

4
2e1

**ANALISIS DE LA REGION REGULADORA DEL GEN
CYP21B EN PACIENTES CON HIPERPLASIA
SUPRARRENAL CONGENITA:**

**VALORACION DE UN ENSAYO DE RETARDO PARA LA
REGION DE UNION AL FACTOR Sp1**

**TESIS PRESENTADA POR
LUCIA NIKOLAIA LOPEZ BOJORQUEZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA**

UACPyP DEL CCH DE LA UNAM

**TESIS DIRIGIDA POR
DRA MARIA TERESA TUSIE LUNA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

258497



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCION	1
La síntesis de hormonas esteroideas	2
<i>Internalización del colesterol en las células de la glándula suprarrenal</i>	2
<i>Principales pasos de la biosíntesis esteroides</i>	3
<i>Las enzimas esteroideogénicas y su compartimentalización</i>	4
Regulación de la síntesis de hormonas esteroideas	5
<i>La estimulación crónica y aguda de la corteza suprarrenal por ACTH</i>	6
<i>La regulación transcripcional de los genes esteroideogénicos</i>	8
Consecuencias funcionales de la deficiencia de 21-hidroxilasa.	9
La Hiperplasia Suprarrenal Congénita	11
El gene de la 21-hidroxilasa	12
El promotor del gene CYP21B	16
<i>La transcripción basal</i>	16
<i>El elemento que responde a cAMP</i>	17
<i>El regulador negativo</i>	17
<i>La transcripción tejido específica</i>	18
El diagnóstico molecular de la HSC	19
ANTECEDENTES	21
OBJETIVOS	23
RESULTADOS	24
<i>Amplificación específica del gene CYP21B</i>	24
<i>Amplificación de un fragmento de 98 pb de promotor del gene CYP21B</i>	27
<i>Identificación de los complejos formados por el fragmento de 98pb y el factor de transcripción Sp1</i>	31
<i>Determinación de diferencias de desplazamiento entre el gene y el pseudogene, y entre individuos normales y pacientes</i>	33
DISCUSIÓN	38
<i>La amplificación CYP21B específica</i>	39
<i>Segunda amplificación para generar templado para ensayos de retardo</i>	40
<i>El fragmento de 98 pb forma complejos</i>	42
<i>El ensayo de retardo es capaz de detectar diferencias entre individuos normales y los pacientes con HSC</i>	43
<i>Los ensayos de retardo como herramienta clínica</i>	45
<i>Correlación entre desplazamiento y el fenotipo de los pacientes</i>	47
MATERIALES Y METODOS	51
BIBLIOGRAFIA	59

RESUMEN

La deficiencia de la 21-hidroxilasa, una enzima que participa en la síntesis de mineralocorticoides y glucocorticoides, produce una enfermedad que se hereda de manera recesiva, conocida como hiperplasia suprarrenal congénita (HSC), que en su forma más severa ocurre en una frecuencia de 1 en 20,000 y de 1 en 5,000 en su forma menos severa, dependiendo de la población. El gene que codifica para la enzima responsable de esta enfermedad, se conoce como CYP21 y se encuentra duplicado. El gene funcional (CYP21B) y el pseudogene (CYP21A) son similares en más del 98%. La alta frecuencia con la que ocurren mutaciones en el gene se ha explicado por un mecanismo de recombinación ilegítima entre el gene y el pseudogene.

De un grupo de más de 50 pacientes mexicanos con HSC se seleccionaron 12 pacientes en los que tras haber secuenciado completamente el gene funcional, no se encontró ninguna mutación en la región estructural del gen que pueda explicar la deficiencia enzimática. En estos casos, la causa de la enfermedad podría deberse a alteraciones en la región promotora del gene. La única otra mutación proveniente del pseudogen, cuyo efecto negativo se ha estudiado *in vitro*, es la que cae en el sitio de unión a Sp1, que no ha sido analizada en pacientes con HSC. La ausencia de mutaciones deletereas en la región codificadora de los 12 pacientes seleccionados, hace de este un grupo candidato a portar esta mutación.

Partiendo de que estudios *in vitro* han establecido que esta mutación altera la capacidad de unir Sp1 en el pseudogene no funcional CYP21A, se montó un ensayo capaz de evaluar esta deficiencia en el promotor del gene funcional CYP21B de estos pacientes. El ensayo consistió en evaluar la capacidad de formar complejos con proteínas nucleares, de un fragmento de 98 pb amplificado específicamente a partir del gene funcional CYP21B de pacientes y de individuos normales no afectados. La presencia de estos complejos se evaluó en ensayos de retardo de movilidad electroforética.

El ensayo fue validado comparando el desplazamiento de los complejos formados por fragmentos de 98 pb amplificados a partir del gene funcional CYP21B ó el pseudogene no funcional CYP21A clonados en cósmidos, encontrando diferencias significativas en la capacidad de unir Sp1. Estos ensayos revelaron diferencias en la capacidad de unión del factor transcripcional Sp1 entre individuos normales no afectados y el grupo de pacientes con HSC. Sin embargo, estas diferencias no presentaron correlación con la severidad de la enfermedad de cada uno de los pacientes.

Las diferencias en desplazamiento entre la versión clonada del gene funcional CYP21B y el fragmento amplificado a partir de individuos no afectados nos permiten suponer que existen variaciones en las secuencias fuera del sitio Sp1 capaces de alterar la unión de este factor a su secuencia consenso. Esto nos permite proponer que existen interacciones complejas entre los diferentes factores de transcripción cuyo sitios de unión se encuentran dentro del fragmento analizado.

Nuestros resultados muestran que este ensayo puede detectar cambios de secuencia que afectan la capacidad de unión de factores de transcripción en una región del promotor que contiene más de un sitio de regulación, lo cual constituye un acercamiento novedoso al estudio de enfermedades genéticas.

INTRODUCCION

Las hormonas esteroides (mineralocorticoides, glucocorticoides y esteroides sexuales) tienen una importancia fundamental en la fisiología de los mamíferos, participando en procesos muy distintos entre sí. Por ejemplo, la diferenciación sexual, el mantenimiento del embarazo y las funciones reproductivas en general son reguladas por andrógenos, estrógenos y progesterona. Los glucocorticoides promueven la gluconeogénesis y la degradación de ácidos grasos y proteínas, permitiendo al organismo resistir condiciones de estrés. Los mineralocorticoides participan en la regulación del volumen del líquido extracelular, incrementando la reabsorción del Na^+ por el riñón. La importancia de las hormonas esteroides es tal, que no son comunes las alteraciones clínicas en las que se ve afectado de manera importante su balance, de lo que se desprende que alteraciones de este tipo de hormonas podrían ser letales. Prácticamente la única enfermedad con una prevalencia genética importante que conlleva la ausencia parcial o total de alguna de estas hormonas es la Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC). En este padecimiento se encuentra afectada la vía biosintética de hormonas esteroides. Los síntomas de esta enfermedad ilustran la importancia de esta vía biosintética y lo delicado de su regulación.

La síntesis de hormonas esteroides

Es en la corteza de la glándula suprarrenal donde se lleva a cabo la etapa más importante de la esterodogénesis. Ahí se expresan una serie de enzimas encargadas de convertir el colesterol en mineralocorticoides: aldosterona y esteroides C19 (andrógenos suprarrenales que sirven como precursores de hormonas sexuales sintetizadas en otros tejidos principalmente en gónadas); y en glucocorticoides: cortisona y cortisol.

Internalización del colesterol en las células de la glándula suprarrenal:

Debido a que el precursor de estas reacciones es el colesterol, un aspecto importante de la biosíntesis de estas hormonas es la internalización del colesterol en las células de la glándula suprarrenal. Mencionaremos entonces que el colesterol es transportado en los fluidos del organismo en forma de macromoléculas lipoprotéicas que solubilizan los lípidos hidrofóbicos y que pueden ser reconocidos por una serie de tipos celulares. El principal acarreador y la fuente primaria del colesterol, son las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los receptores específicos de cada célula para estas moléculas son internalizados por endocitosis una vez que se les ha unido su ligando (Toth 1992). Las vesículas que contienen LDL son atacadas por proteasa permitiendo que al degradar las macromoléculas protéicas se pueda utilizar el colesterol. En las células de la glándula suprarrenal el colesterol es almacenado en forma de ésteres de colesterol y liberado de manera regulada por una esterasa y luego transportado a la mitocondria donde se lleva a cabo el rompimiento del colesterol, la primera reacción de la esteroidogénesis, misma que constituye el paso limitante de la vía (Takemori, 1984).

Principales pasos de la biosíntesis esteroidea

El rompimiento de colesterol a pregnenolona involucra tres enzimas embebidas en la membrana interna de la matriz mitocondrial incluyendo un citocromo P450, denominado enzima que corta la cadena lateral del colesterol (CytP450_{scc}) y que esta regulada por la disponibilidad de sustrato (Lambeth 1985). Esta reacción requiere de la utilización de tres moléculas de NADH⁺ y O₂, requeridas en la hidroxilación secuencial en las posiciones 20' y 22'. La pregnenolona viaja entonces al retículo endoplásmico para ser isomerizada a progesterona o bien hidroxilada a 17 α -hidroxipregnenolona que a su vez es convertida a 17 α -hidroxiprogesteron por acción de una 17,20 lyasa (17 α). La 17 α -hidroxiprogesteron es un intermediario de gran interés para la clínica ya que sus niveles circulantes sirven como un criterio de diagnóstico para casos de alteración de la biosíntesis de hormonas esteroideas (ver figura 1) En casos severos de HSC, los niveles de este precursor pueden aumentar hasta llegar a 10 000 ng/ml equivalente a un incremento de cien veces con respecto a los niveles normales (White 1987). El paso siguiente lo lleva a cabo la enzima 21-hidroxilasa ó P450_{c21} (21-OHase), que cataliza una monooxidación en el carbono 21' del esqueleto del colesterol a partir de dos sustratos (distintos solo por la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 17'). La 21-hidroxilasa utiliza como sustratos a la progesterona y la 17-hidroxiprogesteron para convertirlos en deoxicorticosterona (DOC) y 11-deoxicortisol (S) respectivamente. Durante su ciclo catalítico las enzimas 21-hidroxilasa y 17 α -hidroxilasa son oxidadas y deben ser reducidas por una flavoproteína microsomal que utiliza NADH (NADPH P450 reductasa) para regresarlas a su estado funcional. En este paso los intermediarios deoxicorticosterona (DOC) y 11-deoxicortisol (S) dejan el retículo endoplásmico y son transportados a la mitocondria para el paso final de biosíntesis de hormonas esteroideas, catalizado

por la enzima 11β -hidroxilasa (11β), localizada en la membrana interna de la mitocondria. DOC es convertido a corticosterona y S a cortisol, el principal glucocorticoide en humanos. Estas reacciones se llevan a cabo en las células de la *zona fasciculata* y de la *zona reticularis* de la corteza suprarrenal (Nakane 1975). En las célula de la *zona glomerulosa* donde no hay enzima 17α -hidroxilasa, la corticosterona es convertida a aldosterona, el principal mineralocorticoide en humanos. Esta reacción es el resultado de una 18 hidroxilación también catalizada por la enzima 11β y por una 18 -metiloxidasa (para revisión ver Simpson, et al. 1988).

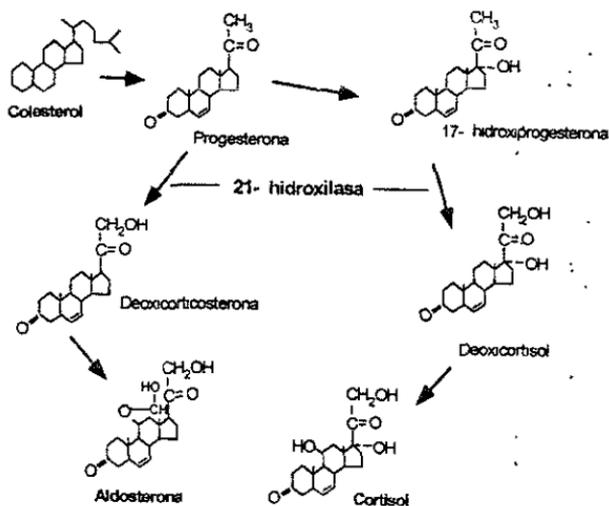


Figura 1 - Resumen de la vía biosintética de las hormonas esteroides, donde se muestran los principales intermediarios y enzimas que participan

Las enzimas esteroideogénicas y su compartimentalización

La mayoría de las enzimas que participan en esta vía son monooxigenasas que pertenecen a la superfamilia de los citocromos P450, hemoproteínas ubicuas

que catalizan reacciones de transferencia de oxígeno utilizando NADPH como transportador electrónico. En las reacciones de hidroxilación del esqueleto de colesterol, el oxígeno requerido para ser incorporado a los grupos hidroxilos, proviene del O₂. (para revisión ver: Guengerich 1992). La mayoría de estas reacciones ocurren en la mitocondria o asociadas al sistema microsomal (Beyer 1956). Hay que resaltar que la vía biosintética de las hormonas esteroideas no se encuentra distribuida de manera uniforme en todas las células de la corteza suprarrenal. Distintas células de la glándula suprarrenal están especializadas para realizar mayoritariamente la síntesis de uno u otro tipo de hormona. La *zona glomerulosa* de la corteza se encarga mayoritariamente de la síntesis de mineralocorticoides, mientras que en la *zona fasciculata* se sintetiza principalmente el cortisol y en la *zona reticularis*, andrógenos. Cada una de estas zonas responde de manera independiente y diferencial al estímulo correspondiente según el caso (Nakane 1975). Esta especialización requiere entre otras cosas de la expresión diferencial de las distintas enzimas biosintéticas de las diferentes hormonas. Por esta razón el estudio de la regulación transcripcional y la expresión de las enzimas, en particular de aquellas que juegan papeles diferentes según el producto final de la vía (17 α , 21-OHasa, 11 β), ha sido estudiado con mucho interés. Cabe mencionar que a la fecha se desconocen los mecanismos que determinan la expresión diferencial de estas enzimas, haciendo posible que una célula sintetice una u otra hormona esteroide.

Regulación de la síntesis de hormonas esteroideas

La regulación más importante de la esteriodogénesis ocurre por medio de la hormona adenocorticotrópica (ACTH) a través de varios mecanismos que favorecen la producción y liberación de hormonas esteroideas. El ACTH regula de manera positiva la síntesis y la transcripción de las enzimas de la vía biosintética. A su vez la producción de ACTH está directamente regulada por el eje

hipotálamo-hipófisis (ver figura 2), de aquí que las alteraciones funcionales del mismo o la hipofisectomía se asocian al desarrollo de desórdenes en el metabolismo intermedio

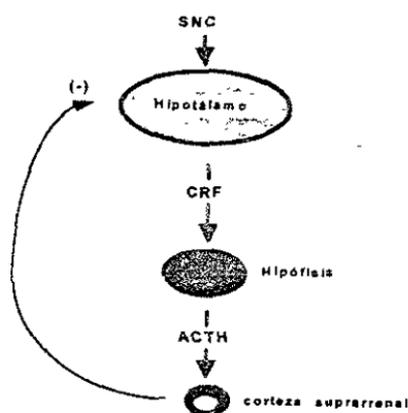


Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis, involucrado en la regulación de la síntesis de hormonas esteroides por parte de la glándula suprarrenal CRF- Factor estimulante corticoide. (-) Efecto inhibitorio por glucocorticoides.

La estimulación crónica y aguda de la corteza suprarrenal por ACTH

El ACTH modifica las funciones de las células de la glándula suprarrenal de distintas maneras. En la primera estimula la transcripción de las enzimas de la vía biosintética que resulta en un aumento en la producción y liberación de hormonas lo que se conoce como efecto crónico. Además el ACTH promueve a tiempos cortos la internalización de colesterol a las células de la corteza suprarrenal mediante la activación de una serie de proteínas cinasas dependientes de cAMP a lo que se la llama respuesta aguda. En las células de la glándula suprarrenal, el ACTH interactúa de manera específica con receptores de la superficie celular activando una vía de transducción que involucra la activación secuencial de adenilato ciclasa y proteínas cinasas dependientes de

cAMP que finalmente resultan en la activación de la transcripción genética mediada por la proteína ASP (ver mas adelante) y por el factor esteroideogénico (SF-1) (Schimer 1994). Como parte de la respuesta aguda, el ACTH es también responsable de la estimulación del colesterol a las células esteroideogénicas, como los receptores LDL. El efecto de ACTH sobre casi todos los puntos de la vía biosintética es de estimulación positiva y esta estimulación a su vez está regulada positivamente por varios intermediarios y por los productos finales, de manera que si una de las enzimas presenta una falla, la falta de producto final de la vía estimulará la síntesis de las demás.

Así por ejemplo, el caso particular de deficiencia en 21hidroxilasa, resulta en una deficiencia de cortisol que es detectada por el eje hipotálamo-hipófisis lo que resulta en un incremento en la producción de ACTH, lo que estimula a su vez la síntesis de varias enzimas esteroideogénicas reguladas transcripcionalmente por esta hormona. Al encontrarse bloqueado el paso de 21-hidroxilación, se acumulan intermediarios de la vía, principalmente 17-hidroxiprogesterona (Ver figura 3), que son entonces convertidos en andrógenos. El exceso de andrógenos circulantes produce virilización de diversos grados.

Las hormonas esteroides, algunos de sus metabolitos y sus hormonas derivadas son transportadas en sangre generalmente unidas a proteínas. Algunos de estos transportadores son inespecíficos, como la albúmina que une con baja afinidad a varias de ellas. La testosterona por ejemplo viaja unida a una β -globulina (TeBG). Por su parte el cortisol y en menor medida la progesterona son transportados por una proteína que lo une con alta especificidad llamada transcortina (CBG), que funciona como reservorio pero no parece jugar un papel importante en la regulación de su actividad biológica

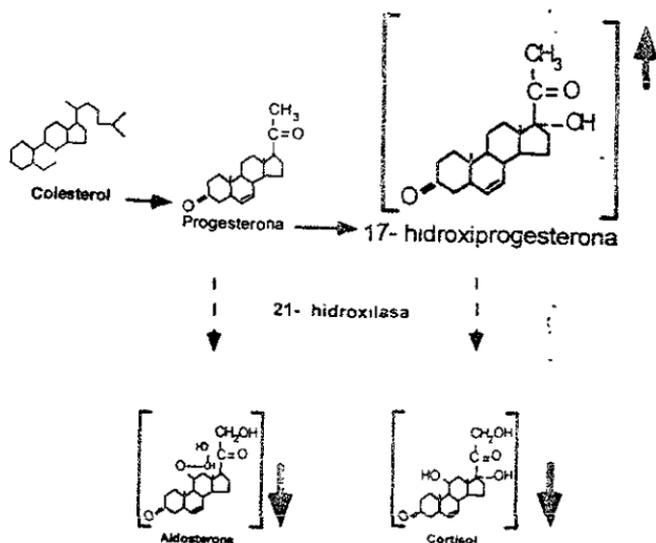


Figura 3.- Resumen de la vía biosintética de las hormonas esteroides cuando se encuentra bloqueado el paso de 21-hidroxilación. Se muestran aumentados aquellos intermedios cuyos niveles se elevan, y disminuidos los productos cuya síntesis se abate.

La regulación transcripcional de los genes esteroidogénicos

La biosíntesis de las hormonas esteroides es un fenómeno altamente regulado a distintos niveles. El análisis de la regulación transcripcional de los genes que codifican para las enzimas biosintéticas presenta elementos comunes y tejido específicos. Todos estos genes responden a activación por ACTH mediante un mecanismo del que se desconocen hasta el momento los detalles. Se ha buscado en varios de ellos los elementos consenso responsables de esta respuesta y no han sido encontrados. En cambio se han descrito mecanismos alternativos de respuesta a la elevación de los niveles de cAMP. Otro elemento de control transcripcional que ha sido localizado en varios de los genes

esteroidogénicos (SSC, 21-hidroxilasa, 11 β hidroxilasa) es el sitio de unión al factor esteroidogénico 1 SF-I (Rice 1991)

Consecuencias funcionales de la deficiencia de 21-hidroxilasa

La deficiencia de 21-hidroxilasa se presenta en una amplia gama de fenotipos que va desde pacientes que carecen totalmente de la actividad enzimática hasta aquellos que conservan entre el 50 y el 60 % de la actividad. Para aquellos individuos que carecen totalmente de actividad de esta enzima el problema principal resulta en la incapacidad para producir aldosterona (ver figura 1). Esta deficiencia tiene consecuencias serias para el paciente ya que la aldosterona regula la reabsorción de los iones contenidos en todo el líquido extracelular que diariamente filtran los riñones (del orden de 180 litros), de manera que cuando esta hormona falta, el riñón no puede mantener las concentraciones normales de Na⁺ (que son del orden de 130-140 mM) en sangre y en fluidos extracelulares y son eliminados por la orina. Ante la incapacidad de retener también optimamente los niveles de K⁺ y H⁺ y el adecuado intercambio de iones con el líquido intracelular, sobrevienen hipotensión, crisis cardiovascular, colapso y muerte (White 1987). Durante el desarrollo embrionario, el producto con actividad deficiente, o totalmente carente de 21-hidroxilasa no se ve afectado ya que son los riñones de la madre los que llevan a cabo esta tarea. Sin embargo, esta deficiencia se manifiesta con un síndrome que se presenta durante las primeras semanas de vida del neonato, denominado clínicamente como "crisis de pérdida de sal".

Cuando la enzima conserva actividad, aunque esta sea muy reducida, se produce suficiente aldosterona para minimizar los problemas derivados de la baja retención de electrolitos. En este caso el principal problema es la síntesis de glucocorticoides, principalmente de cortisol. Debido a la regulación positiva sobre las enzimas de esta vía, la falta de cortisol provoca un aumento de ACTH,

lo que a su vez ocasiona la elevación de los niveles de diversos intermediarios, incluida la testosterona, como se ilustra en la figura 3.

El exceso de testosterona durante el período embrionario principalmente alrededor de la quinta semana de desarrollo intrauterino ocasiona desórdenes en la diferenciación de los genitales externos. El principal problema es para los embriones femeninos y resulta en ambigüedad genital. En el sexo masculino no existen síntomas notorios al nacer, pero por influencia de la testosterona ocurre crecimiento excesivo durante la infancia y maduración acelerada, lo que lleva al cierre prematuro de los discos de crecimiento en los huesos largos, ocasionando estatura baja final.

De manera que el fenotipo y la sintomatología clínica de los pacientes con deficiencia de 21- hidroxilasa dependen del grado de actividad enzimática, de si existe actividad de esta enzima por pequeña que esta sea, o si fue abatida por completo (Tusié 1990, Tusié 1991, White 1994). Según el grado de deficiencia enzimática el fenotipo puede variar desde desórdenes gonadales, alteraciones severas en la regulación de niveles de electrolitos, o bien no ser lo suficientemente grave para ser notado de manera obvia hasta que el individuo presenta problemas hormonales diagnosticados generalmente durante la adolescencia o en la edad adulta. Esta gran diversidad de los fenotipos que presentan los pacientes con HSC ha generado una clasificación según su fenotipo, del mas atenuado al mas severo, como no clásicos, virilizantes simples, o perdedores de sal.

La Hiperplasia Suprarrenal Congénita

La forma clásica que incluye el fenotipo virilizante y el perdedor de sal, ocurre en 1/10 000 nacimientos y la forma no clásica se ha reportado en el 1% de la población en general (White 1987). Lo que la coloca en los primeros lugares de la lista de las enfermedades genéticas comunes.

El diagnóstico bioquímico más común para esta enfermedad es la medición de 17-hidroxiprogesterona circulante, (ver figura 3) intermediario de las vías de síntesis de hormonas esteroideas, sustrato de hidroxilación de la

enzima 21-hidroxilasa y que suele aumentar notablemente en los individuos afectados después de la administración de ACTH. En su forma más grave la deficiencia enzimática es letal en el periodo posnatal, por lo que su diagnóstico oportuno preferiblemente prenatal y el consejo genético adecuado podrían disminuir en muchos casos la severidad y la morbimortalidad del padecimiento. En el caso particular de población mexicana, se ha observado que los individuos diagnosticados se presentan en una proporción de 3 niñas por cada niño. Este dato no representa la proporción real en la que la enfermedad ocurre, sino en la que se le diagnostica. Esto podría ser un reflejo de la alta mortalidad que existe entre individuos de sexo masculino, (donde mueren 3 de cada 4) ya que en estos casos el diagnóstico se complica por no haber signos aparentes de exceso de andrógenos como lo es la ambigüedad genital en niñas. Dependiendo del fenotipo en cuestión, la sintomatología más común incluye ambigüedad genital, deshidratación, crisis hiponatrémica, pseudopubertad precoz, etc. El tipo de estudios bioquímicos para determinar HSC van desde perfil androgénico (medición de cortisol, testosterona, androstenediona y 17-hidroxiprogesterona), hasta la medición de niveles de sodio circulante y presentes en la orina. En muchos de los casos, los síntomas más severos pueden tratarse con suplemento

de glucocorticoides, mineralocorticoides o simplemente de sal en la dieta. La ambigüedad genital puede en ocasiones corregirse con cirugía.

El tipo de herencia reportada para esta enfermedad es .monogérica, autosómica recesiva. En mas del 95% de los casos la mutación se encuentra en el gene que codifica para la enzima 21-hidroxilasa, encargada del paso de conversión de

11-deoxicortisol a partir de 17- hidroxiprogesterona. En el resto de los casos el gene afectado es el que codifica para la enzima 11- β hidroxilasa. Dada la frecuencia con la que se presentan mutaciones en la 21-hidroxilasa, el estudio del gene que codifica parar esta enzima y su regulación han sido atacados desde diversos ángulos

El gene de la 21-hidroxilasa

El gene que codifica para la enzima 21-hidroxilas recibe el nombre de CYP21B, por pertenecer a la superfamilia de genes que codifican para proteínas *cytrocromo P450* Esta localizado en el brazo corto del cromosoma 6, en la banda 21.3, muy cercano a la región de HLA del complejo de histocompatibilidad en el brazo corto del cromosoma 6. La estructura del gene comprende 10 intrones y 9 exones y mide aproximadamente 3.2 Kb. La mayoria de los genes que se encuentran en esta region tienen la particularidad de estar duplicados y el gene CY21B no es la excepción. En este caso el gene tiene como compañero cercano un pseudogene, denominado CYP21A con quien tiene una similitud del 98% en intrones y 96% en exones. Ambos estan separados por una distancia aproximada de 30 kb dentro del las cuales se encuentra el gene que codifica para la proteína C4 del sistema de complemento (ver figura 4). Las escasas diferencias de CYP21A con respecto a CYP21B lo hacen no funcional. Por una parte el nivel del mensajero de CYP21A es menor al 5% con respecto al del gene CYP21B . Por

otra, la introducción de un codón de terminación en el exon 8 produce un producto truncado y de poca estabilidad.

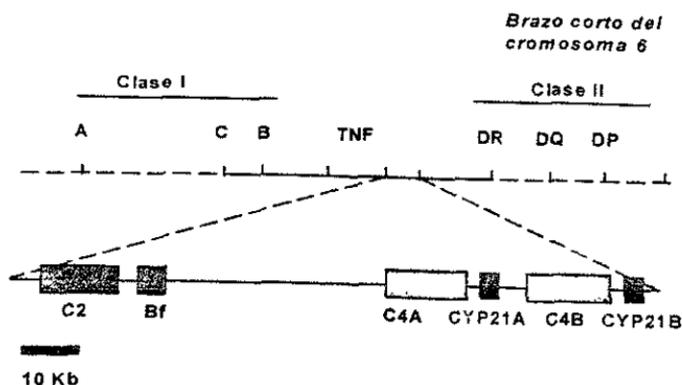


Figura 4 Localización del gene CYP21B. Se indica la posición relativa de varios loci de genes localizados en la región 21.3q del cromosoma 6. Se representa distintos sitios conocidos dentro de esta región.

Se sabe que la alta frecuencia a la que se presenta la enfermedad se debe a que la alta identidad entre el gene funcional y el pseudogene, permite una serie de recombinaciones ilegítimas vía conversión génica que transmiten los cambios del pseudogene (CYP21A) al gene funcional CYP21B, disminuyendo la actividad enzimática del producto génico en diferente medida. Estudios a nivel genético y molecular de individuos con HSC han permitido establecer cuáles de estas diferencias entre el gene y el pseudogene pueden traducirse en mutaciones al ser transferidos de uno a otro. Las mutaciones reportadas a nivel mundial y su repercusión en las características clínicas del padecimiento pueden verse en la tabla 1. Esta transmisión de mutaciones ocurre a todo lo largo del gene y por tanto podría afectar no solo a la región codificadora sino también el promotor y por tanto la eficiencia de la transcripción génica, lo que podría manifestarse en bajos niveles de RNA mensajero.

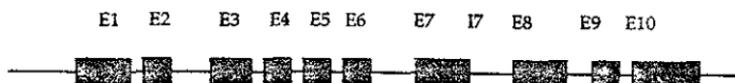
En colaboración con distintos servicios de endocrinología pediátrica, en el laboratorio de la Dra. Tusié se han identificado 54 familias con diagnóstico clínico de HSC. En estas familias se ha realizado análisis mutacional por medio de la secuenciación directa el gene CYP21B. Esto ha permitido establecer el tipo y la frecuencia con la que se encuentran presentes en la población mexicana las distintas mutaciones que han sido reportadas previamente (Ordoñez,1997) (ver tabla1).

Resulta interesante el cambio encontrado en la posición 493 que resulta en la conversión de una asparagina a una serina en el extremo carboxilo terminal de la proteina. Este cambio se presenta con similar frecuencia en individuos afectados (42.5%) que en individuos normales (37.5%) pero es mucho mas frecuente encontrarlo de forma homózigas en los pacientes. No ha sido posible determinar si se trata de una mutación con alguna consecuencia sobre la actividad enzimática, si es un polimorfismo o si pudiera representar un cambio de secuencia en desequilibrio de enlace con una mutación aún no identificada.

Partiendo de este mismo trabajo, en algunos de los pacientes que se secuenciaron, se han encontrado inconsistencias entre el fenotipo clínico y el tipo de mutaciones encontradas (genotipo). Al secuenciar la región codificadora del gene se han encontrado casos en los que dos individuos comparten las mismas mutaciones, sin embargo el fenotipo de la enfermedad es distinto entre estos pacientes. La identificación de estos casos ha motivado el estudio de la región promotora en individuos afectados, bajo la premisa de que mutaciones en la región reguladora que afectaran la eficiencia de la transcripción del gene podrían explicar estas diferencias en la expresión clínica. La región reguladora del gene CYP21 podría jugar un papel importante en algunos pacientes con HSC.

Localización	Mutación	frecuencia reportada (%)	frecuencia encontrada (%)
E1	P30L	17	8.5
E2	A/C --- G	26-42	47.9
E3	Del 8pb	7.5-10	2.1
E4	I172N I236N	7.5-10	11.7
E6	V237E M239K	3	0
E7 1	V273E	10.6	8.5
E7 2	Inserción T	1	1.0
I7	C --- G	NR	0
E8 1	G318 --- S	3-7	4.2
E8 2	R356W	14	7.4
E9	W406 --- S	NR	0
E10	P453S	NR	2.1
Del	delección de CYP21	11-35	1.0

Tabla 1.- Mutaciones en el gene funcional CYP21B. Frecuencias reportadas y frecuencias encontradas en población Mexicana. Se presentan tanto cambios en la secuencia como cambios en aminoácidos (para revisión ver Ordoñez et al, 1998) NR= Frecuencia no reportada, Del= delección del gene, E=Exón, I=Intrón



Mapa 1.- Estructura del gene CYP21B. Distribución de intrones e intrones. Se muestran numerados los exones e intrones donde se han reportado mutaciones en pacientes con HSC (ver tabla 1). E=Exón, I=Intrón

El promotor del gene CYP21

La parte secuenciada de la zona reguladora de CYP21B abarca mas de 1600 pb hacia el extremo 5' (Higashi, 1986). El promotor de este gene ha sido estudiado para definir los elementos que participan en los distintos niveles de regulación.

La transcripción basal

Estudios de expresión con distintas zonas del promotor han evidenciado regiones de importancia involucradas en el mantenimiento de los niveles basales del mensajero localizados entre las bases -230 y -180 pb (Parker 1986) además de la region comprendida entre -210 y -170 pb donde se halla una secuencia de 40 pb altamente conservada entre distintas especies.

En la posición -130 colocan los sitios de unión del factor de transcripción constitutivo NF-1/CTF (Chang, 1995) que se unen al DNA en forma de dímero y a cuya familia pertenecen varios factores de transcripción (Kusk 1996).

Alrededor de la posición -117 se encuentra el sitio consenso de unión a Sp1, un factor de transcripción ubicuo de mamíferos que utiliza la estructura de dedos de zinc para unirse al DNA en una región rica en G y C. El factor Sp1 fue originalmente aislado a partir de células HeLa y es capaz de aumentar la actividad transcripcional, de una gran cantidad de genes entre 10 y 50 veces, incluyendo el del receptor de LDL (Sánchez 1995), el mismo SF-1 (Woodson 1997) y varias enzimas esteroideogénicas (Lee 1994, Zhang 1995).

Ha quedado establecida la importancia de dicho factor para la transcripción de CYP21B. Una mutación en el sitio de unión a esta proteína, afecta los niveles de transcripción hasta en un 80 % (Chang 1995)

El elemento que responde a cAMP

Los genes esteroidogénicos responden a la estimulación por ACTH que actúa a través del segundo mensajero cAMP. En los genes esteroidogénicos no ha quedado establecido con exactitud qué elemento de la región promotora obedece a esta estimulación. Se ha buscado en particular la secuencia típica de respuesta a este segundo mensajero (CRE) de la que solo se ha encontrado una copia entre los -129 y

-96 pb. Parte de esta respuesta le ha sido asignada a otro elemento sin similitud aparente con los CRE y que en cambio se parece a una secuencia específica de adipocitos recién descrita a la que se le ha llamado FSE1. Sin embargo la respuesta importante a cAMP parece estar operada por un mecanismo que es particular para las enzimas esteroidogénicas cuya actividad recae en la proteína ASP (*Adrenal specific protein*), un factor de transcripción específico de la glándula suprarrenal. No es coincidencia entonces que la secuencia consenso de unión a esta proteína esté localizado justamente dentro de la zona que por estudios de expresión fué inicialmente caracterizada como responsable a la estimulación por cAMP, situada entre las bases -126 a -113 para el caso del gene CYP21B (Kagawa,1991).

El regulador negativo

El sitio CK-2 es el blanco de unión del factor NF-GMb, modulador negativo de la respuesta transcripcional. Ha sido descrita en el promotor de genes hematopoiéticos y pertenece a una familia de factores que se unen a cadena sencilla de DNA (Cole 1994). La expresión de esta proteína ha sido encontrada en una gran cantidad de tipos celulares.

Posiblemente este es uno de los represores presentes en el promotor del gene funcional CYP21B responsables de que solo se exprese en células suprarrenales.

La transcripción tejido específica

Como importantes en la especificidad tisular en la expresión de este gene han quedado establecidos algunos elementos. Entre estos resultan interesantes los sitios

-210, -140, y -65 donde se encuentra la secuencia AGGTCA, que se sabe forma complejos con factores de transcripción que han sido comparados con complejos formados por los promotores de otras enzimas esteroidogénicas con los que comparten tamaño y movilidad electroforética (Rice,1991). Recientemente se ha encontrado la proteína que podría interactuar con este elemento, clave para la regulación de este grupo de genes, el factor esteroidogénico 1 (SF-1) (Deepak,1992). Los genes esteroidogénicos comparten entonces secuencias regulatorias propios de su carácter suprarrenal. Además la especificidad celular en la expresión de la enzima 21-hidroxilasa parece estar mediada por la combinación de más de un elemento aunque el mecanismo exacto es desconocido todavía.

Entre las bases -126 y -113 se identificó originalmente una secuencia con respuesta a cAMP y se ha encontrado que participa en la especificidad tisular del gene. Este es el caso del sitio de unión a la proteína ASP, un factor de transcripción específico de células de la glándula suprarrenal. Como se mencionó anteriormente, los genes esteroidogénicos poseen elementos de respuesta al cAMP que les son particulares. La proteína ASP parece ser la responsable de dicha respuesta. (Kagawa, 1991). En la posición -228 se encuentra la secuencia de reconocimiento del receptor nuclear NGFI-B también llamado Nur77, un receptor nuclear de respuesta temprana, que se expresa abundantemente bajo la acción de ACTH en las células de la zona *fasciculata* y *reticularis* de la corteza de la glándula suprarrenal (Wilson et al, 1993) y que es común a otros genes regulados por ACTH. En este caso, NGFI-B parece actuar en cooperación con SF-1 (Wilson,1993) para mediar la especificidad el gene CYP21B.

```

ccattttc tctgagcaaa acatcttccc ataaacrtgc ccacggfggg (ggcagaagg agcgggccc) gctggggc gacactatg cctgcacagf galrtggaa
NGFI-B
cagaagctg acctggagc caggaaag gtcagggrtg cattccctf cctgtctct fgtgggrtg tcaatttt tgaastacg acgtccaaag gccaatgaga
NF-1/CTF
ASP Sp1 CK-2 c t
ciggigtat tccagaaaag ggcactctg tgcctctc ggaggagg tactctag agc tggctcaaggaggcccac anaacagctc cacagcagga
t a c g
ggatggcig gggtcttga gctataagc gcacctcagg gcoctgacgg gctctcgc atg cig ctc ctg gcc
t M L L L G

```

Figura 5- Secuencia de los primeros 300 pb en dirección 5' a partir del sitio de iniciación de la transcripción de la región reguladora del gene funcional CYP21B. Se muestran los sitios de los factores de transcripción conocidos cuya secuencia consenso de unión se encuentra en esta zona. Por debajo de la secuencia del gene funcional y en negritas, podemos ver los cambios que este presenta con respecto a la secuencia del pseudogene no funcional CYP21A (Higashi 1985, White 1985). Con iniciales se muestran los primeros 5 amino acidos de la proteína.

El diagnóstico molecular de la HSC.

Debido a la presencia del pseudogene con el que se comparte una similitud del 98%, el diseño de oligonucleótidos específicos para reacciones de amplificación por técnicas de PCR del gene funcional es complicado y dificulta no solo el estudio del mismo, sino el diagnóstico sobre la posible presencia de mutaciones. El diagnóstico molecular de HSC consiste generalmente en el análisis del gen con estrategias de hibridación con oligonucleótidos mutantes o bien a través la secuenciación directa del gene CYP21B. Pueden también llevarse acabo estudios de Southern Blot para identificar ciertos tipos de deleciones y de duplicaciones asociadas a mutaciones caracterizadas (Werkmeister 1986) Sin embargo la mayoría de las pruebas moleculares son costosas y no pueden llevarse a cabo con un gran número de individuos y mucho menos como parte de los estudios clínicos de rutina.

Las pruebas bioquímicas practicadas en pacientes con HSC son capaces de revelar deficiencias asociadas al metabolismo de hormonas esteroides, pero solo el análisis molecular podría confirmar el origen genético.

El gene que codifica para la enzima 21- hidroxilasa, se encuentra duplicado. Gracias a que tanto el gene como el pseudogene han sido secuenciados se sabe cuales son los cambios de base entre el gene funcional CYP21B y el pseudogene no funcional CYP21A. El pseudogene también se transcribe aunque con una eficiencia mucho menor a la del gene, dando además como producto un mensajero truncado y extremadamente lábil. Sin embargo el bajo nivel en su transcripción se debe a las diferencias que existen en su región promotora con respecto al gene funcional. De las diferencias encontradas entre los promotores del gene y el pseudogene, en el sitio de unión a Sp1 ocurre una cuya importancia para modular la transcripción ha quedado demostrada (Chang 1995). También ha quedado demostrado que este cambio reduce la capacidad del promotor del pseudogene de unir Sp1 en ensayos de retardo. Ya que las mutaciones en el gene encontradas en pacientes parecen provenir mayoritariamente del pseudogene, es posible postular que en la región promotora pudieran también darse estas transferencias de mutaciones. Esta tesis contempla la búsqueda de alteraciones en los promotores de pacientes en aquellas regiones en las que se sabe que estas mutaciones resultan importantes. Una de estas regiones es el sitio de unión al factor de transcripción Sp1.

En ensayos de retardo han quedado establecidas estas diferencias entre gene y pseudogene en particular en este sitio (Chang 1995), por lo tanto estos mismos ensayos podrían mostrarnos patrones distintos, al analizar el promotor de individuos afectados con HSC e individuos normales, en el sitio Sp1.

ANTECEDENTES

En el laboratorio de la Dra. Ma. Teresa Tusié se cuenta con una colección de 54 familias afectadas con HSC. Esta ha sido reunida en colaboración con los servicios de endocrinología de instituciones de salud (principalmente hospitales de tercer nivel) en donde se han detectado y diagnosticado los casos de HSC y llevado a cabo algunas pruebas bioquímicas para su confirmación (perfil androgénico, medición de sodio en la orina y niveles de 17-hidroxiprogesterona circulante).

Se ha obtenido de estas familias DNA derivado de linfocitos sanguíneos. Esto ha permitido una gran variedad de estudios moleculares y genéticos en estas familias. Parte importante de estos trabajos ha sido la secuenciación de entre el 40 y 50% del total del gene CYP21B de los 54 pacientes (Ordoñez et al 1998).

Gracias a esto ha sido posible determinar la frecuencia con la que las mutaciones reportadas para HSC en otras poblaciones ocurren en población mexicana. También se han identificado posibles polimorfismos y nuevas mutaciones y se han encontrado una serie de casos particularmente interesantes de los que se han desprendido otros trabajos, incluyendo el presente.

Los individuos seleccionados para este trabajo corresponden a tres grupos distintos: 1) pacientes que no portan ninguna de las 13 mutaciones más frecuentemente asociadas con HSC en otras poblaciones; 2) pacientes portadores de un cambio en el exón 10 (N493S) que se encuentra frecuentemente de forma homociga entre los pacientes analizados y se postula pudiera estar en desequilibrio de enlace con una mutación responsable del fenotipo aun no identificada y 3) pacientes con mutaciones idénticas dentro de

la región codificadora incluyendo los intrones del gen α que presentan fenotipos o formas clínicas distintas

Estas características los han convertido en candidatos a realizarseles diversos estudios en la región promotora del gene ya que mutaciones en esta zona podrían explicar la presentación de síntomas o las diferencias en severidad encontradas entre distintos pacientes.

En la siguiente tabla (tabla 2) se encuentran enumerados los pacientes utilizados en este estudio. Se muestran las mutaciones encontradas al realizar la secuenciación directa y el fenotipo clínico.

Numero de identificación	Genotipo	Fenotipo	Sexo
56	Sin mutación	Virilizante	M
97	Sin mutación	No clásico	M
125	Sin mutación	Perdedor de sal	F
96	Sin mutación	Virilizante ó No Clásico (?)	M
18	Hm E 10	Perdedor de sal	F
26	Hm E 10	Virilizante	M
34	Hm E 10	Virilizante	F
54	Hm E 10	Perdedor de sal	M
111	Ht E 10, Hm E 1	No clásico	F
116	Hm del 2GG, codon 482	Perdedor de sal	F
124	Hm I 2 Ht E 4	Perdedor de sal	F
21	Hm I 2 Ht E 4	Virilizante	F

Tabla 2.- Características clínicas y de las mutaciones presentes en los pacientes utilizados en este estudio

Hm = Mutación homociga

Ht = Mutación heterociga

La descripción de las mutaciones se encuentra en la tabla 1

Mutación del exon 10 = N4935 Ver texto (Antecedentes) para detalles

OBJETIVOS

-Desarrollar la implementación de un método de ensayos de retardo de movilidad electroforética basado en la obtención de un fragmento procedente de las regiones promotoras del gene CYP21B, de pacientes con HSC por deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa

-Valorar el procedimiento como una metodología para detectar alteraciones funcionales en esta región promotora. Esto conlleva a la estandarización del método, así como a la evaluación de sus limitaciones y su nivel de sensibilidad.

-Determinar si existen diferencias funcionales entre la región promotora de controles sanos y un grupo de pacientes con HSC candidatos a tener mutaciones en la región promotora del gen CYP21B.

-Determinar si es posible establecer correlaciones entre el grado de alteración funcional detectada por esta metodología y el fenotipo clínico de los pacientes analizados.

RESULTADOS

Amplificación específica del gene CYP21B

Con el fin de amplificar de manera específica la región promotora del gene funcional CYP21B mediante PCR sin obtener amplificado del pseudogene CYP21A, se diseñaron oligonucleótidos aprovechando las diferencias existentes entre ambos genes. Estos oligonucleótidos se diseñaron sobre aquellas regiones donde existía mayor número de diferencias de secuencia entre el gene y el pseudogene en un rango de aproximadamente 20 nucleótidos. Para el oligonucleótido sentido (OH12) estas diferencias entre CYP21B y CYP21A radican sólo en 2 de 20 bases mientras que para el oligonucleótido antisentido (OH22) las diferencias radican en 5 de 21 bases (figura 6, parte superior). En ambos oligos se buscó una discrepancia en la base del extremo 3' para aumentar la especificidad de la reacción de PCR.

Utilizando estos oligonucleótidos el producto de amplificación esperado es de 818 pb conteniendo 280 pb de la región promotora y 580 pb de la región codificadora hasta el intrón III. La región del intrón III es donde existe un mayor número de diferencias entre el gene y el pseudogene.

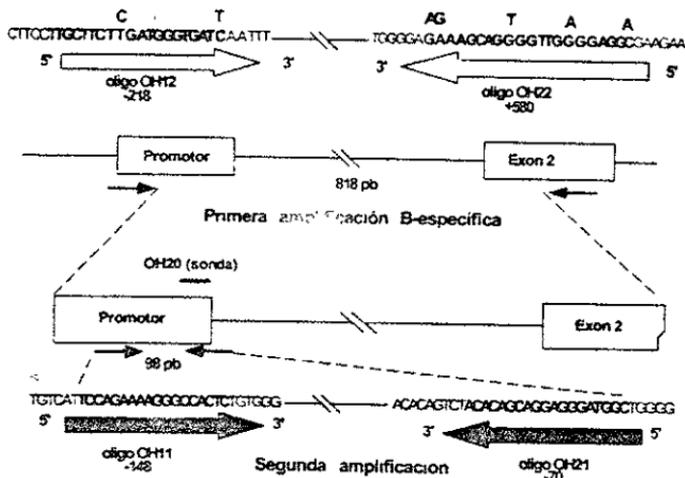


Figura 6 -Estrategia segunda para la amplificación específica de la region promotora del gene funcional CYP21B. Diseño de oligonucleótidos específicos (OH12 y OH22) que aprovechan diferencias entre gene y pseudogene. En la parte superior se muestran las zonas sobre las que estos fueron diseñados, aprovechando los cambios presentes entre el pseudogene y gene. En la parte inferior de la figura se muestran los oligonucleótidos de las segunda amplificación que no distinguen entre CYP21B y CYP21A (OH11 y OH21) los tamaños de los fragmentos esperados a partir de ambas amplificaciones se especifican entre las flechas que representan los oligonucleótidos sentido y antisentido de cada una de las reacciones de amplificación. Se muestra la ubicación del oligonucleótido interno a la reacción de PCR utilizado como sonda para comprobar la identidad del fragmento obtenido a partir de la primera amplificación.

La amplificación de este producto se hizo por separado para cada uno de los pacientes seleccionados, partiendo de DNA genómico obtenido de linfocitos sanguíneos. Como reacciones control de la especificidad de los oligonucleótidos OH12 y OH22 se usaron además como templado un cósmido en el que se encuentra clonado el gene funcional CYP21B (B) y un cósmido que contiene el pseudogene CYP21A (A). La amplificación de los pacientes y de los cósmidos, se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar la presencia y el tamaño del producto de amplificación (figura 8a). A partir del cósmido que contiene el gene funcional CYP21B, se obtuvo una banda del tamaño esperado que no se presentó en las reacciones que partían de cósmido con el pseudogene CYP21A (tercer carril de derecha a izquierda de la figura 8a). Se pudo observar un producto de PCR del mismo peso en las muestras amplificadas a partir de DNA genómico. Los productos de amplificación corridos en el gel de agarosa fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa y a través de un ensayo de

Southern Blot se determinó la identidad del producto. Como sonda se utilizó un oligonucleótido interno a la reacción de PCR (oligonucleótido OH20, ver figura 7 y mapa 2) marcado por fosforilación con [³²P] γ ATP conteniendo secuencia compartida por A y B que revelaría además la posible presencia de producto proveniente de la posible amplificación del pseudogene CYP21A que pudiera estar presente en pequeñas cantidades, no detectables por tinción con bromuro de etidio. En todos los casos se obtuvo señal positiva exceptuando el carril correspondiente a la amplificación a partir del cósmido que contiene el pseudogene CYP21A (segundo carril de derecha a izquierda de la figura 8b)

En el mapa 2 (ver sección de Materiales y métodos) se muestra la ubicación de los oligos específicos de B y la localización del oligo interno utilizado como sonda. En la siguiente figura (figura 7) se muestra la secuencia de la región amplificada por los oligonucleótidos OH11 y OH21 que contiene el sitio ASP/Sp1 y que fue utilizado como sustrato para los ensayos de retardo de movilidad electroforética.

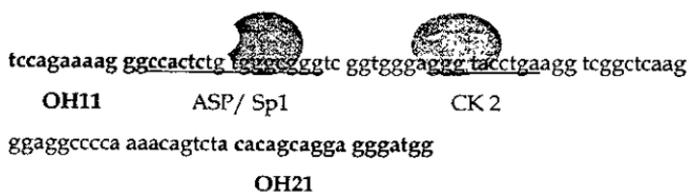


Figura 7- Secuencia del fragmento de 98 pb, producto de la segunda amplificación de la región promotora del gene funcional CYP21B. Se han subrayado los sitios de unión a factores de transcripción conocidos, ubicados en esta zona, los sitios CK-2 y ASP/Sp1. En negritas se muestra la ubicación de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR (OH11 y OH21).

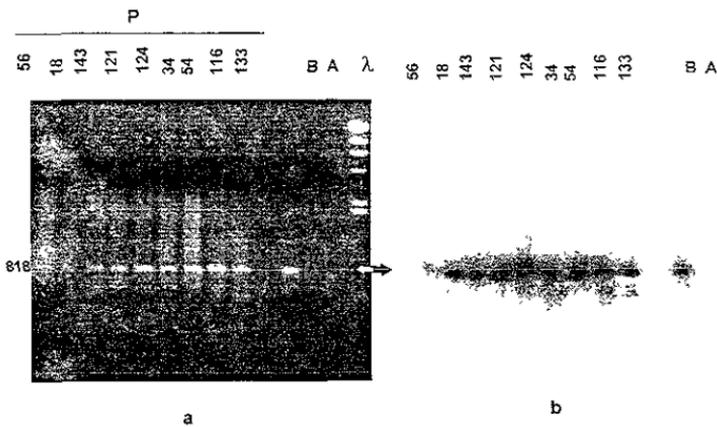


Figura 8. Análisis de los productos de amplificación B específica de pacientes con deficiencias en la enzima 21-OHasa a) Gel de agarosa donde se separaron los productos de la primera amplificación a partir de cósmido con el gene funcional CYP21B (B), del cósmido con el pseudogene CYP21A (A) o a partir de DNA genómico de 10 individuos afectados cuyo número de identificación se especifica se encuentra en la parte superior de cada carril b) *Southern Blot* resultado de la transferencia del mismo gel, hibridado con el oligonucleotido interno al producto de PCR esperado, OH20 [^{32}P] γ ATP

Amplificación de un fragmento de 98 pb del promotor del gene funcional CYP21B

El producto de PCR de la primera amplificación específica del gene funcional CYP21B, se utilizó como templado para una segunda amplificación que incluyera únicamente la secuencia del promotor en la que estuviera contenido el sitio Sp1 (figuras 6 y 7). Esta reacción de PCR se hizo utilizando los oligonucleótidos OH11 y OH21, que generó un producto con un tamaño de 98 pb. Para constatar la pureza del fragmento amplificado, se corrió en un gel desnaturalizaste de acrilamida en donde la presencia del DNA fue revelada con una tinción con plata (fig 9a)

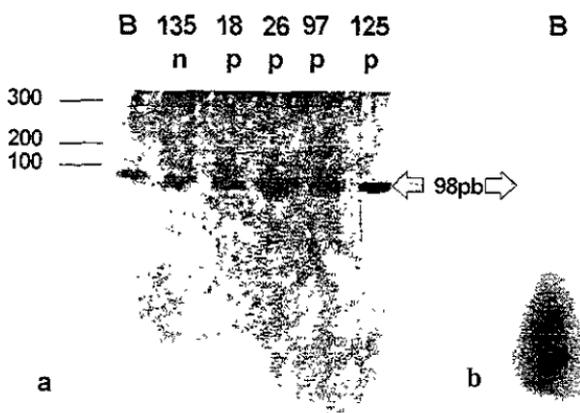


Figura 9. Amplificación de un producto de PCR de 98 pb para su uso en ensayos de retardo a) Gel de acrilamida teñido con plata donde se muestra la amplificación de un fragmento de 98 pb que contiene la región Sp1 del promotor del gene funcional CYP21B obtenido a partir del cósmido conteniendo CYP21B (B), a partir de individuos normales o a partir de pacientes con deficiencia 21-OHasa b) Autoradiografía del mismo fragmento de 98 pb kinado con $[^{32}\text{P}]$ / ATP y corrido en un gel denaturalizante de acrilamida.

Los ensayos de retardo requieren que los fragmentos de DNA empleados se encuentren marcados radioactivamente con $[^{32}\text{P}]$, de manera que con el propósito de marcar radioactivamente este fragmento, intentamos purificarlo. El producto de la reacción de PCR se separó en un gel de agarosa al 1.5% y la banda conteniendo el fragmento se purificó utilizando la técnica de *polvo de vidrio* (*glass powder*) como se describe en materiales y métodos. Una vez puricado el fragmento se marco con $[^{32}\text{P}]$ / ATP por kinación. La reacción se corrió en un gel denaturalizante de acrilamida cuya autoradiografía se muestra (figura 9b)

Debido a la baja eficiencia tanto de la segunda amplificación de PCR como del proceso de purificación, la escasa cantidad de producto marcado que obtuvimos al final no nos permitiría utilizar el producto marcado (mostrado en la figura 9 b) en los ensayos de retardo de movilidad electroforética. De manera que para tratar de aumentar la eficiencia de marcaje del fragmento se optó por sintetizarlo en presencia de un nucleótido marcado radioactivamente ($[^{32}\text{P}]$ / dCTP), de tal manera que este fuera incorporado directamente al producto amplificado durante la reacción de PCR. Esta reacción resultó ser

mucho más eficiente y adecuada para generar un fragmento DNA que pudiera ser utilizado en los ensayos de retardo de movilidad electroforética. Sin embargo esta aproximación también conlleva algunas dificultades técnicas debido a la alta sensibilidad inherente a la visualización de los productos de la amplificación. Encontramos discrepancias entre los patrones electroforéticos obtenidos por tinción plata o con bromuro de etidio y por autoradiografía de los productos de PCR. En la autoradiografía de los geles de acrilamida, con frecuencia aparecían subproductos inespecíficos generalmente de mayor peso molecular y en menor proporción que el producto de 98 pb, que no se habían visualizado con técnicas menos sensibles como la tinción con plata o con bromuro de etidio. En la figura 5 podemos ver dos geles de acrilamida en los que se corrieron dos reacciones de PCR distintas con [32 P] α dCTP incorporado directamente en la reacción de PCR. En una de ellas (A) se observan subproductos inespecíficos mientras que en la otra (B) solo aparece el fragmento de 98 pb. Las condiciones para lograr una reacción de PCR adecuada que pueda ser utilizada para los ensayos de retardo, requieren precauciones que generalmente no son necesarias para una reacción de PCR común, como la esterilidad de todos los reactivos y la limpieza del área de trabajo. Bajo estas condiciones fué posible obtener productos de PCR adecuados, en donde el fragmento de 98 pb representa más del 99% de los productos de la reacción. Estas reacciones resultaron ser adecuadas para realizar ensayos de retardo de movilidad electroforética.

Ya que resultaba importante contar con el fragmento de 98 pb con la secuencia del promotor del gene no funcional CYP21A como control en los ensayos de retardo de movilidad electroforética, realizamos la amplificación del mismo con los oligonucleótidos OH11 y OH21 (que comparten secuencia entre A y B) a partir del cósmido en el que se encuentra clonado el pseudogene CYP21A. Al realizar esta amplificación siempre encontramos mayor proporción de subproductos inespecíficos de mayor peso molecular al esperado (ver figura 10). Sin embargo con este fragmento de 98 pb amplificado a partir del pseudogene obtuvimos resultados informativos al utilizarlo como sustrato en

los ensayos de retardo de movilidad electroforética.

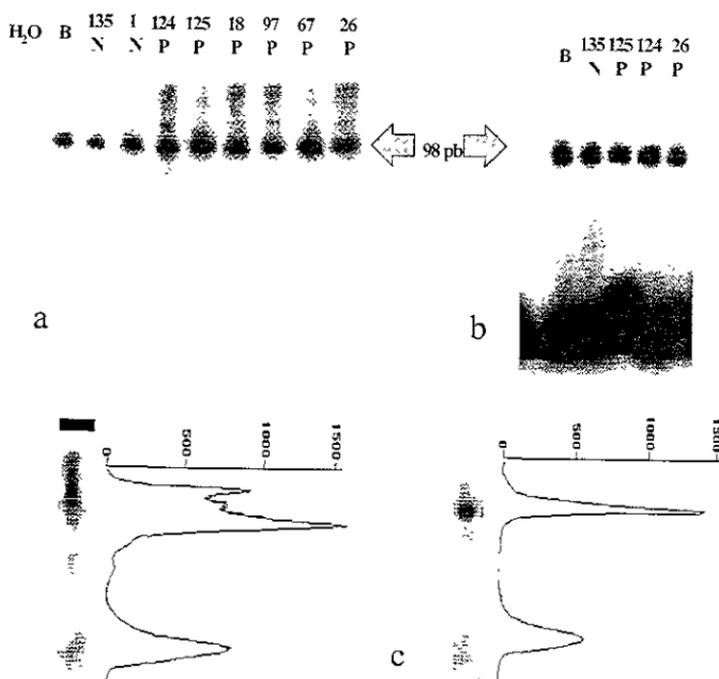


Figura 10- Análisis de los productos de PCR de segunda amplificación a partir de cosmido que contiene el gene funcional CYP21B (B), del pseudogene CYP21A (A), de individuos controles normales (n) o de individuos afectados con HSC (p), los numeros de identificación se muestran en la parte superior de los gels. Los dos gels presentados muestran distintos grados de pureza del fragmento amplificado, el fragmento de 98 pb se muestra con una flecha a) Reacción de PCR donde se amplifican subproductos de mayor peso molecular. b) Reacción de PCR en la que se amplificó con alto grado de pureza el fragmento de 98 pb. Autoradiografía del gel de acrilamida denaturalizante donde se separó la reacción de amplificación c) Autoradiografía del gel de acrilamida denaturalizante donde se separaron las reacciones de amplificación los productos obtenidos de la amplificación del fragmento de 98 pb a partir del gene funcional CYP21B y del pseudogene no funcional CYP21A. Se muestra la presencia de subproductos de mayor peso molecular en el caso de pseudogene. Del lado derecho de cada carril se muestra la densitometría de una línea vertical que lo atraviesa, para mostrar cuantitativamente la calidad de ambos fragmentos. Las unidades de la grafica representan cpm detectadas por el *Fosforminger*

Una vez obtenidos los fragmentos de 98 pb marcados con [³²P] α dCTP derivados de la primera amplificación y procedentes de DNA genómico de pacientes, se procedió a probar su capacidad para formar complejos en los ensayos de retardo de movilidad electroforética

Identificación de los complejos formados por el fragmento de 98 pb y el factor de transcripción Sp1

En la siguiente figura se muestra un ensayo de retardo en el que se utilizó este fragmento obtenido a partir del cósmido con el gene funcional CYP21B (B), con un individuo normal, o con dos individuos afectados en actividad de 21-Ohasa que presentan fenotipos de *perdedor de sal* (125) y *virilizante simple* (124)

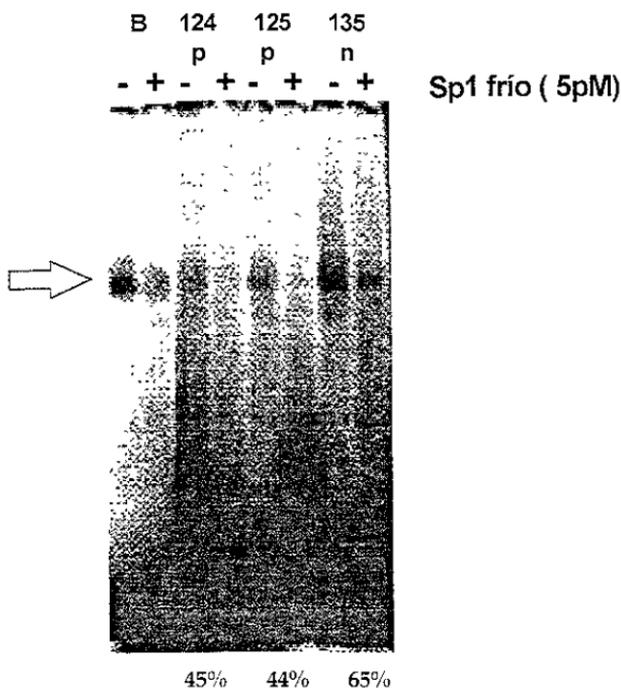


Figura 11- Autoradiografía de un ensayo de retardo de movilidad electroretica en el que se ensayaron fragmentos obtenidos a partir de cósmido con el gene funcional CYP21B (B), a partir de individuos normales (n) y a partir de pacientes deficientes en actividad de 21-hidroxilasa (p) cuyos numeros de identificación se muestra en la parte superior de la figura. Los valores de parte inferior de la figura representan la fracción de oligonucleotido marcado desplazado en presencia (+) y en ausencia (-) de 5pM de oligonucleotido Sp1 frío.

En el ensayo que se muestra en la figura 11 podemos ver la formación de complejo con proteínas nucleares al utilizar el fragmento de 98 pb en retardos de movilidad electroforética. Para determinar si estos complejos contenían al factor transcripcional Sp1 al ensayo se incluyó un oligonucleótido comercial que contiene el sitio de unión a Sp1, con el propósito de competir posibles complejos que tuvieran este factor. En la figura 11 se observa el desplazamiento correspondiente a la competencia con oligonucleótido frío (carriles con el símbolo +). La intensidad de la banda correspondiente al complejo se cuantificó después de digitalizar las cpm en un Storm (Molecular Dynamics) y fué calculado como porcentaje de desplazamiento con respecto al total no desplazado. Resulta interesante observar que el desplazamiento relativo en individuos controles normales (n) y en B, es menor que en el caso de individuos afectados con HSC (p).

Con la intención de completar la caracterización del complejo formado con el fragmento de 98 pb utilizamos anticuerpo dirigido contra el factor de transcripción Sp1, añadido al ensayo de retardo. En este caso observamos la migración diferencial del complejo formado por Sp1. Probamos también la formación de complejo entre el factor de transcripción Sp1 y el oligonucleótido que contiene el sitio consenso de unión a Sp1 marcado con ^{32}P . En la figura 12 se ilustra la formación de un complejo con Sp1 (I) y la confirmación de que se trata de un complejo que contiene la proteína Sp1 al utilizar anticuerpo y observar un retardo mayor en la movilidad electroforética (*supershift*) (II). Este mismo comportamiento se muestra con fragmento obtenido a partir del gene funcional CYP21B (B), de un individuo control normal y al utilizar oligonucleótido con el sitio Sp1.

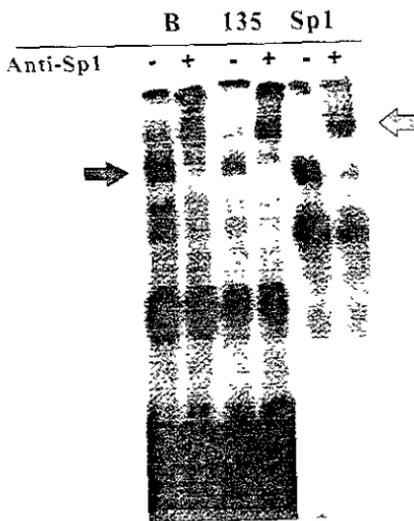


Figura 12- Formación de un complejo que contiene al factor Sp1 y secuencias amplificadas a partir del promotor del gene CYP21B. Autoradiografía de un ensayo de retardo con el fragmento de 98 pb obtenido a partir del cosmido que contiene el gene funcional CYP21B (B), a partir de un individuo control normal (135) y utilizando el oligonucleoendo comercial que contiene el sitio consenso de unión a Sp1. Donde así se indica, se utilizó anticuerpo dirigido contra Sp1 (-). Los complejos formados sin anticuerpo (I) y con anticuerpo (II) se encuentran señalados con flechas.

Determinación de diferencias de desplazamiento entre el gene y el pseudogene, y entre individuos normales y pacientes

Con el fin de conseguir desplazamiento diferencial entre individuos normales e individuos afectados, se probó la capacidad del fragmento de 98 pb obtenido a partir del gene funcional CYP21B (B) obtenido en una reacción de PCR sin nucleótido radioactivo (frio), para desplazar la formación de complejo con Sp1

En este ensayo de retardo se observa el desplazamiento obtenido al competir el complejo con un exceso de aproximadamente 20 veces del fragmento de 98 pb obtenido a partir del cósmido que contiene el gene funcional CYP21B. Puede observarse que el desplazamiento se lleva a cabo adecuadamente y además que este se presenta en mayor proporción en los

individuos afectados que en el control y en el cósmido con el gene funcional (B).

La caracterización del total de los individuos afectados y de los individuos normales utilizados como control, se llevó a cabo empleando como competidor frío el fragmento de 98 pb amplificado a partir del gene funcional CYP21B

Con el fin de valorar el ensayo como método para detectar diferencias en la interacción del promotor de CYP21B y el factor Sp1, se utilizó como control el fragmento de 98 pb obtenido a partir del cósmido en el que se encuentra clonado el pseudogene CYP21A. El patrón de complejos que forma este fragmento, no es el mismo que el que forma el fragmento obtenido a partir del gene funcional o de DNA genómico, debido a la mayor proporción de subproductos de mayor peso molecular (ver figura 10 C). Sin embargo, los datos que arroja son informativos, ya que el desplazamiento observado fue mayor que el obtenido con el fragmento proveniente del gene funcional CYP21B. Esto puede verse claramente en la figura 14, donde el desplazamiento obtenido con el individuo normal utilizado como control y el obtenido con el gene funcional, son menores que en los individuos afectados y que en el pseudogene no funcional CYP21A.

Al llevar a cabo estos análisis con los demás pacientes, encontramos diferencias cuantitativas de desplazamiento de los complejos observados. En la siguiente figura pueden verse el resto de la colección de pacientes candidatas a mutaciones en región promotora del gene CYP21B. Puede observarse el desplazamiento diferencial entre los individuos con HSC y los individuos normales o el gene funcional CYP21

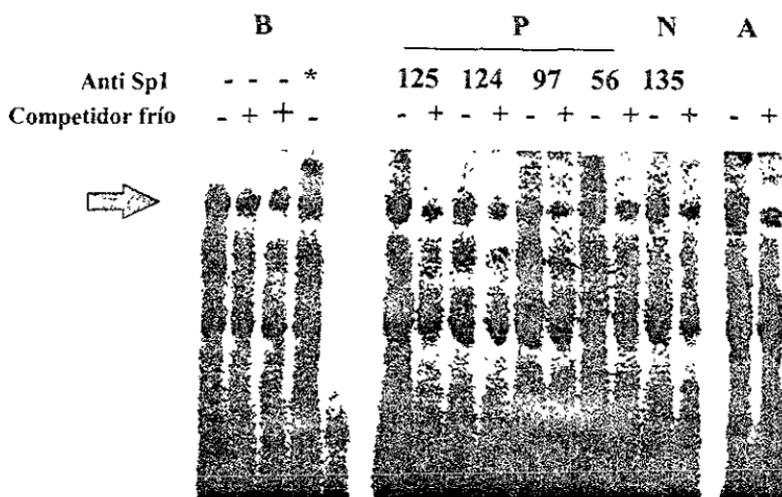


Figura 13.- Desplazamiento diferencial entre individuos con deficiencia en 21-hidroxilasa (P) e individuos normales (N), utilizando como control el gene funcional CYP21B (B) y el pseudogene no funcional CYP21A (A). Autoradiografía de un ensayo de retard de movilidad electroforética. Se utilizó como competidor frío al fragmento de 98 pb obtenido de la reacción de PCR sin marcar, amplificando a partir del gene funcional CYP21B. Se señalan los carriles en los que se utilizó competidor frío (+). El carril donde se utilizó el doble de cantidad de competidor frío que en los demás, se señala con un símbolo (+) de mayor tamaño. Se indica el carril en el que se utilizó un anticuerpo contra Sp1 (*) para identificar el complejo que contiene el factor de transcripción. Este complejo se encuentra señalado con una flecha. Los números de identificación de los individuos utilizados se muestra en la parte superior del gel. En el carril en donde no se utilizó extractos nucleares para la realización del ensayo aparecen las letras NP (No Proteína).

Encontramos que existían diferencias significativas entre el desplazamiento del fragmento de 98 pb obtenido a partir del gene funcional CYP21B y el obtenido a partir de pseudogene no funcional CYP21A. Se realizó una prueba de *t* para los valores de desplazamiento entre estos dos tipos de fragmentos. En las siguientes gráficas puede verse que el desplazamiento diferencial resulta mayor en aproximadamente un 40% en el caso del gene funcional que en el pseudogene.

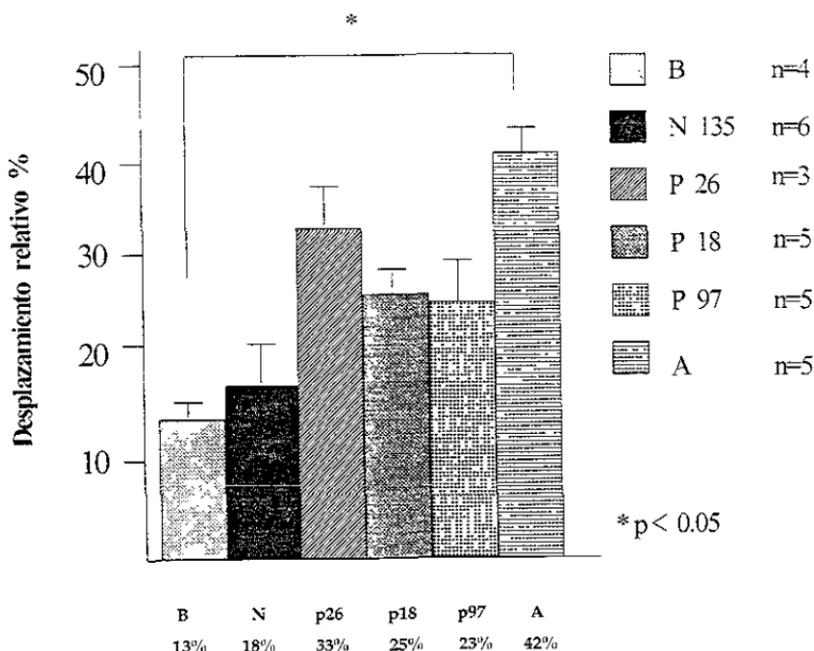


Figura 14.- En estas figuras se encuentra representado el porcentaje de desplazamiento relativo de tres pacientes (p26, p18 y p97) y de un individuo normal (135), comparados con el desplazamiento relativo del gene funcional CYP21B (B) y del pseudogene no funcional CYP21A (A). Se señala el tamaño de la muestra utilizada para cada caso y el número de identificación de cada paciente. En la parte de abajo de la figura podemos ver en cada caso los valores promedio de desplazamiento con los que se realizó la grafica. El valor de p al comparar A y B fue menor a 0.05 (*).

En la figura 14 puede verse que las diferencias entre el desplazamiento obtenido de el gene y el pseudogene son significativas. Los desplazamientos obtenidos de los pacientes analizados son mayores que el pseudogene A y menores que el gene B, pero las diferencias entre ellos no son significativas de manera que no es posible establecer una correlación entre el índice de desplazamiento y el fenotipo clínico de los individuos analizados. El valor de p al comparar individuos normales y pacientes resultó de 0.23. En la siguiente tabla se muestran los valores de desplazamientos relativos obtenidos de los 12 pacientes utilizados en este estudio.

Numero de identificacion	Genotipo	Fenotipo	Porcentaje de desplazamiento relativo
56	Sin mutacion	Virilizante	47%
97	Sin mutacion	No clásico	25%
125	Sin mutacion	Perdedor de sal	24%
96	Sin mutacion	Virilizante o No Clásico (?)	45%
18	Hm E10	Perdedor de sal	24%
26	Hm E10	Virilizante	33%
34	Hm E10	Virilizante	70%
54	Hm E10	Perdedor de sal	42%
111	Ht E10, Hm E-1	No clásico	47%
116	Hm del 2GC, codon 482	Perdedor de sal	70%
124	Hm 1-2 Ht E-4	Perdedor de sal	30%
21	Hm 1-2 Ht E-4	Virilizante	64%

Tabla 3.-Resultados de los desplazamientos obtenidos con los pacientes analizados en este estudio.

Ht-heterocigo para la mutacion señalada

Hm-homocigo para la mutacion señalada

La descripcion de las mutaciones se encuentra en la tabla 1

DISCUSION

La hiperplasia suprarrenal congénita es una enfermedad hereditaria en la que la principal limitación para su tratamiento radica en el diagnóstico adecuado y oportuno. Debido a que es fácilmente controlable con terapia substitutiva oral, es difícil entender el alto índice de mortalidad al que se encuentra asociada, en particular en individuos de sexo masculino (Ordoñez et al, 1997). La implementación de métodos de diagnóstico molecular y de tamizaje clínico que puedan realizarse de manera rápida y sencilla resultaría de gran utilidad en la práctica clínica.

Este trabajo describe la implementación de un ensayo de retardo de movilidad electroforética como un método para el análisis de un elemento esencial de la función de la región promotora de un gene: la capacidad de unir proteínas que activan la transcripción. Este ensayo de interacción

DNA-proteína permitió analizar la región promotora del gene CYP21B en pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita. La implementación de este tipo de metodología resulta novedosa ya que nunca antes ha sido descrita para diagnóstico de posibles alteraciones en la capacidad de unión (transcripcional) de la región promotora de pacientes con un defecto genético. Esta metodología podría ser implementada para el tamizaje de posibles alteraciones en la región promotora de otros genes implicados en distintas enfermedades hereditarias

La amplificación CYP21B-específica

La enzima 21-hidroxilasa es codificada por dos genes distintos, localizados en tandem y muy cercanos entre sí, a una distancia aproximada de 30 Kb. El gen funcional CYP21B comparte 98% de identidad con el pseudogene CYP21A. Debido a que la mayoría de las mutaciones asociadas con la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa son las mismas que existen en el pseudogene, se considera que este último sirve como un reservorio de mutaciones que son transferidas al gen funcional CYP21B por eventos de recombinación ilegítima. Por esta razón es indispensable que el método de amplificación del gen CYP21B a partir de pacientes sea específico evitando amplificar la misma región del pseudogen. Esto se logró diseñando oligonucleótidos en las regiones donde existen diferencias de secuencia entre gen y pseudogene (generalmente se busca tener 2 a 4 cambios en 20 pb): Como controles de amplificación positiva y negativa se emplearon DNAs de cósmidos que tienen clonado de manera independiente el gen o el pseudogene.

El diseño de oligonucleótidos debe tomar en cuenta aspectos como la afinidad con la cadena complementaria y la estabilidad del extremo 3' (oligonucleótidos con alta estabilidad en el extremo 5' y con baja estabilidad en el extremo 3' permiten mejor eficiencia en las reacciones de PCR) (Wojciech, 1992). El programa utilizado para el diseño de los oligonucleótidos toma en cuenta estos aspectos. Cabe mencionar que los oligonucleótidos específicos que resultaron del diseño, no presentan grandes diferencias entre el gen y el pseudogene, constituyendo entre el 10% y el 15% de la secuencia total de los oligonucleótidos B-específicos (ver figura 6). A pesar de esto, la estandarización de las condiciones adecuadas en la reacción de PCR, (como la temperatura de alineación y el número de ciclos) permitieron utilizarlos para lograr amplificación específica del gen funcional (figura 8).

Algunos de los oligonucleótidos diseñados como B específicos pudieron ser utilizados para amplificar a partir del cósmido que contiene el pseudogene CYP21A bajo condiciones de baja temperatura de alineamiento durante el PCR.

El contar con cósmidos en el que se encontraran clonados el gene funcional o el pseudogene nos permitió evaluar durante todo el proceso de amplificación la especificidad y la eficiencia de las reacciones. No hubiera sido posible comprobar con certeza la especificidad de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación B-específica de no contar con estos controles. La evaluación de la calidad de los producto de PCR fue posible también gracias a la disponibilidad de estos controles. Por ejemplo, al llevar a cabo la primera amplificación B-específica a partir de DNA genómico de individuos afectados o de individuos normales, también se amplificaron, en algunos casos y en menor proporción un fragmento de menor peso molecular al esperado de 818 pb (figura 8a). Este fragmento parece además compartir cierta identidad con el producto principal ya que en algunos pacientes pudimos ver hibridación del mismo al utilizar como sonda un oligonucleótido interno a la reacción de PCR (figura 8b). Podría tratarse del producto de un gene con el que CYP21B pudiera tener cierta semejanza, posiblemente otro gene esteroideogénico. Es importante entonces el que este producto de amplificación inespecífica de 818 pb no apareciera en las reacciones obtenidas a partir del cósmido en el que se encuentra clonado el gene funcional, confirmando el origen genómico de este producto.

Segunda amplificación para generar template para ensayo de retardo

La reacción de segunda amplificación para obtener un fragmento de 98 pb que contiene sólo la región promotora de interés, no se llevó a cabo con oligonucleótidos CYP21B específicos (ver figura 6), lo que además de facilitar el diseño de los oligonucleótidos para la reacción de PCR y aumentar la eficiencia de la reacción, permitió la obtencion de este fragmento a partir tambien del cósmido en el que se encuentra clonado el pseudogene no funcional CYP21A. Los fragmentos de 98 pb generados a partir de los cosmidos con el gen o el pseudogene fueron utilizados como control en los ensayos de retardo

La segunda amplificación se llevó a cabo utilizando como templado altas diluciones (1 en 10000) de la primera amplificación, lo cual permite disminuir la presencia de contaminantes o de templados inespecíficos. A pesar de ser más eficiente que la primera amplificación, esta segunda amplificación produce un fragmento pequeño, difícil de purificar eficientemente por métodos convencionales para su marcaje a través de kinación. La incorporación de un nucleótido marcado ($[^{32}\text{P}]\alpha\text{dCTP}$) a la reacción de PCR resolvió el problema de la purificación y el posterior marcaje del mismo, además de aumentar considerablemente la actividad específica del fragmento. Sin embargo, hay que hacer mención que la incorporación directa del nucleótido marcado radioactivamente puede tener inconvenientes secundarios debido a la alta sensibilidad con que los fragmentos de la reacción pueden ser detectados por autoradiografía (figura 10a). Esto hizo necesaria la aplicación de precauciones de esterilidad adicionales para evitar la presencia de otros potenciales templados de amplificación.

Para los ensayos de retardo es necesario obtener un fragmento de amplificación marcado radioactivamente con una alta actividad específica, ya que la cantidad de factores transcripcionales presentes en los extractos nucleares es de orden pM, por lo que la cantidad de complejo que se forma es muy pequeña (entre el 1 y el 2% del DNA marcado). El marcaje radioactivo por kinación el producto de PCR no alcanzó la actividad específica necesaria para visualizar el complejo DNA-factor nuclear, por lo que se optó marcar el fragmentos incorporando $[^{32}\text{P}]\alpha\text{dCTP}$ a la reacción de PCR.

La validación del ensayo de movilidad electroforética como método para detectar alteraciones de interacción DNA-proteína fué posible por contar con el fragmento proveniente del cósmido con el pseudogene CYP21A. La obtención de este fragmento no fué sencilla ya que al amplificar la región de 98 pb, se amplificaban inespecíficamente otros productos de PCR, generalmente de mayor peso molecular. A pesar de ello fué posible demostrar que este fragmento forma los mismos complejos que el fragmento del gene funcional y

realizar un ensayo de desplazamiento que fue comparado con la unión de estos complejos con respecto a los formados con el fragmento del gen CYP21B.

El fragmento de 98 pb forma complejos

Dado que el factor de transcripción Sp1 es ubicuo, exploramos diversas fuentes para la obtención de esta proteína nuclear. Una buena fuente de proteínas nucleares y de Sp1 en particular resultó ser la línea celular L929 (fibroblastos murinos de pulmón embrionario), de los que obtuvimos cantidades de proteína superiores a otras líneas ensayadas. Por esta razón todos los estudios se llevaron a cabo con esta línea. Con fines comparativos se hizo un ensayo con proteínas nucleares extraídas de la línea celular Y-1 (células tumorales de glándula suprarrenal de ratón), obteniendo un patrón de bandeo similar a la que se obtuvo con extractos de células L929 (datos no mostrados).

El fragmento de 98 pb amplificado ya sea a partir del gene funcional, del pseudogene no funcional, o a partir de DNA genómico de individuos no afectados o pacientes, fue capaz de asociarse con proteínas nucleares. Estas asociaciones pueden ser visualizadas como bandas en los ensayos de retardo de movilidad electroforética. Los complejos formados con el templado de 98pb fueron en su mayoría específicos ya que no fueron desplazados al utilizar un polinucleótido que compite por carga como el polidIdC (datos no mostrados).

El fragmento amplificado resultó capaz de formar más de un complejo lo cual puede deberse a la diversidad de sitios de unión para factores de transcripción presentes en esta región (ver figura 5). Sin embargo, fue posible discriminar entre el complejo o complejos formados específicamente con el factor de transcripción Sp1 y los complejos formados con otras proteínas nucleares. Esta identificación fue posible gracias a dos herramientas: 1) la utilización del un oligonucleótido que contiene el sitio consenso de unión para este factor de transcripción (figura 11) y 2) el uso de un anticuepo dirigido contra el factor de transcripción que al unírsele altera la movilidad electroforética de todo el complejo (lo que se conoce como "supershift" ya que el

complejo formado por el DNA, el factor de transcripción y el anticuerpo migra mas lentamente, figura 12 La naturaleza dimérica de Sp1 (McKnighth 1986, Kadanoga 1986) podria explicar la presencia de mas de una complejo durante la caracterización del mismo

En los ensayos de retardo de movilidad electroforética en los que se utilizaron extractos nucleares de la linea celular Y-1 pudimos distinguir pequeñas diferencias en el patrón de los complejos formados. Estas diferencias pueden deberse a la presencia del factor de transcripción ASP, específico de las celulas de la glandula suprarrenal, y responsable en parte de la expresión tejido específica del gene CYP21B (datos no mostrados).

El ensayo de retardo es capaz de detectar diferencias entre individuos normales y los pacientes con HSC.

El ensayo de retardo implementado nos permitió detectar diferencias cualitativas de desplazamiento entre los distintos individuos analizados (controles vs pacientes, figuras 13 y 14) Esto fué posible empleando como competidor frío el fragmento de 98 pb amplificado a partir del gene funcional CYP21B, que consiguió desplazar específicamente la mayoría de los complejos formados. Esto no fué posible al utilizar el oligonucleótido con el sitio consenso de unión a Sp1, ya que el fragmento de 98 pb contiene sitios de unión para distintos factores de transcripción (incluyendo el factor Sp1, figura 5) De esta forma, una de las ventajas de utilizar como competidor frío al fragmento de 98 pb proveniente del promotor del gene funcional CYP21B, es que estamos en posibilidad de evaluar alteraciones en la capacidad de unión de este fragmento debidas a cambios de secuencia presentes o no en el sitio de union para el factor de transcripción Sp1.

El desplazamiento observado fue mayor al utilizar el fragmento de 98 pb proveniente del pseudogene (42 %), comparado con el del gene funcional CYP21B o el de los controles sanos (13 y 18 % respectivamente), como se describe en la figura 14 Los pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa

presentan un desplazamiento intermedio como se ejemplifica en la figura 14 a) fenotipo virilizante simple con un desplazamiento de 33% (paciente No 26), b) fenotipo no clásico con un desplazamiento de 23% (paciente No 97) y c) fenotipo perdedor de sal de 25 % (paciente No 18). Ya que el fragmento de 98pb de los pacientes proviene de DNA genómico total, el ensayo analiza simultaneamente la mezcla del alelo paterno con el materno.

El haber encontrado diferencias entre el desplazamiento del promotor del gene funcional CYP21B (13 %) y del pseudogene CYP21A (42 %) con una $p = .0409$ (figura 14), nos permitió validar este método como prueba funcional para la búsqueda de alteraciones en promotores de pacientes a través de ensayos de retardo de movilidad electroforética

No contamos con información de secuencia del sitio Sp1 en los pacientes analizados, sin embargo análisis preliminares con la enzima de restricción Aci-1 que distingue cambios de secuencia en ese sitio, sugieren que ninguno de los pacientes analizados hasta el momento tiene cambios de bases con respecto a la secuencia del gene funcional en esta región (resultados obtenidos como parte de otra tesis de licenciatura). Ya que nuestro ensayo detecta diferencias en la afinidad del complejo SPI a través de evaluar diferencias cualitativas en el desplazamiento con templado frio, esto implica que la menor afinidad aparente encontrada en nuestros pacientes podría explicarse por al menos dos mecanismos: 1) a través de alteraciones en la afinidad de otros factores de transcripción que se unen en algun otro sitio de la secuencia del templado de 98 pb y que afectan de manera directa o indirecta la interacción con la proteína Sp1, 2) cambios de secuencia que alteren la estructura secundaria o terciaria de la región y por lo tanto dificulten la interacción de la proteína Sp1 con el DNA.

El hecho de haber logrado desplazamiento diferencial entre el promotor de gene y pseudogene y que el desplazamiento observado sea mayor al adicionar cantidades crecientes de competidor frio, hace a este ensayo útil para detectar diferencias en la capacidad de unión de factores de transcripción en promotores amplificados a partir de DNA genómico de pacientes. El ensayo que hemos montado podría ser implementado para el estudio de otros

promotores ya que es posible llevar a cabo desplazamiento diferencial, aunque no se cuente con el oligonucleótido comercial que contenga el sitio consenso de unión al factor de transcripción en cuestión para ser utilizado como competidor frío (que es como comunmente se realizan las competencias en los ensayos de retardo de movilidad electroforética) Gracias a que es posible obtener desplazamiento diferencial, utilizando como competidor frío el fragmento amplificado a partir de un alelo patrón (en este caso a partir del gene funcional CYP21B) el estudio puede llevarse a cabo incluso sin que los distintos sitios de unión y factores transcripcionales de la region promotora de un determinado gene hayan sido caracterizado con detalle

Los ensayos de retardo como herramienta clínica

La hiperplasia suprarrenal congénita puede ser diagnosticada a distintos niveles. Después de la exploración clínica, la primera prueba bioquímica consiste en la medición de los niveles circulantes de 17-hidroxiprogesterona, el metabolito de la biosíntesis que sirve como sustrato a la enzima 21-hidroxilasa y que puede elevarse hasta 10 000 ng/ml, mil veces por encima de su nivel normal (ver figura 3).

Con las revisiones médicas de rutina, en muchos casos no resultan obvia la detección de esta enfermedad, debido a que generalmente se presentan síntomas que puede asociarse a otros padecimientos. Es común que niños recién nacidos escapen al diagnóstico clínico ya que los signos y síntomas por exceso de andrógenos no son tan aparentes como en productos del sexo femenino, y muchos de ellos mueren por crisis de pérdida de sal debido a la deficiencia de aldosterona. Un niño con fenotipo perdedor de sal, presenta vómitos y diarreas severas en el periodo posnatal; este cuadro clínico facilmente puede confundirse con infecciones del tracto digestivo, comunes en países en vias de desarrollo. De manera que muchos de estos pacientes no son diagnosticados adecuadamente y mueren pudiendo haber sido tratados con

mineralocorticoides. Otro problema del diagnóstico deficiente es la imposibilidad de proporcionar consejo genético a las familias afectadas.

Para las 17 mutaciones reportadas en la región codificadora o los intrones se llevan a cabo actualmente análisis de hibridación o secuenciación directa del gene. Este tipo de estudios son difíciles de implementar a gran escala, por ejemplo para tamizaje neonatal. Contar con un método de tamizaje rápido en el que se puedan evidenciar alteraciones en las interacciones DNA-proteína en el promotor de este gene sería de gran utilidad en aquellos pacientes donde las determinaciones de 17-hidroxiprogesterona sean sugestivas de bloqueo de la vía biosintética de cortisol. A pesar de que aún no han sido descritas mutaciones en la región reguladora del gen CYP21B en pacientes con HSC, existe evidencia molecular y clínica que sugiere que algunos de los pacientes pudieran tener mutaciones en la región promotora. Por ejemplo, aproximadamente un 20% de los alelos de pacientes mexicanos no parece tener ninguna de las 17 mutaciones descritas en otras poblaciones. Además dentro de esta misma población de pacientes fueron identificados individuos con mutaciones idénticas en la región codificadora que presentan fenotipos clínicos distintos (e.g virilizantes vs perdedores de sal) (Ordoñez et al, en prensa). En estos individuos mutaciones que afectaran la capacidad transcripcional del gen podrían explicar las diferencias en la expresión clínica del padecimiento. El hecho de que aún no se hayan descrito mutaciones de regulación en pacientes con HSC por deficiencia de 21-hidroxilasa pudiera deberse a que es difícil definir el efecto funcional de cambios de secuencia encontrados en esa región. El único estudio que ha demostrado diferencias en la capacidad del promotor del pseudogene con respecto al gene funcional fué descrito para el sitio Sp1. Un sólo cambio de base en ese sitio es capaz de reducir la eficiencia transcripcional del promotor un 80%. Evaluar posibles alteraciones en la región promotora de los pacientes requeriría además de la identificación de uno o más cambios de secuencia, la demostración de su efecto funcional. Demostrar que estos cambios alteran la capacidad transcripcional requeriría por ejemplo, de clonar estas regiones en vectores de expresión, donde el promotor analizado dirija la

transcripción de genes reporteros. Este tipo de ensayos además de costosos no son fácilmente implementables al estudio de un gran número de pacientes. Además este tipo de análisis tiene la limitante de que al subclonar en vectores de expresión los productos de PCR, se separan los alelos paterno y materno por lo que se tiene que probar un número grande de clonas por individuo para asegurar que se están estudiando ambas copias (materna y paterna). En este sentido el ensayo establecido por nosotros representa una alternativa valiosa para el tamizaje rápido de alteraciones en la funcionalidad de la región promotora en pacientes. En particular para este trabajo fueron seleccionados pacientes candidatos a mutaciones en región promotora por tres criterios (tabla 2): 1) pacientes no portadores de ninguna de las 13 mutaciones conocidas más frecuentemente asociadas en otras poblaciones, 2) pacientes portadores de un cambio en exón 10 (N493S), el cual se encuentra más frecuentemente de forma homociga en pacientes con HSC y que parece estar en desequilibrio de enlace con una mutación aún no identificada y 3) pacientes con mutaciones idénticas en la región codificadora o intrones que presentan fenotipos clínicos distintos. Estos 10 pacientes fueron seleccionados de un total de 54, después del análisis mutacional a través de secuenciación directa del gen, por lo que no resulta extraño que en todos ellos aparecieran diferencias de desplazamiento con respecto a los controles sanos.

En el laboratorio de la Dra. Tusié, se lleva a cabo el análisis de la región promotora del gene CYP21B en pacientes desde diversos puntos de vista. Además de la secuenciación directa, se han realizado análisis por enzimas de restricción y PCR-SSCP. Estos estudios son complementarios a los ensayos funcionales y a los de interacción DNA-proteína y como el de retardo en la movilidad electroforética descrito en esta tesis.

Correlación entre desplazamiento y el fenotipo de los pacientes

Aunque en principio el ensayo de retardo de movilidad electroforética montado nos permite establecer diferencias cualitativas en la capacidad de

union al factor Sp1 a los productos de PCR de los distintos pacientes, no se observó una correlacion entre el grado de desplazamiento detectado y el fenotipo presentado por los paciente Sin embargo, la validez de este ensayo queda documentada por las diferencias en el desplazamiento que muestran los fragmentos amplificados a partir de las versiones clonadas de CYP21B o CYP21A. Un paciente que presentara en el gene funcional CYP21B sólo el cambio de C por T en el sitio de unión a Sp1, proveniente del pseudogen CYP21A, como mutación homóciga (en ambos alelos) presentaría un desplazamiento del 42 % o mayor, semejante al observado para el promotor derivado del pseudogen CYP21A. Por otra parte, un paciente que presentara esta mutación de forma heteróciga (sólo en un alelo) presentaría un patrón de desplazamiento intermedio entre el control normal CYP21B y el del pseudogene. Adicionalmente, el desplazamiento con productos de PCR provenientes del promotor de CY21B de individuos no afectados muestran una gran variabilidad (del 30 al 70%). Esta dispersión puede deberse en parte a la complejidad generada por la presencia homóciga o heteróciga de distintas cobinaciones de poliformismos y/o mutaciones capaces de afectar la unión de Sp1, de manera directa o indirecta. De hecho, que el porcentaje de desplazamiento relativo para el producto de PCR de individuos normales fuera menor al que se observó para el fragmento amplificado a apartir del gene funcional CYP21B, sugiere la presencia de polimorfismos y/o mutaciones presentes en la región promotora amplificada. Es muy probable que los cambios de secuencia se encuentren fuera del sitio de unión de los factores de transcripción conocidos.

La amplia distribucion de los valores de desplazamiento en individuos normales y pacientes podrían reflejar interacciones complejas que ocurren entre los factores de transcripción presentes en nuestros extractos nucleares y la región del promotor que utilizamos como templado de nuestros ensayos. Vale la pena resaltar que aunque no conocemos con exactitud la naturaleza de estas interacciones, el ensayo que hemos montado es capaz de detectarlas. Para poder establecer con más presición estas interacciones podrían estudiarse los

diversos complejos que el fragmento de 98 pb es capaz de formar: comparando el desplazamiento de estos complejos con el desplazamiento de los complejos que contienen Sp1 e identificando los factores transcripcionales presentes en estos complejos. Esta información se complementará con la secuencia de esta región de 98 pb en estos individuos que permitirá conocer las posibles alteraciones asociadas a las diferencias en desplazamiento observadas (proyecto de otra tesis de licenciatura).

Ya que mutaciones homóclgas o heteróclgas pueden estar presentes en pacientes con distintos fenotipos clínicos, y que estos a su vez pueden tener una combinación distinta de polimorfismos y mutaciones adicionales en la región codificadora, es difícil predecir el efecto final de los distintos cambios sobre la actividad enzimática. Estudios de expresión *in vitro* han establecido que los pacientes perdedores de sal tiene abatida completamente la actividad enzimática, mientras que los virilizantes simples tiene mutaciones cuyo resultado final es actividad residual de alrededor de un 2% (Tusié Luna et al 1990). Un paciente perdedor de sal en donde pudiéramos establecer correlación fenotípica a través de ensayos de retardo tendría que ser portador de mutaciones homóclgas cuyo efecto fuera el de abatir completamente la actividad transcripcional del gen.

La compleja correlación entre el genotipo y el fenotipo en HSC hace suponer que solo en aquellos individuos en los que la mutación en el sitio Sp1 fuera responsable de la gravedad clínica de la enfermedad podríamos establecer correlaciones entre la alteración de las interacciones DNA-proteína y el fenotipo. Una dificultad a lo largo de nuestros ensayos fué el no poder cuantificar los productos de PCR tanto fríos como marcados. Al no disponer de la concentración de estos fragmentos no fué posible establecer la relación de masa entre el templado marcado y el competidor frío más que de forma relativa. De manera que entre los distintos ensayos no se conservó de manera constante la relación de templado marcado y competidor frío. Esto podría explicar también la alta variabilidad inter-ensayo que tuvimos. Es

recomendable realizar el ensayo un numero suficiente de repeticiones (al menos 5) para eliminar en parte esta variabilidad y obtener resultados mas confiables.

Para obtener información mas precisa acerca de la naturaleza del desplazamiento del fragmento de 98 pb proveniente de alguno de estos individuos sería conveniente complementar estos estudios de retardo habiendo resuelto de alguna manera la cuantificación de la masa del fragmento de 98 pb tanto del utilizado como templado radioactivo como del utilizado como competidor frio. Esto permitiría estimar una constante de afinidad aparente en estos pacientes y establecer si estas correlacionan con los fenotipos.

De cualquier forma nuestro ensayo de retardo nos ha permitido suponer que muy probablemente en la transcripción del gene CYP21B participan mecanismos de interacción proteína-proteína y proteína-DNA cuya naturaleza no conocemos

La técnica implementada de ensayos de retardo de movilidad electroforética realizada a partir del DNA genómico de pacientes y enfocada al estudio de las interacciones DNA-proteína en una enfermedad genética, resulta novedosa. Hemos llevado a cabo la valoración de un método que si bien puede ser optimizado de múltiples maneras, en el estado en el que se encuentra ha demostrado su utilidad practica

MATERIALES Y METODOS

Southern Blot:

Estos ensayos se realizaron para comprobar la identidad de un fragmento de DNA obtenido a partir de una reacción de PCR, que fué hibridada con un oligonucleótido interno al producto esperado, marcado radioactivamente

Electroforesis:

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1.5% en una solución de TAE 1X (50X: Tris acetato 40 mM, EDTA 2mM pH 8.5). Para visualizar las bandas y evaluar la transferencia se utilizó bromuro de etidio. (Ver sección geles de agarosa)

Transferencia.

Los geles se transfirieron por capilaridad con una solución SSC 6X (20X 3M NaCl, 0.3 M citrato de sodio pH 7, ajustado con 1M HCl) a membranas de Nylon-Nitrocelulosa (MSI). Una vez transferida y seca la membrana se fijó el DNA a la nitrocelulosa irradiando la membrana con luz UV en un Stratalinker (Stratagene)

Prehibridación e Hibridación:

Las membranas se incubaron a 37°C en agitación con la solución de prehibridación (Denharts 1%, SSC 60%, SDS 0.5%, NaH₂PO₄ 0.05%, DNA de esperma de salmón 100 µg/ml). El oligonucleótido marcado fué mezclado con la solución de hibridación (Denharts 1%, SSC 60%, NaH₂PO₄ 0.05%, tRNA de levadura 20µg/ml) y posteriormente incubado con la membrana a la que se le había retirado la solución de prehibridación. Se hibrido durante toda la noche en agitación a 37°C, y fue lavada para retirarle el exceso de oligonucleótido. Los lavados se hicieron a temperatura ambiente con SSC 6X, NaH₂PO₄ 0.05% y 5°C por debajo de la T_m del oligo utilizado como sonda. La membrana fué empacada en una bolsa de plástico y expuesta, ya sea en película fotográfica o en pantalla de un fosforimetro STORM de Molecular Dynamics, para luego ser revelada o leída.

Fosforilación del oligonucleótido:

200 ng del oligonucleótido a marcar contenidos en 1 µl, se mezclaron con 0.5 µl de enzima T4 fosfonucleótido kinasa que equivalen a 5 U (Stratagene), 2.5 µl de amortiguador para la enzima (que provee el mismo fabricante), 3 µl de [³²P]γATP con una actividad específica de 3000 Ci por mmol, y agua para completar 25 µl. Se incubaron 30 min a 30°C y 15 min a 65°C para inactivar a la enzima. La reacción de marcado fue mezclada con 1 ml de solución de hibridación y posteriormente se pasó a través de un filtro de nitrocelulosa para eliminar el exceso de [³²P]γATP no incorporado.

Purificación de DNA por polvo de vidrio (*glass powder*)

Para esta metodología se empleó el kit USBiClean. La banda que contiene el fragmento de DNA de nuestro interés se cortó de un gel de agarosa y en un tubo eppendorf se mezcló con 500 µl de NaI 6M. Se incubó a 55°C durante 10-20 minutos. Se pasó a hielo durante un minuto. Se le agregaron 10 ml de suspensión de polvo de vidrio y se incubó en hielo durante 15 min. Se centrifugó en la microfuga a 16,000 g, y se desechó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 700 µl de solución de lavado fría (Tris-HCl 0.2M pH 7, NaCl 1M, EDTA 20 mM, etanol al 50%) y se centrifugó a 16,000 g y se desechó el sobrenadante. Este paso se repitió tres veces. A la pastilla se le agregaron 20 µl de agua y se incubó a 55°C durante 5 min. se centrifugó a 16,000 g por 5 minutos. El sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf. Se secó en *SAVANT* y se guardó a -20°C.

Geles de acrilamida desnaturalizantes:

Las reacciones de PCR de segunda amplificación y los oligonucleótidos fosforilados se corrieron en estos geles desnaturalizantes para corroborar el tamaño y la eficiencia de la reacción de marcado.

Para preparar el gel se mezclaron 5.1 g de urea, 1 ml de agua, 1 ml de amortiguador TBE 1X (TBE 10X: 89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2mM EDTA, pH 8) y 5 ml de solución acrilamida:bisacrilamida en una proporción 29:1 al 30%. Para polimerizar la mezcla se agregaron 12 µl de Terametiletilediamina (TEMED) y 25 µl de persulfato de amonio 10%. Las muestras se mezclaron en una proporción 1:1 con la solución de colorantes (EDTA 20 mM, formamida 95%, azul de bromofenol 0.05% y xileno de xianol 0.05%) se corrieron a 100 V, hasta que los

colorantes sobrepasaron la mitad. Los geles fueron teñidos con plata o expuestos en película fotográfica para obtener un autoradiograma, según el caso.

Tinción con plata:

La tinción con plata fué utilizada para visualizar los productos de PCR que se amplificaban con baja eficiencia y que no se veían claramente en geles de agarosa teñidos con Bromuro de etidio, ya sea debido a su tamaño o a la baja cantidad de DNA obtenida de la amplificación. En esta técnica el nitrato de plata se precipita al DNA o proteínas presentes en el gel revelandolos con mayor sensibilidad que otros métodos.

Se corrieron los geles de acrilamida denaturalizantes. Fueron fijados en 100 ml de una solución de metanol 40%, formaldehído 5% durante 10 minutos en agitación constante. Se efectuaron al gel dos lavados de 5 minutos con agua destilada. El gel fue reducido con 100 ml de una solución de tiosulfato de sodio al 2% (200 μ l de la solución concentrada de tiosulfato en 100 ml de agua) durante un minuto en agitación. Se efectuaron al gel tres lavados de 5 minutos con agua destilada. El gel fué teñido con 100 ml de la solución de nitrato de plata durante 30 minutos en agitación constante. Se efectuaron al gel tres lavados de 5 minutos con agua destilada. Se reveló la tinción con 100 ml de solución de revelado. La solución de revelado se cambió según fué necesario mientras se vigilaba atentamente el gel y cuando aparecieron las bandas se detuvo la reacción inmediatamente para evitar manchas en el gel. La reacción fué detenida con 100 ml de solución de metanol 50% y ácido acético 5%. El gel fué lavado con agua y guardado en una solución de etanol al 10%. Las soluciones utilizadas fueron preparadas como se describe a continuación:

Solución concentrada de tiosulfato: 100 mg de tiosulfato de sodio fueron disueltos en un ml de agua destilada.

Solución de nitrato de plata: a 20 ml de hidróxido de sodio al 0.4%, se le agregaron 1.5 ml de hidróxido de amonio. Se le agregó gota a gota y en agitación una solución de 0.8 g de nitrato de plata disuelto en 4 ml de agua. Se aforó a 100 ml.

Solución reveladora: 1.25 ml de ácido cítrico al 1% se mezclaron con 100 μ l de la solución concentrada de tiosulfato y 100 μ l de formaldehído al 37%. Se aforó a 100 ml.

Cultivos celulares

Las células Y-1, originalmente aisladas de la corteza adrenal de carcinoma de ratón, fueron obtenidas de la American Type Culture Cell Collection (ATCC). Las células fueron crecidas en medio Ham's F-10 (In Vitro, México) con 1% de solución antibiótica-antimicótica (GIBCO-BRL) y suplementado con 15% de suero de caballo y 2.5% de suero fetal bovino (In Vitro, México) ambos previamente inactivados y suplementado con 50 μ M de sulfato de gentamicina.

Las células L929, fibroblastos murinos originalmente aislados de epitelio de pulmón embrionario, fueron obtenidas de la American Type Culture Cell Collection (ATCC). Las células fueron crecidas en medio MEM (In Vitro, México) con 1% de solución antibiótica-antimicótica (GIBCO-BRL) y suplementado con 10% de suero fetal bovino (In Vitro, México), previamente inactivado y suplementado con 50 μ M de sulfato de gentamicina. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C, en atmósfera de 5% de dióxido de carbono y saturada de humedad. Todas las soluciones empleadas en el cultivo de las células fueron esterilizadas por filtración utilizando filtros de poro de 0.22 μ m (Millipore, Type GS)

Obtención de extractos nucleares:

Los factores de transcripción activos son proteínas que se encuentran unidas al DNA. Las células de las que son aisladas se resuspenden en un amortiguador hipotónico que aunado a un proceso de congelación facilita el rompimiento de las mismas. Los núcleos se centrifugan para separarlos del citoplasma y gracias a la acción de una solución de fuerza iónica intermedia, las proteínas asociadas al DNA son removidas sin lisar el núcleo y luego separadas en la fracción soluble.

Se partió de células Y-1 o de células L929, crecidas casi a confluencia. Los cultivos fueron lavados con la solución PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 , 1.4 mM KH_2PO_4) fría y despegadas del plato con espátula. Se recuperaron en un tubo cónico de 15 ml. Fueron centrifugadas de 5 a 10 minutos a 375 x g. Se descartó el sobrenadante y la pastilla fue congelada en baño de hielo seco y etanol de dos a tres minutos para romper las células. Una vez congelada, se resuspendió la pastilla suavemente en 100 μ l de amortiguador hipotónico (Hepes 10mM, KCl 10 mM, DTT mM, pH 7.9). El estado de los núcleos fue entonces evaluado con azul tripano mezclado en una proporción 1:1. Se centrifugaron en tubos eppendorf en la microfuga a 4°C durante 10 minutos a 16,000 x g. Se deshechó el sobrenadante. Para extraer las proteínas nucleares la pastilla resultante fue resuspendido en 30 μ l

de amortiguador hipertónico (HEPES 20 mM, NaCl 0.4 M, glicerol 25%, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) Sigma, 0.2 mM, Dithiothreitol (DTT) (Sigma) 1 mM, Fenil-Metil-Sulfonil Fluor (PMSF) 0.5 mM, pH 7.9). Esta suspensión fue incubada a 4°C durante 30 minutos en agitación. Se centrifugó 20 min a 4°C en la microfuga a 16,000 x g. El sobrenadante fue recuperado y mezclado en una proporción 1:1 con el amortiguador de dilución (HEPES 20 mM, KCl 50 mM, glicerol 20%, EDTA 0.2 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM). Se determinó la cantidad de proteína obtenida por el método de Bradford y se alícuotó en tubos la cantidad de proteína necesaria para un ensayo de retardo (10 µg). La proteína fue congelada en baño de hielo seco y etanol y almacenada a -70°C. Todo el procedimiento se lleva a cabo en hielo y se utilizan soluciones frías.

Fosforilación de oligonucleótidos para retardo:

200 ng del oligonucleótido se marcaron como lo indica la sección fosforilación del oligonucleótido para ensayos de *Southern Blot*. La reacción de marcado resultante se mezcló con 30 µl de amortiguador TBE 1X. Se calculó la actividad específica en el contador de centelleo.

Ensayos de retardo:

Los ensayos de retardo fueron utilizados ya que en ellos se aprovecha la interacción específica de algunas proteínas con una secuencia particular de DNA que previamente se ha marcado radioactivamente. Durante la electroforesis en un gel de acrilamida no desnaturizante se separan el DNA unido a proteína, del no unido que corre más rápidamente. En este caso los ensayos fueron utilizados como herramienta para valorar la unión a proteínas específicas a una secuencia en particular procedente de DNA genómico.

En un tubo eppendorf se agregaron 10 µg de proteína proveniente de los extractos nucleares y se completó con agua a un volumen de 13 µl. Se adicionaron 6 µl de mezcla de reacción (DTT 50 mM, 2% glicerol, albúmina sérica bovina fracción V (BSA) 20 µg, 50 U de polihexanucleótido (poliHN6), 2 µg de polideoxinosina-deoxicitidina (polidIdC) (ambos de Pharmacia) y 1 µl del oligonucleótido fosforilado conteniendo entre 5000 y 10 000 cpm. Se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la formación de complejos DNA-proteína. En caso de ensayos de competencia con oligonucleótido o fragmento no marcado, este se puso a incubar, 15 minutos antes de adicionar el

DNA marcado La reacción se detuvo adicionando 6 μ l de colorante (ficoll 45, 15 % azul de bronofenol 0.25% y xianol xileno 0.25%). Se cargaron las reacciones en un gel de acrilamida:bisacrilamida no denaturalizante al 5% que fue corrido a 100 V hasta que los colorantes alcanzaron la mitad del gel. El gel fue puesto a secar y luego expuesto, ya sea en película fotográfica para obtener una autoradiografía o en pantalla de fosforimetro para luego ser revelada o leída.

Obtención de DNA genómico

Se refiere brevemente el método solamente para dar una idea de la calidad de las muestras.

La obtención de DNA genómico de los individuos afectados utilizados para este estudio, a partir de digestión de leucocitos de suero sanguíneo con proteinasa K y extracción orgánica con fenol, seguida de una extracción orgánica con cloroformo-isoamílico. La fase acuosa fue precipitada con acetato de sodio y etanol y la pastilla se lavo con etanol al 70%, se resuspendió en Amortiguador TE y se cuantificó por espectrofotometría. Las muestras de DNA genómico de pacientes utilizadas se encuentran en un rango de concentraciones de 0.1 a 0.5 μ g/ μ l.

Gel de agarosa:

Para preparar el gel, se pesó la agarosa y se mezcló con amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M) 1X. Se calentó a 60°C hasta que se disolvió. Se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0.05%. Para ser corrida, la muestra se mezcló en una proporción 1:1 con el amortiguador de cargado (0.1% glicerol, 0.25% xileno xilol, 0.25% azul de bromofenol). Una vez cargado el gel se corrió en amortiguador TAE 1X a 100 V y se visualizó bajo luz U.V. en un transiluminador.

Reacciones de PCR:

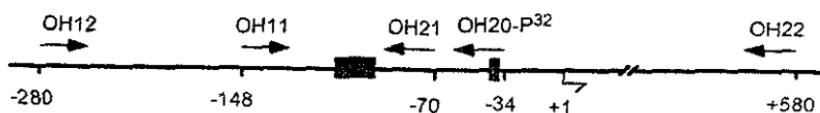
Primero se obtuvo un fragmento de 818 pb B específico para el gene funcional CYP21B (primera amplificación B-específica) procedente de individuos afectados a partir del cual se realizó una segunda amplificación para obtener el fragmento de 98 pb que contiene el sitio de unión Sp1. Esta segunda reacción también se realizó

de manera que el producto quedara marcado radioactivamente, mediante la incorporación directa de un desoxinucleótido [³²P].

Diseño y síntesis de oligonucleótidos:

Para la amplificación específica del gene CYP21B a partir de DNA genómico, se aprovecharon las diferencias existentes entre el gene y el pseudogene, por esta razón, los oligonucleótidos no se ubican en sitios donde su secuencia favorece la eficiencia de la reacción de PCR, sino donde existen mayor número de diferencias. Es importante que en la base del extremo 3' del oligonucleótido se localice una discrepancia entre el gene y el pseudogene, para favorecer la unión con el primero. Para diseñar los oligonucleótidos se utilizó el programa OLIGOTM 4.0. Los oligonucleótidos B específicos fueron OH12 y OH22. Los demás contienen secuencia compartida por gene y pseudogene. Los oligonucleótidos que resultaron fueron los siguientes:

Nombre	Secuencia	Tm
OH12	5' TTGCTTCTTGATGGGTGATCA 3'	65 °C
OH22	5' GCCTCCCCAACCCCTGCTTTC 3'	75 °C
OH11	5' TCCAGAAAAGGGCCACTC 3'	61 °C
OH21	5' CCATCCCTCCTGCTGTGT	61 °C
OH20	5' GGCCCTGAGGTGCCACTT 3'	66 °C



■ TATAA

■ Asp/Sp1 (-117, -94)

Mapa 2.- Localización sobre la secuencia del gene funcional CYP21B de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación β-específica son OH12 y OH22. Los que amplifican el fragmento de 98 pb son OH11 y OH21 y el oligonucleótido marcado con [³²P]yATP utilizado para identificar el fragmento de 818 pb es OH20.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados en el laboratorio de la Dra. Tussí con la colaboración de Salvador Ramirez y Laura del Bosque utilizando un sintetizador Beckman Oligo 1000 DNA synthesizer. Los reactivos utilizados son del Kit DNA

synthesis reagent de Beckman. Fueron cuantificados por espectrofotometría y diluidos en agua para PCR.

Primera amplificación a partir de DNA genómico de pacientes:

5 µl de DNA genómico (conteniendo cantidades variables de DNA, según el caso), 1 ng de oligonucleótidos B específicos (OH12 y OH22), 2mM MgCl₂, 1X amortiguador II para PCR, dNTPs 0.05 mM, 0.1 µg de ASB, formamida 3%, en un volumen final de 50 µl. El programa de amplificación fué el siguiente:

94 °C 3 minutos	40 ciclos
94 °C 1 minuto	
58 °C 1 minuto	
72 °C 1 minuto	
72 °C 3 minutos	

Segunda amplificación:

Los productos de la primera amplificación fueron utilizados como templado a altas diluciones (1.10 000). El resto de la mezcla de reacción fué la misma que la utilizada para la primera amplificación. Se utilizó también 1 ng de cada uno de los oligonucleótidos (OH11 y OH21). El programa de amplificación fué el siguiente:

94 °C 3 minutos	40 ciclos
94 °C 1 minuto	
60 °C 1 minuto	
72 °C 1 minuto	
72 °C 3 minutos	

Incorporación directa de [³²P] en los productos de reacción de PCR.

2 mM MgCl₂, 1X amortiguador II para PCR, 0.1 mM dATP dTTP dGTP, 6.5 µM dCTP, 5 mCi de [³²P]adCTP, en un volumen final de reacción de 25 µl. Los oligonucleótidos para segunda amplificación (OH11 y OH 21) se utilizaron a una concentración de 100 mM. El programa de amplificación que se utilizó fue el mismo que para segunda amplificación.

Todas las soluciones del kit para PCR y la enzima Taq polimerasa de Perkin Elmer

BIBLIOGRAFIA

- Ahlgren R., Simpson E., Waterman M. and Lund J. (1990) Characterization of the promoter/regulatory region of the bovine CYP11A (P-450 scc) gene. *J Biol. Chem* 265 (6): 3313-3319.
- Beyer K., Samuels L. T., (1956) Distribution of steroid 3- β dehydrogenase in cellular structures of the adrenal gland. *J. Biol. Chem.* 219:69-76
- Adrenal-specific transcription of the human P450c21A "pseudogene". *J. Biol. Chem.* 268: 12919-12924.
- Chang S., Chung B. (1995) Difference in transcriptional Activity of two homologous CYP21A genes. *Endocrinology* 9(10): 1330-1336.
- Coles L. S. Occhidoro F. Vadas-MA, Shannon M. (1994) A sequence specific single-strand DNA binding protein that contacts repressor sequences in the human Gm-CSF promoter. *Nucleic. Acid. Res* 22(20):4276-83.
- Coon M.J., Ding X., Pernecky S., Vaz A. (1992) Cythochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* 6: 669-673.
- Darren J. D., Speiser W., Schulze E. Betterndorf M., Fitness J., Barany F., White P.C. (1996) Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-based diagnosis of 21-hidroxilase deficiency in CAH affected pedigrees. *Hum Mol. Genet.* 5(12): 2939-2048.
- De pak S., Dougals A. R., Parker K. L (1992) Steroidogenic Factor I, key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homologue of *fushi tarazu*-factor 1. *Mol. Endocrinol.* 6 (8):1249-1258.

-Douglas A. R., Moun A. R., Bogerd A. M., Parker K. L. (1991) A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Mol. Endocrinol.* 5(10): 1552-1561.

-Gitelman S. E., Bristow J., Miller W. L. (1992) mechanism and consequences of the duplication of the human C4/P450c21/Gene X Locus. *Mol. Cell. Biol.* 12(5):2124-2134

-Gonzalez F. J. (1992) Human Cytochromes P450, problems and prospects. *TIPS* 13: 346-352.

-Guengerich F. P. (1992) Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *FASEB J.* 6: 745-748.

-Guengerich F. P. (1992) Cytochrome P450: advances and prospects. *FASEB J.* 6: 667-668.

-Higashi Y., Yoshioka H., Yamane M., Gotoh O., Yoshiaki F. (1986) Complete Nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: A pseudogene and a genuine gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 2841-2845.

-Haynes R. C., Koritz S.B., Peron F.G., (1959) Influence of adenosine 3',5'-monophosphate on corticoid production by rats adrenal glands. *J. Biol. Chem.* 234:1421-1423

-Kadanaga J. T., Carner K. R., Masiarz F. R., Tijan R. (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51:1079-1090.

-Kadanaga J. T., Jones K. A., Tijan R. (1986) Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1. *TIBS* 11:20-23

- Kagawa N., Waterman M. (1990) cAMP-dependent transcription of the human CYP21B gene requires a cis-regulatory element distinct from the consensus cAMP-regulatory element. *J. Biol. Chem.* 265: 11299-11305.
- Kagawa N., Waterman M (1991) Evidence that an adrenal-specific nuclear protein regulates the cAMP responsiveness of the human CYP21B (P450C21) gene. *J. Biol. Chem.* 266 (17):11199-11204.
- Karoboyas G. C., Koritz S. B., (1965) Identity of the site of action of adenosine 3',5'-monophosphate and adrenocorticotrophic hormone in corticosteroidogenesis in rat adrenal and beef adrenal cortex slices. *Biochemistry* 4:462-468.
- Kusk P., John S., Fragoso G., Michelotti J., Hager G. L. (1996) Characterization of an NF-1/CTF family member as a functional activator of the mouse mammary tumor virus long terminal repeat 5' enhancer.
- McNight S., Tjian R. (1986) Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 46(6):795-805.
- Miller W.L., Morel Y. (1989) The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Annu. Rev. Genet* 23: 371-393.
- Mornet E., Crete P., Kuten F., Raux-Demay M., Boue J., White P. C., Boue A., (1991) Distribution and deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 48:79-88.
- Nakane P. K. (1975) Zonal distribution of microsomal cytochrome P450 in adrenal cortex. *Ann. NY Acad. Sci.* 254:203-211
- Lee Y. H., Yano M., Liu S. Y., Matsunaga E., Johnson P., Gonzalez F. J. (1994) A novel cis-acting element controlling the rat CYP2D25 gene and requiring cooperative between C/EBPbeta and an Sp1 factor. *Moll. Cell Biol.* 14(2): 1383-1394.

-Ordoñez M. L., Ramirez S. J., Lopez A., Riba L, Gamboa S., Cerrillo H., Altamirano, Calzada L., Robles V., Mendoza M., Tusié Luna M. (1998) Molecular genetic analysis of patient carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the mexican population. Hum. Gent. en prensa.

-Parker K. L., Schimer B. P., Chaplin D. D., Seidman J. G. (1986) Characterization of a regulatory region of the steroid 21-hydroxylase gene. J. Biol. Chem. 261(33):15353-15355.

-Rice D.A., Mown A.R., Bogerd A.M., Parker K.L. (1991) A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. Mol. Endocrinol. 5(10):1552-1561.

-Sanchez H. B., Yieh-L. Osborne T. F. (1995) Cooperation by steroid regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. J. Biol. Chem. 270(3):1161-9.

-Schimmer B. P. (1995) Molecular and genetics approaches to the study of signal transduction in the adrenal cortex. Can. J. Physiol Pharmacol. 73(8):1097-107

-Seamon K. B., Padget W., Daly J. W (1981) Forskolín : Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. Proc. Nati. Acad. Sci : USA. 78(6): 3363-3367.

-Simpson E. R., Waterman M. R. (1988) Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. Ann. Rev. Physiol. 50: 427-440.

-Speiser P. W., Dupont J., Zhu D., Serra T J., Buegeleisein M., Tusié-Luna M. T., Lesser M., New M., White P. (1992) Disease expresion and molecular genotype in Congenital Adrenal Hiperplasia due to 21-hidroxiase deficient. J. Clin. Inv. 90:584-595.

-Takemori S, Komiani S. (1984) The role of cytochromes P450 in adrenal steroidogénesis. TiBS 9: 393-396.

- Toth I. E., (1992) Lipoprotein receptors and steroidogenesis in adrenocortical cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol* 43(5):395-402
- Tusié L. M. T., Traktman P., White C. P. (1990) Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J. Biol. Chem.* 265:20916-20922
- Werkmeister J., New M. I., Dupont B., White P. C. (1986) Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes. *Am. J. Hum. Genet* 39:461-467
- Wedel A., Luthman H. (1993) Steroid 21-hydroxylase (P450c21): a new allele and spread of mutations through the pseudogene. *Hum. Genet.* 91: 236-240.
- White P. C., Grossberger D., Onufer B. J., Chaplin D. D., New M. I., Dupont B., Strominger J. L. (1985) Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 1089-1093.
- White P. C., New M. I., Dupont B. (1986) Structure of human steroid 21 hydroxylase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 5111-5115.
- White P. C., Tusié-Luna M. T (1995) Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:10796-10800.
- White P. C., Tusié-Luna M. T., New M. I., Speiser P. W. (1994) Mutations in steroid 21-hydroxylase (CYP21) *Hum. Mut.* 3: 373-378.
- Wilson T., Mouw. A., Weaver C., Milbrandt J. and Parker K. (1993) The orphan Nuclear receptor NGF1-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. *Mol. Cell. Biol.* 13 (2): 861-868.

-Wojciech Rychlik (1992) Reference Manual OLIGO 4.0 for Macintosh.
National Biosciences, Inc., Plymouth, MN

-Zanger U. M., Kagawa N., Lund J, Waterman M. R. (1992) Distinct
biochemical mechanism for cAMP-dependent transcription of CYP17
and CYP21. FASEB J. 2: 719-723.