

Received: 2009.05.11
Accepted: 2009.06.15
Published: 2009.07.13

Seladyna 1/DHCR24: główne białko homeostazy komórkowej i biosyntezy cholesterolu

Seladin-1/DHCR24: A key protein of cell homeostasis and cholesterol biosynthesis

Joanna Drzewińska, Łukasz Pułaski, Mirosław Soszyński, Grzegorz Bartosz

Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Seladyna 1 (produkt genu *DHCR24*) jest wielofunkcyjnym białkiem, którego właściwości enzymatyczne, antyoksydacyjne i antyapoptyczne sprawiają, że stanowi ono istotny czynnik neuroprotektyny. Białko to zidentyfikowano w związku z jego obniżoną ekspresją w komórkach objętych chorobą Alzheimera, a mutacje w *DHCR24* powodujące zahamowanie enzymatycznej aktywności białka w szlaku biosyntezy cholesterolu są przyczyną śmiertelnej choroby desmosterolozji.

Seladyna 1 jako enzym biosyntezy cholesterolu wpływa na tworzenie tratw lipidowych i kaweol, struktur błonowych zaangażowanych w funkcjonowanie szlaków przekazywania oraz niektórych procesów metabolicznych, takich jak trawienie białka prekursorowego amyloidu. Ma to szczególne znaczenie w związku z powiązaniem seladyny 1 z patofizjologią choroby Alzheimera. Niezależnie od roli enzymatycznej, seladyna 1 może pełnić funkcje inhibitora kaspazy 3, przekaźnika sygnałów w szlaku odpowiedzi stymulowanym przez reaktywne formy tlenu i onkogenne białko Ras, a także zmiataacza wolnych rodników. Wydaje się, że efekty tych aktywności są w pośredni sposób modulowane przez błonową zawartość cholesterolu. Stąd poszczególne funkcje seladyny 1 są również wynikiem aktywności enzymatycznej białka w szlaku biosyntezy cholesterolu.

Seladyna 1/DHCR24 występuje w wielu tkankach, a na najwyższym poziomie ekspresji występuje w komórkach mózgu i nadnerczy. Przy tym seladyna 1 ma zmieniony profil ekspresji w nowotworach o różnym pochodzeniu tkankowym. Ze względu na pełnione role seladyny 1 intensywnie bada się mechanizm funkcjonowania tego białka, jednak tylko w niewielkim zakresie określono czynniki wpływające na regulację ekspresji kodującego go genu. Dotychczas stwierdzono, że ekspresję seladyny 1 w komórkach skóry reguluje heterodimer LXR α /RXR α , w komórkach prostaty – AR, a za wysoką ekspresję w tkance nerwowej odpowiada prawdopodobnie aktywacja za pośrednictwem ER α . Poza estrogenami i androgenami w stymulacji ekspresji genu *DHCR24* uczestniczą również hormony tarczycy i IGF-1.

Słowa kluczowe:

***DHCR24* • seladyna 1 • choroba Alzheimera • cholesterol • stres oksydacyjny**

Summary

Seladin-1 is a multifunctional protein encoded by *DHCR24* gene and due to its enzymatic, antioxidant, and anti-apoptotic activities, it is considered as neuroprotective agent. Seladin-1 was identified as a gene down-regulated in brain regions selectively degenerated in Alzheimer's disease. Mutations of *DHCR24* gene result in inhibition of the enzymatic activity of seladin-1, causing an accumulation of desmosterol and leading to a lethal disorder called desmosterolosis. As an enzyme of cholesterol biosynthesis, seladin-1 enhances the formation of lipid rafts and caveoles. These membrane structures are involved in the maintenance of signaling pathways and me-

tabolic processes, such as the degradation of amyloid precursor protein, which is especially significant in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Independently of its enzymatic activity in cholesterol biosynthesis, seladin-1 acts as a caspase-3 inhibitor, a mediator of response to oxidative and oncogenic stress, and a reactive oxygen species scavenger. However, the effects of these activities seem to be indirectly modulated by membrane cholesterol level, which in turn gives priority to seladin-1's enzymatic function in cholesterol biosynthesis, among its other functions. Seladin-1 is ubiquitously expressed, with the highest expression level in the brain and adrenal glands. Differences in seladin-1 expression profile were reported in transformed cells originating from many tissue types. Although the mechanisms of the regulation of seladin-1 activity demand further elucidation, it has already been shown that *DHCR24* gene was activated by LXR α /RXR α in skin, by ER α in neurons, and by AR in prostate. Apart from estrogens and androgens, thyroid hormones, and IGF-1 also take part in the stimulation of seladin-1 expression.

Key words: *DHCR24* • seladin-1 • Alzheimer's disease • cholesterol • oxidative stress

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=890490>

Word count: 6319

Tables: –

Figures: 2

References: 78

Adres autorki: mgr Joanna Drzewińska, Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; jdrzewin@biol.uni.lodz.pl.

Wykaz skrótów: **AR** – jądrowy receptor androgenów; **BACE** – enzym trawiący miejsce β białka prekursorowego amyloidu; **ChA** – choroba Alzheimera; **DRM** – błony odporne na detergenty; **ER** – jądrowy receptor estrogenów; **ERE** – element odpowiedzi na jądrowy receptor estrogenów; **GC-MS** – spektrometria mas sprzężona z chromatografią gazową; **GFP** – zielone białko fluorescencyjne; **HPLC** – wysokosprawna chromatografia cieczowa; **HPTLC** – wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa; **IGF-I** – insulinopodobny czynnik wzrostu-1; **IGFBP-2** – białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu; **LXR** – wątrobowy receptor X; **PEG** – glikol polietylenowy; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **RXR** – jądrowy receptor retinoidowy X; **siRNA** – małe interferujące RNA.

WSTĘP

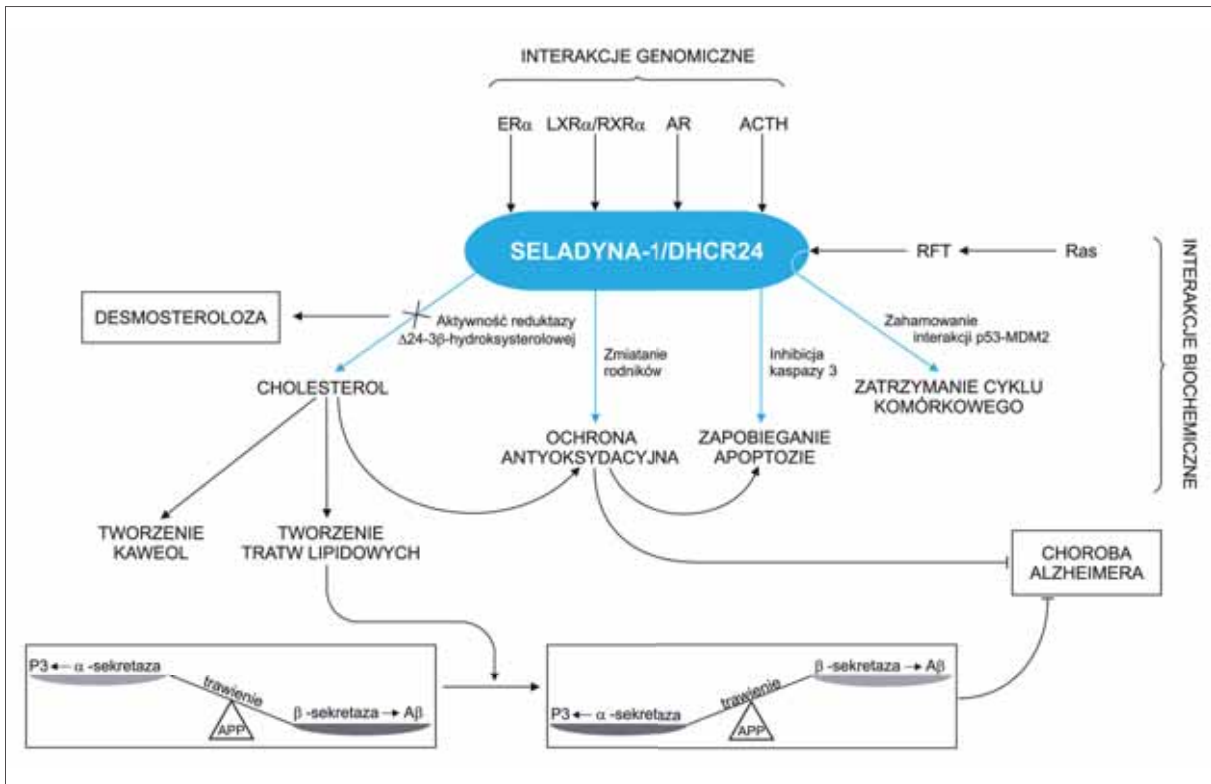
Odkąd zidentyfikowano białko seladynę 1 (produkt genu *DHCR24*), przypisano mu wiele pozornie niepowiązanych ze sobą funkcji. Wykazano, że białko to ma obniżoną ekspresję w komórkach mózgu objętych chorobą Alzheimera, bierze udział w biosyntezie cholesterolu, hamuje aktywację kaspazy 3 (głównego mediatora procesu apoptozy), nadaje komórkom odporność na toksyczne działanie β -amyloidu oraz na stres oksydacyjny. Stwierdzono również, że pełni ono funkcję w przekazywaniu sygnału w odpowiedzi na stres onkogenny i oksydacyjny, oraz że może być bezpośrednim zmiataczem reaktywnych form tlenu (RFT). Wraz z postępem badań nad poszczególnymi aspektami aktywności seladyny 1 odkrywano powiązania między jej poszczególnymi funkcjami, co podniosło rangę tego białka jako czynnika wszechstronnie zaangażowanego w utrzymywanie homeostazy redoks i działającego neuroprotekcynie (ryc.1).

IDENTYFIKACJA GENU *DHCR24* I BIAŁKA SELADYNA 1/*DHCR24*

Chorobę Alzheimera (ChA) cechuje znacząca utrata neuronów i synaps w określonych regionach mózgu, w związku

z powstawaniem splotów neurofibrylarnych oraz zewnątrzkomórkowym i śródkomórkowym nagromadzeniem β -amyloidu w postaci blaszek starczych. Powstające blaszki amyloidowe są równomiernie rozmieszczone w korze nowej i hipokampie, jednak najsilniejszej degeneracji podlegają duże neurony piramidowe hipokampa. Neurony piramidowe, znajdujące się w płatach czołowym, ciemieniowym i potylicznym kory, nie ulegają degeneracji nawet w późnych stadiach ChA [28,29].

Badania nad genetycznym podłożem zjawisk prowadzących do rozwoju ChA przyniosły w 2000 roku identyfikację genu kodującego białko seladyna 1. Greeve i wsp. stosując technikę różnicowej prezentacji mRNA (differential mRNA display) porównywali ekspresję genów w regionach mózgu wykazujących zmiany fizjopatologiczne charakterystyczne dla ChA z regionami mózgu, w których zmiany te nie występowały. Stwierdzono, że ponad 30 genów ma odmienny profil ekspresji, a wśród nich zidentyfikowano jeden o znacznie obniżonej ekspresji w dolnej korze skroniowej w stosunku do kory czołowej, podczas gdy u osób zdrowych ekspresja pozostawała na tym samym poziomie we wszystkich regionach mózgu. Ten białkowy produkt genu o wyraźnie zmienionym profilu ekspresji w rejonach mózgu objętych ChA nazwano seladyna 1 (seladin-1) jako akronim wyrażenia „SElective Alzheimer Disease INdicator”



Ryc. 1. Funkcje białka seladyny 1/DHCR24 oraz czynniki mogące wywierać na nie wpływ. Aβ – β-amyloid

[30]. W kolejnych badaniach, na podstawie analizy *post mortem* płatów skroniowego i potylicznego mózgow osób ze zmianami neuropatologicznymi charakterystycznymi dla ChA, stwierdzono o 33% niższy poziom transkrypcji seladyny 1 w porównaniu z odpowiednimi obszarami mózgow pacjentów bez demencji [35].

Kolejnym krokiem w wyjaśnianiu biologicznych właściwości seladyny 1 było wykazanie, że białko to ma również swoistą aktywność enzymatyczną. Desmosteroloza to rzadka recesywna choroba autosomalna charakteryzująca się występowaniem wielu wad uniemożliwiających przeżycie płodu lub prowadzących do śmierci krótko po narodzeniu [25]. U płodów i noworodków z desmosterolozą w osoczu stwierdzono podniesiony poziom prekursora cholesterolu – desmosterolu. Zaburzenie to związane jest z brakiem aktywności reduktazy Δ^{24} - 3β -hydroksysterolowej (DHCR24), która katalizuje redukcję podwójnego wiązania przy węglu 24 desmosterolu, w wyniku czego powstaje cholesterol. Na podstawie homologii do enzymów roślinnych (szlaku biosyntezy roślinnych steroli i brassinosteroidów), Waterham i wsp. zidentyfikowali ludzkie cDNA *DHCR24*, które okazało się identyczne z cDNA seladyny 1 [69]. Na tej podstawie gen nazwano *DHCR24* (nr dostępu w GeneBank AF261758), zaś w odniesieniu do białka kodowanego przez ten gen używa się zamiennie nazw seladyna 1 lub DHCR24.

GEN *DHCR24* I PRODUKT JEGO EKSPRESJI

Gen *DHCR24* jest umiejscowiony na chromosomie 1p31.1-p33, obejmuje sekwencję wielkości 46415 par zasad i składa się z 8 eksonów i 9 intronów. Otwarta ramka

odczytu obejmuje 1548 nukleotydów, co odpowiada 516 resztom aminokwasowym i obliczonej masie 60,1 kDa. Na podstawie homologii z innymi białkami przewiduje się, że białko seladyna 1 ma przynajmniej jedną domenę transmembranową. Ponadto seladyna1 zawiera konserwatywną domenę zaangażowaną w niekowalencyjne wiązanie FAD, charakterystyczną dla klasy oksydoreduktaz zależnych od FAD [30,55]. Chociaż nie stwierdzono sekwencji konsensusowej wiązania NADPH, to właśnie od tego ko-faktora jest zależna enzymatyczna aktywność białka, jak wykazały eksperymenty wykorzystujące *Saccharomyces cerevisiae* do heterologicznej ekspresji ludzkiego *DHCR24* [69]. Seladyna 1 jest umiejscowiona w retikulum endoplazmatycznym, a w mniejszym stopniu w aparacie Golgiego. Ponadto, w N-końcowej części białka zidentyfikowano region, który może stanowić sygnał jego mitochondrialnej lokalizacji (MTS), jednak do tej pory nie stwierdzono, by seladyna 1 występowała w mitochondriach [30]. Jądrowe umiejscowienie seladyny 1 obserwowano w wyniku translokacji zachodzącej w komórkach nadnerczy pod wpływem adrenokortykotropiny (ACTH) [6, 57] oraz w fibroblastach pod wpływem silnego stresu oksydacyjnego [73].

Pedretti i wsp., dzięki zastosowaniu techniki modelowania homologii zaproponowali strukturę seladyny 1, w której reszty aminokwasowe 1-22 stanowią peptyd sygnałowy MTS, a pozostałe 494 reszty aminokwasowe tworzą funkcjonalne białko (gdzie reszty aminokwasowe 23-55 to domena transmembranowa, sekwencje 55–235 i 492–517 to domena wiążąca FAD, a 236–491 to domena wiążąca substrat) [59].

Andersson i wsp. zidentyfikowali 4 naturalne mutacje zmiany sensu dla genu *DHCR24*: E191K, N294T, K306N,

Y471S. Każda z tych mutacji (niezależnie od występowania pozostałych) powodowała spadek aktywności enzymatycznej seladyny 1 [4]. Według modelu Pedrettiego mutacje te dotyczą domen wiążących substrat lub FAD [59].

Stwierdzono również, że seladyna 1 jest potencjalnym substratem trawienia kaspaz. W komórkach śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC) przechodzących apoptozę, seladyna 1 jest trawiona do białka o masie 40 kDa. Analiza sekwencji seladyny 1 wykazała obecność dwóch domniemanych motywów rozpoznawanych przez kaspazy: LEVD (w pozycji 122-125 reszty aminokwasowej) i VVOD (w pozycji 383-386 reszty aminokwasowej), stwierdzono również, że trawienie w którymkolwiek z tych miejsc daje produkty wielkości 40 kDa. Obie te sekwencje są wysoce konserwatywne we wszystkich ortologach seladyny 1, co może świadczyć o tym, że białko to może być substratem śmierci dla trawienia przez kaspazy [30].

EKSPRESJA SELADYNY 1 W KOMÓRKACH PRAWIDŁOWYCH

Wysoki poziom ekspresji seladyny 1 stwierdzono w mózgu osób zdrowych, najwyższy w rejonach korowych, substancji czarnej, jądrze ogoniastym, hipokampie, rdzeniu przedłużonym oraz w rdzeniu kręgowym [30], a także w komórkach macierzystych mózgu [8]. Poza ośrodkowym układem nerwowym seladyna 1 na wysokim poziomie ekspresji występuje w nadnerczach [6,30,49,61], przysadce mózgowej, płucach [30], gruczole krokowym [9,10,22,31] i wątrobie płodu, na umiarkowanym poziomie w wątrobie, śledzionie [30,69], jajnikach [26,30], jądrach i tarczycy [30], a na niskim poziomie ekspresji w sercu, macicy, jelitach. Natomiast w komórkach krwi seladyna 1 była niewykrywalna [30].

Jak wykazali Benvenuti i wsp., w komórkach prekursorowych neuronów seladyna 1 występuje na wysokim poziomie ekspresji, lecz w procesie ich różnicowania w neurony poziom ekspresji seladyny 1 znacząco spada. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że obniżenie poziomu ekspresji seladyny 1 obserwowane w regionach mózgu objętych chorobą Alzheimera może być wynikiem zaburzeń związanych z pulą neuronalnych komórek macierzystych mózgu [8]. Kontynuując badania nad procesem różnicowania ludzkich komórek macierzystych w komórki nerwowe, Benvenuti i wsp. stwierdzili, że hormony tarczycy pobudzają proces różnicowania i jednocześnie (głównie trójiodotyronina) stymulują ekspresję seladyny 1 w będących modelami komórek macierzystych komórkach hMSC (ludzkie mezenchymalne komórki pnia) i FNC (płodowe komórki neuroepitelialne) [7]. Natomiast, w komórkach już zróżnicowanych do fenotypu neuronalnego ekspresja seladyny 1 była niższa i nie podlegała modulacji przez trójiodotyroninę. Chociaż biologiczne znaczenie indukcji ekspresji seladyny 1 przez hormony tarczycy w komórkach prekursorowych neuronów wymaga dalszych badań, to przypuszcza się, że w związku z aktywnością antyapoptotyczną seladyny 1 wzrost jej ekspresji w komórkach rozwijającego się mózgu może być związany z ochroną komórek prekursorowych przed śmiercią. Z tego punktu widzenia seladyna 1 może być uznawana za czynnik pomagający zachować pulę młodych i samoregenerujących się komórek multipotencjalnych, które później przejdą pod kontrolę innych regulowanych przez hormony tarczycy genów pobudzających różnicowanie w kierunku fenotypu neuronalnego [7].

Niedawno stwierdzono również nadekspresję seladyny 1 w rogówce dorosłych myszy [74] oraz wzrost ekspresji seladyny 1 w makrofagach pod wpływem czynnika pobudzającego kolonie 1 (CSF1) [36].

EKSPRESJA SELADYNY 1 W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Porównując komórki prawidłowe różnych narządów i odpowiadające im stransformowane komórki nowotworowe stwierdzono znaczące różnice w profilu ekspresji seladyny 1. W stosunku do prawidłowych komórek nadnerczy, komórki raka nadnerczy wykazują obniżony poziom seladyny 1, a jej znacznie podwyższoną ekspresję obserwuje się w gruczolakach wydzielających aldosteron. Ze względu na to, że wykazano stymulację ekspresji *DHCR24* przez szlak adrenokortykotropiny (ACTH)/cAMP, uważa się, że za efekt obserwowany w komórkach gruczolaka nadnerczy odpowiada wysoka ekspresja receptora ACTH [61]. Na podstawie tych badań przypuszcza się, że seladyna 1 może pełnić w komórkach nadnerczy podwójną rolę: w regulacji steroidogenezy oraz w ochronie komórek przed działaniami niepożądanymi intensywnej steroidogenezy, takich jak np. stres oksydacyjny [57]. Ponadto stwierdzono, że poziom ekspresji seladyny 1 znacząco maleje wraz z przechodzeniem komórek raka kory nadnerczy w kolejne stadia zaawansowania rozwoju nowotworu [49].

Tymczasem według Di Stasi i wsp. w komórkach czerniaka przebiega zjawisko odwrotne. Obserwowano wzrost poziomu ekspresji seladyny 1 w komórkach czerniaka w fazie przerzutowania w stosunku do nowotworu w stadium pierwotnym. Tłumaczy to antyapoptotyczną i antyoksydacyjną funkcją seladyny 1. Potwierdzeniem tej tezy może być podwyższenie poziomu ekspresji enzymów antyoksydacyjnych, co w dalszej kolejności sugeruje, że wzrost ekspresji seladyny 1 może być związany ze współdziałaniem tego białka z enzymami antyoksydacyjnymi [21].

Z kolei Luciani i wsp. wysunęli wniosek, że seladyna 1, wykazująca wysoki poziom ekspresji w gruczolakach przysadki niewytwarzających somatotropiny (GH), chroni te komórki przed proapoptotycznym działaniem somatostatyn i może być uznawana za jeden z czynników niosących oporność na interwencje farmakologiczne w tym typie nowotworów. Autorzy badań założyli to oparli na obserwacji, że jednocześnie z nadekspresją seladyny 1 w tym typie gruczolaków przysadki pojawia się ekspresja receptorów somatostatyn, a mimo to komórki nie odpowiadają na zastosowany analog somatostatyn oktreotyd. W konsekwencji nie następuje aktywacja kaspazy 3 i indukcja apoptozy obserwowane w przypadku gruczolaków wydzielających GH i jednocześnie wykazujących niski poziom ekspresji seladyny 1 [50].

Bonaccorsi i wsp. stwierdzili, że w późnych stadiach rozwoju guza prostaty seladyna 1 podlega wysokiej ekspresji, natomiast w komórkach raka w stadium przerzutowania jej poziom jest obniżony w stosunku do komórek prawidłowych. Przyjmuje się, że za efekt ten odpowiedzialna jest stymulacja ekspresji seladyny 1 przez szlak związany z jądrowymi receptorami androgenów – AR (których wysoki poziom zanotowano w zaawansowanym guzie prostaty). Z zaburzeniem funkcjonowania szlaku AR w komórkach raka w fazie przerzutowania wiąże się spadek ekspresji seladyny 1 [10].

REGULACJA EKSPRESJI GENU *DHCR24*

Wiele danych pozwalało przypuszczać, że w regulację ekspresji *DHCR24* są zaangażowane estrogeny. Jednak dopiero badania Luciani i wsp. dostarczyły dowodów na istnienie tej zależności. Zjawisko wzrostu zawartości cholesterolu oraz zwiększonej oporności na toksyczne działania β -amyloidu i stresu oksydacyjnego, obserwowane w płodowych komórkach neuroepitelialnych (FNC) w wyniku ekspozycji na 17 β -estradiol, stanowiło przesłankę o aktywacji ekspresji seladyny 1 przez estrogeny [48]. W oparciu o wyniki uzyskane techniką genów reporterowych oraz RT-PCR stwierdzono następnie, że transkrypcja genu *DHCR24* jest aktywowana pod wpływem 17 β -estradiolu, selektywnych modulatorów receptorów estrogenów, takich jak raloksyfen i tamoksyfen oraz fitoestrogenów (genisteina, zearalenon). Dowiedziono, że zachodzi bezpośrednia interakcja receptora ER β z półpalindromowymi sekwencjami typu ERE (umiejscowionymi w regionie promotora od 4384 do 2887 nukleotydów w kierunku 5' od miejsca startu transkrypcji genu *DHCR24*) [48]. Biorąc pod uwagę, że w neuronach hipokampa u chorych na ChA stwierdzono obniżoną ekspresję ER α , a 17 β -estradiol aktywuje transkrypcję *DHCR24* w komórkach nerwowych prawdopodobnie za pośrednictwem ER α uznano, że seladyna 1 pełni podstawową rolę w zjawisku neuroprotekcji wywoływanym przez estrogeny [48].

Ponadto, badania Gianniniego i wsp. wskazują na istnienie sygnalizacji krzyżowej (cross-talku) między szlakiem estrogenów a IGF-I oraz na wzajemne oddziaływanie między seladyną 1, estrogenami i IGF-I. Traktowanie płodowych komórek neuroepitelialnych 17 β -estradiolem powodowało dziewięciokrotne zwiększenie wydzielania IGF-I do medium hodowlanego, a z kolei pod wpływem IGF-I następował znaczący wzrost ekspresji seladyny 1, której poziom ulegał następnie obniżeniu na skutek działania wysokiego stężenia glukozy [27].

Uwzględniając, że IGF-I powoduje stymulację wzrostu, redukcję apoptozy oraz wzrost wydzielania białka IGF-BP-2 (które zapewnia wiązanie IGF-I do receptora) [11], zakłada się, że seladyna 1 może być mediatorem pozytywnego wpływu IGF-I na przeżywalność komórek układu nerwowego, chociaż dokładny mechanizm działania wymaga wyjaśnienia [27].

W badaniach Bonaccorsiego i wsp. prawie dokładnie ten sam region promotora genu *DHCR24*, który uczestniczy w interakcji z ER β został uznany za region zawierający element odpowiedzi na AR. Sekwencja od 4394 do 2892 nukleotydu (w kierunku 5' od miejsca startu transkrypcji) wykazywała zdolność do transkrypcyjnej aktywacji w liniach komórkowych pochodzących z łagodnego rozrostu gruczolaki krokowego (BPH) pod wpływem R1881, który jest syntetycznym agonistą AR [10]. Dodatkowo analiza *in silico* pozwoliła zidentyfikować w promotorze w okolicach pozycji 2901 (ponownie licząc nukleotydy w kierunku 5' od miejsca startu transkrypcji) domniemane miejsce wiązania AR. Ponadto, zanotowano wzrost poziomu ekspresji *DHCR24* pod wpływem naturalnego agonisty AR dihydrotestosteronu w komórkach LNCaP (linia komórek raka prostaty odpowiadająca na androgeny) [66]. W komórkach LNCaP obserwowano także spadek ekspre-

sji *DHCR24* po zahamowaniu przekształcania testosteronu w jego fizjologicznie czynną postać dihydrotestosteron [9]. Obniżenie ekspresji receptora androgenów i w związku z tym *DHCR24* następowało także w komórkach prostaty szczurów, którym dostarczano duże dawki selenu [44].

Gen *DHCR24* zidentyfikowano jako jeden z genów wykazujących zmiany w ekspresji w skutek obniżenia ekspresji receptora oksysteroli LXR (w komórkach wątroby myszy) oraz zawierających sekwencję wiążącą LXR α (na podstawie analizy wiązania do DNA genomowego z linii komórki ludzkiego raka wątroby) [68]. Wang i wsp. dokładnie zanalizowali regulację tego genu w związku z tym, że w komórkach skóry szlak biosyntezy cholesterolu jest bardzo aktywny i wiele genów związanych z metabolizmem cholesterolu jest regulowanych przez jądrowe receptory oksysteroli z grupy LXR. Stwierdzono, że prawidłowy poziom ekspresji *DHCR24* w komórkach skóry myszy zapewnia receptor LXR α , natomiast nie stymuluje on ekspresji tego genu w mózgu. Szczegółowa analiza zdolności wiązania się LXR z sekwencją promotorową *DHCR24* wykazała, że w regulacji transkrypcji *DHCR24* najprawdopodobniej bierze udział heterodimer LXR α /RXR α , który wiąże się z elementem odpowiedzi na LXR (LXRE DR4) znajdującym się w obrębie 1500 par zasad w sekwencji intronu drugiego [68].

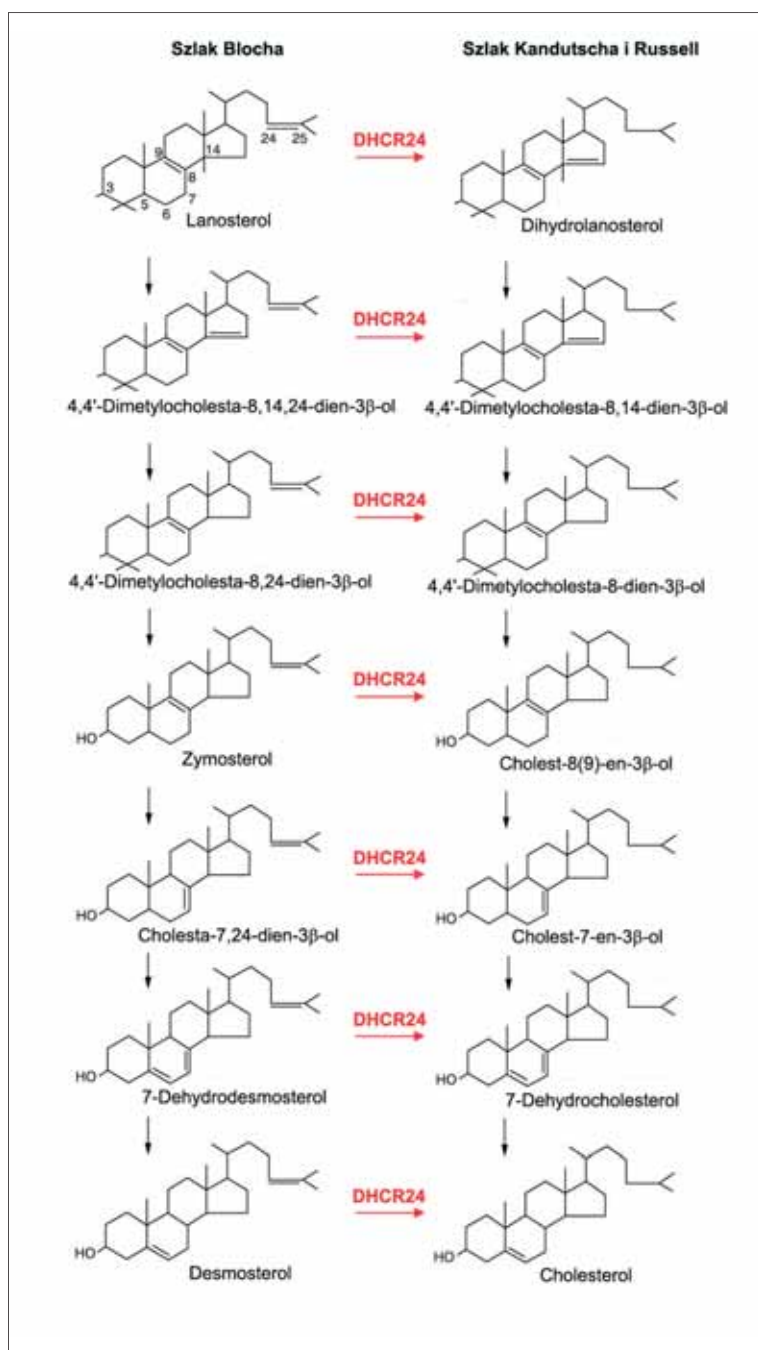
Na podstawie powyższych badań można stwierdzić, że regulacja transkrypcji *DHCR24* jest swoista tkankowo. Jednak ze względu na znaczną odległość położenia domniemanych sekwencji wiążących receptory ER α , AR i LXR α /RXR α od miejsca startu transkrypcji należy wziąć pod uwagę, że czynniki te mogą brać udział zarówno we wzmacnianiu, jak i tłumieniu podstawowej transkrypcji genu *DHCR24*.

ENZYMATYCZNA AKTYWNOŚĆ SELADYNY 1 W BIOSYNTIEZIE CHOLESTEROLU

Początkowo wydawało się, że różne role seladyny 1: antyapoptotyczna, antyoksydacyjna, enzymatyczna i transdukcja, są całkiem odrębne. Jednak obecny stan wiedzy na temat wzajemnych relacji poszczególnych właściwości seladyny 1 pozwala stwierdzić, że dominującą rolą seladyny 1 jest aktywność enzymatyczna. To właśnie w związku z modulowaniem poziomu cholesterolu w błonie funkcja enzymatyczna, w mniejszym lub większym stopniu, warunkuje pozostałe efekty wywierane przez seladynę 1. Stąd role jakie pełni seladyna 1 będą tu opisane w aspekcie ich związku z aktywnością białka jako enzymu biosyntezy cholesterolu.

Seladyna 1 pełni szczególnie ważną rolę w biosyntezie cholesterolu, ponieważ stanowi pomost między dwoma szlakami (ryc. 2). Redukując wiązanie podwójne przy węglu 24 ostatniego prekursora cholesterolu, desmosterolu, seladyna 1 stanowi ostatni enzym szlaku Blocha, natomiast redukując wiązanie podwójne przy węglu 24 we wcześniejszych prekursorach szlaku Blocha przekierowuje syntezę na szlak Kandutsch i Russell [41]. Enzymatyczna aktywność seladyny 1 jest najważniejsza dla syntezy cholesterolu, a z kolei cholesterol jest prawdopodobnie nieodzowny do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmu ludzkiego.

Cholesterol, będąc jednym z głównych składników błon komórkowych ssaków pełni wiele funkcji: jego właściwości fizyczne pozwalają na tworzenie w obrębie błony domen



Ryc. 2. Szlaki biosyntezy cholesterolu po etapie przekształcenia skwalenu w lanosterol

o odmiennej płynności [3,64] bierze on udział w interakcjach białko-lipid [5] oraz ułatwia funkcjonowanie białek błonowych [2,54]. W komórkach nerwowych współtworzy osłonki mielinowe. W przypadku zaburzenia zdolności syntezy cholesterolu w embrionalnym rozwoju człowieka zachodzą nieprawidłowości, co wynika m.in. z zaburzenia szlaku sygnalizacji Sonic Hedgehog [17]. Wynika to stąd, że białka należące do rodziny Hedgehog odgrywają rolę modulatorów wzrostu i morfogenezy, i aby pełnić funkcję sygnalizacyjną muszą być zmodyfikowane poprzez kowalencyjne związanie cholesterolu.

Desmosteroloza będąca wynikiem mutacji genu *DHCR24* należy do grupy zaburzeń wrodzonych związanych z nie-

prawidłowym przebiegiem procesu biosyntezy cholesterolu na poziomach późniejszych niż etap syntezy skwalenu [32]. Te wady genetyczne objawiają się poważnymi nieprawidłowościami w rozwoju i w większości przypadków prowadzą do zmian neurofizjologicznych, co sugeruje ważną rolę cholesterolu w utrzymywaniu homeostazy mózgu. Jednak to, że desmosteroloza jest zaburzeniem letalnym może świadczyć zarówno o istotności roli cholesterolu, toksyczności desmosterolu, jak i istotności pozaenzymatycznych funkcji seladyny 1. Jednym z kroków w wyjaśnianiu tego problemu było wyhodowanie myszy pozbawionych jednego lub obydwu alleli genu *DHCR24*, co pozwoliło na obserwację wszystkich następstw niedoboru bądź braku cholesterolu w warunkach *in vivo*.

METODY OZNACZANIA SELADYNY 1

Do badania ekspresji genu *DHCR24* na poziomie mRNA wykorzystywano technikę RT-PCR [8,10,20,22,26,31,35,40,44,47,49,50], Northern blotting [21,30,35,61], a także hybrydyzację otrzymanego przez odwrotną transkrypcję cDNA z mikromacierzami DNA [10]. Poziom białka seladyny 1 w komórkach oznaczano metodą Western blotting z użyciem otrzymanych przez Greeve i wsp. króliczych poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko fragmentowi sekwencji aminokwasów (od 203 do 218 reszty aminokwasowej) seladyny 1 [30,48,49,57,73] lub z zastosowaniem komercyjnie dostępnych króliczych przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciwko N-końcowemu fragmentowi seladyny 1 [40].

Komórki wykazujące nadekspresję genu *DHCR24* otrzymywano w wyniku transfekcji komórek wektorem pEGFP-N1 zawierającym sekwencję otwartej ramki odczytu seladyny 1 [16,30,40]. Wyciszenie ekspresji genu *DHCR24* uzyskiwano techniką interferencji RNA z użyciem siRNA, którym transfekowane były komórki [40,48,73]. Wyhodowano również myszy pozbawione jednego (*DHCR24* +/-) lub obydwu alleli (*DHCR24* -/-) genu *DHCR24* [14,52,53]. W badaniach mających na celu określenie wewnątrzkomórkowego umiejscowienia białka seladyny 1 wykorzystywano techniki immunofluorescencyjne [57,73] oraz fluorescencyjne białko fuzyjne *DHCR24*-GFP, wytwarzane w komórkach stransfekowanych konstruktem EGFP-N1-*DHCR24* [8,21].

Badania aktywności enzymatycznej reduktazy Δ^{24} - 3β -hydroksysterolowej były oparte na detekcji zmian w komórkowej zawartości cholesterolu względem desmosterolu. Do oznaczeń desmosterolu i cholesterolu w komórkowym ekstraktach lipidowych stosowano techniki: GC-MS [8,10,16,48,69], HPLC [47], HPTLC [20,21].

Stosowanymi w badaniach inhibitorami aktywności reduktazy Δ^{24} - 3β -hydroksysterolowej były triparanol [53] oraz 5,22E-cholestadien- 3β -ol [16].

Zdolność wiązania się seladyny 1 z białkiem p53 i blokowania w ten sposób interakcji p53-MDM2 badano z zastosowaniem rekombinowanego białka GST-seladyna 1 oraz rekombinowanego białka Flag-p53. Zachodzenie powyższych interakcji stwierdzano metodą precypitacji rekombinowanych białek i immunoblotingu wykorzystującego przeciwciała anty-Flag i anty-GST, na podstawie występowania prążków odpowiadających poszczególnym kompleksom białek (MDM2 związane z Flag-p53, MDM2 niezwiązane z Flag-p53, GST-seladyna 1 związane z Flag-p53) [73].

Do badania aktywności zmiatającej seladyny 1 względem rodników używano komercyjnego zestawu do fluorescencyjnej detekcji katalazy [46].

WPLYW ZABURZENIA EKSPRESJI *DHCR24* NA ORGANIZMY MYSZY

Myszy heterozygotyczne *DHCR24* +/- rozwijały się w sposób prawidłowy i dożywały dorosłego wieku bez większych problemów zdrowotnych, ale z umiarkowanym (istotnym statystycznie) obniżeniem poziomu cholesterolu. W mózgu tych myszy średnia zawartość cholesterolu w błonach spadała o 29%, a całkowity poziom w komórce o 15%, za-

wartość desmosterolu znacznie wzrosła (prawie 6-krotnie), a poziom produktu katabolizmu cholesterolu 24-hydroksycholesterolu zmalał o około 25% w porównaniu do zawartości w mózgu myszy dzikich. Cramer i wsp. zanotowali również zmiany w składzie i funkcjonowaniu traw lipidowych [20].

Natomiast u myszy *DHCR24* -/- nie wykryto mRNA seladyny 1, w mózgu nie stwierdzono obecności cholesterolu, a zawartość 24-hydroksycholesterolu spadła o 97%, wzrósł natomiast poziom desmosterolu (50-krotnie) [20]. Myszy *DHCR24* -/- wyhodowane przez Wechslera i wsp. w chwili urodzenia były o 25% mniejsze od dzikich, były bezpłodne, miały mniej tkanki tłuszczowej podskórnej umiejscowionej w okolicy krezki, a neurony ośrodkowego układu nerwowego cechował widoczny spadek mielinizacji. Stwierdzono prawidłowy profil syntezy kwasów żółciowych, ale ograniczeniu uległa synteza kwasu cholowego, koniecznego do prawidłowej absorpcji cholesterolu i lipidów. Ponadto, wątroby myszy *DHCR24* -/- zawierały trzy razy mniej fitosteroli niż myszy typu dzikiego. Porównawcza analiza patomorfologiczna wykazała, że u myszy *DHCR24* -/- w wieku 3 miesięcy poza jądrami wszystkie organy miały prawidłową strukturę [70]. Z kolei Cramer i wsp. u myszy *DHCR24* -/- zaobserwowali ograniczenie ruchów i dermopatię restrykcyjną – letalną wadę wrodzoną związaną z nagromadzeniem wody w komórkach naskórka (zjawisko to obserwowano również u ludzi z desmosterolozą) [52,53]. Zaburzenie to objawia się gładką, napiętą skórą bez zmarszczek, znacznie uwodnionym naskórkiem, zaburzeniem struktury i funkcji warstwy rogowej naskórka. Może to być wynikiem obserwowanych zaburzeń w procesie różnicowania keratynocytów oraz zmian dystrybucji ceramidów współtworzących z cholesterolem funkcjonalną barierę epidermalną. Ponadto, pojawienie się akwaporyny 3 w nietypowych dla jej profilu ekspresji komórkach naskórka odzwierciedla znaczący wzrost przyswajania i zawartości glicerolu, co z kolei wiąże się ze wzrostem zawartości wody w tej warstwie skóry [52].

Gdy myszy z niedoborem któregośkolwiek z pozostałych enzymów biosyntezy cholesterolu umierały w stadium embrionalnym, myszy *DHCR24* -/- są żywotne, chociaż dane na temat maksymalnej długości życia są rozbieżne (kilka dni – Mirza i wsp.; 1 miesiąc Cramer i wsp.; 3 miesiące – Wechsler i wsp.). Jednak przy całkowitym braku cholesterolu dożycie tego wieku nie byłoby możliwe [20]. Dojrzewanie embrionu i rozwój postnatalny tych myszy są możliwe, ponieważ w przeciwieństwie do człowieka, u myszy funkcjonuje mechanizm zapewniający przechodzenie cholesterolu przez łożysko. Stąd cholesterol z krwi heterozygotycznej matki uzupełnia niedobór cholesterolu w fazie embrionalnej, natomiast dalsza żywotność może być związana z zastąpieniem cholesterolu przez desmosterol lub z innym niewyjaśnionym mechanizmem [20].

Pod względem identyczności aminokwasów białko seladyna 1 myszy jest w 97% homologiczne z białkiem ludzkim i przy założeniu, że pełni ono takie same funkcje w organizmie myszy i człowieka, dane na temat wpływu niedoboru tego białka stanowią ważny punkt odniesienia dla badań *in vitro* z zastosowaniem ludzkich linii komórkowych.

ZNACZENIE POZIOMU CHOLESTEROLU DLA ZACHODZENIA PROCESÓW ZWIĄZANYCH Z CHOROBA ALZHEIMERA

Patogenezę ChA zaczęto wiązać z metabolizmem cholesterolu, gdy stwierdzono, że posiadanie allelicznego wariantu $\alpha 4$ apolipoproteiny E (będącej głównym transporterem cholesterolu w mózgu) stanowi główny czynnik ryzyka zachorowania na ChA. Wykazano, że allel $\alpha 4$ obniża średni wiek zachorowania na ChA oraz że występuje on u 40–60% chorych [19,63].

Badania prowadzone pod kątem udziału zmian poziomu cholesterolu w etiologii ChA dostarczały z jednej strony wiele doniesień o obniżonym poziomie cholesterolu u chorych na ChA, a z drugiej strony danych o tym, że to wzrost poziomu cholesterolu sprzyja rozwojowi ChA [32,76]. Zwolennicy tego ostatniego stanowiska twierdzili, że wzrost poziomu cholesterolu wzmacnia wytwarzanie β -amyloidu w modelach *in vitro* oraz zwierzęcych modelach ChA. Zgodnie z tym poglądem badania epidemiologiczne wskazywały, że terapia statynami może działać ochronnie przed zachorowaniem na ChA, jednak kliniczne korzyści płynące ze stosowania statyn mogły być również wynikiem ich działania niezwiązanego z poziomem cholesterolu w mózgu, a mianowicie wpływu na krążenie mózgowe oraz procesy zapalne [60]. Ponadto, większość statyn nie przekracza bariery krew–mózg, a te które to czynią (np. lowastatyna i simwastatyna) hamują wytwarzanie pęcherzyków synaptycznych, tworzenie dendrytów i rozgałęzień aksonalnych [32]. Stąd obserwowane działania statyn na organizm obejmują również trudny do oszacowania wpływ statyn na komórki układu nerwowego. Powyższy nurt badań dotyczył holistycznego ujęcia zmian poziomu cholesterolu w organizmie. Nie rozpatrywano oddzielnie poziomu cholesterolu w osoczu i wewnątrzkomórkowej zawartości cholesterolu w błonach. Natomiast rozgraniczenie znaczenia wahań poziomu cholesterolu w tych dwóch pulach ma duże znaczenie zwłaszcza w przypadku układu nerwowego, gdzie cholesterol jest wytwarzany lokalnie *de novo*, stąd jego błonowa zawartość jest niezależna od poziomu w osoczu.

Biorąc pod uwagę, że białko prekursorowe amyloidu (APP) jest białkiem błonowym i że sposób jego degradacji ma podstawowe znaczenie dla rozwoju ChA, w badaniach skoncentrowanych na wyjaśnieniu mechanizmu kontrolującego trawienie APP zwrócono szczególną uwagę na wpływ cholesterolu na ten proces. W warunkach fizjologicznie prawidłowych ponad 90% APP podlega trawieniu przez β -sekretazę w obrębie N-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej, a następnie w obrębie domeny transbłonowej jest trawione przez γ -sekretazę, w wyniku czego powstaje nietoksyczny, rozpuszczalny produkt końcowy – peptyd P3. Prawie 10% APP ulega rozpadowi w wyniku alternatywnego sposobu trawienia. W szlaku tym bierze udział β -sekretaza (BACE), która w pierwszej kolejności odcina N-końcowy fragment APP, a następnie domena transmembranowa trawiona jest przez γ -sekretazę. W rezultacie powstaje toksyczny produkt końcowy, składający się z 40-42 reszt aminokwasowych, zwany β -amyloidem [62]. W związku z małą wydajnością trawienia typu β oraz aktywnością enzymów degradujących β -amyloid, w warunkach fizjologicznie prawidłowych nie ulega on nagromadzeniu. Natomiast w warunkach patologicznych następuje intensyfikacja alternatywnego sposobu trawienia APP.

Zarówno APP, jak i enzymy biorące udział w jego proteolizie są białkami błonowymi i ich rozmieszczenie w błonie jest uwarunkowane zawartością cholesterolu, który organizuje błonę w przedziały różniące się między sobą płynnością. Cholesterol jest komponentem zapewniającym strukturalną integralność mikrodomen tratw lipidowych. Błonowe tratwy lipidowe to małe (50–100 nm), heterogeniczne, wysoce dynamiczne domeny bogate w cholesterol i sfingolipidy, stanowiące przedział dla niektórych procesów komórkowych i mogące tworzyć większe platformy przez interakcje występujących w nich białek z innymi białkami i lipidami [12]. Wprawdzie nie udało się jeszcze opracować metody pozwalającej na bezpośrednią obserwację i/lub izolację tratw lipidowych, niemniej zakłada się, że tratwy lipidowe występują w uporządkowanej ciekłej fazie błony i dzięki temu są bardziej odporne na rozpuszczanie w detergentach niejonowych. Stąd uznaje się, że skład tratw w komórkach do pewnego stopnia odpowiada tzw. błonom odpornym na deterenty (DRM) [12]. Ustalono że APP występuje w błonie komórkowej zarówno w obrębie DRM, jak i poza nimi. W DRM umiejscowione są także niektóre z enzymów degradujących β -amyloid: powstająca z plazminogenu plazmina, IDE (enzym degradujący insuliny) oraz neprylizyna [14,39,42].

Ponadto, najnowsze badania dowodzą, że APP i α -sekretaza występują głównie w przedziałach błony niezwiązanych z tratwami lipidowymi, podczas gdy BACE i kompleks γ -sekretyz występują w obrębie tratw błony aparatu Golgiego i późnych endosomów [67]. Stąd uważa się, że umiarkowany spadek poziomu cholesterolu w błonie neuronów hipokampa (<25%) powoduje dezorganizację tratw, co prowadzi do zwiększenia częstości kontaktu BACE z APP i wzrostu wytwarzania β -amyloidu [1,20]. Z kolei drastyczny spadek poziomu cholesterolu (>35%) powoduje zahamowanie aktywności BACE i γ -sekretyzy i w związku z tym następuje spadek wytwarzania β -amyloidu (mimo bezpośredniego kontaktu BACE i γ -sekretyzy z APP) (ryc. 1) [1]. Powyższą hipotezę dotyczącą wpływu zmian poziomu błonowego cholesterolu na metabolizm APP postawiono na podstawie obserwacji zjawisk zachodzących zarówno w błonach neuronów hipokampa transgenicznych myszy, jak i neuronów hipokampa pacjentów z ChA [1].

Zaobserwowano również, że umiarkowana utrata cholesterolu błonowego, spowodowana np. obniżeniem poziomu ekspresji seladyny 1 w neuronach, powoduje nie tylko zmianę drogi przetwarzania APP na szlak generujący β -amyloid [1,20], ale także szybsze i wzmoczone wiązanie wydzielonych oligomerów β -amyloidu z błoną komórek nerwowych. W rezultacie wzrasta przepuszczalność błony, następuje zmiana dystrybucji jonów wapnia wewnątrz eksponowanych komórek i dochodzi do stresu oksydacyjnego [15,16]. Zgodnie z przewidywaniami, pozytywną korelację między nadekspresją seladyny 1 i wzrostem oporności na toksyczność β -amyloidu wykazano w badaniach prowadzonych na liniach komórek neuroglejaka H4 [28] i nerwiaka zarodkowego SH-SY5Y [16,20]. Wobec tego, że oporność na toksyczność agregatów β -amyloidu w takim samym stopniu zwiększała zawartość błonowego cholesterolu za pomocą PEG-cholesterolu, jak i nadekspresja seladyny 1 [16,30], założono, że neuroprotektynne działanie tego białka jest wynikiem jego funkcji enzymatycznej. W komórkach z nadekspresją seladyny 1

oprócz wzrostu poziomu cholesterolu błonowego obserwowano brak aktywności BACE, aktywację plazminogenu i spadek wytwarzania β -amyloidu [20]. Stąd, niższa generacja β -amyloidu w tych komórkach może być wypadkową dwóch procesów: skierowania szlaku degradacji APP na drogę trawienia przez β -sekretazę oraz trawienia β -amyloidu przez plazminę, gdyż błony bogate w cholesterol w większym stopniu wiążą plazminogen [16,20].

Chociaż w powyższych badaniach rozpatrywano jedynie znaczenie niedoboru cholesterolu w warunkach obniżonej ekspresji seladyny 1, to z eksperymentów przeprowadzonych na modelach mysich wiadomo, że cholesterol jest prawdopodobnie zastępowany w błonach przez desmosterol. Stąd nasuwa się pytanie, w jakim stopniu desmosterol może funkcjonalnie zastąpić cholesterol i w jakim stopniu odmienne właściwości desmosterolu mogą się przyczyniać do patogenezы choroby Alzheimera.

FUNKCJE CHOLESTEROLU A DESMOSTEROL

Podczas gdy występowanie innych prekursorów cholesterolu w błonach komórkowych jest szeroko rozpowszechnione, desmosterol obficie występuje jedynie w błonie komórkowej astrocytów i plemników [45,56].

Wprawdzie desmosterol może zamiast cholesterolu uczestniczyć w modyfikacji białek Hedgehog, to stwierdzono, że zmodyfikowane desmosterolem białka Sonic Hedgehog w tkankowej hodowli neuronów wykazywały mniejszą aktywność [18,53].

Wykazano, że podwójne wiązanie między węglami C24 i C25 w desmosterolu zmienia jego konformację w odniesieniu do cholesterolu, stąd ma on bardziej nachylną płaszczyznę w stosunku do fosfolipidów błonowych i tworzy mniej upakowaną strukturę tratw lipidowych [65].

Wykorzystując proteoliposomy jako model tratw lipidowych stwierdzono, że aktywność BACE w układzie z desmosterolem jest zbliżona do aktywności w układzie z cholesterollem, podczas gdy w obecności 7-ketocholesterolu aktywność BACE jest mniejsza [38].

Wpływ obecności desmosterolu na aktywność BACE oceniano także na podstawie eksperymentów przeprowadzonych na myszach. W mózгах 3-tygodniowych myszy *DHCR24* $-/-$ cholesterol nie występował, a jego brak był w 50% kompensowany obecnością desmosterolu, czemu towarzyszył spadek aktywności plazminy i BACE oraz zmniejszone wytwarzanie β -amyloidu. Wyniki wspierają hipotezę, że drastyczny spadek poziomu cholesterolu (powyżej 30%) powoduje zahamowanie aktywności związanych z tratwami enzymów zaangażowanych w metabolizm APP. Nie oznacza to, że desmosterol nie zastępuje funkcjonalnie cholesterolu, ale w tych warunkach wzrost poziomu desmosterolu nie jest dostateczny, by móc zniwelować skutek obniżenia poziomu cholesterolu, za czym przemawiają obserwacje procesów zachodzących u 16-tygodniowych myszy.

W mózгах 16-tygodniowych myszy *DHCR24* $-/-$ cholesterol był całkowicie zastąpiony przez desmosterol, a β - i γ -sekretazy wykazywały pełną aktywność, czemu

towarzystowało wytwarzanie β -amyloidu [41]. Na tej podstawie można stwierdzić, że chociaż desmosterol tworzy mniej stabilne tratwy lipidowe, to nie wpływa to w znaczący sposób na aktywność enzymów trawiących APP w szlaku amyloidogennym. Tym samym jeśli spadek ekspresji seladyny 1 powoduje wzrost aktywności szlaku amyloidogennego, to bezpośrednią tego przyczyną, w świetle powyższych wyników badań, nie może być obniżenie poziomu cholesterolu, gdyż jest ono kompensowane przez wzrost zawartości desmosterolu w błonach.

Sugeruje to, że obserwowany efekt wynika z innego mechanizmu niż zmiana aktywności czy umiejscowienia enzymów względem substratu.

Założenie to znajduje potwierdzenie w rezultatach badań Crameriego i wsp., które wskazują, że ekspresja seladyny 1 jest konieczna do swoistej rekrutacji lipidów i białek do DRM oraz że niedobór tego białka powoduje dezorganizację DRM związaną z nieprawidłową lokalizacją białek i lipidów [20].

Inną strukturą błonową, w której tworzeniu uczestniczy cholesterol, a jej funkcjonowanie mogłoby ulec zmianie w obecności desmosterolu, są kaweole. Stanowią one stabilne wpuklenia błony komórkowej, których rdzeń lipidowy budują sfingolipidy i cholesterol, a od tratw lipidowych różnią się obecnością kaweoliny – palmitylowanego białka integralnego błony, wiążącego cholesterol. Nie stwierdzono obecności kaweol w komórkach nerwowych. Główną rolą kaweoliny 1, podlegającej ekspresji w niemal wszystkich tkankach, jest bezpośrednie wiązanie cholesterolu i zapewnienie w ten sposób jego stałej puli koniecznej do tworzenia wpukleń [47]. Chociaż niektóre funkcje kaweol są tematem sporów, stwierdzono zaangażowanie tych struktur w endocytozę, transport cholesterolu, regulację przekazania sygnałów, a także w proces nowotworzenia [24,72]. Badania Lu i wsp. wykazują, że w obrębie kaweoli w embrionalnych fibroblastach myszy występują receptory insuliny (IR), a pozbawienie tych komórek cholesterolu powoduje zaburzenie struktury kaweol i odłączenie się od nich IR [46,47]. Zjawisko to prowadzi do zaburzenia efektów wywołanych przez insulinę, takich jak fosforylacja IRS-1 (substratu receptora insuliny) i uczestniczących w szlaku antyapoptotycznym białek Akt i Bad. Stąd zaburzenie aktywności insuliny w związku z brakiem cholesterolu w komórkach *DHCR24* $-/-$ MEF jest przynajmniej częściowo odpowiedzialne za apoptozę tych komórek [47]. Chociaż w badaniach tych nie oszacowano wpływu, jaki zastąpienie cholesterolu desmosterolem może mieć na ekspozycję IR przez kaweole, to Westermann i wsp. stwierdzili, że desmosterol w mniejszym stopniu niż cholesterol stabilizuje kaweole. Może to być związane z mniejszą hydrofobowością desmosterolu, co z kolei może wpływać na płynność błony i zmieniać strukturę kaweol [71]. W oparciu o przykład zaburzenia szlaku związanego z insuliną można przyjąć, że również wiele innych szlaków sygnalizacji związanych z kaweolami może ulegać zahamowaniu w warunkach braku ekspresji *DHCR24*. Jednak w świetle ostatnich badań, w których autorzy wskazują, że zastąpienie cholesterolu desmosterolem w komórkach HeLa w niewielkim stopniu obniża integralność błony czy tworzenie kaweol [37], znaczenie desmosterolu dla funkcjonalności kaweol jest dyskusyjne.

Stwierdzono natomiast różnice między desmosterolem i cholesterolem na poziomie regulacji transkrypcji niektórych genów. Badania *in vitro* Yanga i wsp. wykazały, że desmosterol z jednej strony hamuje szlak SREBP-2, a z drugiej strony aktywuje receptory jądrowe z grupy LXR [77]. SREBP-2 i SREBP-1c to czynniki transkrypcyjne należące do rodziny białek wiążących sterolowy element regulacyjny (sterol regulatory element-binding proteins - SREBP). Regulują one ekspresję genów zaangażowanych w homeostazę lipidową i cholesterolową [78]. SREBP-2 preferencyjnie aktywuje geny metabolizmu cholesterolu, podczas gdy SREBP-1c preferencyjnie aktywuje geny metabolizmu kwasów tłuszczowych i trójglicerydów [34]. Geny obu tych czynników mogą być aktywowane w konsekwencji spadku poziomu steroli. U myszy *DHCR24* +/- obserwowano wzrost ekspresji SREBP-1c w porównaniu do SREBP-2, co prawdopodobnie odzwierciedla to, że SREBP-1c (w przeciwieństwie do SREBP-2) jest jednym z genów aktywowanych przez LXR. Natomiast u myszy *DHCR24* -/- całkowity brak cholesterolu i zastąpienie go desmosterolem powoduje silną aktywację genów stymulowanych przez LXR oraz mechanizmy kompensujące brak cholesterolu [33].

Badano także wpływ zastąpienia cholesterolu desmosterolem na syntezę kwasów żółciowych. Klasyczny szlak syntezy kwasów żółciowych rozpoczyna się hydroksylacją cholesterolu przez enzym CYP7A1, zaś droga alternatywna zaczyna się hydroksylacją prowadzoną przez enzym CYP27. Choć wykazano, że desmosterol może pełnić rolę prekursora kwasów żółciowych w obu drogach ich syntezy, to u myszy *DHCR24* +/- nie stwierdzono by desmosterol był substratem dla Cyp7a1. Ponadto wykazano, że desmosterol jest bardziej efektywnym substratem Cyp27 niż cholesterol. Może to wynikać stąd, że czynnikiem limitującym aktywność Cyp27 względem cholesterolu jest transport cholesterolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej, podczas gdy desmosterol może przenikać przez lipofilne błony w znacznie większym stopniu [33].

SELADYNA 1/CHOLESTEROL A STRES OKSYDACYJNY

Od momentu odkrycia zmian ekspresji seladyny 1 w ChA przypisywano jej działanie antyoksydacyjne i antyapoptotyczne.

Już Greeve i wsp. stwierdzili, że nadekspresja seladyny 1 chroni komórki przed stresem oksydacyjnym i apoptozą wywołanymi nadtlakiem wodoru i β -amyloidem poprzez hamowanie aktywacji kaspazy 3 [30]. Stwierdzono, że w warunkach ostrego stresu oksydacyjnego następuje trawienie seladyny 1 do białka 40 kDa przez kaspazy (głównie kaspazę 6), a powstające białko jest prawdopodobnie nieaktywne. W związku z tym, Greeve i wsp. postawili hipotezę, że zarówno produkt trawienia seladyny 1 o masie 40 kDa, jak i sam spadek transkrypcji *DHCR24* stanowią sygnał proapoptotyczny [30].

Wu i wsp. opisali w 2004 r. kolejną rolę seladyny 1 jako mediatora w szlaku odpowiedzi na stres oksydacyjny i aktywację onkogenu Ras. Według nich, seladyna 1 może uczestniczyć w tym samym mechanizmie odpowiedzi na RFT, zainicjowanym zarówno bezpośrednio przez stres oksydacyjny, jak i przez aktywację Ras (ryc. 1). Wynika to stąd, że z aktywacją białka Ras związana jest nie tylko inicja-

cja transformacji nowotworowej, ale także przedwczesne starzenie się komórek poprzez generację RFT i następującą po nim akumulację p53 i p16INK4a [43].

Wykazano, że seladyna 1 jest bezpośrednim regulatorem aktywności p53, gdyż hamuje następującą w odpowiedzi na stres oksydacyjny interakcję między p53 a MDM2. W rezultacie następuje spadek zależnej od MDM2 ubikwitynacji p53 i nagromadzenie się zaktywowanego p53 w komórce, w wyniku czego następuje zatrzymanie cyklu komórkowego. Jak wykazała analiza sekwencji, zaangażowanie seladyny 1 w regulację interakcji p53 z MDM2 umożliwiają dwie sąsiadujące ze sobą regiony seladyny 1: homologiczny z miejscem wiązania MDM2 na p53 (Box P) i homologiczny z miejscem wiązania p53 na MDM2 (Box F) [73]. Ponadto aktywność seladyny 1 w regulacji p53 jest niezależna od jej funkcji enzymatycznej, gdyż mutacja *DHCR24* N294T/K306N, która blokuje aktywność enzymatyczną białka, nie ma wpływu na interakcję seladyny 1 z p53 [40,73]. Wu i wsp. stwierdzili, że seladyna 1 nie wpływa na aktywację Ras ani generowanie RFT, stąd w szlaku odpowiedzi na stres oksydacyjny i przedwczesnym starzeniu seladyna 1 musi działać jako efektor RFT, oddziałujący na szlak p53. Rezultaty tych badań pozwoliły na przypisanie seladynie 1 nieoczekiwanej dotąd funkcji w integracji sygnałów w odpowiedzi na stres onkogeny i oksydacyjny.

Ponadto, Kuehnle i wsp. zaobserwowali, że w komórkach nerwiaka zarodkowego (SH-SY5Y) w następstwie ostrego stresu oksydacyjnego nie pojawiają się żadne produkty trawienia seladyny 1 (jak twierdzili Greeve i wsp.), ale następuje wzrost ekspresji seladyny 1, co nadaje komórkom odporność na toksyczne działanie nadtlenu wodoru. Jednocześnie, wraz ze wzrostem zawartości cholesterolu w komórkach nerwiaka zarodkowego (zarówno poprzez wprowadzenie egzogenego cholesterolu, jak i w wyniku nadekspresji *DHCR24*) obserwowany był wzrost fosforylacji kinaz Akt i ERK, które uczestniczą w sygnalizacji zaangażowanej w przeżycie komórki i są aktywowane m.in. przez RFT [51]. Na tej podstawie stwierdzono, że wysoki poziom seladyny 1 chroni komórkę przed stresem oksydacyjnym poprzez mechanizm angażujący czynniki sprzyjające przeżyciu komórek (takie jak Akt) i jest to związane z udziałem domen bogatych w cholesterol w szlakach przekaznictwa sygnałów aktywowanych przez stres oksydacyjny.

Jednak, te same badania wykazały, że paradoksalnie również niski poziom seladyny 1 stanowi czynnik sprzyjający przeżyciu komórek nerwiaka zarodkowego. Zaobserwowano, że w warunkach długotrwałej ekspozycji komórek na stres oksydacyjny następuje obniżenie poziomu seladyny 1 oraz znaczny spadek poziomu p53. Stąd uznano, że seladyna 1 musi działać ochronnie na komórki w dwojaki sposób.

Wysoki poziom seladyny 1 zwiększa stabilizację zaaktywowanego p53, jednak nie następuje zatrzymanie cyklu komórkowego czy apoptoza, ponieważ przeważa mechanizm ochronny związany ze wzrostem poziomu cholesterolu. Tymczasem w warunkach niskiego poziomu seladyny 1, chociaż mechanizm związany z cholesterolem nie może odgrywać roli ochronnej przed stresem oksydacyjnym, jak tłumaczy Kuehnle i wsp., za wzmoczoną odporność na stres oksydacyjny odpowiada wówczas obniżona stabiliza-

cja aktywowanego p53, a co za tym idzie spadek ekspresji genów aktywowanych przez p53 i uczestniczących w procesie apoptozy lub zatrzymania cyklu komórkowego [40].

Ponadto, chociaż domena seladyny 1 zaangażowana w syntezę cholesterolu nie uczestniczy w interakcji z p53, okazuje się, że sygnalizacja szlaku Ras jest modulowana w zależności od zawartości błonowego cholesterolu oraz występowania DRM [23, 58]. Sugeruje to, że zmiany poziomu ekspresji seladyny 1 mogą się przyczyniać do patogenezы chorób neoplastycznych i/lub neurodegeneracyjnych zarówno zależnie od cholesterolu, jak i niezależnie, poprzez modulację szlaków przeżycia i śmierci komórki [20].

Z kolei Lu i wsp. zaobserwowali zwiększone wytwarzanie RFT w mysich fibroblastach embrionalnych wyizolowanych z myszy *DHCR24*^{-/-}. W komórkach z przywróconą ekspresją *DHCR24* wystąpił spadek generacji RFT. Zjawisko to tłumaczono zmiatającymi wolne rodniki właściwościami seladyny 1 (ryc. 1). Na podstawie badania aktywności antyoksydacyjnej poszczególnych fragmentów białka seladyny 1 określono, że za zdolność do enzymatycznej dekompozycji nadtlenu wodoru odpowiada N-końcowy fragment białka (od 1 do 395 reszty aminokwasowej). Okazało się, że seladyna 1 wykazuje zaledwie kilkakrotnie niższą aktywność względem rozkładu nadtlenu wodoru ($1,3 \pm 0,5 \times 10^3$ mol/s/mol białka) w porównaniu z aktywnością katalazy oznaczaną w tych samych warunkach ($7,3 \pm 1,4 \times 10^3$ mol/s/mol białka) [46]. W kontekście aktywności zmiatacza wolnych rodników, seladyna 1 może również chronić miejsce swej lokalizacji – retikulum endoplazmatyczne – przed stresem spowodowanym nieprawidłowym składaniem białek, nadmiernym wiązaniem disiarczokowym i następującą w wyniku tego generacją RFT [75].

PODSUMOWANIE

Seladyna 1 zapewniając właściwy poziom cholesterolu przyczynia się do zachowania prawidłowego składu i funkcji tratw lipidowych oraz zapewnia prawidłowy przebieg wielu innych procesów zależnych od cholesterolu.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abad-Rodriguez J., Ledesma M.D., Craessaerts K., Perga S., Medina M., Delacourte A., Dingwall C., De Strooper B., Dotti C.G.: Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *J. Cell Biol.*, 2004; 167: 953–960
- [2] Albert A.D., Boesze-Battaglia K., Paw Z., Watts A., Epan R.M.: Effect of cholesterol on rhodopsin stability in disk membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996; 1297: 77–82
- [3] Anderson R.G., Jacobson K.: A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science*, 2002; 296: 1821–1825
- [4] Andersson H.C., Kratz L., Kelley R.: Desmosterolosis presenting with multiple congenital anomalies and profound developmental delay. *Am. J. Med. Genet.*, 2002; 113: 315–319
- [5] Ayala-Sanmartin J.: Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of annexins by their core domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 283: 72–79
- [6] Battista M.C., Roberge C., Otis M., Gallo-Payet N.: Seladin-1 expression in rat adrenal gland: effect of adrenocorticotrophic hormone treatment. *J. Endocrinol.*, 2007; 192: 53–66
- [7] Benvenuti S., Luciani P., Cellai I., Deledda C., Baglioni S., Saccardi R., Urbani S., Francini F., Squecco R., Giuliani C., Vannelli G.B., Serio M., Pinchera A., Peri A.: Thyroid hormones promote cell differentiation and up-regulate the expression of the seladin-1 gene in *in vitro* models of human neuronal precursors. *J. Endocrinol.*, 2008; 197: 437–446
- [8] Benvenuti S., Saccardi R., Luciani P., Urbani S., Deledda C., Cellai I., Francini F., Squecco R., Rosati F., Danza G., Gelmini S., Greeve I., Rossi M., Maggi R., Serio M., Peri A.: Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells: changes in the expression of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *Exp. Cell Res.*, 2006; 312: 2592–2604
- [9] Biancolella M., Valentini A., Minella D., Vecchione L., D'Amico F., Chillemi G., Gravina P., Bueno S., Prosperini G., Desideri A., Federici G., Bernardini S., Novelli G.: Effects of dutasteride on the expression of genes related to androgen metabolism and related pathway in human prostate cancer cell lines. *Invest. New Drugs*, 2007; 25: 491–497
- [10] Bonaccorsi L., Luciani P., Nesi G., Mannucci E., Deledda C., Dichiarà F., Paglierani M., Rosati F., Masieri L., Serni S., Carini M., Proietti-Pannunzi L., Monti S., Forti G., Danza G., Serio M., Peri A.: Androgen receptor regulation of the seladin-1/DHCR24 gene: altered expression in prostate cancer. *Lab. Invest.*, 2008; 88: 1049–1056

Chociaż początkowo trudno było rozstrzygnąć, czy obniżenie ekspresji seladyny 1 jest efektem czy przyczyną zmian fizjopatologicznych zachodzących w chorobie Alzheimera, to z perspektywy dzisiejszego stanu wiedzy można przyjąć, że to spadek aktywności seladyny 1 leży (przynajmniej częściowo) u podstaw tych zaburzeń.

Z przeprowadzonych badań wynika, że obniżenie poziomu cholesterolu w błonach związane ze spadkiem ekspresji seladyny 1 powoduje nasilenie się amyloidogennego mechanizmu degradacji APP. Jednak, jak wskazują eksperymenty przeprowadzone na myszach, wraz ze spadkiem poziomu cholesterolu stopniowo następuje nagromadzenie w błonach desmosterolu. Z kolei badania *in vitro* wykazały, że w obecności desmosterolu BACE i β -sekretraza zachowują taką samą aktywność jak w przypadku cholesterolu. W związku z tym przekierowanie szlaku trawienia APP na tor amyloidogenny prawdopodobnie nie jest związane ze spadkiem poziomu cholesterolu, kiedy jest on zastępowany przez desmosterol, wynika natomiast z zaburzenia aktywności seladyny 1 względem organizacji tratw lipidowych. Natomiast w zakresie, w jakim w organizmie człowieka zastępowanie błonowego cholesterolu przez desmosterol jest w znacznym stopniu ograniczone, seladyna 1 wpływa na metabolizm APP i szlaki sygnalizacji związane z tratwami lipidowymi głównie poprzez modulację poziomu cholesterolu.

Negatywne następstwa obniżenia ekspresji seladyny 1 to z jednej strony spadek poziomu cholesterolu prowadzący do wzrostu wytwarzania i nagromadzenia β -amyloidu, a w konsekwencji kumulacja wewnątrzkomórkowego wapnia do poziomu toksycznego dla komórki oraz wywołanie stresu oksydacyjnego. Jednak niedobór seladyny 1 może się przyczyniać do ograniczenia roli tego białka w przekazywaniu sygnału w odpowiedzi na stres oksydacyjny, do osłabienia mechanizmu enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej oraz do aktywacji kaspazy 3 prowadzącej do apoptozy. Stąd, białko seladyna 1 wszechstronnie uczestniczy w utrzymaniu komórkowej homeostazy redoks i między innymi w ten sposób stanowi czynnik neuroprotektynny.

- [11] Brooker G.J., Kalloniatis M., Russo V.C., Murphy M., Werther G.A., Bartlett P.F.: Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *J. Neurosci. Res.*, 2000; 59: 332–341
- [12] Brown D.A., London E.: Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 17221–17224
- [13] Bucciantini M., Calloni G., Chiti F., Formigli L., Nosi D., Dobson C.M., Stefani M.: Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 31374–31382
- [14] Bulloj A., Leal M.C., Surace E.I., Zhang X., Xu H., Ledesma M.D., Castaño E.M., Morelli L.: Detergent resistant membrane-associated IDE in brain tissue and cultured cells: Relevance to A β and insulin degradation. *Mol. Neurodegener.*, 2008; 3: 22
- [15] Cecchi C., Baglioni S., Fiorillo C., Pensalfini A., Liguri G., Nosi D., Rigacci S., Bucciantini M., Stefani M.: Insights into the molecular basis of the differing susceptibility of varying cell types to the toxicity of amyloid aggregates. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 3459–3470
- [16] Cecchi C., Rosati F., Pensalfini A., Formigli L., Nosi D., Liguri G., Dichiarà F., Morello M., Danza G., Pieraccini G., Peri A., Serio M., Stefani M.: Seladin-1/DHCR24 protects neuroblastoma cells against A β toxicity by increasing membrane cholesterol content. *J. Cell. Mol. Med.*, 2008; 12: 1990–2002
- [17] Cooper M.K., Porter J.A., Young K.E., Beachy P.A.: Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science*, 1998; 280: 1603–1607
- [18] Cooper M.K., Wassif C.A., Krakowiak P.A., Taipale J., Gong R., Kelley R.L., Porter F.D., Beachy P.A.: A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat. Genet.*, 2003; 33: 508–513
- [19] Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-Vance M.A.: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 1993; 261: 921–923
- [20] Cramer A., Biondi E., Kuehnle K., Lütjohann D., Thelen K.M., Perga S., Dotti C.G., Nitsch R.M., Ledesma M.D., Mohajeri M.H.: The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and A β generation *in vivo*. *EMBO J.*, 2006; 25: 432–443
- [21] Di Stasi D., Vallacchi V., Campi V., Ranzani T., Daniotti M., Chiodini E., Fiorentini S., Greeve I., Prinetti A., Rivoltini L., Pierotti M.A., Rodolfo M.: DHCR24 gene expression is upregulated in melanoma metastases and associated to resistance to oxidative stress-induced apoptosis. *Int. J. Cancer*, 2005; 115: 224–230
- [22] Dong Y., Zhang H., Gao A.C., Marshall J.R., Ip C.: Androgen receptor signaling intensity is a key factor in determining the sensitivity of prostate cancer cells to selenium inhibition of growth and cancer-specific biomarkers. *Mol. Cancer Ther.*, 2005; 4: 1047–1055
- [23] Eisenberg S., Shvartsman D.E., Ehrlich M., Henis Y.I.: Clustering of raft-associated proteins in the external membrane leaflet modulates internal leaflet H-ras diffusion and signaling. *Mol. Cell Biol.*, 2006; 26: 7190–7200
- [24] Fielding C.J., Fielding P.E.: Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1529: 210–222
- [25] FitzPatrick D.R., Keeling J.W., Evans M.J., Kan A.E., Bell J.E., Porteous M.E., Mills K., Winter R.M., Clayton P.T.: Clinical phenotype of desmosterolosis. *Am. J. Med. Genet.*, 1998; 75: 145–152
- [26] Fuller P.J., Alexiadis M., Jobling T., McNeillage J.: Seladin-1/DHCR24 expression in normal ovary, ovarian epithelial and granulosa tumours. *Clin. Endocrinol.*, 2005; 63: 111–115
- [27] Giannini S., Benvenuti S., Luciani P., Manuelli C., Cellai I., Deledda C., Pezzatini A., Vannelli G.B., Maneschi E., Rotella C.M., Serio M., Peri A.: Intermittent high glucose concentrations reduce neuronal precursor survival by altering the IGF system: the involvement of the neuroprotective factor DHCR24 (Seladin-1). *J. Endocrinol.*, 2008; 198: 523–532
- [28] Gómez-Isla T., Hollister R., West H., Mui S., Growdon J.H., Petersen R.C., Parisi J.E., Hyman B.T.: Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 1997; 41: 17–24
- [29] Gómez-Isla T., Price J.L., McKeel D.W.Jr, Morris J.C., Growdon J.H., Hyman B.T.: Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, 1996; 16: 4491–4500
- [30] Greeve I., Hermans-Borgmeyer I., Brellinger C., Kasper D., Gomez-Isla T., Behl C., Levkau B., Nitsch R.M.: The human DIMINUTO/DWARF1 homolog seladin-1 confers resistance to Alzheimer's disease-associated neurodegeneration and oxidative stress. *J. Neurosci.*, 2000; 20: 7345–7352
- [31] Hendriksen P.J., Dits N.F., Kokame K., Veldhoven A., van Weerden W.M., Bangma C.H., Trapman J., Jenster G.: Evolution of the androgen receptor pathway during progression of prostate cancer. *Cancer Res.*, 2006; 66: 5012–5020
- [32] Herman G.E.: Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. *Hum. Mol. Genet.*, 2003; 12(Suppl.1): R75–R88
- [33] Heverin M., Meaney S., Brafman A., Shafir M., Olin M., Shafaati M., von Bahr S., Larsson L., Lövgren-Sandblom A., Diczfalusy U., Parini P., Feinstein E., Björkhem I.: Studies on the cholesterol-free mouse: strong activation of LXR-regulated hepatic genes when replacing cholesterol with desmosterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2007; 27: 2191–2197
- [34] Horton J.D.: Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.*, 2002; 30: 1091–1095
- [35] Iivonen S., Hiltunen M., Alafuzoff I., Mannermaa A., Kerokoski P., Puolivali J., Salminen A., Helisalmi S., Soininen H.: Seladin-1 transcription is linked to neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 2002; 113: 301–310
- [36] Irvine K.M., Andrews M.R., Fernandez-Rojo M.A., Schroder K., Burns C.J., Su S., Wilks A.F., Parton R.G., Hume D.A., Sweet M.J.: Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) delivers a proatherogenic signal to human macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 2009; 85: 278–288
- [37] Jansen M., Pietiäinen V.M., Pölönen H., Rasilainen L., Koivusalo M., Ruotsalainen U., Jokitalo E., Ikonen E.: Cholesterol substitution increases the structural heterogeneity of caveolae. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 14610–14618
- [38] Kalvodova L., Kahya N., Schwille P., Ehehalt R., Verkade P., Drechsel D., Simons K.: Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 36815–36823
- [39] Kawarabayashi T., Shoji M.: Plasma biomarkers of Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Psychiatry*, 2008; 21: 260–267
- [40] Kuehnle K., Cramer A., Kälin R.E., Luciani P., Benvenuti S., Peri A., Ratti F., Rodolfo M., Kulic L., Heppner F.L., Nitsch R.M., Mohajeri M.H.: Prosurvival effect of DHCR24/Seladin-1 in acute and chronic responses to oxidative stress. *Mol. Cell Biol.*, 2008; 28: 539–550
- [41] Kuehnle K., Ledesma M.D., Kalvodova L., Smith A.E., Cramer A., Skaanes-Brunner F., Thelen K.M., Kulic L., Lütjohann D., Heppner F.L., Nitsch R.M., Mohajeri M.H.: Age-dependent increase in desmosterol restores DRM formation and membrane-related functions in cholesterol-free DHCR24 $-/-$ mice. *Neurochem. Res.*, 2009; 34: 1167–1182
- [42] Ledesma M.D., Abad-Rodriguez J., Galvan C., Biondi E., Navarro P., Delacourte A., Dingwall C., Dotti C.G.: Raft disorganization leads to reduced plasmin activity in Alzheimer's disease brains. *EMBO Rep.*, 2003; 4: 190–196
- [43] Lee A.C., Fenster B.E., Ito H., Takeda K., Bae N.S., Hirai T., Yu Z.X., Ferrans V.J., Howard B.H., Finkel T.: Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 7936–7940
- [44] Legg R.L., Tolman J.R., Lovinger C.T., Lephart E.D., Setchell K.D., Christensen M.J.: Diets high in selenium and isoflavones decrease androgen-regulated gene expression in healthy rat dorsolateral prostate. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2008; 6: 57
- [45] Lin D.S., Connor W.E., Wolf D.P., Neuringer M., Hachey D.L.: Unique lipids of primate spermatozoa: desmosterol and docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.*, 1993; 34: 491–499
- [46] Lu X., Kambe F., Cao X., Kozaki Y., Kaji T., Ishii T., Seo H.: 3 β -Hydroxysteroid- Δ 24 reductase is a hydrogen peroxide scavenger, protecting cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Endocrinology*, 2008; 149: 3267–3273
- [47] Lu X., Kambe F., Cao X., Yoshida T., Ohmori S., Murakami K., Kaji T., Ishii T., Zadworny D., Seo H.: DHCR24-knockout embryonic fibroblasts are susceptible to serum withdrawal-induced apoptosis because of dysfunction of caveolae and insulin-Akt-Bad signaling. *Endocrinology*, 2006; 147: 3123–3132
- [48] Luciani P., Deledda C., Rosati F., Benvenuti S., Cellai I., Dichiarà F., Morello M., Vannelli G.B., Danza G., Serio M., Peri A.: Seladin-1 is a fundamental mediator of the neuroprotective effects of estrogen in human neuroblast long-term cell cultures. *Endocrinology*, 2008; 149: 4256–4266
- [49] Luciani P., Ferruzzi P., Arnaldi G., Crescioli C., Benvenuti S., Nesi G., Valeri A., Greeve I., Serio M., Mannelli M., Peri A.: Expression of the novel adrenocorticotropic-responsive gene selective Alzheimer's disease indicator-1 in the normal adrenal cortex and in adrenocortical adenomas and carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004; 89: 1332–1339

- [50] Luciani P., Gelmini S., Ferrante E., Lania A., Benvenuti S., Baglioni S., Mantovani G., Cellai I., Ammannati F., Spada A., Serio M., Peri A.: Expression of the antiapoptotic gene seladin-1 and octreotide-induced apoptosis in growth hormone-secreting and nonfunctioning pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005; 90: 6156–6161
- [51] Martindale J.L., Holbrook N.J.: Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.*, 2002; 192: 1–15
- [52] Mirza R., Hayasaka S., Kambe F., Maki K., Kaji T., Murata Y., Seo H.: Increased expression of aquaporin-3 in the epidermis of DHCR24 knockout mice. *Br. J. Dermatol.*, 2008; 158: 679–684
- [53] Mirza R., Hayasaka S., Takagishi Y., Kambe F., Ohmori S., Maki K., Yamamoto M., Murakami K., Kaji T., Zadworny D., Murata Y., Seo H.: DHCR24 gene knockout mice demonstrate lethal dermopathy with differentiation and maturation defects in the epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 2006; 126: 638–647
- [54] Mitchell D.C., Straume M., Miller J.L., Litman B.J.: Modulation of metarhodopsin formation by cholesterol-induced ordering of bilayer lipids. *Biochemistry*, 1990; 29: 9143–9149
- [55] Mushegian A.R., Koonin E.V.: A putative FAD-binding domain in a distinct group of oxidases including a protein involved in plant development. *Protein Sci.*, 1995; 4: 1243–1244
- [56] Mutka A.L., Lusa S., Linder M.D., Jokitalo E., Kopra O., Jauhainen M., Ikonen E.: Secretion of sterols and the NPC2 protein from primary astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 48654–48662
- [57] Otis M., Battista M.C., Provencher M., Campbell S., Roberge C., Payet M.D., Gallo-Payet N.: From integrative signalling to metabolic disorders. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008; 109: 224–229
- [58] Parton R.G., Hancock J.F.: Lipid rafts and plasma membrane micro-organization: insights from Ras. *Trends Cell Biol.*, 2004; 14: 141–147
- [59] Pedretti A., Bocci E., Maggi R., Vistoli G.: Homology modelling of human DHCR24 (seladin-1) and analysis of its binding properties through molecular docking and dynamics simulations. *Steroids*, 2008; 73: 708–719
- [60] Reiss A.B., Siller K.A., Rahman M.M., Chan E.S., Ghiso J., de Leon M.J.: Cholesterol in neurologic disorders of the elderly: stroke and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, 2004; 25: 977–989
- [61] Sarkar D., Imai T., Kambe F., Shibata A., Ohmori S., Siddiq A., Hayasaka S., Funahashi H., Seo H.: The human homolog of *Diminuto/Dwarf1* gene (*hDiminuto*): a novel ACTH-responsive gene overexpressed in benign cortisol-producing adrenocortical adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001; 86: 5130–5137
- [62] Selkoe D.J.: The cell biology of β -amyloid precursor protein and prenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.*, 1998; 8: 447–453
- [63] Seshadri S., Drachman D.A., Lippa C.F.: Apolipoprotein E ϵ 4 allele and the lifetime risk of Alzheimer's disease. What physicians know, and what they should know. *Arch. Neurol.*, 1995; 52: 1074–1079
- [64] Simons K., Ikonen E.: Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997; 387: 569–572
- [65] Vainio S., Jansen M., Koivusalo M., Róg T., Karttunen M., Vattulainen I., Ikonen E.: Significance of sterol structural specificity. Desmosterol cannot replace cholesterol in lipid rafts. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 348–355
- [66] Velasco A.M., Gillis K.A., Li Y., Brown E.L., Sadler T.M., Achilleos M., Greenberger L.M., Frost P., Bai W., Zhang Y.: Identification and validation of novel androgen-regulated genes in prostate cancer. *Endocrinology*, 2004; 145: 3913–3924
- [67] Vetrivel K.S., Cheng H., Lin W., Sakurai T., Li T., Nukina N., Wong P.C., Xu H., Thinakaran G.: Association of γ -secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 44945–44954
- [68] Wang Y., Rogers P.M., Stayrook K.R., Su C., Varga G., Shen Q., Nagpal S., Burris T.P.: The selective Alzheimer's disease indicator-1 gene (Seladin-1/DHCR24) is a liver X receptor target gene. *Mol. Pharmacol.*, 2008; 74: 1716–1721
- [69] Waterham H.R., Koster J., Romeijn G.J., Hennekam R.C., Vreken P., Andersson H.C., FitzPatrick D.R., Kelley R.I., Wanders R.J.: Mutations in the 3β -hydroxysterol Δ 24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am. J. Hum. Genet.*, 2001; 69: 685–694
- [70] Wechsler A., Brafman A., Shafir M., Heverin M., Gottlieb H., Damari G., Gozlan-Kelner S., Spivak I., Moshkin O., Fridman E., Becker Y., Skaliter R., Einat P., Faerman A., Björkhem I., Feinstein E.: Generation of viable cholesterol-free mice. *Science*, 2003; 302: 2087
- [71] Westermann M., Steiniger F., Richter W.: Belt-like localisation of caveolin in deep caveolae and its re-distribution after cholesterol depletion. *Histochem. Cell Biol.*, 2005; 123: 613–620
- [72] Williams T.M., Lisanti M.P.: Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2005; 288: C494–C506
- [73] Wu C., Miloslavskaya I., Demontis S., Maestro R., Galaktionov K.: Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. *Nature*, 2004; 432: 640–645
- [74] Wu F., Lee S., Schumacher M., Jun A., Chakravarti S.: Differential gene expression patterns of the developing and adult mouse cornea compared to the lens and tendon. *Exp. Eye Res.*, 2008; 87: 214–225
- [75] Xu F., Rychnovsky S.D., Belani J.D., Hobbs H.H., Cohen J.C., Rawson R.B.: Dual roles for cholesterol in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 14551–14556
- [76] Yanagisawa K.: Cholesterol and pathological processes in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.*, 2002; 70: 361–366
- [77] Yang C., McDonald J.G., Patel A., Zhang Y., Umetani M., Xu F., Westover E.J., Covey D.F., Mangelsdorf D.J., Cohen J.C., Hobbs H.H.: Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 27816–27826
- [78] Yokoyama C., Wang X., Briggs M.R., Admon A., Wu J., Hua X., Goldstein J.L., Brown M.S.: SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*, 1993; 75: 187–197

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.