

IZABELA GOŹDZIKIEWICZ i JADWIGA GNIOT-SZULŻYCKA

Zakład Biochemii

Uniwersytet Mikołaja Kopernika

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej

Gagarina 7, 87-100 Toruń

e-mail: jgsz@biol.uni.torun.pl

MECHANIZM KONWERSJI CHOLESTEROLU DO PREGNENOLONU Z UDZIAŁEM MITOCHONDRIALNEGO KOMPLEKSU DESMOLAZY

WSTĘP

Wszystkie hormony steroidowe są pochodnymi cholesterolu. Ich synteza zachodzi głównie w korze nadnerczy, jajnikach i jądrach, a także w łożysku, mózgu, skórze i tkance tłuszczowej (DĄBROWSKA i SZUKALSKI 1966, SZUKALSKI 1977, MILLER 1987, HANUKOGLU 1992, BILIŃSKA 1997). Pierwsza reakcja w syntezie większości hormonów steroidowych, prowadząca do wytworzenia pregnenolonu z cholesterolu, zachodzi przy udziale mitochondrialnego kompleksu enzymatycznego desmolazy cholesterolowej.

Ustalenie przebiegu enzymatycznej transformacji cholesterolu w pregnenolon było wynikiem badań nad kompleksem desmolazy cholesterolowej prowadzonych w latach 1950–1970 (MALENDOWICZ i TRZECIAK 1974, WOJCIECHOWSKI 1986, MILLER 1987). Reakcje te przedstawione są na Ryc. 1. Obecna wiedza na temat budowy i regulacji aktywności tego wieloenzymowego kompleksu jest znacznie pełniejsza. W skład kompleksu desmolazy

(Ryc. 2) wchodzi: flawoproteina – reduktaza adrenodoksyny (AdxR), luźno związana z wewnętrzną błoną mitochondrialną, utleniająca NADPH oraz adrenodoksyna (Adx), białko macierzy mitochondrialnej i cytochrom P450_{scc} (ang. side chain cleavage cytochrome P450), który jest integralnym białkiem wewnętrznej błony mitochondrialnej (SHIKITA i HALL 1973b, VIJAYAKUMAR i SALERNO 1992, KMIĘCIAK i TRZECIAK 1994, LEWIS i HLAVICA 2000, MILES i współaut. 2000, TAKEUCHI i współaut. 2001, HANNEMANN i współaut. 2001). Z trójeta-powego procesu przemiany cholesterolu w pregnenolon (Ryc. 1) pierwszą reakcją stanowi 22-hydroksylacja (powstaje 22R-hydroksycholesterol), drugą 20-hydroksylacja z wytworzeniem 20,22R-dihydroksycholesterolu (TUCKEY i CAMERON 1993a), trzecią jest od-szczepienie sześciowęglowego fragmentu łańcucha bocznego cholesterolu z utworze-niem pregnenolonu (3-hydroksy-5-preg-nen-20-on) i aldehydu izokapronowego

Wykaz stosowanych skrótów: A II – angiotensyna; ACTH – hormon adrenokortykotropowy; Adx – adrenodoksyna; AdxR – reduktaza adrenodoksyny; cAMP – cykliczny AMP; *CYP11A* – podrodzina genowa cytochromów P450, do której należy gen cytochrom P450_{scc}; *CYP11A1* – gen cytochromu P450_{scc}; FSH – hormon folikulotropowy; GRP78 – „mniejsze” białko szoku cieplnego; HSP – białka szoku cieplnego; LH – hormon luteinizujący; P450_{scc} – cytochrom P450 odcinający łańcuch boczny cholesterolu; PBR – obwodowy receptor benzodiazepin; PKA – kinaza białkowa A; SAP – polipeptydowy aktywator steroidogenezy; SCP₂ – białko przenoszące stero-le; StAR – białkowy regulator steroidogenezy; TrE-132 – czynnik transkrypcyjny o masie 132 D.

(SHIMIZU i współaut. 1961, DĄBROWSKA i SZUKALSKI 1966, SZUKALSKI 1977, MILLER 1987, LIEBERMAN i LIN 2001). W ostatnich latach badania krystalicznych form wymienionych białek pozwoliły na stworzenie modeli i poznanie struktury kompleksu desmolazy (VIJAYAKUMAR i SALERNO 1992, GRINBERG i

współaut. 2000, MÜLLER i współaut. 2001, HANNEMANN i współaut. 2001, TAKEUCHI i współaut. 2001 oraz internetowa baza danych: <http://www.rcsb.org/pdb>).

SKŁADNIKI KOMPLEKSU DESMOLAZY CHOLESTEROLEWEJ

REDUKTAZA ADRENODOKSYNY (AdxR)

Reduktaza adrenodoksyny jest białkiem luźno związanym z wewnętrzną błoną mitochondrialną. Zbudowana jest ona z 460 aminokwasów o masie cząsteczkowej około 50 kD (KIMURA 1981). Zawiera w swej strukturze 16 helis alfa i 20 struktur beta (MÜLLER i współaut. 2001). W interakcjach z fosfolipidami błony uczestniczą przypuszczalnie dwa jony siarczanowe (SO_4^{2-}) znajdujące się blisko N-końca cząsteczki. W tym miejscu znajdują się również reszty aminokwasów hydrofobowych (Trp⁴²⁰) i zasadowych (Arg³¹, Arg⁷⁰, Arg⁷³, Lys⁴² i Arg⁴⁵⁶), które reagują ze składnikami błony (MÜLLER i współaut. 2001). AdxR zawiera dwie domeny z których jedna wiąże FAD, a druga NADP. Aminokwasami oddziałującymi z NADPH są reszty His i Cys (KIMURA 1981). Gen dla reduktazy adrenodoksyny znajduje się na chromosomie 17 w prążku 24 do 25 (SPARKES i współaut. 1991).

ADRENODOKSYNA (Adx)

Adrenodoksyna należy do rodziny ferredoksyn, do której zaliczamy białka roślinne, bakteryjne i zwierzęce, które, mimo wysokiej homologii w obrębie odpowiednich grup (GRINBERG i współaut. 2000), cechuje niska identyczność sekwencji (poniżej 23%). Adrenodoksyna została odkryta w 1965 r. przez Kimurę i jego współpracowników (KIMURA 1981, TAKEUCHI i współaut. 2001). Dojrzała forma adrenodoksyny zbudowana jest z 128 aminokwasów o m. cz. 12 kD (GRINBERG i współaut. 2000) i powstaje przez odcięcie N-końcowej presekwencji o długości 58-aminokwasów. Adrenodoksyna jest białkiem globularnym i występuje w formie dimeru. Każdy łańcuch zawiera 3 helisy alfa oraz 5 struktur beta (MÜLLER i współaut. 2001). Podobnie jak reduktaza adrenodoksyny, jest białkiem posiadającym dwie domeny: korową i interakcyjną.

W domenie korowej występuje centrum żelazowo-siarkowe [2Fe-2S], w którym atomy żelaza wiążą się z atomami siarki grup sulfhydrylowych cystein i z dwoma atomami nieorganicznej siarki (GRINBERG i współaut. 2000). Ludzka adrenodoksyna zawiera w swojej strukturze aminokwasy konserwatywne wśród ferredoksyn kręgowców, które nie występują u roślin. Są to m.in. Thr⁴⁹ w pętli aminokwasów koordynujących klaster [2Fe-2S] (HANNEMANN i współaut. 2001) oraz His⁵⁶ (GRINBERG i współaut. 2000). Promotor genu, kodujący adrenodoksynę, znajduje się na chromosomie 11 w prążku 22 (SPARKES i współaut. 1991, GRINBERG i współaut. 2000). Ekspresja tego genu jest regulowana przez ACTH. Gen adrenodoksyny z nadnerczy wołu zawiera sekwencję warunkującą odpowiedź na cAMP (CRS), do której wiążą się czynniki transkrypcyjne SP₁ i SP₃ oraz czynnik białkowy ze strukturą palców cynkowych (CHENG i współaut. 2000), homologiczny do mysiego białka ZBP-89, które uczestniczy w represji podstawowej aktywności transkrypcyjnej (CHENG i współaut. 2000).

CYTOCHROM P450_{scc}

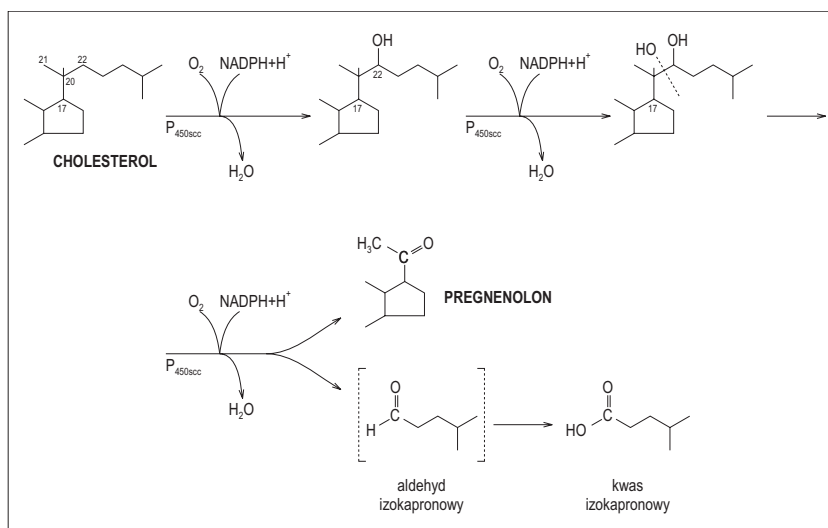
Cytochromy P450 są zaliczane do monooksygenaz, które odgrywają istotną rolę w metabolizmie związków naturalnych (sterydy, kwasy tłuszczowe i żółciowe), jak też związków pochodzenia zewnętrznego (leki, pestycydy) (SZUTOWSKI 1980, COON i współaut. 1992, GUENGERICH 1992, KOBYLIŃSKA 1994, LEWIS i HLAVICA 2000, GOODSSELL 2001). Należący do tej rodziny białek cytochrom P450_{scc}, pośredniczy w przenoszeniu elektronów z NADPH na cholesterol (Ryc. 1). Mitochondrialny cytochrom P450_{scc} jest białkiem transmembranowym, podczas gdy cytochromy P450, znajdujące się w siateczce śródplazmatycznej, wyposażone są tylko w jedną lub dwie hydrofobowe domeny

kotwiczące (USANOV i współaut. 1990, HANUKOGLU 1992, BLACK 1992).

Geny cytochromów P450 tworzą nadrodzinę, w której wyróżniono 27 rodzin genowych. Gen cytochromu P450_{scc}, razem z genem P450₁₁ (cytochrom uczestniczący w biosyntezie kortyzolu), został zaliczony do rodziny *CYP11*, w której wyróżniono podrodziny: *CYP11A* i *CYP11B*. Pierwsza z nich, zawiera wyłącznie gen cytochromu P450_{scc} (*CYP11A1*), natomiast do podrodziny *CYP11B* zaliczono gen cytochromu P450₁₁ (*CYP11B1*) wraz z innymi, ściśle spokrewnionymi genami (np. P450_{ald} cytochromu biorącego udział w tworzeniu aldosteronu *CYP11B2*) (SPARKES i współaut. 1991, KMIECIAK i TRZECIAK 1994,

CYP11A, za pośrednictwem ścieżki sygnałowej, w której uczestniczy cAMP (HANUKOGLU i współaut. 1990, CHENG i współaut. 2000, GIZARD i współaut. 2002) i czynnik transkrypcyjny SF1 oraz białko TREP-132 (GIZARD i współaut. 2002). Hamującą na ekspresję *CYP11A* wpływa angiotensyna II (AII), która aktywuje kinazę białkową C (PKC) fosforylującą białka, wiązane przez element odpowiedzi na estry forbolu (TRE) (KMIECIAK i TRZECIAK 1994).

W 1984 r. uzyskano cDNA kodujące P450_{scc} z nadnerczy wołowych (MOROHASI i współaut. 1984), a wkrótce po tym otrzymano również cDNA z nadnerczy ludzkich (SPARKES i współaut. 1991). Z mitochondriów nadnerczy



Ryc. 1. Proces konwersji cholesterolu do pregnenolonu.

Opis w tekście.

SAKAKI i INOUE 2000). Badania z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ* pozwoliły zlokalizować gen *CYP11A* człowieka w chromosomie 15 na ramieniu q, w prążku 23 do 24 (SPARKES i współaut. 1991). *CYP11A* człowieka ma długość około 20 kbp i zawiera dziewięć eksonów. W procesie transkrypcji powstaje specyficzny mRNA o długości około 2 kbp. Gen *CYP11A* występuje w tkankach syntetyzujących hormony steroidowe (nadnercza, jądra, jajniki, łożysko). Uszkodzenia *CYP11A* są z reguły letalne, chociaż istnieją doniesienia o powodzeniu terapii zastępczej w przypadku wczesnego rozpoznania defektu (patrz KMIECIAK i TRZECIAK 1994). ACTH stymuluje steroidogenezę w nadnerczach na etapie pomiędzy cholesterolem a pregnenolonem (SPARKES i współaut. 1991, GRINBERG i współaut. 2000), wpływając na transkrypcję

wołu wyizolowano również produkt białkowy genu *CYP11A* o masie cząsteczkowej 49 kD (według innych źródeł 53 kD), (SHIKITA i HALL 1973b lub 60 kD (KIMURA 1981), które powstają z prekursora o ciężarze 54,5 kD. Dojrzała forma białka tworzy w błonie wielomeryczny kompleks o masie cząsteczkowej 850 kD (SHIKITA i HALL 1973a, b). Monomer cytochromu P450_{scc} zbudowany jest z 482-aminokwasów (wg innych źródeł z 520 aminokwasów) (VIJAYAKUMAR i SALERNO 1992), posiada dużą ilość helis alfa [24] i o połowę mniej struktur beta [12]. Ludzki P450_{scc} wykazuje 82% homologii aminokwasów i 72% homologii nukleotydów z wołowym. W układzie *in vitro* oczyszczony monomer P450_{scc} ulega fosforylacji katalizowanej przez kinazę C na grupach -OH Ser i Thr (KMIECIAK i TRZECIAK 1994). TUCKEY i CAMERON (1993) wykazali, iż

cytochrom P450_{scc} ma jedno centrum aktywne zlokalizowane w otoczeniu hemu, które wiąże substrat i tlen cząsteczkowy. W centralnej części cytochromu P450_{scc} znajduje się zagłębienie z głównymi miejscami jego oddziaływań z adrenodoksyną (VIJAYAKUMAR i SALERNO 1992, TUCKEY i CAMERON 1993).

Synteza P450_{scc} zachodzi w cytosolu, a następnie, po modyfikacji potranslacyjnej, następuje przeniesienie do wewnętrznej błony mi-

tochondrialnej. Proces dojrzewania P450_{scc} polega na odcięciu N-końcowej sekwencji sygnałowej bogatej w Leu, Ala i Arg przez peptydazę mitochondrialną MPP w trakcie wbudowywania prekursora do wewnętrznej błony (BLACK 1992, KOJIMA i współaut. 2001). Komplex desmolazy jest stosunkowo trwały. Okres półtrwania dla cytochromu P450_{scc} wynosi 3,5 dnia, adrenodoksyny 50 dni, zaś reduktazy adrenodoksyny 4,5 dnia (KIMURA 1981).

ŁAŃCUCH PRZENOŚNIKÓW ELEKTRONÓW

ODDZIAŁYWANIA POMIĘDZY POSZCZEGÓLNYMI SKŁADNIKAMI KOMPLEKSU

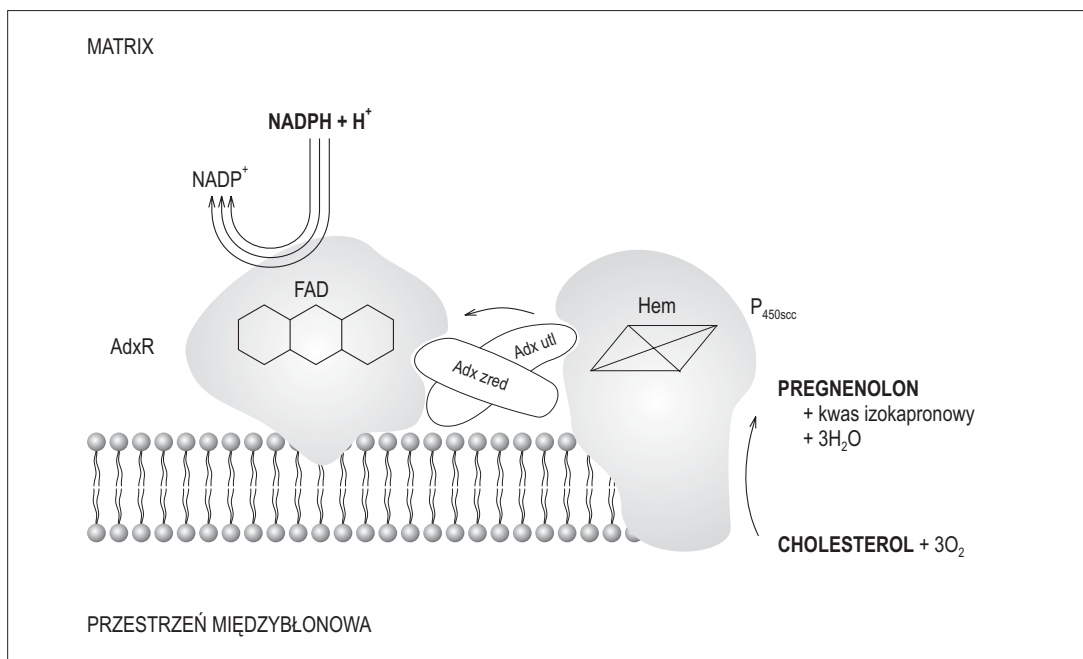
Wszystkie składniki kompleksu desmolazy cholesterolowej wraz z FAD i NADPH tworzą krótki łańcuch przenośników elektronów. Ze względu na liczbę i budowę poszczególnych składników, kompleksy cytochromów P450, uczestniczące w przenoszeniu elektronów u różnych organizmów, dzielimy na trzy typy: I – występujący u wielu bakterii i we wszystkich eukariotycznych mitochondriach, zawiera NADP-zależną reduktazę adrenodoksyny, adrenodoksynę i cytochrom P450; II – znajduje się w eukariotycznych mikrosomach i złożony jest z dwóch białek: NADP-zależnej reduktazy, zawierającej zarówno FAD i FMN oraz z cytochromu P450; III – zbudowany podobnie jak system typu II, lecz poszczególne składniki połączone są ze sobą pojedynczym polipeptydem. Przedstawicielem III typu jest bakteryjny cytochrom P450 BM3 (LEWIS i HLAVICA 2000, MILES i współaut. 2000).

Schemat topografii składników kompleksu cytochromu P450 typu I, omawiany w niniejszym artykule, przedstawiono na Ryc. 2. Reduktaza adrenodoksyny tworzy zagłębienie, w które wpasowuje się globularna adrenodoksyna. Istnieją dwa główne regiony oddziaływań między tymi białkami. Pierwszy region interakcji to połączenia jonowe, utworzone przez reszty aminokwasów domeny wiążącej NADP AdxR a odpowiednimi miejscami w łańcuchu na powierzchni Adx (GRINBERG i współaut. 2000). Drugi istotny region interakcji tworzą wiązania polarne w obszarze, utworzonym przez tzw. korowę domeny Adx i domeny FAD w AdxR oraz przez wiązanie krzyżowe (ang. crosslink) między Asp³⁹ Adx z Lys²⁷ AdxR (MÜLLER i współaut. 2001). Połączenia między tymi białkami stabilizuje dodatkowo C-końiec Adx, który tworzy wydłużony polipeptyd,

zagłębiający się w głęboką szczelinę pomiędzy dwiema globularnymi domenami AdxR. Jednak połączenie w tym rejonie jest raczej luźne i dość elastyczne. Oprócz tych szerokich obszarów oddziaływań istnieje też szereg pojedynczych połączeń poprzez wiązania wodorowe, siły van der Waalsa, które występują między resztami [2Fe-2S] centrum katalicznego w Adx a pierścieniem izoalloksazynowym FAD AdxR (MÜLLER i współaut. 2001). Adx nie wykazuje znaczących różnic konformacji między formą wolną a formą występującą w kompleksie z AdxR, natomiast takie różnice występują w reduktazie adrenodoksyny (AdxR). Arg²⁴⁰ i Lys²⁷ w AdxR, będące punktami kontaktowymi białek, ulegają zbliżeniu podczas tworzenia kompleksu. AdxR ma również zdolność do wzajemnej reorientacji swoich domen (MÜLLER i współaut. 2001). Adrenodoksyna jest w przybliżeniu dwukrotnie mniejszym białkiem od cytochromu P450_{scc} i wpasowuje się w utworzone przez niego zagłębienie, w taki sposób, że jej centrum żelazowo-siarkowe znajduje się nieomal prostopadle naprzeciw hemu (GRINBERG i współaut. 2000). Mała, 35-aminokwasowa domena zawiera kwaśne aminokwasy w odcinku 72-79, które odpowiadają za połączenia zarówno z reduktazą adrenodoksyny, jak i z cytochromem P450_{scc} (GRINBERG i współaut. 2000, MÜLLER i współaut. 2001). Zarówno utleniona, jak i zredukowana adrenodoksyna, wiąże się z tym samym obszarem cytochromu P450_{scc}. W miejscach interakcji P450_{scc} z adrenodoksyną występują aminokwasy zasadowe m.in. Lys⁴⁰³, która tworzy wiązanie krzyżowe z Asp⁷⁹ domeny interakcyjnej adrenodoksyny. Pozostałe aminokwasy zasadowe P450_{scc}, w pętli otaczającej centrum żelazowo-siarkowe Adx, tworzą obszar dodatkowych oddziaływań z kwaśnymi aminokwasami adrenodoksyny (MÜLLER i współaut. 2001, MÜLLER E.-C. i współaut. 2001). Istnieją od-

mienne opinie dotyczące roli C-końcowego odcinka Adx, który wpasowuje się w szczelinę utworzoną przez reduktazę adrenodoksyny, według MÜLLERA i współaut. (2001) nie odgrywa on istotnej roli w tworzeniu kompleksu z cytochromem, natomiast zdaniem innych uczestniczy w interakcji Adx z cytochromem P450scc (NOVIKOVA i współaut. 2000).

chodnych, jak C₂₄, C₂₅, C₂₆, wywołuje znaczne obniżenie procesu hydroksylacji w pozycji C₂₀, co prawdopodobnie jest wynikiem zmiany orientacji C₂₂ i C₂₀ w stosunku do hemu cytochromu P450scc. Związki te, z uwagi na możliwość ich syntezy (np. C₂₅ hydroksycholesterol) z udziałem cytochromu P450scc, mogą być regulatorami procesu syntezy pregnenolonu,



Ryc. 2. Schemat budowy kompleksu mitochondrialnej desmolazy cholesterolowej.

Opis w tekście.

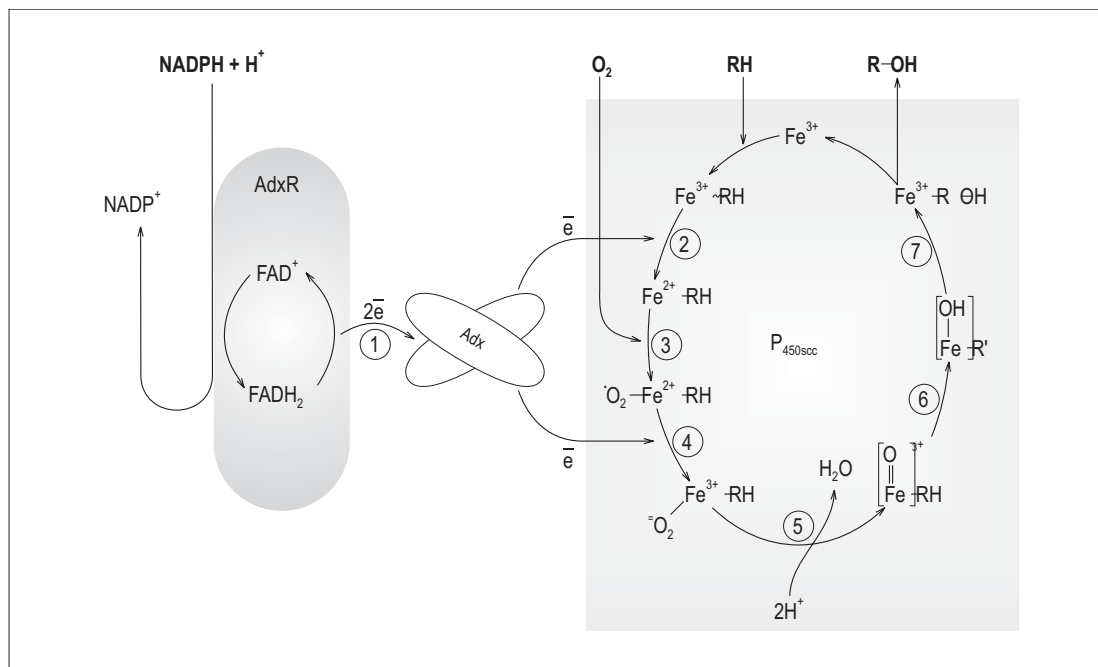
PRZENOSZENIE ELEKTRONÓW

W procesie przenoszenia elektronów biorą udział dwa substraty ulegające utlenieniu: cholesterol i NADPH. Do utworzenia dwóch grup hydroksylowych, wprowadzanych sekwencyjnie do pierścienia steroidowego, wykorzystane zostają dwa atomy tlenu cząsteczkowego. Trzeci atom tlenu zostaje wprowadzony do struktury drugiego produktu reakcji, jakim jest kwas izokapronowy. W reakcji zużywane są 3 mole NADPH i 3 mole O₂. Z badań nad sekwencją reakcji hydroksylacji, prowadzących do syntezy pregnenolonu (patrz TUCKEY i CAMERON 1993) wynika, że po pierwszej hydroksylacji powstaje 22R-hydroksycholesterol, w drugiej tworzy się 22R-20-dihydroksycholesterol (Ryc. 1). Doświadczenia prowadzone z użyciem analogów strukturalnych cholesterolu wykazały wysoką specyficzność struktury centrum aktywnego względem 22R-cholesterolu. Wiele przebadanych hydroksypo-

nie są jednak wykorzystywane do jego syntezy. Stwierdzono również, iż niektóre związki wiążące się z centrum aktywnym cytochromu P450scc, np. 22-ketocholesterol, całkowicie hamują proces syntezy pregnenolonu (TUCKEY i CAMERON 1993). Dla pełnej aktywności cytochromu P450scc potrzebne są również fosfolipidy (KIDO i KIMURA 1979, TUCKEY i CAMERON 1993). Sekwencje reakcji hydroksylacji przedstawiono na Ryc. 3. Pierwszy etap polega na redukcji przez NADPH grupy prostetycznej (FAD⁺) w reduktazie adrenodoksyny (reakcja dwuelektronowa) (reakcja 1). Zredukowana adrenodoksyna oddaje jeden elektron na kompleks cytochrom P-450scc (Fe⁺³) z substratem (cholesterol) – reakcja 2, co prowadzi do redukcji cytochromu P-450scc (Fe⁺²), który następnie wiąże tlen cząsteczkowy (reakcja 3). W kolejnej reakcji następuje przyjęcie drugiego elektronu z adrenodoksyny (reakcja 4). Na tym etapie żelazo cytochromu P450scc jest trójwartościowe, a związany z kompleksem

tlen ma ładunek [-2]. Następnie jeden z atomów tlenu ulega redukcji do wody (reakcja 5), a usunięcie atomu wodoru z substratu (reakcja 6), prowadzi przejściowo do wytworzenia wolnego rodnika. W następnej reakcji tworzy się

hydroksycholesterol, ściśle związany z cytochromem P450_{scc}, zostaje następnie przekształcony w trzecim cyklu w pregnenolon i kwas izokapronowy. Te ostatnie związki są uwalniane z kompleksu enzymatycznego



Ryc. 3. Cykl hydroksylacji zachodzący z udziałem cytochromu P450_{scc}.

Opis w tekście.

22-hydroksycholesterol (reakcja 7). W kolejnym cyklu reakcji hydroksylacji, których substratem jest 22-hydroksycholesterol, wytworzony zostaje 22,20-dihydroksycholesterol. Produkt dwóch cykli hydroksylacji: 22R,20-di-

(COON i współaut. 1992, MILES i współaut. 2000, LIEBERMAN i LIN 2001).

TRANSPORT CHOLESTEROLU I KONWERSJA CHOLESTEROLU DO PREGNENOLONU

Synteza steroidów w nadnerczach zachodzi w odpowiedzi na wydzielany ACTH z przedniego płata przysadki mózgowej. W gonadach proces syntezy hormonów steroidowych stymulują wydzielane przez przedni płat przysadki mózgowej LH i FSH (MALENDOWICZ i TRZECIAK 1974; KIMURA 1981; HANUKOGLU 1992; BILIŃSKA 1997, 1999). Początkowo sądzono, że działanie tych hormonów ma istotne znaczenie w przemianie cholesterolu w pregnenolon poprzez wpływ na aktywność cytochromu P450_{scc}. Późniejsze badania wykazały jednak, że na inicjację i podtrzymanie steroidogenezy najistotniejszy wpływ ma dostępność cholesterolu dla kompleksu enzymatycznego desmolazy (STOCCO 2000a). W początkowej fazie synte-

zy pregnenolonu w nadnerczach, po stymulacji za pomocą ACTH, trwającej około 2 minut, wykorzystany zostaje endogenne cholesterol, zgromadzony w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Stężenie cholesterolu w zewnętrznej i wewnętrznej błonie mitochondrialnej wynosi odpowiednio 31,4 i 44,6 nmol/mg białka (KIMURA 1981). Później kompleks desmolazy zużywa cholesterol z kropli lipidowych lub też pochodzący z błony plazmatycznej i syntetyzowany *de novo*. Mobilizacja cholesterolu z kropli lipidowych następuje w odpowiedzi na stymulację hormonami tropowymi (ACTH, LH, FSH), które aktywują cyklazę adenylanową. Zsyntetyzowany cAMP uczynnia kinazę białkową A (PKA), która poprzez fosfory-

lację, uaktywnia hydrolazę estrów cholesterolu (WOJCIECHOWSKI 1986; HANUKOGLU 1992; KMIĘCIAK i TRZECIAK 1994; STOCCO 1998, 2000a).

Przeniesienie cholesterolu z zewnętrznej błony mitochondrialnej do błony wewnętrznej, gdzie znajduje się kompleks cytochromu P450_{scc}, to dalszy, istotny, nie do końca poznany, etap w procesie steroidogenezy. Otwartym pytaniem jest czy te same procesy i czynniki, które są włączone w wewnątrzkomórkowy transport cholesterolu między błoną plazmatyczną i różnymi organellami, dostarczają cholesterol do zewnętrznej błony mitochondrialnej. Wśród białek komórki występują specyficzne białka, określane jako białka przenoszące sterole (ang. sterol carrier protein, SCP), które biorą udział w różnych procesach, np. w przekształceniu skwalenu w cholesterol, w metabolizmie cholesterolu do kwasów żółciowych, a także wewnątrzkomórkowym transporcie cholesterolu (MALENDOWICZ i TRZECIAK 1974, WOJCIECHOWSKI 1986). W transporcie cholesterolu do zewnętrznej błony mitochondrialnej, uczestniczy prawdopodobnie jedno z białek SCP, a mianowicie białko SCP₂ (ang. sterol carrier protein₂) (KAN i UNGAR 1973, BAUM i współaut. 1997, GALLEGOS i współaut. 2001). Początkowo sądzono, że białko to mogłoby ułatwiać także przemieszczenie się cholesterolu z zewnętrznej do wewnętrznej błony mitochondrialnej, jednak późniejsze badania nie potwierdziły tej hipotezy. Już w 1965 r. GARREN i współaut. oraz VERNIKOS-DANIELIS i HALL wykazali, że inhibitory biosyntezy białek: puromycyna, cykloheksomid i aktynomycyna D hamują mitochondrialną steroidogenezę wywołaną przez ACTH. Późniejsze badania wykazały, że proces ten zachodził w wyniku zahamowania syntezy „bliżej nieokreślonych białek”, nie było jednak wśród nich desmolazy (KIMURA 1981; CHERRADI i współaut. 1998; STOCCO 1998; 2000b; SŁOCIŃSKA 2002). Wykazano także, że syntetyzowane pod wpływem ACTH białka mają krótki okres półtrwania.

Jedno z pierwszych białek, wyodrębnione przez Pedersena i Browna w 1983 r. to białko o masie cząsteczkowej 3,2 kD – nazwane SAP (ang. steroidogenesis activator peptide) (XU i współaut. 1991). Struktura C-końcowego fragmentu SAP (608–636) jest homologiczna do fragmentu białka szoku cieplnego (ang. glucose regulatory protein, GRP78) z nadnerczy szczura (różnice dotyczą tylko dwóch amino-

kwasów). Stwierdzono również, że inhibicja biosyntezy białka SAP, nie miała wpływu na przenoszenie cholesterolu do wewnętrznej, a jedynie do zewnętrznej błony mitochondrialnej (PRIVALLE i współaut. 1983, STOCCO 2000a). Dane te wskazywały na istnienie innego regulatora transportu cholesterolu. Białkiem tym jest, wykryte w laboratorium Orme-Johnson, a następnie oczyszczone przez STOCCO w 1991 r., białko o m. cz. 30 kD nazwano StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*). Okazało się, że StAR pośredniczy w przeniesieniu cholesterolu z błony zewnętrznej do wewnętrznej (STOCCO 2000). StAR zostało również zklonowane, a następnie zsekwencjonowane w 1994 roku (CLARK i współaut. 1994). W formie prekursorowej ma ono masę 37 kD (285 aminokwasów (BOSE i współaut. 1999), a w dojrzałej 30 kD. StAR jest fosfoproteiną; zawiera dwa miejsca fosforylacji na resztach Ser, z których jedna ulega fosforylacji przez kinazę białkową A, zaś druga przez kinazę białkową C. Procesy fosforylacji zwiększają aktywność StAR (STOCCO 2000a, ARTEMENKO i współaut. 2001). Na skutek stymulacji komórki hormonami tropowymi następuje szybkie zwiększenie syntezy prekursorowego białka StAR w cytoplazmie. Białko to jest wiązane przez białka opiekuńcze (HSP 70S), które uniemożliwiają fałdowanie się prekursora, co jest warunkiem umożliwiającym import do mitochondrium (Ryc. 4A). Podczas transportu StAR jest wbudowywane w błonę, przypuszczalnie przy udziale białek TOM (translokaza zewnętrznej błony mitochondrialnej) i TIM (translokaza wewnętrznej błony mitochondrialnej) (WOJTKOWSKA 2002). Początkowo sądzono, że utworzenie miejsc kontaktowych między błonami mitochondrialnymi jest wystarczające do transportu zarówno StAR jak i cholesterolu (STOCCO 2000a,b). Później stwierdzono, że C-końcowy fragment zawierający aminokwasy 63–193 (domena START) jest niewrażliwy na działanie proteaz oraz, że jedynie ten odcinek jest niezbędny dla przeniesienia cholesterolu. Podczas importu białka StAR i cholesterolu domena START pozostaje na powierzchni błony zewnętrznej, zaś fragment N-końcowy jest konieczny dla przemieszczenia StAR do wewnętrznej błony mitochondriów. Przed rozpoczęciem importu lub równocześnie z nim, sekwencje C-końcowego fragmentu StAR oddziałują z dotąd niezidentyfikowanymi składnikami zewnętrznej błony mitochondrialnej.

Proponowano, że mogą być to białko SCP₂, PBR (obwodowy receptor benzodiazepin) (CHERRADI i współaut. 1998, STOCCO 1998, SŁOCIŃSKA 2002), a także wspomniany już peptyd SAP, współdziałający z GTP (XU i współaut. 1991, CHERRADI i współaut. 1998). Jego udział jest synergistyczny z SAP, podczas gdy SCP₂ współdziała z innymi czynnikami (XU i współaut. 1991). Obwodowy receptor benzodiazepin PBR, zidentyfikowany w 1977 r. w błonach komórek nerwowych mózgu szczura (VERMA i SNYDER 1989, SŁOCIŃSKA 2002), według Papadopoulos'a może tworzyć kanał, który umożliwia przemieszczenie cholesterolu z zewnętrznej do wewnętrznej błony mitochondrialnej (LISCUM i MUNN 1999). Lokalizacja ekspresji PBR oraz stymulujący efekt jego ligandów na syntezę hormonów steroidowych, wydaje się potwierdzać to przypuszczenie. Zniszczenie genu PBR w hodowlach komórek nowotworowych Leydiga, w warunkach prawidłowych syntetyzujących hormony steroidowe, powoduje zahamowanie transportu cholesterolu do mitochondriów i uniemożliwia ich syntezę. Z tych informacji wynika, że StAR i PBR współdziałają w regulacji transportu cholesterolu do mitochondriów i ułatwiają jego przemieszczenie do wewnętrznej błony mitochondrialnej; uproszczony mechanizm transportu przedstawia Ryc. 4A.

Po obserwacji zmian rozpuszczalności białka StAR w różnym pH pojawiła się inna koncepcja, dotycząca udziału tego białka w transporcie cholesterolu (Ryc. 4B). W pH 3.5–4.0 staje się ono tzw. płynnym (ang. molten) białkiem globularnym (BOSE i współaut. 1999; STOCCO 2000, 2001). Dzięki działaniu pompy protonowej utworzenie odpowiedniego mikrośrodowiska może powodować zmiany konformacyjne białka, w szczególności w obrębie domeny 63–193, z równoczesnym otwarciem się kieszeni hydrofobowej, umożliwiającej przechwycenie cholesterolu z zewnętrznej błony mitochondrialnej.

Według Schroedera (PETRESCU i współaut. 2001), StAR funkcjonuje jak typowe białko transportujące lipidy, ponieważ działa na zewnętrznej błonie mitochondrialnej i posiada wspomnianą już domenę określoną jako START (ang. related lipid-transfer, StAR), tworzącą hydrofobowy kanał (STOCCO i współaut. 2001). Domena START po przejściu przez zewnętrzną błonę mitochondrialną, w obrębie przestrzeni międzybłonowej zmienia konformację i wchodzi w interakcje z wewnę-

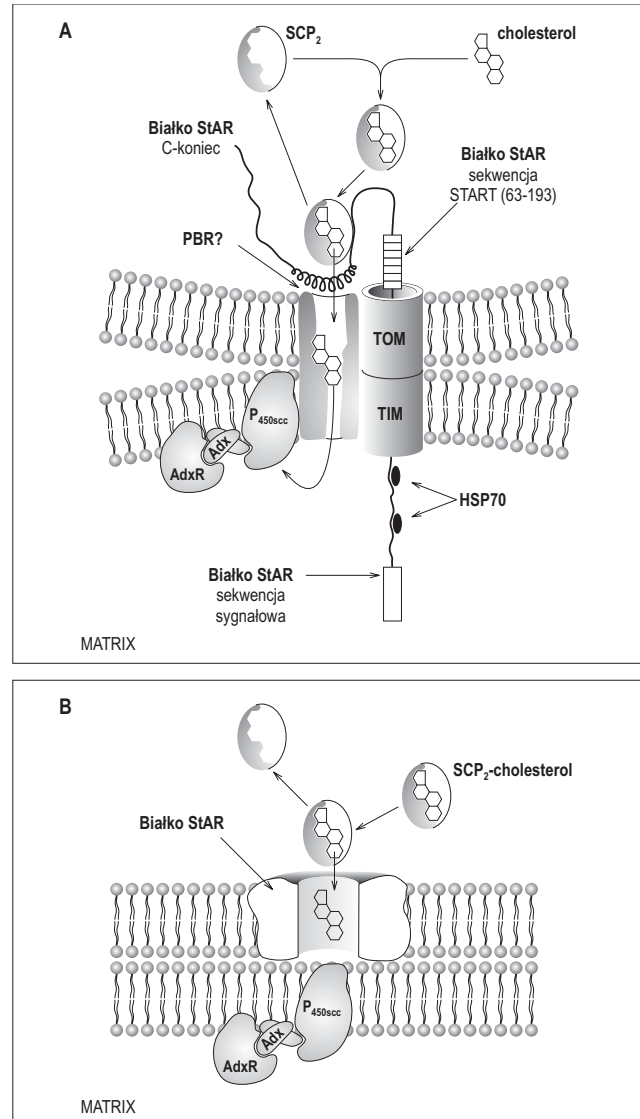
trzną błonę mitochondrialną, przenosząc cholesterol do centrum aktywnego cytochromu P450_{sc}. Transport cholesterolu z udziałem białka StAR przedstawia Ryc. 4B. Gdy tylko import białka StAR zostaje zakończony i nie ma ono już kontaktu z błoną zewnętrzną, zostaje zatrzymany proces przenoszenia cholesterolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej. Tak więc, stała synteza i dojrzewanie prekursora StAR, której towarzyszy interakcja między C-końcowym fragmentem StAR i błoną zewnętrzną, jest nieodzowna dla przemieszczania się cholesterolu z cytosolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej (STOCCO 1998, 2000a, b).

Białko StAR jest kodowane przez genomowy DNA i syntetyzowane w cytozolu, a następnie szybko importowane do mitochondriów. Tylko nowo zsintetyzowane białko uczestniczy w transporcie cholesterolu (ARTEMENKO i współaut. 2001). Nadekspresja cDNA StAR w komórkach steroidogennych i nowotworowych komórkach COS powoduje wzrost produkcji steroidów nawet przy braku stymulacji hormonalnej (SUGAWARA i współaut. 1995a,b). Ekspresja StAR jest regulowana pozytywnie przez gonadotropiny i cAMP oraz negatywnie przez prostanglandynę F₂ (PGF₂) (STOCCO 1998, SHEA-EATON i współaut. 2002) i białka regulowane przez kinazę C (PKC). Zwiększenie stężenia PGF₂ podwyższa ilość mRNA cFos, co z kolei powoduje redukcję mRNA StAR (SHEA-EATON i współaut. 2002; STOCCO 1998, 2001). Zagadnienia te omówione zostały w pracy przeglądowej na temat regulacji genu *StAR*: (STOCCO i współaut. 2001). Stwierdzono również, że inhibitor hydrolazy estrów cholesterolu, CEH (fosforan dietyloumbeliferonu), obniża syntezę białka StAR. Stała ekspresja białka StAR jest istotnym punktem kontroli steroidogenezy (STOCCO 1998). StAR jest białkiem wysoce konserwatywnym. U myszy i szczurów sekwencje aminokwasów białka StAR są w 96% identyczne, ludzkie i mysie są względem siebie w 92% podobne, a w 87% identyczne, wołowe i mysie są homologiczne w 84%. Oprócz tego, częściowy owczy cDNA jest w 80% identyczny z odpowiednimi sekwencjami innych gatunków (STOCCO 1998).

Przy omawianiu regulacji ekspresji genu cytochromu P450_{sc} wspomniano, że angiotensyna II wpływa hamująco na ten proces (CHERRADI i współaut. 1998). Transport wolnego cholesterolu do zewnętrznej błony mitochondrialnej pobudza angiotensynę II za pośrednictwem kalmodulino-zależnej kinazy II;

mechanizm ten nie został jednak dokładnie poznany, ale przypuszcza się, że w tym procesie uczestniczą białka cytoszkieletu i SCP₂ (XU i współaut. 1991, CHERRADI i współaut. 1998). Wykazano, że kalmodulino-zależna kinaza II stymuluje syntezę *de novo* białka StAR. Przy-

współaut. (1989) oraz XIANG i LAMBERTH (1989) wynika, że siarczan cholesterolu występujący w komórce, choć nie wiąże się z cytochromem P450_{scc}, hamuje przemianę cholesterolu w pregnenolon. Ma on prawdopodobnie wpływ na dostępność cholesterolu dla



Ryc. 4. Sposoby transportu cholesterolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej.

A. transport cholesterolu z udziałem białka StAR, receptora benzodiazepin (PBR) oraz białek TOM i TIM; B. transport cholesterolu z udziałem białka StAR, którego sekwencja START tworzy kanał ułatwiający translokację.

puszcza się również, iż zmiany w puli cytosolowego wapnia prowadzą do zwiększenia stężenia $[Ca^{2+}]$ w macierzy mitochondrialnej, co prowadzi do wzrostu stężenia NADPH, niezbędnego w biosyntezie steroidów (CHERRADI i współaut. 1998, HOMMA i współaut. 2000).

W regulacji biosyntezy hormonów steroidowych w nadnerczach może również uczestniczyć siarczan cholesterolu. Z prac LAMBETH i

kompleksu desmolazy. Nie wyklucza się możliwości, że hamujący efekt związany jest z procesem translokacji cholesterolu. W nadnerczach ludzi dorosłych i płodów ludzkich istnieje prawdopodobnie odrębny system syntezy steroidów, wykorzystujący siarczan cholesterolu jako substrat (KORTE i współaut. 1982, MANSON i współaut. 1983).

REGULACJA BIOSYNTETY HORMONÓW STEROIDOGENEZY W ŁOŻYSKU

W ludzkim łożysku synteza hormonów steroidowych (MANSON i BOYD 1971, MEIGS i SHEEN 1977, BOGUSŁAWSKI 1983) inicjowana jest przez odcięcie łańcucha bocznego cholesterolu, w przeciwieństwie do innych tkanek, nie wymaga wysokiej sprawności transportu cholesterolu ze względu na niską zawartość P450scc w łożysku (10–25%), w porównaniu do innych tkanek produkujących steroidy (TUCKEY i HEADLAM 2002). W łożysku nie ulega również ekspresji białko StAR, lecz funkcjonuje w nim mniej wydajny jego homolog, a mianowicie białko MLN 64 (STRAUSS i współaut. 1996, STOCCO 1998, STOCCO 2000b, STOCCO 2001, BEN-ZIMRA i współaut. 2002). Inne różnice w steroidogenezie łożyskowej dotyczą odmienności regulacji procesu transkrypcji. Podstawowym tkankowo specyficznym czynnikiem pośredniczącym w cAMP-zależnej ekspresji P450scc i innych hydroksylaz steroidów w nadnerczach i gonadach jest SF1. Ten kluczowy regulator transkrypcji w tkankach steroidogenicznych nie ulega ekspresji w łożysku. Jego funkcję w łożysku przejmuje białko określone mianem PNF (placental nuclear factor) (BOSE i współaut. 1995, BEN-ZIMRA i współaut. 2002, SHEA-EATON i współaut. 2002).

Badania nad czynnikami wpływającymi na konwersję cholesterolu do pregnenolonu w

łożysku wykazały, że również dostarczanie elektronów do kompleksu desmolazy jest czynnikiem regulującym ten proces (TUCKEY i współaut. 1997, BOSE i współaut. 1996). W łożysku stężenie reduktazy adrenodoksyny i adrenodoksyny jest niższe niż w nadnerczach. Stwierdzono, że steroidogeneza w sonifikowanych mitochondriach z aktywnością P450scc wzrasta po dodaniu egzogennej reduktazy adrenodoksyny, natomiast dodanie zredukowanej adrenodoksyny nie wywołuje takiego efektu, a dodanie utlenionej hamuje ją (TUCKEY i SADLEIR 1999, TUCKEY i współaut. 2001). Aktywność cytochromu P450scc jest więc limitowana przez stężenie reduktazy adrenodoksyny (AdxR), które pozwala mitochondrialnemu systemowi desmolazy pracować z 16% wydajnością w stosunku do jego wydajności maksymalnej (TUCKEY i HEADLAM 2002, TUCKEY i współaut. 2001). Z uwagi na to, iż utleniona i zredukowana forma adrenodoksyny wiążą się z tym samym miejscem na cytochromie P450scc, szybkość konwersji cholesterolu do pregnenolonu zależy od zmian stężenia zredukowanej adrenodoksyny (TUCKEY i współaut. 1997, STOCCO 2000a, TUCKEY i HEADLAM 2002).

PODSUMOWANIE

W artykule przedstawiono dane dotyczące budowy kompleksu mitochondrialnej desmolazy, który uczestniczy w konwersji cholesterolu do pregnenolonu. Mitochondrialny kompleks desmolazy z kory nadnerczy i innych tkanek zawiera: NADPH – zależną reduktazę adrenodoksyny; adrenodoksynę i cytochrom P450scc, należący do rodziny genowej *CYP11A*. Budowa krystalicznych białek kompleksu desmolazy, jak i proces transportu elektronów w tym kompleksie zostały stosunkowo

dobrze poznane. Mechanizmy regulacji aktywności systemu nie są jeszcze w pełni znane; uzyskane dane wskazują na specyficzność tkankową w ich oddziaływaniach. Ostatnio wykazano, że jednym z czynników ograniczających proces konwersji cholesterolu w pregnenolon jest transport cholesterolu do wewnętrznej błony mitochondrialnej; wymaga on stałej syntezy białka StAR (nadnercza) lub białka o podobnej strukturze i funkcji (łożysko).

CONVERSION OF CHOLESTEROL TO PREGNENOLONE BY THE MITOCHONDRIAL DESMOLASE COMPLEX

S u m m a r y

The data concerning the structure of the mitochondrial desmolase complex, which converts chole-

sterol to pregnenolone has been described. The desmolase contains: NADPH dependent adrenodoxin

reductase (AdxR), soluble adrenodoxin (Adx) and cytochrom P450 of the CYP 11 gene family. The crystal structure of the desmolase components, as well as the electron transport mechanism conducted by this complex, were recently established; the mechanisms which regulate the desmolase activity are fragmentally recognized, however, tissue specific regulatory systems exist. The main factor limiting desmolase activity,

recently discovered, is the delivery of cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane. This system depends on a permanent synthesis of cholesterol transporting protein StAR (in adrenals) or proteins with a similar function in other tissues (eg. placenta).

LITERATURA

- ARTEMENKO I. P., ZHAO D., HALES D. B., HALES K. H., JEFCOATE C. R., 2001. *Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells.* JBC 276, 46583–46596.
- BAUM CH. L., RESCHLY E. J., GAYEN A. K., GROCH M. E., SCHADICK K., 1997. *Sterol carrier protein-2 overexpression enhances sterol cycling and inhibits cholesterol ester synthesis and high density lipoprotein cholesterol secretion.* JBC 272, 6490–6498.
- BEN-ZIMRA M., KOLER M., MELAMED-BOOK N., ARENSBURG J., PAYNE A. H., ORLY J., 2002. *Uterine and placental expression of steroidogenic genes during rodent pregnancy.* Mol. Cell Endocrinol. 187, 223–231.
- BILIŃSKA B., 1997. *Regulacja procesu steroidogenezy w komórkach Leydiga ssaków. Rola białka StAR.* Post. Biol. Kom. 24, 183–202.
- BILIŃSKA B., 1999. *Rola białka StAR w procesie steroidogenezy.* Post. Biol. Kom. 26, 161–165.
- BLACK S. D., 1992. *Membrane topology of the mammalian P450 cytochromes.* FASEB J. 6, 680–685.
- BOGUSŁAWSKI W., 1983. *Cytochrome P450 and steroidogenic activity of human placenta mitochondria.* J. Steroid Biochem. 18, 771–775.
- BOSE H. S., SUGAWARA T., STRAUSS III J. F., MILLER W. L., 1996. *The pathophysiology and genetics of Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia.* New England J. Medicine 335, 1870–1878.
- BOSE H. S., WHITTAL R. M., BALDWIN M. A., MILLER W. L., 1999. *The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 7250–7255.
- CHENG P.-Y., KAGAWA N., TAKAHASHI Y., WATERMAN M. R., 2000. *Three zinc finger nuclear proteins, Sp1, Sp3, and a ZBP-89 homologue, bind to the cyclic adenosine monophosphate – responsive sequence of the bovine adrenodoxin gene and regulate transcription.* Biochemistry 39, 4347–4357.
- CHERRADI N., BRANDENBURGER Y., CAPPONI A. M., 1998. *Mitochondrial regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein.* Eur. J. Endocrinol. 139, 249–256.
- CLARK B. L., WELLS J., KING S. R., STOCOCO D. M., 1994. *The purification, cloning, and expression of a novel LH-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells: characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR).* J. Biol. Chem. 269, 28314–28322.
- COON M. J., DING X., PERNECKY S. J., VAZ A. D. N., 1992. *Cytochrome P450: progress and predictions.* FASEB J. 6, 669–673.
- DĄBROWSKA R., SZUKALSKI B., 1966. *Metabolizm hormonów sterydowych.* Post. Biochem. 12, 347–361.
- FIELDING CH. J., FIELDING PH. E., 1997. *Intracellular cholesterol transport.* J. Lipid Res. 38, 1503–1519.
- GALLEGOS A. M., ATSHAVES B. P., STOREY S. M., STARODUB O., PETRESCU A. D., HUANG H., MCINTOSH A. L., MARTIN G. G., CHAO H., KIER A. B., SCHROEDER F., 2001. *Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2.* Prog. Lipid Res. 40, 498–563.
- GARREN L. D., NEY R. L., DAVIS W. W., 1965. *Studies on the role of protein synthesis in the regulation of corticosterone production by ACTH in vitro.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53, 1443–1450.
- GIZARD F., LAVALLÉE B., DEWITTE F., TEISSIER E., STAELS B., HUM D. W., 2002. *The transcriptional regulating protein of 132 kDa (TreP-132) enhances P450_{scc} gene transcription through interaction with steroidogenic factor-1 in human adrenal cells.* JBC 277, 39144–39155.
- GOODSELL D. S., 2001. *The molecular perspective: cytochrome P450.* Stem Cells 19, 263–264.
- GRINBERG A. V., HANNEMANN F., SCHIFFLER B., MÜLLER J., HEINEMANN U., BERNHARDT R., 2000. *Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties.* Proteins 40, 590–612.
- GUENGERICH F. P., 1992. *Characterization of human cytochrome P450 enzymes.* FASEB J. 6, 745–748.
- HANNEMANN F., ROTTMANN M., SCHIFFLER B., ZAPP J., BERNHARDT R., 2001. *The loop region covering the iron-sulfur cluster in bovine adrenodoxin comprises a new interaction site for redox partners.* JBC 276, 1369–1375.
- HANUKOGLU I., 1992. *Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis.* J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 43, 779–804.
- HANUKOGLU I., FEUCHT WANGER R., HANUKOGLU A., 1990. *Mechanism of corticotropin and cAMP induction of mitochondrial cytochrome P450 system enzymes in adrenal cortex cells.* JBC 265, 20602–20608.
- HOMMA R., KIMOTO T., NIIMURA Y., KRIVOSHEEV A., HARA T., OHTA Y., KAWATO S., 2000. *Real-time fluorescence analysis on molecular mechanisms for regulation of cytochrome P450_{scc} activity upon steroidogenic stimulation in adrenocortical cells.* J. Inorg. Bioch. 82, 171–180.

- KAN K. W., UNGAR F., 1973. *Characterization of an adrenal activator for cholesterol side chain cleavage*. JBC 218, 2868–2875.
- KIDO T., KIMURA T., 1979. *The formation of binary and ternary complexes of cytochrome P450_{sc} with adrenodoxin and adrenodoxin reductase adrenodoxin complex*. JBC 254, 11806–11815.
- KIMURA T., 1981. *ACTH stimulation of cholesterol side chain cleavage activity of adrenocortical mitochondria*. Mol. Cell Biochem. 36, 105–122.
- KMIECIAK D., TRZECIAK W. H. 1994. *Udział transkrypcji genu cytochromu P450_{sc} w regulacji syntezy hormonów sterydowych w korze nadnerczy*. Post. Biochem. 40, 240–247.
- KOBYLIŃSKA K., 1994. *Formy molekularne cytochromu P-450 wątroby szczura*. Post. Biochem. 40, 248–252.
- KOJIMA K., YAMASAKI E., KITADA S., OGISHIMA T., ITO A., 2001. *Recognition of mitochondrial protein precursor lacking arginine at position-2 by mitochondrial processing peptidase: processing of bovine cytochrome P450 (SCC) precursor*. J. Biochem. 130, 497–502.
- KORTE K., HEMSELL P. G., MANSON J. J., 1982. *Sterol sulfate metabolism in the adrenals of the human fetus, anencephalic newborn, and adult*. J. Chin. Endocrinol. Metab. 55, 671–675.
- LAMBERTH J. D., XU X. X., GLOVER M., 1987. *Cholesterol sulfate inhibits adrenal mitochondrial cholesterol side chain cleavage at a site distinct from cytochrome P-450_{sc}*. JBC 262, 9181–9188.
- LEWIS D. F. V., HLAVICA P., 2000. *Interactions between redox partners in various cytochrome P450 systems: functional and structural aspects*. BBA 1460, 353–374.
- LIEBERMAN S., LIN Y. Y., 2001. *Reflection on sterol side-chain cleavage process catalyzed by cytochrome P450_{sc}*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 78, 1–14.
- LISCUM L., MUNN N. J., 1999. *Intracellular cholesterol transport*. BBA 1438, 19–37.
- MALENDOWICZ L. K., TRZECIAK W. H., 1974. *Rola ACTH w regulacji metabolizmu cholesterolu w korze nadnerczy*. Endokrynol. Pol. 25, 61–81.
- MANSON J. J., HEMSELL P. G., KORTE K., 1983. *Steroidogenesis in dispersed cells of human fetal adrenal*. J. Chin. Endocrinol. Metab. 56, 1057–1062.
- MANSON J. J., BOYD G. J., 1971. *The cholesterol side-chain cleavage enzyme system in mitochondria of human term placenta*. Eur. J. Biochem. 21, 308–321.
- MEIGS R. A., SHEEN L. A., 1977. *Mitochondria from human placenta. III The role of respiration and energy generation in progesterone biosynthesis*. BBA 165, 225–235.
- MILES C. S., OST T. W. B., NOBLE M. A., MUNRO A. W., CHAPMAN S. K., 2000. *Protein engineering of cytochromes P-450*. BBA 1543, 383–407.
- MOROHASHI K., FUJII-KURIYAMA Y., OKADA Y., SAGOWA K., INAYAMA S., AMURA T., 1984. *Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for mRNA of mitochondrial cytochrome P-450(SCC) of bovine adrenal cortex*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4647–4651.
- MILLER W. L., 1987. *Structure of genes encoding steroidogenic enzymes*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 27, 759–766.
- MÜLLER E.-C., LAPKO A., OTTO A., MÜLLER J. J., RUCKPAUL K., HEINEMANN U., 2001. *Covalently crosslinked complexes of bovine adrenodoxin with adrenodoxin reductase and cytochrome P450_{sc}*. Eur. J. Biochem 268, 1837–1843.
- MÜLLER J. J., LAPKO A., BOURENKOV G., RUCKPAUL K., HEINEMANN U., 2001. *Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis*. JBC 276, 2786–2789.
- NOVIKOVA L. A., NZAROV P. A., SAVELIEV A. S., DRUTSA V. L., SERGEEV V. N., MILLER W. L., LUZIKOV V. N., 2000. *Interaction of catalytic domains in cytochrome P450_{sc}-adrenodoxin reductase-adrenodoxin fusion protein imported into yeast mitochondria*. Biochemistry 65, 1362–1366.
- PETRESCU A. D., GALLEGOS A. M., OKAMURA Y., STRAUSS III J. F., SCHROEDER F., 2001. *Steroidogenic acute regulatory protein binds cholesterol and modulates mitochondrial membrane sterol domain dynamics*. JBC 276, 36970–36982.
- PRIVALLE C. T., CRIVELLO J., JEFCOATE C. R., 1983. *Regulation of mitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P450_{sc} in adrenal glad*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 702–706.
- SAKAKI T., INOUE K. 2000. *Practical application of mammalian cytochrom P450*. J. Biosc. Bioenerg. 90, 583–590.
- SHEA-EATON W., SANDHOFF T. W., LOPEZ D., HALES D. B., MCLEAN M. P., 2002. *Transcriptional repression of the rat steroidogenic acute regulatory (StAR) protein gene by the AP-1 family member c-Fos*. Mol. Cell Endocrinol. 188, 161–170.
- SHIKITA M., HALL P. F., 1973. *Cytochrome P450 from bovine adrenocortical mitochondria: an enzyme for the side chain cleavage of cholesterol. I. Purification and properties*. JBC 248, 5598–5604.
- SHIKITA M., HALL P. F., 1973. *Cytochrome P450 from bovine adrenocortical mitochondria: an enzyme for the side chain cleavage of cholesterol. II. Subunit structure*. JBC 248, 5605–5609.
- SHIMIZU K., HAYANO M., GUT M., DORFMAN R. I., 1961. *The transformation of 20-hydroxycholesterol to isocaproic acid and C₂₁ steroids*. JBC 236, 695–699.
- SŁOCIŃSKA M., 2002. *Peryferyczny receptor benzodiazepin*. Post. Biol. Kom. 29, 319–339.
- SPARKES R. S., KLISAK I., MILLER W. L., 1991. *Regional mapping of genes encoding human steroidogenic enzymes: P450_{sc} to 15q23-q24, adrenodoxin to 11q22; adrenodoxin reductase to 17q24-25; and P450c17 to 10q24-q25*. DNA Cell Biol. 10, 359–365.
- STOCCO D. M., 1998. *A review of the characteristics of the protein required for the acute regulation of steroid hormone biosynthesis: the case for the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein*. PSEBM. 217, 123–129.
- STOCCO D. M., 2000a. *Intramitochondrial cholesterol transfer*. BBA 1486, 184–197.

- STOCCO D. M., 2000b. *The role of the StAR protein in steroidogenesis; challenges for the future*. J. Endocrinol. 164, 247–253.
- STOCCO D. M., 2001. *Tracking the role of a StAR in the sky of the New Millennium*. Mol. Endocrinol. 15, 1245–1254.
- STOCCO D. M., CLARK B. J., REINHART A. J., WILLIAMS S. C., DYSON M., DASSI B., WALSH L. P., MAANNA P. R., WANG X., ZELEZNIK A. J., ORLY J., 2001. *Element involved in the regulation of the StAR gene*. Mol. Cell Endocrinol. 177, 55–59.
- SUGAWARA T., HOLT J. A., DRISCOLL D., STRAUSS III J. F., LIN D., MILLER W. L., PATTERSON D., CLANCY K. P., HART I. M., CLARK B. J., STOCCO D. M., 1995a. *Human steroidogenic acute regulatory protein (StAR): functional activity COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4778–4782.
- SUGAWARA T., LIN D., HOLT J. A., MARTIN K. O., JAVITT N. B., MILLER W. L., STRAUSS III J. F., 1995b. *Structure of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: StAR stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity*. Biochemistry 34, 12506–12512.
- SZUKALSKI B., 1977. *Komórkowa i subkomórkowa topografia enzymów steroidogenezy*. Post. Biochem. 23, 95–111.
- SZUTOWSKI M. M., 1980. *Effect of natural lipids on the activity of rabbit pulmonary mixed-function oxidase system with cytochrome P-450*. Pol. J. Pharmacol. Pharm. 32, 759–765.
- TAKEUCHI K., TSUBAKI M., FUTAGAWA J., MASUYA F., HORI H., 2001. *Adrenodoxin-cytochrome P450_{sc} interaction as revealed by EPR spectroscopy: comparison with the putidaredoxin-cytochrome P450_{cam} system*. J. Biochem. 130, 789–797.
- TUCKEY R. C., CAMERON K. J., 1993. *Side-chain specificities of human and bovine cytochromes P450_{sc}*. Eur. J. Biochem. 217, 209–215.
- TUCKEY R. C., HEADLAM M. J., 2002. *Placental cytochrome P450_{sc} (CYP11A1): comparison of catalytic properties between conditions of limiting and saturating adrenodoxin reductase*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 81, 153–158.
- TUCKEY R. C., SADLEIR J., 1999. *The concentration of adrenodoxin reductase limits cytochrome P450_{sc} activity in the human placenta*. Eur. J. Biochem. 263, 319–325.
- TUCKEY R. C., MCKINLEY A. J., HEADLAM M. J., 2001. *Oxidized adrenodoxin acts as a competitive inhibitor of cytochrome P450_{sc} in mitochondria from the human placenta*. Eur. J. Biochem. 268, 2338–2343.
- TUCKEY R. C., WOODS S. T., TAJBAKHSH M., 1997. *Electron transfer to cytochrome P-450_{sc} limits cholesterol-side-chain-cleavage activity in the human placenta*. Eur. J. Biochem. 244, 835–839.
- USANOV S. A., CHERNOGOLOV A. A., CHASHCHIN V. L., 1990. *Is cytochrome P-450_{sc} a transmembrane protein?* Eur. J. Biochem. 275, 33–35.
- VERMA A., SNYDER S. H., 1989. *Peripheral type benzodiazepine receptors*. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 307–322.
- VERNIKOS-DANIELIS J., HALL P. F., 1965. *Inhibition of adrenocortical responsiveness to ACTH by actinomycin D in vivo*. Nature 207, 766–770.
- VIJAYAKUMAR S., SALERNO J. C., 1992. *Molecular modeling of the 3-D structure of cytochrome P450_{sc}*. BBA 1160, 281–286.
- WOJCIECHOWSKI Z. A., 1986. *Białkowe aktywatory biosyntezy i metabolizmu cholesterolu*. Post. Biochem. 32, 59–78.
- WOJTKOWSKA M., 2002. *Import białka do mitochondriów*. Post. Biol. Kom. 29, 379–397.
- XIANG X. X., LAMBETH J. D., 1989. *Cholesterol sulfate is naturally occurring inhibitor of steroidogenesis in isolated rat adrenal mitochondria*. JBC 264, 7222–7227.
- XU T., BOWMAN E. P., GLASS D. B., LAMBETH J. D., 1991. *Stimulation of adrenal mitochondrial cholesterol side-chain cleavage by GTP, steroidogenesis activator polypeptide (SAP), and sterol carrier protein 2*. JBC 266, 6801–6807.