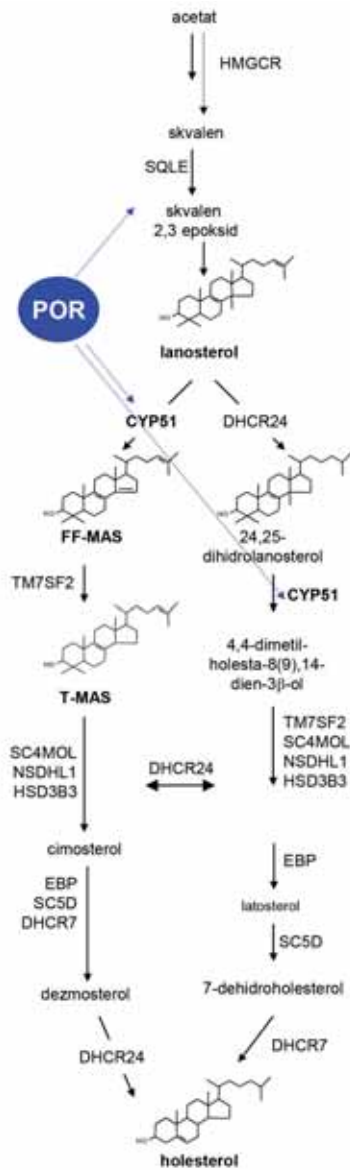
pri delovanju proteina Hedgehog (Hh) (1), ki uravnava embrionalni razvoj (2).

Molekula holesterola nastane v seriji več kot 30 reakcij in vseh 27 ogljikovih atomov holesterola izvira iz molekule acetyl-CoA z 2 ogljikovima atomoma. Lanosterol je prvi ciklični intermediat v biosintetski poti (3), ki se v seriji demetilacij, redukcij in oksidacij pretvori v holesterol (Slika 1) (4). Po lanosterolu pa se biosintezna pot loči na dve možni veji z intermediami, ki imajo nasičeno (5) ali nenasičeno (6) Δ 24-vez (Slika 1).

Intermediati pred-lanosterolnega dela zalagajo celico s številnimi biološko pomembnimi molekulami, kot sta koencim Q10 in hem A (7). Tudi intermedii poznega dela imajo potencialne svoje biološke vloge. Dva sterola so izolirali iz spolnih žlez sesalcev in vplivata na razvoj in kvaliteto jajčnih celic (8, 9), iz 7-dehidroholesterola pa nastane vitamin D. Poleg tega so z nedavnimi raziskavami pokazali, da so pravzaprav sterolni intermedii tisti, ki so ključni za patologijo genetskih obolenj biosinteze holesterola (10). Le-ti se kopičijo in povzročijo napake pri fuziji obraznih struktur (10) in razvoja las (11).

V po-lanosterolnem delu biosintetske poti je opisanih šest prirojenih napak, ki so posledica mutacij v holesterogenih genih (12) in imajo določene skupne fenotipske značilnosti. Antley-Bixler-jev sindrom (ABS) nastane kot posledica mutacij v različnih genih, največkrat v receptorju fibroblastnih rastnih faktorjev 2 (FGFR2). Fenotip podoben ABS so opazili tudi pri otrocih, ki so bili v maternici izpostavljeni flukonazolu, antimikotiku in inhibitorju lanosterol 14 α -demetilaze (CYP51) (13). Azoli se pogosto uporabljajo v kmetijstvu in tudi za zdravljenje živali in ljudi. Njihovo delovanje temelji na inhibiciji glivnega CYP51 (14). CYP51 katalizira demetilacijo lanosterola v biosintezni poti sterolov (15). Tako so pozornost pri pacientih z ABS usmerili tudi na CYP51 in sintezo holesterola (16, 17). V fibroblastih nekaterih pacientov, tistih brez mutacij v *FGFR2*, so ugotovili povečano količino lanosterola. Kopičenje lanosterola, ki je substrat encima CYP51, kaže na neaktivnost encima (18). Vendar pri pacientih mutacij v samem *CYP51* niso našli (19), kasneje pa so odkrili, da je pri teh pacientih okvarjen gen za citokrom P450-oksido-reduktazo (POR) (20, 21). Protein POR je donor elektronov v številnih oksidoreduktivnih reakcijah, predvsem kataliziranih s citokromi P450. V biosintezi holesterola sta to 14 α -demetilacija lanosterola s CYP51 in monooksigenacija skvalena s svalen-monooksigenazo (SQLE) (14).





Slika 1: Shema biosinteze holesterola. Kratice encimov predstavljajo simbol UniGene. HMGCR- HMG-CoA-reduktaza; LBR- lamin B receptor; TM7SF2- 14-dehidroholesterol-reduktaza; SC4MOL- sterol C4-metil-oksidaža; NSDHL- 3-β-hidroksi-Δ5-steroid-dehidrogenaza, HSD3B3- 3β-ketosteroid-reduktaza, EBP- sterol-8,7 izomeraza; SC5D- sterol-C5 desaturaza; DHCR7- 7-dehidroholesterol-reduktaza, POR- citokrom P450-oksido-reduktaza. FF-MAS- mejozo aktivirajoči sterol iz folikularne tekočine, 4,4-dimetil-5α-cholesta-8,14,24-triene-3β-ol; T-MAS- mejozo aktivirajoči sterol iz mod.

Figure 1: Schematic representation of post-squalene part of cholesterol biosynthesis. Abbreviations of enzyme names correspond to UniGene Symbols. HMGCR- HMG-CoA reductase; LBR- lamin B receptor; TM7SF2- 14-dehydrocholesterol reductase; SC4MOL- sterol C4-methyl oxidase, NSDHL- 3-β-hydroxy-Δ5-steroid dehydrogenase, HSD3B3- 3β-keto-steroid reductase, EBP- sterol 8, 7 isomerase; SC5D- sterol- C5 desaturase; DHCR7- 7-dehydrocholesterol reductase. FF-MAS- follicular fluid meiosis activating sterol, 4,4-dimethyl-5α-cholesta-8,14,24-triene-3β-ol; T-MAS- testis meiosis activating sterol, 4,4-dimethyl-5α-cholesta-8,24-diene-3β-ol.

Da bi preučili vpliv *POR* na metabolizem holesterola, smo analizirali sterolni profil v jetrih miši z izničnim genom *Por*.

2 MATERIALI IN METODE

Jetra miši divjega seva in L-PORKO (miši z izničnim genom *Por* v jetrih) smo dobili iz laboratorija prof. dr. Ro-

landa Wolfa (University of Dundee) (pet v vsaki skupini) Analizo sterolov smo izvedli po že opisanem postopku (22) z manjšimi spremembami. Iz zamrznjenih in posušenih jeter (*angl. freeze-dried*) smo ekstrahirali lipide v ekstrakcijski tekočini (75% n-heptan : 25% izopropanol (v/v)). Organsko fazo smo posušili in ekstrahirane lipide umilili z enourno inkubacijo v raztopini 10% KOH v 80% etanolu pri 60°C. Po alkalni hidrolizi smo pH uravnali z 1M KH₂PO₄ in ponovno izvedli ekstrakcijo, kot je opisana zgoraj. Organsko fazo smo posušili, raztopili v mobilni fazi za analizo HPLC z normalno fazo in izvedli ločitev na koloni ChromSpherSi, 5 μm,

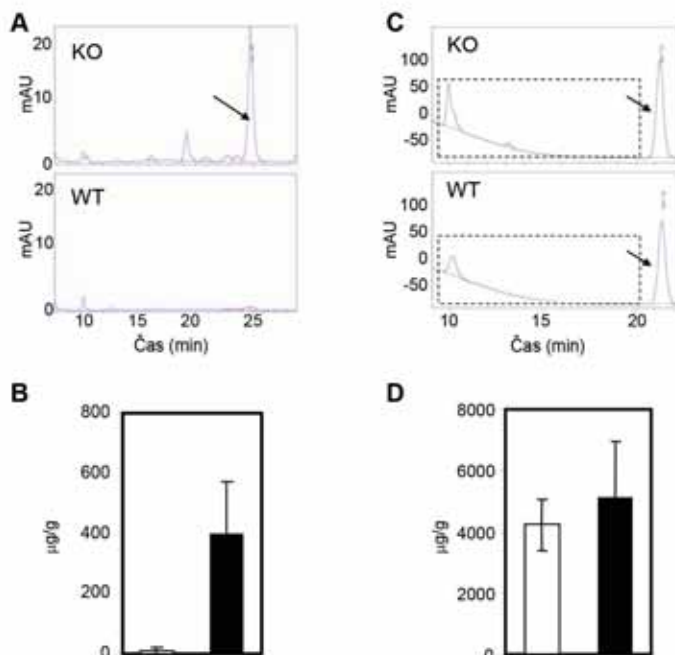
250x4.6 mm (Varian) z mobilno fazo 99,5% n-heptan (J.T.Baker):0,5% izopropanol (J.T.Baker) (v/v) s pretokom 1,00 mL/min. Količino holesterola smo določili na osnovi kromatograma analize z normalno fazo pri 200 nm. Ker se lanosterol in T-MAS na normalni fazi ne ločita, smo frakcijo z intermediati (8-20 minut) polovili, posušili, raztopili v acetonitrilu in jih analizirali s pomočjo separacije na reverzni fazi na koloni C8-LiChrospher RP-8, 5 μ m, 250x4,6 mm (Varian) z mobilno fazo (v/v) 93% acetonitril (Fischer Scientific):7% vode s pretokom 1,00 mL/min. Na osnovi retencijskih časov (RT) standardov smo lahko določili lanosterol (Sigma L5768; RT 24,5 min na reverzni fazi in holesterol (Steraloids C6760; RT 21,3 min na normalni fazi), medtem ko so bili 7-dehidroholesterol (Steraloids C3000), latosterol (Steraloids C7400-000) in T-MAS in FF-MAS (laboratorijski standardi (22) pod mejo detekcije.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Želeli smo preučiti vlogo citokrom P450-oksido-reduktaze (POR) na biosintezo holesterola v jetrih. Citokrom P450-oksido-reduktaza (POR) namreč sodeluje kot donor elek-

tronov pri dveh reakcijah v biosintezni poti, pri mono-oksigenaciji skvalena s skvalen-epoksidazo in pri 14 α -demetilaciji lanosterola s CYP51 (Slika 1). Razvita sta bila dva modela miši z izničnim genom *Por* specifično v jetrih (L-PORKO) (23, 24). V jetrih miši divjega seva in L-PORKO (23) smo analizirali sterolni profil. Določili smo količino holesterola in lanosterola (Slika 2), medtem ko je bila količina 7-dehidroholesterola, latosterola, FF-MAS in T-MAS pod mejo detekcije. Količina lanosterola je v jetrih miši L-PORKO 35-krat povečana (397,48 \pm 138,87 μ g/g vs. 11,55 \pm 5,17 μ g/g; Slika 2A in B). Lanosterol je substrat za CYP51-posredovano reakcijo. Njegovo kopičenje kaže na to, da je CYP51 neaktiven in da je za CYP51 POR nezamenljiv donor elektronov. Mono-oksigenacija skvalena je v biosintezni poti pred CYP51 (Slika 1) in očitno poteče kljub odsotnosti POR. Skvalen-mono-oksigenaza ima verjetno alternativni vir elektronov, kot na primer citokrom b₅/NADH-reduktazo (25).

Kljub velikemu kopičenju lanosterola, ki kaže na to, da je sinteza holesterola na ravni CYP51 močno inhibirana ali celo ustavljena, se količina celokupnega holesterola v jetrih ni bistveno spremenila (4233,54 \pm 837,14 μ g/g vs. 5104,10 \pm 1869,77 μ g/g; Slika 2C in D). Ko količina holesterola pade, transkripcijski faktor SREBP2 namreč aktivira tako biosintezno pot kot tudi prevzem holesterola iz plazme



Slika 2: Količina lanosterola in holesterola v jetrih miši z izničnim genom *Por*. Reprezentativni kromatogrami lanosterola (puščica) po analizi HPLC z reverzno fazo (A) in holesterola (puščica) z normalno fazo (C). Na osnovi kromatogramov smo določili količino lanosterola (B) in holesterola (D) v jetrih miši divjega seva (beli stolpci) in miši z izničnim genom *Por* (črni stolpci). Rezultati predstavljajo srednjo vrednost in standardno deviacijo petih živali.

Figure 2: Lanosterol and cholesterol amount in the liver of wild type and liver specific *Por* knock-out mice. Representative reverse phase (A) and straight phase (C) HPLC chromatograms of lanosterol (A) and cholesterol (C) analysis. Quantification of lanosterol (B) and cholesterol (D) in the liver of wild type (white bars) and liver specific *Por* knock-out (black bars) mice. Results represent mean \pm SD of 5 animals.

preko z receptorjem LDL posredovane endocitoze (26). V jetrih miši L-PORKO je povišano izražanje holesterogenih genov, vendar to ne zadostuje za sintezo holesterola (24). Povečan pa je tudi prevzem lipoproteinov LDL, kar kaže znižana raven serumskega holesterola za 65% pri miših L-PORKO (23).

4 SKLEP

Z našo analizo smo pokazali, da je encim citokrom P450-reduktaza nujen pri 14 α -demetilaciji lanosterola v biosintezni poti holesterola. Posledica napak v genu *Por* oziroma eksperimentalno izničenje gena je neaktivnost encima POR in posledična inhibicija CYP51 in akumulacija lanosterola. Metilirani steroli pa ne morejo funkcionalno zamenjati holesterola (5), kar je skupaj s pomanjkanjem holesterola ključno pri patogenezi ABS in teratogenem delovanju azolov. Kljub temu, da je biosintetska pot prekinjena, pa je količina holesterola nespremenjena, najverjetneje zaradi homeostatskih mehanizmov, ki omogočajo uravnavanje količine holesterola na ravni prevzema holesterola iz LDL delcev.

5 LITERATURA

1. Incardona JP, Eaton S. Cholesterol in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 193-203.
2. Bijlsma MF, Spek CA, Peppelenbosch MP. Hedgehog: an unusual signal transducer. *Bioessays* 2004; 26: 387-394.
3. Waterham HR, Wanders RJ. Biochemical and genetic aspects of 7-dehydrocholesterol reductase and Smith-Lemli-Opitz syndrome *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529: 340-356.
4. Liscum L. Cholesterol biosynthesis. In: Vance DE, Vance JE, eds. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier 2002; 409-431.
5. Bloch KE. Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem* 1983; 14: 47-92.
6. Kandutsch AA, Russell AE. Preputial Gland Tumor Sterols. *J Biol Chem* 1960; 235: 2256-2261.
7. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343: 425-430.
8. Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, et al. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature* 1995; 374: 559-562.
9. Bokal EV, Fon Tacer K, Vrbnjak M, et al. Follicular sterol composition in gonadotrophin stimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 249: 92-98.
10. Engelking LJ, Evers BM, Richardson JA, et al. Severe facial clefting in *Insig*-deficient mouse embryos caused by sterol accumulation and reversed by lovastatin. *J Clin Invest* 2006; 116: 2356-2365.
11. Evers BM, Farooqi MS, Shelton JM, et al. Hair Growth Defects in *Insig*-Deficient Mice Caused by Cholesterol Precursor Accumulation and Reversed by Simvastatin. *J Invest Dermatol* 2010; 130(5):1237-48.
12. Porter FD, Herman GE. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *J Lip Res* 2011; 52 6-34.
13. Horvat S, Mcwhir J, Rozman D. Defects in cholesterol synthesis genes in mouse and in humans: lessons for drug development and safer treatments. *Drug Metabolism Reviews* 2011; 43: 69-90.
14. Rozman, D, Monostory K. Perspectives of the non-statin hypolipidemic agents. *Pharmacology & Therapeutics* 2010; 127: 19-40.
15. Strömstedt M, Rozman D, Waterman MR. The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14 α -demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. *Arch Biochem Biophys* 1996; 329: 73-81.
16. Aleck KA, Bartley DL. Multiple malformation syndrome following fluconazole use in pregnancy: report of an additional patient. *Am J Med Genet* 1997; 72: 253-256.
17. Reardon W, Smith A, Honour JW, et al. Evidence for digenic inheritance in some cases of Antley-Bixler syndrome? *J Med Genet* 2000; 37: 26-32.
18. Keber R, Motaln H, Wagner KD, et al. Mouse knockout of the cholesterologenic cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51) resembles Antley-Bixler syndrome. *J Biol Chem* 2011; 286(33): 29086-97.
19. Kelley RI, Kratz LE, Glaser RL et al. Abnormal sterol metabolism in a patient with Antley-Bixler syndrome and ambiguous genitalia. *Am J Med Genet* 2002; 110: 95-102.
20. Fluck CE, Tajima T, Pandey AV, et al. Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. *Nat Genet* 2004; 36: 228-230.
21. Fukami M, Horikawa R, Nagai T, et al. Cytochrome P450 oxidoreductase gene mutations and Antley-Bixler syndrome with abnormal genitalia and/or impaired steroidogenesis: molecular and clinical studies in 10 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 414-426.
22. Baltzen M, Byskov AG. Quantitation of meiosis activating sterols in human follicular fluid using HPLC and photodiode array detection. *Biomed. Chromatogr* 1999; 13: 382-388.
23. Henderson CJ, Otto DM, Carrie D, et al. Inactivation of the hepatic cytochrome P450 system by conditional deletion of hepatic cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* 2003; 278: 13480-13486.
24. Gu J, Weng Y, Zhang QY, et al. Liver-specific deletion of the NADPH-cytochrome P450 reductase gene: impact on plasma cholesterol homeostasis and the function and regulation of microsomal cytochrome P450 and heme oxygenase. *J Biol Chem* 2003; 278: 25895-25901.
25. Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, et al. Biodiversity of the P450 catalytic cycle: yeast cytochrome b5/NADH cytochrome b5 reductase complex efficiently drives the entire sterol 14-demethylation (CYP51) reaction. *FEBS Letters* 1999; 462: 283-288.
26. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89: 331-340.