

00551

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

6

EFFECTO DE LA CO-EXPRESION DE DISTINTAS MUTANTES  
SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA  
UTILIZANDO UN SISTEMA DE EXPRESION CON EL VIRUS  
DE VACCINIA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUIMICA)**

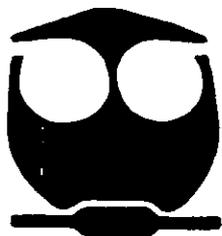
**P R E S E N T A :**

**Q.F.B. XOCHITL ADRIANA** **FELIX LOPEZ**

TUTORA: DRA. MARIA TERESA TUSIE LUNA

MEXICO, D. F.

2000





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**ESTA TESIS SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE GENÉTICA DE LA  
NUTRICIÓN DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO CON SEDE EN EL  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA.**

*A mi esposo Tonatiuh por compartir día a día su espíritu de lucha y superación,  
así como por contar siempre con su invaluable apoyo, paciencia, amor y  
comprensión.*

*A mi hijo Faustino por formar parte de nuestras vidas.*

**Por esos fuertes lazos que nos unen sin importar la distancia, por su apoyo y ejemplo a seguir**

**A mis padres: Rosario y Javier  
A mis hermanos: Cuquis, Javier, Raúl y José Rosario**

**A toda mi familia.**

**A cada uno de los integrantes de la familia Ortíz Soto, con especial cariño por sus demostraciones de afecto a**

**Teresa Soto y Patricia Ortíz.**

### Agradecimientos:

A la Dra. María Teresa Tusíé Luna por todas sus enseñanzas.

Al Dr. Antonio Velázquez Arellano.

Al Dr. Diego Arenas Aranda.

Al Dr. Fabio Salamanca Gómez.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por sus sugerencias.

Al Dr. Cuauhtemoc Reyes porque en gran medida contribuyó en mi formación académica.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Salvador Ramírez, Laura Riba, Laura del Bosque, Javier Cabello, María Luisa, Etelvina, Aarón, Ulises, Sirám, Ricardo, Yayoi, Maribel, Erika, Fausto, Adriana, Verónica y Eduardo.

A los integrantes del laboratorio del Dr. Zentella: Adriana, Lúcia, Criselda, Erika, Catalina y por su apoyo técnico a José Luis Ventura.

A todos los integrantes de la Unidad de Genética de la Nutrición: Rocío, María Luisa, Angeles, Isabel Ibarra, Zazil, Dra. Cristina Fernández, Sra. Tere, Matias, Alejandra Díaz, Alejandra Deolarte, Jesús, Saúl y Sara.

A los integrantes de la Sección Clínica: Dra. Marcela Vela, Marthita, Isabel Cicerón, Violeta, Blanca, Araceli, Pilar, Arturo, Salvador Gamboa, Moisés y Carlos.

Por la revisión de esta tesis a: Dr. Rogelio Rodríguez  
Dr. Gerardo Gamba  
Dra. Martha Menjivar,  
Dr. Guillermo Mendoza  
Dr. Armando Tovar

A mis amigos: Samuel, Pedro, Alberto, Claudia, Miriam, Luz María, Adela, Irma, Elena, Mari, Rafael, Selene, Carolina, Paul, Haydee, Israel, Blanquita, Vicky, a la Dra. Rosenda Peñalosa, al Dr. Ramón Coral y con recuerdo especial a Leticia Soto, Blanca Mascareño, Yadira Velázquez y al Dr. Guillermo Romero.

A Mercedes Sánchez y a mi gordito por su ayuda en el cuidado de Faustino en mis largas ausencias de trabajo.

**Al Biólogo Salvador Ramírez Jiménez, por apoyarme en el aprendizaje de las cuestiones metodológicas del laboratorio y por su amistad.**

Por las becas otorgadas para la realización de esta tesis a:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de registro 94043, a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), a través del Departamento de Intercambio Académico.

A la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), a través del Dr. Cuauhtemos Reyes.

# ÍNDICE

## RESUMEN

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
La glándula suprarrenal .....	1
Biosíntesis de esteroides suprarrenales .....	1
Propiedades enzimáticas de los citocromos P450 .....	3
Ciclo de reacción de los citocromos P450.....	4
Características espectroscópicas de los citocromos P450.....	5
La hiperplasia suprarrenal congénita.....	6
Consecuencias bioquímicas en la deficiencia de la enzima	
21-hidroxilasa.....	6
Participación de la aldosterona en la fisiología renal.....	7
Fenotipos clínicos en la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa.....	7
Fenotipo perdedor de sal.....	8
Fenotipo virilizante simple.....	8
Fenotipo no clásico.....	8
Bases moleculares de la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa.....	9
Mutaciones identificadas en pacientes con deficiencia	
de la enzima 21-hidroxilasa.....	10
Distintas mutaciones se han asociado a la expresión de distintos	
fenotipos.....	11
Consecuencias funcionales de distintas mutaciones en el gen que codifica	
para la enzima 21-hidroxilasa.....	13
Sistema de expresión para la enzima 21-hidroxilasa.....	14
Estudios de correlación fenotipo-genotipo en la deficiencia de 21-hidroxilasa..	15
Relación estructura-función de la enzima 21-hidroxilasa.....	16
Dominios específicos de la proteína.....	18
Localización de las mutaciones reportadas en pacientes dentro del	
modelo tridimensional de la proteína.....	19

Características estructurales y funcionales descritas de mutantes de la enzima 21-hidroxilasa.....	19
Mutante I172N (Ile → Asn).....	19
Mutante V281L (Val → Leu).....	20
Mutante en Cluster (Ile236-Val237-Met239 → Asn-Glu-Lys).....	21
Mutante R356W (Arg → Trp).....	22
Constantes cinéticas descritas de la enzima silvestre y dos mutantes de 21-hidroxilasa.....	25
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>26</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Construcción del virus recombinante de vaccinia.....	28
Identificación del virus recombinante.....	29
Extracción de DNA viral a partir de los lisados celulares.....	31
Amplificación en cadena de la polimerasa (PCR).....	31
Amplificación y titulación de las clonas virales.....	32
Virus recombinantes disponibles conteniendo el cDNA de la forma silvestre y las distintas mutantes de la enzima 21-hidroxilasa.....	33
Expresión de la enzima 21-hidroxilasa en células en cultivo.....	33
Ensayo de actividad enzimática.....	34
Ensayo de actividad enzimática co-expresando distintas formas de la enzima (silvestre o mutantes).....	35

## RESULTADOS

Identificación del virus recombinante de vaccinia conteniendo el clon silvestre.....	38
Ensayo funcional de la clona silvestre.....	39
Actividad enzimática de las distintas formas de la enzima 21-hidroxilasa.....	40
Co-expresión de las distintas formas de la enzima 21-hidroxilasa.....	40
Co-expresión de la enzima silvestre (WT) con las mutantes V281L, I172N, Cluster y R356W.....	40
Co-expresión de la enzima mutante V281L con las mutantes I172N, Cluster Y R356W.....	42

## DISCUSIÓN

Implicaciones de este estudio para la correlación fenotipo-genotipo en la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa.....	43
Cómo explicar un efecto dominante negativo para una enzima activa en estado monomérico.....	45
Mecanismos alternos que pudieran explicar el decremento en actividad enzimática cuando son co-expresadas dos variantes de la enzima 21-hidroxilasa.....	45
El sistema de co-expresión de distintas formas de la enzima para entender la expresión de fenotipos clínicos variables.....	46
El sistema de expresión de vaccinia para evaluar el efecto de la combinación de distintas mutantes de la enzima.....	50
El sistema de co-expresión de distintas formas de la enzima como herramienta de estudio de la estructura y la función de distintas mutantes.....	51

CONCLUSIONES.....	53
-------------------	----

REFERENCIAS.....	54
------------------	----

## RESUMEN

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) comprende un grupo de enfermedades autosómicas recesivas caracterizadas por la deficiencia de alguna de las enzimas que participan en el metabolismo de esteroides suprarrenales (aldosterona y cortisol). En más del 90% de los pacientes con HSC la enzima responsable es la 21-hidroxilasa como consecuencia de mutaciones en el gen CYP21 que codifica para esta enzima. La enfermedad se presenta con un amplio espectro de variantes clínicas caracterizadas por la deficiencia absoluta o relativa de aldosterona.

La enzima 21-hidroxilasa tiene una expresión tejido específica por lo que los estudios de expresión de proteínas mutantes *in vitro* se han utilizado para evaluar el efecto que tienen sobre la actividad enzimática, las distintas mutaciones identificadas en pacientes con HSC.

Los estudios de expresión han permitido asociar distintas mutaciones con determinados fenotipos, sin embargo, existen pacientes que expresan un fenotipo clínico más severo del que pudiera predecirse a través de las mutaciones identificadas en ellos. Esto sugiere que pudiera existir un efecto sinérgico sobre el abatimiento de la actividad enzimática al combinar distintas mutaciones.

En esta tesis se estudió el efecto de la co-expresión de distintas formas mutantes de la enzima 21-hidroxilasa, con el objeto de identificar posibles proteínas mutantes con efecto negativo sobre la actividad de la enzima silvestre. El sistema de expresión utilizado se basó en la infección de células COS-1 con virus recombinantes de vaccinia conteniendo distintas formas mutantes del cDNA de la enzima. A diferencia de otros sistemas de expresión, en este sistema, el cDNA es introducido a la célula a través de un proceso mediado por receptores virales lo cual asegura un sistema de incorporación de DNA sujeto a menos variabilidad comparado con otros procesos de transfección de DNA como la electroporación o la incorporación de DNA mediada por liposomas.

Nuestros resultados indican que tres de las cuatro mutantes estudiadas I172N, V281L y Cluster muestran un aparente efecto dominante negativo sobre la actividad de la enzima silvestre, mientras que la mutante R356W no mostró tal efecto. La capacidad de las enzimas mutantes para abatir la actividad de la enzima silvestre fue muy semejante para dos de ellas (V281L y Cluster) mientras que la mutante I172N tuvo un efecto menor. Esto nos llevo a sugerir distintos mecanismos responsables de este efecto dominante negativo, para al menos dos de las formas mutantes que pudieran estar relacionados con la alteración en la estructura o la función de cada enzima mutante.

## INTRODUCCIÓN

### LA GLÁNDULA SUPRARRENAL

La glándula suprarrenal se localiza en la parte superior de cada riñón, consta de dos órganos endócrinos conocidos como médula y corteza, cada uno es funcionalmente distinto. La médula suprarrenal secreta principalmente catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina), implicadas en distintas respuestas a estrés. La corteza suprarrenal consta histológicamente de tres zonas distintas: zona glomerulosa, fasciculada y reticular. En el humano en la zona glomerulosa se sintetizan mineralocorticoides (principalmente aldosterona) involucrados en el equilibrio de sodio y el volumen del líquido extracelular, en la zona fasciculada se producen glucocorticoides (principalmente cortisol) con múltiples efectos principalmente catabólicos, sobre el metabolismo de los carbohidratos y proteínas, y en la zona reticular se producen andrógenos.

### BIOSÍNTESIS DE ESTEROIDES SUPRARRENALES

En la esteroidogénesis suprarrenal participan un grupo de enzimas mitocondriales (P450<sub>scc</sub> y P450<sub>11 $\beta$</sub> ) y microsomales (P450<sub>c21</sub> y P450<sub>17 $\alpha$</sub> ), de las cuales la mayoría son citocromos P450 a excepción de una de ellas, la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa 3 $\beta$ -HSD (Finkelstein and Schaefer, 1979; White *et al.*, 1987a).

El precursor de los esteroides es el colesterol, el cual es transportado a las mitocondrias en donde es convertido a pregnenolona en una reacción catalizada por la enzima segmentadora de la cadena lateral del colesterol (P450<sub>scc</sub>), este es el paso limitante en la síntesis de esteroides y es controlada por la disponibilidad del sustrato. La pregnenolona es deshidrogenada en el retículo endoplásmico para formar progesterona en una reacción catalizada por la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$

HSD) posteriormente, la progesterona se hidroxila en las posiciones  $17\alpha$ ,  $21$  y  $11\beta$  por las enzimas  $P450_{17\alpha}$ ,  $P450_{c21}$ ,  $P450_{11\beta}$ , respectivamente, para producir 17-hidroxiprogesterona, 11-desoxicortisol y cortisol (White *et al.*, 1987a).

La vía biosintética para la aldosterona es similar a la del cortisol, excepto por la participación de la enzima  $P450_{17\alpha}$ , que no se expresa en la zona glomerulosa. Para la síntesis de aldosterona, la pregnenolona es convertida a progesterona y sucesivamente hidroxilada en las posiciones  $21$ ,  $11\beta$  y  $18$  para producir respectivamente, desoxicortisona, corticosterona y 18 hidroxicorticosterona. En la etapa final de la síntesis de aldosterona una misma enzima la  $P450_{11\beta}$  cataliza ambas etapas de  $11\beta$  y  $18$  hidroxilación así como también la oxidación de la 18-hidroxicorticosterona (White *et al.*, 1987a).

Por lo tanto, la enzima 21-hidroxilasa (o  $P450_{c21}$ ) reconoce dos sustratos, 17-hidroxiprogesterona y 11-desoxicortisol, cada uno de ellos involucrados en la ruta biosintética de mineralo y glucocorticoides respectivamente (Fig. 1).

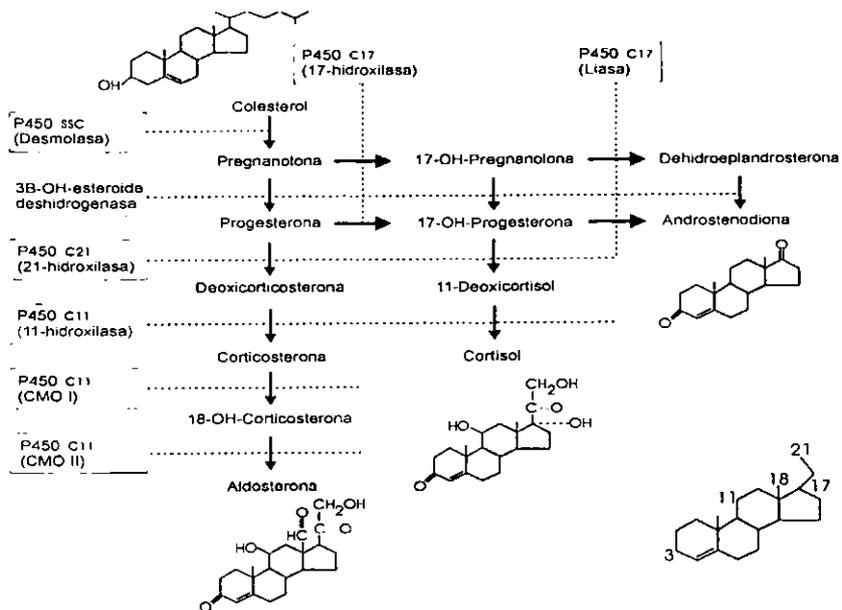
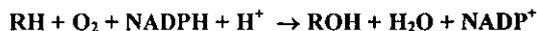


Figura 1. Biosíntesis de esteroides en corteza suprarrenal. El cortisol es sintetizado en la zona fasciculada a partir del colesterol, en donde éste es cortado para formar pregnanolona. La pregnanolona es deshidrogenada para formar progesterona, que posteriormente se hidroxila en las posiciones 17 $\alpha$ , 21 y 11 $\beta$ , para producir cortisol. Para la síntesis de aldosterona la pregnanolona es convertida a progesterona e hidroxilada en las posiciones 21, 11 $\beta$  y 18. En la etapa final de la síntesis de aldosterona la enzima P45011 $\beta$  cataliza las etapas de hidroxilación en las posiciones 11 y 18, como también otra actividad adicional de oxidación de la 18-hidroxicorticosterona.

## PROPIEDADES ENZIMÁTICAS DE LOS CITOCROMOS P450

Los citocromos P450 son enzimas que contienen un grupo hemo y se encuentran unidas a membrana mitocondrial o microsomal, con un peso molecular aproximado de 50 Kd. Los P450 participan en el metabolismo oxidativo de esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, leucotrienos y drogas (Ortiz, 1986; Ruckpaul, 1989). Algunos P450 se expresan en el hígado o en pulmón y son inducidos por una variedad de drogas y otros xenobióticos tales como fenobarbital e hidrocarburos aromáticos policíclicos (New *et al.*, 1989). Los citocromos P450 catalizan reacciones con función monooxigenasa u

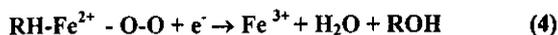
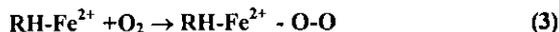
oxigenasa-mixta, en las cuales un átomo del oxígeno molecular es transferido al sustrato (R) y el otro es reducido a H<sub>2</sub>O.



El sistema monooxigenasa de los citocromos P450 incluye un citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH, el propio citocromo P450 y los componentes fosfolipídicos de membrana. Existen diferencias entre los sistemas de transferencia de electrones de los citocromos P450s mitocondriales y microsomales, aunque ambos reciben los electrones del NADPH. Los citocromos P450 mitocondriales utilizan una proteína no hémica como la adrenodoxin reductasa (flavoproteína) y la adrenodoxina, en contraste con los citocromos microsomales, que utilizan una flavoproteína diferente llamada citocromo P450 reductasa. Los electrones del NADPH son transferidos vía reductasa a la adrenodoxina, la cual transfiere los electrones a una forma férrica oxidada del citocromo P450, la forma ferrosa del P450 activa al O<sub>2</sub> para finalmente hidroxilar al sustrato.

#### Ciclo de reacción de los citocromos P450

Los citocromos P450 catalizan la reacción de mono-oxigenación de una variedad de moléculas orgánicas mediante el siguiente mecanismo multi-enzimático.



En la etapa 1, el sustrato RH se une directamente sobre la superficie del grupo hemo adyacente al sitio de unión del O<sub>2</sub>. En la etapa 2, un electrón es transferido del NADPH para reducir el átomo de hierro de estado férrico (Fe<sup>3+</sup>) a ferroso (Fe<sup>2+</sup>). En la etapa 3, el O<sub>2</sub> se une al complejo enzima-sustrato por medio del hierro del grupo hemo.

Finalmente, en la etapa 4, un segundo electrón del NADPH se transfiere al complejo enzima-sustrato- $O_2$ , en este paso un átomo del oxígeno es reducido a  $H_2O$  y el otro es utilizado para hidroxilar al sustrato, que posteriormente es liberado de la enzima como ROH (Poulos, 1995).

### **Características espectroscópicas de los citocromos P450**

Las características espectroscópicas de los citocromos P450 son utilizadas ampliamente para el análisis cualitativo y cuantitativo de este tipo de proteínas, en muchos casos sin necesidad de una purificación extensa. Una característica que distingue a todos los citocromos P450s es el pico máximo de absorción a 450 nm que presentan al unirse con monóxido de carbono y reducirse con el agente reductor ditionita. De esta característica de absorción es que reciben el nombre de P450s (Omura and Sato, 1964).

La primera etapa del ciclo de reacción de hidroxilación de este tipo de enzimas se determina por la formación del complejo enzima-sustrato. Las características espectroscópicas de este complejo dependen del tipo de sustrato unido. Si el sustrato que se une lo hace a residuos de aminoácidos no polares del sitio activo de la proteína, al ser hidroxilados inducen un cambio de absorción con un pico máximo a 425-435 nm y un mínimo 385-390 nm, que se conoce como espectro diferencial tipo I. Otro tipo de compuestos, los cuales se asumen que se unen directamente al grupo hemo, inducen un cambio de absorción con un pico máximo a 390-410 nm y un mínimo de 425-435 nm, a lo cual se le conoce como espectro de tipo II. La mayoría de estos compuestos actúan más como inhibidores que como sustratos (Ortiz, 1986; Ruckpaul, 1989).

Los P450 involucrados en el metabolismo de esteroides muestran una amplia especificidad por el sustrato ya que intervienen en la formación de importantes intermediarios metabólicos. El amplio rango de sustratos usados por P450s extrasuprarrenales hace suponer que el sitio de unión a sustrato muestra un amplio rango de tamaños, formas y flexibilidad (Poulos, 1995).

## LA HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA

La hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) representa un grupo de enfermedades monogénicas con herencia autosómica recesiva (New *et al.*, 1989). Estas enfermedades se caracterizan por la actividad ausente o disminuida de alguna de las enzimas que participan en la biosíntesis de mineralo y glucocorticoides en la corteza suprarrenal (New *et al.*, 1989). En más del 90% de los pacientes con HSC la enzima que se encuentra afectada es la 21-hidroxilasa debido a mutaciones en el gen que codifica para esta enzima CYP21B (Higashi *et al.*, 1988b; White *et al.*, 1988).

### CONSECUENCIAS BIOQUÍMICAS EN LA DEFICIENCIA DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA

La deficiencia de 21-hidroxilasa provoca una disminución en la síntesis de cortisol y aldosterona. La disminución en la síntesis de cortisol resulta en un aumento en la secreción de ACTH (hormona adrenocorticotrófica) lo que estimula constantemente a la corteza suprarrenal, con la subsecuente hiperplasia. El defecto primario en la deficiencia de 21-hidroxilasa es la sobreproducción y acumulación de precursores de la enzima próximos al bloqueo (progesterona y 17-hidroxiprogesterona) y el desvío de estos hacia la síntesis de andrógenos. Las niñas afectadas con HSC presentan ambigüedad genital al nacimiento debido a la exposición elevada de andrógenos. En ambos sexos, posterior al nacimiento se manifiesta crecimiento óseo rápido, con maduración esquelética acelerada, cierre prematuro de la epífisis y corta estatura cuando llegan a la edad adulta (New *et al.*, 1989).

## Participación de la aldosterona en la fisiología renal

La aldosterona es fundamental para regular la absorción de iones contenidos en el líquido extracelular que diariamente filtran los glomérulos renales (del orden de 180 litros), de manera que cuando esta hormona falta el riñón no puede mantener las concentraciones normales de  $\text{Na}^+$  en sangre y en fluidos extracelulares (que son del orden de 130-140 mM) y que son eliminados por la orina. Ante la incapacidad de mantener también niveles óptimos de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$ , ya que al tiempo que se incrementa la absorción de  $\text{Na}^+$  en el riñón, se aumenta la secreción de  $\text{K}^+$ , se produce un inadecuado intercambio de iones con el líquido intracelular y sobrevienen hipotensión, crisis cardiovascular, colapso y eventualmente la muerte (Speiser *et al.*, 1992).

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 acabo esta tarea. Sin embargo, esta deficiencia se manifiesta durante las primeras semanas de vida del neonato como crisis de pérdida de sal.

A la aldosterona se le han atribuido una serie de funciones en el túbulo distal de la nefrona así como en otras células epiteliales como las glándulas salivales, como la estimulación del transporte de  $\text{Na}^+$  extracelular activando los canales de  $\text{Na}^+$  y la bomba de  $\text{N}^+-\text{K}^+-\text{ATP}^+$ asa, y la activación de la transcripción de algunos genes para el transporte de  $\text{Na}^+$  (Verrey, 1999).

## FENOTIPOS CLÍNICOS EN LA DEFICIENCIA DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA

Esta enfermedad presenta una amplia gama de manifestaciones fenotípicas, clasificándose en dos grupos: La forma severa o clásica que incluye a los fenotipos perdedor de sal y virilizante simple, con una frecuencia aproximada de 1/14000 nacimientos (Pang *et al.*, 1988; Miller and Morel, 1989). La forma atenuada o no clásica afecta entre un 2-3% de los Europeos del Este, a los Judíos y, aproximadamente al 1% de los individuos en la población general (Speiser *et al.*, 1985).

### **Fenotipo perdedor de sal**

La característica que distingue a este fenotipo es la deficiencia absoluta de aldosterona. Las manifestaciones clínicas como vómito y deshidratación severa aparecen en las primeras semanas de vida. Si el padecimiento no es reconocido a tiempo los niños mueren en el período postnatal por choque hipovolémico. Los individuos que manifiestan este fenotipo portan mutaciones que alteran severamente la actividad de la enzima 21-hidroxilasa, lo cual resulta en la incapacidad para producir aldosterona.

### **Fenotipo virilizante simple**

En estos sujetos se produce suficiente aldosterona para reducir las consecuencias derivadas de la baja retención de electrolitos. Se considera que en estos pacientes, la enzima conserva actividad residual, aunque esta es muy baja (2%). En estos pacientes el principal problema es la síntesis deficiente de glucocorticoides, principalmente cortisol. Debido a la regulación positiva sobre las enzimas de esta vía, la falta de cortisol provoca un aumento en la secreción de ACTH, lo que a su vez ocasiona la elevación de los niveles de diversos intermediarios provocando el desvío de estos a la síntesis de andrógenos resultando en virilización pre y postnatal. En individuos del sexo femenino se manifiesta como ambigüedad genital. Los individuos masculinos escapan al diagnóstico después del nacimiento y es hasta los 4-7 años de edad cuando presentan pubertad precoz, con aparición de vello pubico, axilar y facial, además de tener edad ósea avanzada (Miller and Morel, 1989).

### **Fenotipo no clásico**

Es la forma más común de HSC, existen desde formas crípticas o asintomáticas (principalmente en varones) hasta formas clínicas con signos como hirsutismo, acné o infertilidad y en las mujeres oligomenorrea (Jones and Jones, 1954). Los pacientes con este fenotipo clínico muestran alelos con actividad parcial que retienen entre un 25 y

50% de la actividad normal (Tusié-Luna *et al.*, 1991; Speiser *et al.*, 1992b; Helmberg *et al.*, 1992).

## BASES MOLECULARES DE LA DEFICIENCIA DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA

El gen que codifica para la enzima 21-hidroxilasa (CYP21) pertenece a la familia de genes que codifican para citocromos P450. Se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (en la banda 6p21.3) dentro de la región de la clase III del complejo mayor de histocompatibilidad HLA, (Fig. 2). La estructura del gen comprende 10 exones y 9 intrones y contiene 3.1 Kb (White *et al.*, 1986; Higashi *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1987). La mayoría de los genes que se encuentran en esta región tienen la particularidad de estar duplicados (Gitelman *et al.*, 1992) incluyendo al gen CYP21 que tiene un gen homólogo denominado CYP21P. Ambos genes se encuentran adyacentes a una distancia aproximada de 30 Kb y entre cada uno de ellos se localizan, los genes C4A y C4B que codifican para el factor cuatro del complemento sérico (White *et al.*, 1985, 1986; Higashi *et al.*, 1986). El gen y el pseudogen tienen un 98% de homología en la región codificadora y un 96% en los intrones (Rodrigues *et al.*, 1987).

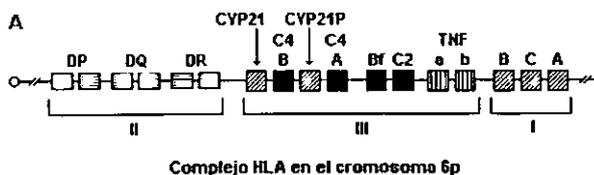


Figura 2. Arreglo de genes en el complejo mayor de histocompatibilidad HLA en el brazo corto del cromosoma 6. El centrómero está representado por un círculo, los números romanos indican las clases del complejo mayor de histocompatibilidad, los genes CYP21 y CYP21P (gen y pseudogen de 21-hidroxilasa respectivamente) están localizados en la región de la clase III alternados con dos genes que codifican para el cuarto componente del complemento sérico (C4B y C4A). TNF son los genes del factor de necrosis tumoral.

El análisis de secuencia entre el gen y el pseudogen muestra que este último posee múltiples mutaciones que impiden la síntesis de la enzima funcional. Estas mutaciones incluyen una eliminación de 8 pares de bases en el exón 3 (GAGACTAC) (White *et al.*, 1988), una inserción de una base en el exón 7 (Mornet *et al.*, 1991), ambas provocan corrimiento del marco de lectura y terminación prematura de la traducción. Además, el pseudogen posee 15 mutaciones puntuales, de las cuales 10 resultan en una sustitución de aminoácidos y una produce un codón de paro. Muchas de estas mutaciones se han identificado en el gen funcional (CYP21) de pacientes con HSC. Por esta razón se ha propuesto que eventos de conversión génica generan la transferencia de mutaciones puntuales del pseudogen al gen funcional (Higashi *et al.*, 1988a).

Los alelos que tienen mutaciones puntuales son los más frecuentes en pacientes con deficiencia de la 21-hidroxilasa representando más de dos terceras partes de los alelos mutantes descritos en todas las poblaciones estudiadas hasta el momento (Morel *et al.*, 1989; Speiser *et al.*, 1992b; Wilson *et al.*, 1995a).

Adicionalmente, se han identificado mutaciones que no se encuentran en el pseudogen. El efecto de algunas de estas mutaciones ha sido estudiado a través de ensayos de expresión *in vitro* (Helmberg *et al.*, 1992; Nikoshkov *et al.*, 1997).

### **Mutaciones identificadas en pacientes con deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa**

Se han identificado distintas mutaciones en el gen que codifica para la enzima 21-hidroxilasa (CYP21) de pacientes con HSC, entre las que se encuentran eliminaciones parciales o totales del gen, 29 diferentes mutaciones puntuales entre las que existen aquellas que afectan el procesamiento del RNA mensajero (Higashi *et al.*, 1988a; Lajic and Wedell, 1997), mutaciones que cambian un aminoácido por otro (Tusié-Luna *et al.*, 1991) y mutaciones que generan codones de terminación (Higashi *et al.*, 1988b; Tusié-Luna *et al.*, 1991; 1990; Speiser *et al.*, 1992b; Lajic and Wedell, 1997).

Para la mayoría de las mutaciones identificadas en los pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa se conocen las frecuencias alélicas en distintas poblaciones, incluyendo población Mexicana como se muestran en la Tabla 1.

## Distintas mutaciones se han asociado a la expresión de distintos fenotipos

Las mutaciones que frecuentemente se asocian a la forma perdedora de sal son aquéllas que abaten completamente la síntesis de la proteína o dan como resultado una proteína inactiva, entre estas se incluyen: a) las eliminaciones parciales o totales del gen CYP21, b) la mutación del intrón 2 que se localiza 13 bases antes del inicio del exón 3, mutación afecta el procesamiento de RNA mensajero y es la que se encuentra con mayor frecuencia en pacientes con esta entidad clínica (Higashi *et al.*, 1988b, 1991), c) mutaciones que afectan el marco de lectura traduccional y que generan codones sin sentido como la eliminación de 8 pares de bases en el exón 3, el cambio en el exón 8 Glu 318 a codón de terminación. Por último una mutación puntual que provoca un cambio de aminoácido en el exón 8 (Arg356 por Trp) situado en el sitio probable de unión a sustrato (White, 1987b; Picado and Miller 1988; Chiou *et al.*, 1990) y una mutación que cambia tres aminoácidos contiguos (I236-Val237, Met239 por Asn-Glu-Lys) en el exón 6 conocida como mutación en Cluster (Globerman *et al.*, 1988; Tusié-Luna *et al.*, 1990; Speiser *et al.*, 1992b).

La forma virilizante simple ha sido asociada con la mutación de Ile172 por Asn localizada en exón 4 (Tusié-Luna *et al.*, 1990; Chiou *et al.*, 1990).

La forma no clásica se ha asociado con la mutación Val281 por Leu en exón 7 (Speiser *et al.*, 1988, 1992b), con la mutación Pro30 por Leu localizada en el exón 1 (Tusié-Luna *et al.*, 1991) y con una mutación en exón 10 Pro453 por Ser (Hemberg *et al.*, 1992).

Distintos reportes sugieren que hasta un 45% de los pacientes son heterocigotos compuestos (distintas mutaciones en alelo paterno y materno) y aproximadamente un 20% de todos los alelos en pacientes tienen más de una mutación, sugiriendo que el rango tan amplio de expresión fenotípica es debido a la gran heterogeneidad de alelos mutantes (Speiser *et al.*, 1992b; Wedell and Luthman 1993; Wilson *et al.*, 1995b).

Localización	Mutación	Población general	Referencias	Población Mexicana
E1	W22→Terminación	NR		0
E2	P → 30	17	(Tusié-Luna <i>et al.</i> , 1991)	8.5
I1	A → G	NR		0
I2	A/C → G	26-42	(Higashi <i>et al.</i> , 1991; Owerbach <i>et al.</i> , 1990; Wilson <i>et al.</i> , 1995a)	47.9
E3	P105 → L	NR		0
E3	Del 8 pb	7.5-10	(Wilson <i>et al.</i> , 1995a; Carrera <i>et al.</i> , 1996)	2.1
E4	I172 → N	7.5-10	(Higashi <i>et al.</i> , 1991)	0
E6	Cluster I236 →N V237 →Q M239 →L	3	(Higashi <i>et al.</i> , 1991)	
E71	V281 L	10.6	(Wilson <i>et al.</i> , 1995a)	8.5
E72	Inserción de T	1	(Higashi <i>et al.</i> , 1991; Speiser <i>et al.</i> , 1992b)	1.0
I7	C G	NR		0
E81	G318 →Terminación	3-7	(Globerman <i>et al.</i> , 1988; Owebach <i>et al.</i> , 1990)	4.2
E82	R356→W	14	(Carrera <i>et al.</i> , 1996; Higashi <i>et al.</i> , 1991)	7.4
E9	W406 →Terminación	NR		0
E10	P453→ S	NR		2.1
E10	R483→ P	NR	(Nikoshkov <i>et al.</i> , 1998)	0
Del	Delección del gen CYP21	11-35	(Wilson <i>et al.</i> , 1995a; Araujo <i>et al.</i> , 1996; Owerbach <i>et al.</i> , 1990)	1.0

Tabla 1. Frecuencias alélicas de distintas mutaciones puntuales y la delección del gen CYP21 en población Mexicana (Ordóñez *et al.*, 1998) y otras poblaciones. Se muestran las sustituciones de aminoácidos y los cambios de base para las mutaciones intrónicas. NR = Frecuencia no reportada, Del = Delección del gen, E = Exón, I = Intrón, 0 = no se encontró la mutación.

## CONSECUENCIAS FUNCIONALES DE DISTINTAS MUTACIONES EN EL GEN QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA 21-HIDROXILASA

Ya que la enzima 21-hidroxilasa se expresa únicamente en corteza suprarrenal, no es posible estudiar la actividad de distintas enzimas mutantes directamente en sangre de pacientes como se hace, por ejemplo, para estudiar la actividad de la enzima fenilalanina-hidroxilasa en pacientes con fenilcetonuria (Okano *et al.*, 1991). Sin embargo, mediante estudios de expresión *in vitro*, ha sido posible evaluar el efecto de distintas mutaciones identificadas en pacientes. Utilizando ensayos de expresión en células en cultivo con virus recombinantes de vaccinia, se demostró que la mutación Val281 por Leu conserva una actividad del 20-50% (para hidroxilar progesterona y 17-hidroxiprogesteroa respectivamente), comparada con la exhibida por la enzima normal (Tusié-Luna *et al.*, 1990). La mutación Ile172 por Asn se traduce en una actividad residual del 2% (Tusié-Luna *et al.*, 1990; Chiou *et al.*, 1990), mientras la mutación en Cluster del exón 6 Ile236-Val237-Met239 por Asn-Glu-Lys, y la mutante con la sustitución de Arg356 por Trp no mostraron actividad enzimática (Chiou *et al.*, 1990). En otro estudio relacionado, se mostró que la mutante Pro30 por Leu conservaba un 30% de la actividad normal (Tusié-Luna *et al.*, 1991), mientras que la mutante Pro453 por Ser mostró reducción de la actividad de la enzima hasta de un 50% para hidroxilar 17-hidroxiprogesteroa y de un 20% para metabolizar progesterona (Helmberg *et al.*, 1992).

Las mutaciones puntuales que frecuentemente se asocian a la forma perdedora de sal, inhiben completamente la actividad de la proteína, como la mutación en Cluster en el exón 6 Ile236-Val237, Met239 por Asn-Glu-Lys (Globerman *et al.*, 1988; Tusié-Luna *et al.*, 1990; Speiser *et al.*, 1992b) y la mutación Arg356 por Trp en el exón 8 situada en el posible sitio de unión a sustrato (White, 1987b; Picado and Miller, 1988; Chiou *et al.*, 1990).

La forma virilizante simple ha sido asociada con la mutación de Ile172 por Asn localizada en exón 4, esta mutante conserva una actividad enzimática residual de 1-2% (Tusié-Luna *et al.*, 1990; Chiou *et al.*, 1990). Por último, la forma no clásica se ha asociado con la mutación Val281 por Leu en exón 7, la cual retiene entre un 20-50% de actividad enzimática (Speiser *et al.*, 1988, 1992b), la mutación Pro30 por Leu localizada

en el exón 1, que conserva entre un 30-60% de actividad enzimática (Tusié-Luna *et al.*, 1991) y a una mutación en el exón 10 Pro453 por Ser, que al igual que la mutación anterior resulta en una actividad enzimática disminuida entre un 30-60% de la actividad normal (Hemberg *et al.*, 1992).

## SISTEMA DE EXPRESIÓN PARA LA ENZIMA 21-HIDROXILASA

Entre los distintos sistemas que se han usado para expresar citocromos P450s de mamíferos usando cDNA se pueden mencionar los siguientes: baculovirus para infectar células de insecto en cultivo (Asseffa *et al.*, 1989), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (Wu *et al.*, 1991, 1991; Hu *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1996), virus de vaccinia para infectar células de mamífero en cultivo (Tusié-Luna *et al.*, 1990, 1991; Hemberg *et al.*, 1992), y distintos procedimientos de transfección de células COS-1 entre los que se encuentran: fosfato de calcio, liposomas, electroporación (Chiou *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1991, 1991; Hu *et al.*, 1996; Lajic *et al.*, 1997; Nikoshkov *et al.*, 1997).

La expresión *in vitro* de las proteínas recombinantes de 21 hidroxilasa con el sistema del virus de vaccinia y células COS-1, permite la expresión de niveles altos de la proteína recombinante aproximadamente 2% de la proteína total (Tusié-Luna *et al.*, 1990). Este sistema, difiere de otros en que la transcripción ocurre en el citoplasma de la célula, y posee una autonomía de las funciones de la célula huésped (Mackett *et al.*, 1984). En el sistema de expresión de vaccinia empleado fue posible también incrementar la cantidad de holoenzima mediante la adición exógena de precursores del grupo hemo al medio de cultivo, como protoporfirina IX y transferrina los cuales incrementan la conversión de sustrato en un 15% (Tusié-Luna *et al.*, 1990).

Las células COS-1 además de llevar a cabo la síntesis de proteína recombinante, permiten la inserción de la proteína a la membrana de retículo endoplásmico y su asociación con la NADPH reductasa (que se expresa endogenamente), convirtiendo la proteína sintetizada en funcionalmente activa (Zuber *et al.*, 1987, 1988).

## ESTUDIOS DE CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO EN LA DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA.

Los pacientes con deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa muestran una gama de fenotipos clínicos, que van desde las formas más severas con signos de virilización y desbalance electrolítico en pacientes recién nacidos, hasta las formas aparentemente asintomáticas presentes en adultos jóvenes. Esta gran heterogeneidad en la presentación clínica se explica al menos parcialmente, por la gran heterogeneidad de alelos mutantes. Distintos reportes sugieren que hasta un 45% de los pacientes son heterocigotos compuestos (poseen distintas mutaciones en cada uno de los genes paterno y materno) y aproximadamente un 20% de todos los alelos en pacientes tienen más de una mutación *e.g.* alelos con mutaciones múltiples, (Speiser *et al.*, 1992b; Wedell and Luthman, 1993; Wilson *et al.*, 1995b).

Algunas mutaciones se han asociado más frecuentemente a un determinado fenotipo clínico (*e.g.* mutaciones sin sentido se encuentran frecuentemente en pacientes con el tipo perdedor de sal). Sin embargo, existen pacientes donde las mutaciones identificadas no parecen correlacionar con el grado de afectación clínica. Para algunos de estos pacientes en donde las mutaciones identificadas dentro de la región codificadora y/o los intrones del gen predicen un fenotipo clínico atenuado, se ha postulado que pudieran existir adicionalmente, mutaciones en la región promotora del gen que tuvieran un efecto negativo sobre la transcripción del mismo (Wilson *et al.*, 1995b). Por otro lado, en aquellos pacientes portadores de mutaciones severas que afectan gravemente la función de la proteína y que no muestran un cuadro clínico grave, se ha postulado la existencia de otro citocromo P450 expresado fuera de la glándula suprarrenal, que pudiera sustituir al menos parcialmente la función de la enzima 21-hidroxilasa (Mellon *et al.*, 1989).

Adicionalmente, se ha reportado que la combinación de distintas mutaciones parecen tener un efecto sinérgico sobre la alteración de la actividad enzimática (Nikoshkov *et al.*, 1997). Esto sugiere que la combinación, el número y tipo de mutaciones presentes en un mismo alelo o bien en distintos alelos determina el grado de actividad enzimática *in vivo*. Por lo tanto, estudios de expresión *in vitro* utilizando cDNAs con mutaciones múltiples o bien estudios de co-expresión de distintas formas

mutantes podrían ser útiles para el establecimiento de la correlación fenotipo-genotipo en esta entidad clínica.

## RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA

Mediante el alineamiento de secuencia de cinco citocromos P450s bacterianos, entre los que se encuentran: P450bm-3 (Ravichandran *et al.*, 1993), P450cam (Raag *et al.*, 1993), P450terp (Hasemann *et al.*, 1994), P450eryf (Cupp-Vicker and Poulos, 1995), y P450nor (Park *et al.*, 1997), se propuso un modelo de estructura tridimensional (3D) para la enzima 21-hidroxilasa de humano. Este modelo se basa en el alineamiento del citocromo P450bm-3, el que es más parecido estructuralmente al de los mamíferos, compartiendo una identidad de secuencia de 22.7% con la enzima 21-hidroxilasa.

Estructuralmente, la molécula de 21-hidroxilasa puede dividirse en dos regiones: la región amino terminal, con una identidad de secuencia del 15% y la región carboxilo-terminal de un 25% con respecto al citocromo P450bm-3. La mayoría de los aminoácidos conservados se localizan en la parte carboxilo-terminal, mientras que en la parte amino se encuentran los cambios más importantes en la secuencia de la proteína.

En este alineamiento se observa que coinciden perfectamente elementos de la estructura secundaria, sin embargo existen regiones no conservadas entre las cuales se encuentran: la hélice B, la región carboxilo terminal de la hélice F y el extremo amino terminal de la hélice G. Existen también diferencias entre las longitudes de las hélices F y G así como en la unión entre ambas (Gotoh, 1992). Las hélices B muestran distintas orientaciones en los diferentes P450 y no siempre están presentes (Poulos, 1995).

En base a la variabilidad de las secuencias de los citocromos P450s se definieron seis regiones estructuralmente importantes (SRSs) entre las que se encuentran: a) la región SRS1 cercana a la hélice B, b) la región SRS2 que se localiza en el extremo carboxilo-terminal de la hélice F, c) la región SRS3 se localiza en extremo amino-terminal de la hélice G, d) la región SRS4 que se localiza en el centro de la hélice I, e) la región SRS5 se localiza después de la hélice K y la integra una parte de la cadena 4 de

la hoja 1 y, por último, f) la región SRS6 que se localiza en el giro entre la cadena 1 de la hoja 4 y el extremo de la hoja 6 (Gotoh 1992, Fig. 3).

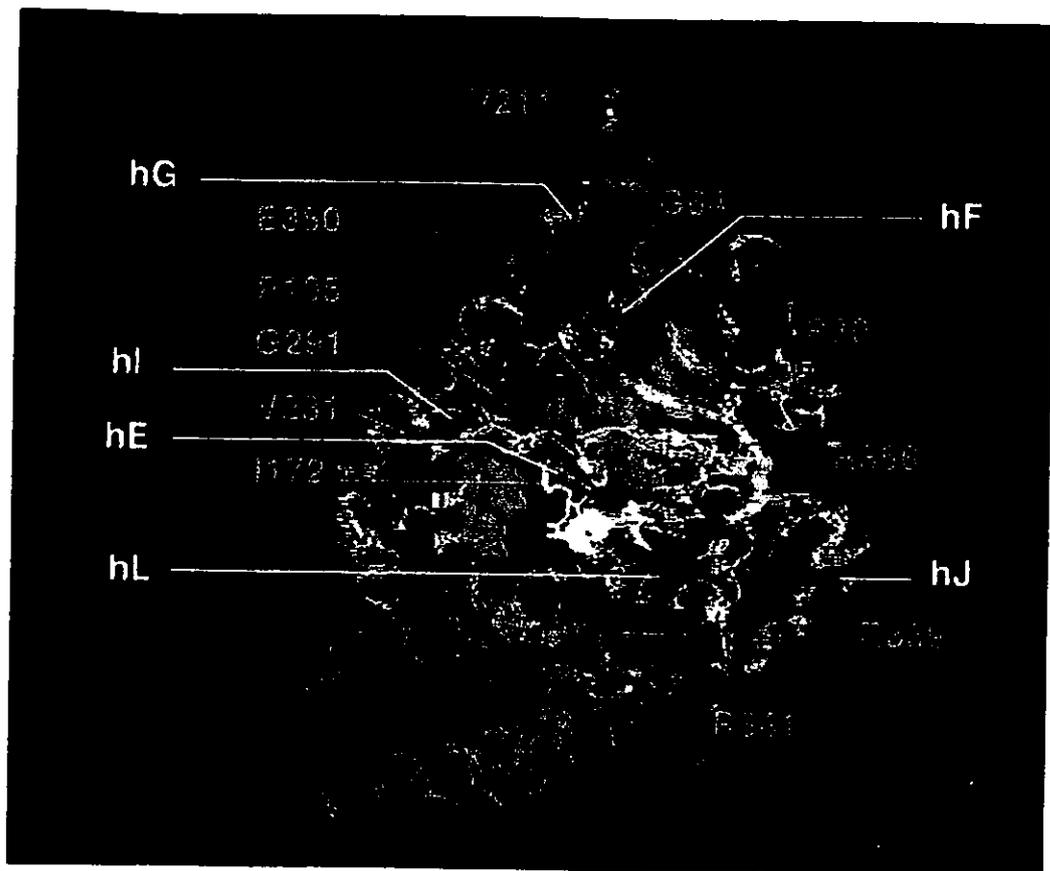


Figura 3. Modelo de la estructura tridimensional de la proteína 21-hidroxilasa de humano. Se muestran las hélices y los residuos afectados por algunas mutaciones. La región de aminoácidos en donde se encuentra el residuo de Cisteína se muestra en color amarillo, y los residuos que participan en la interacción redox se muestran en color verde. Figura tomada de Mornet and Gibrat (2000).

## Dominios específicos de la proteína

Dentro de los residuos conservados en la estructura tridimensional de la proteína se encuentran Glu 351 y Arg 354 en la hélice K y Arg 408, así como los residuos Tyr 295 y Glu 294 localizados en la mitad de la hélice I, que pueden ser importantes para la catálisis.

El residuo Cys 428 es el que se une covalentemente al grupo hemo, pero se necesitan cuatro residuos más para que exista una coordinación apropiada, entre los que se encuentran el residuo Arg 426 (localizado en la hendidura Cys), los residuos Trp 116 y Lys 120 que se localizan en la hélice C (en el caso de P450<sub>bm-3</sub> Trp 96 e His 100 respectivamente) y, finalmente, un residuo cargado positivamente que en la mayoría de los P450 es uno, pero que en 21-hidroxilasa son dos, His 365 y Arg 366.

En la tabla 2 se resumen las regiones y los residuos involucrados en el contacto con el sustrato, entre los que se encuentran los residuos de la hoja 1, especialmente aquellos que se localizan en las cadenas 2, 3 y 4 y los residuos pequeños de la hélice A.

Cadena $\beta$ 1-2	R47, Y51	
Cadena $\beta$ 1-4	P329, A330	SRS5
Cadena $\beta$ 1-3	M354	
Hélice A	L29	
Hélice B'	L75, V78	SRS1
Hélice I	I263, A264	SRS4
Retorno $\beta$	L437, T438	SRS6

Tabla 2. Residuos involucrados en contacto con el sustrato de acuerdo a Li and Poulos (1997).

Por último, se ha propuesto que los extremos del giro entre las hélices F y G puede ser la entrada al sitio activo.

## **Localización de las mutaciones reportadas en pacientes dentro del modelo tridimensional de la proteína.**

Para cada aminoácido conservado así como para cada mutación reportada en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa se identificó la localización del aminoácido correspondiente en el modelo tridimensional (Mornet and Gibrat, 2000; Zurutuza *et al* .,1999). Este modelo permitió definir regiones funcionalmente importantes en la molécula, entre las que se encuentran: 1) los aminoácidos vecinos al grupo hemo, 2) los aminoácidos del sitio catalítico de la enzima, 3) los dominios de unión a sustrato y 4) el grupo de aminoácidos que definen la interacción con el sistema de oxido-reducción.

La correlación entre los datos clínicos aunado al efecto funcional que provocan distintas mutaciones, permitió proponer el posible efecto de cada una de estas mutaciones sobre la estructura tridimensional y la función de la proteína. Dichos efectos pueden explicarse por la localización del aminoácido en la estructura, y por la naturaleza bioquímica de estos cambios, entre los que pudieran encontrarse rupturas de enlaces de puentes de hidrógeno, la compactación de la estructura tridimensional, y cambios en la hidrofobicidad.

## **CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DESCRITAS DE MUTANTES DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA**

### **Mutante I172N (Ile→Asn)**

Esta mutación se ha asociado con más frecuencia a pacientes con el fenotipo virilizante simple de HSC (Amor *et al.*, 1988). Mediante estudios de expresión *in vitro* con proteínas recombinantes se mostró que esta enzima mutante retenía entre el 1 y 2% de la actividad enzimática (Chiou *et al.*, 1990; Tusié-Luna *et al.*, 1990).

El residuo Ile (Isoleucina) en la posición 172, se encuentra conservado entre citocromos P450s de distintas especies, lo cual sugiere que puede tener una función importante en la estructura de la proteína (Nelson and Strobel, 1988). El residuo

correspondiente en el citocromo P450IIB forma parte de la señal de anclaje a la membrana (Monier *et al.*, 1988) y se ha propuesto que pudiera tener un papel similar en la enzima humana (Amor *et al.*, 1988; Chiou *et al.*, 1990).

En estudios de expresión de la proteína mutante en células eucariontes en cultivo se determinó mediante fraccionamiento subcelular e inmunodetección que esta proteína se encontraba en el citosol (Tusié-Luna *et al.*, 1990).

En un estudio relacionado, al expresar la proteína mutante en una línea celular estable de rata, se demostró mediante inmunofluorescencia que la proteína se encontraba unida a membrana de retículo endoplásmico (Hsu *et al.*, 1996).

A través de un ensayo de transcripción-traducción *in vitro*, se evaluó la integración a la membrana, la separación de las fracciones soluble e insoluble (unida a membrana), se demostró que la proteína tiene una integración eficiente a la membrana (Hsu *et al.*, 1996).

Al expresar la proteína en levaduras y purificarla parcialmente a partir de microsomas, se demostró mediante digestión con proteinasa K la presencia de una conformación parcialmente desplegada de la proteína (Hsu *et al.*, 1996).

En dicho estudio se determinó mediante inmunoprecipitación que la cantidad de apoproteína sintetizada es la misma que para la enzima silvestre, pero al cuantificarla mediante espectroscopia diferencial se determinó que solo un 10% de la proteína se encontraba como holoenzima (hemoproteína), lo cual permitió sugerir que tiene una eficiencia disminuida para incorporar el grupo hemo. El efecto tan drástico sobre la actividad de la enzima se le atribuye al efecto combinado del cambio conformacional y el menor contenido de holoenzima (Hsu *et al.*, 1996).

### **Mutante V281L (Val→Leu)**

Es la mutación más frecuentemente asociada al fenotipo no clásico de HSC.

Mediante ensayos de expresión *in vitro* con virus recombinantes se mostró que conserva una actividad enzimática del 25 y 50% (para hidroxilar progesterona y 17-hidroxiprogesterona, respectivamente). Mediante fraccionamiento subcelular se

demonstró que esta proteína mutante se encontraba tanto en citosol como en membrana microsomal (Tusié-Luna *et al.*, 1991).

En un estudio de expresión utilizando células de eucarionte, se determinaron los niveles de hemoproteína mediante espectroscopia diferencial, encontrándose que solo el 20% de la proteína esta como holoenzima, por lo que se propuso que la pérdida de actividad enzimática de esta mutante puede deberse a la reducción en los niveles de proteína funcional (Wu and Chung, 1991).

Mediante el modelo de estructura tridimensional propuesto recientemente para la enzima 21-hidroxilasa, se le ha atribuido a esta mutación un posible efecto estructural, modificando débilmente la orientación de la hélice I. Este efecto es similar al de la mutante I172N, pero con consecuencias menos severas sobre la incorporación del grupo hemo (Mornet and Gibrat, 2000).

#### **Mutante en "Cluster" (Ile236, Val237, Met239 →Asn-Glu-Lys)**

Esta sustitución de tres aminoácidos contiguos en las posiciones 236-239 se encuentra en el pseudogen (CYP21P) y se postula que estas mutaciones son transferidas al gen funcional mediante eventos de conversión génica, ya que en pacientes siempre se observan estas tres sustituciones juntas. (Tusié-Luna *et al.*, 1990; Speiser *et al.*, 1992b). Esta mutación en Cluster se asocia frecuentemente al fenotipo perdedor de sal. En ensayos de expresión *in vitro* se demostró que esta proteína no tiene actividad enzimática (Tusié-Luna *et al.*, 1990).

De acuerdo al modelo tridimensional propuesto, estas mutaciones se localizan en la hélice G, la cual junto con la hélice F son importantes para el reconocimiento del sustrato. Aunque la mutación en Cluster se localiza lejos del sitio de unión al sustrato y estos aminoácidos no interactúan directamente con él, estas sustituciones modifican fuertemente la interacción hidrofóbico-hidrofílico de la hélice G por ser sustituciones que reemplazan aminoácidos hidrofóbicos por polares. Por lo anterior, se propone que

estas mutaciones podrían desestabilizar la hélice G y perturbar así la estructura y la función de la proteína (Mornet and Gibrat, 2000).

### **Mutante R356W (Arg→Trp)**

Es una de las mutaciones más comunes asociada al fenotipo perdedor de sal de HSC (Chiou *et al.*, 1990).

Mediante sistemas de expresión *in vitro* empleando células eucariontes en cultivo se demostró que está mutante no tiene actividad enzimática (Chiou *et al.*, 1990), similar a lo que ocurre con la mutante en Cluster.

Adicionalmente, a la mutación R356W, se han descrito en pacientes dos sustituciones distintas en la misma posición, R356P y R356Q. Mediante experimentos de expresión *in vitro* se ha determinado el efecto de cada una de ellas sobre la actividad de la enzima (0.15 y 0.65% de actividad enzimática residual respectivamente) (Helmberg *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1992; Lajic *et al.*, 1997).

La sustitución R356W se localiza en una región altamente conservada en otros citocromos que metabolizan esteroides, que incluye los aminoácidos 342-358, en donde se requiere la presencia de un aminoácido cargado en la posición 356. Inicialmente, esta región se había propuesto que participaba como dominio de unión a sustrato (White 1987b; Picado and Miller, 1988). Sin embargo, de acuerdo a modelos más recientes de estructura del P450arom (bacteriano) y P450c17 (de humano), el sitio de unión a esteroide se localiza en la parte opuesta a la superficie de la molécula, es decir en contacto con la membrana microsomal (Graham-Lorence *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1997). Esto llevó a proponer que esta región podría interactuar con el sistema de oxidoreducción (Miller *et al.*, 1997).

Mediante el alineamiento de secuencias de las regiones de aminoácidos 346-369 de la enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa y 338-361 de 21-hidroxilasa (P450c21) de humano, se identificó un dominio que contiene cinco residuos de arginina (R) en la secuencia de P450c17 en las posiciones: 347, 349, 358, 362 y 364, de los cuales cuatro se conservan en 21-hidroxilasa (Fig. 4). Ya que mutaciones que cambian un aminoácido por otro

dentro de este grupo de residuos de argininas, tienen un efecto drástico sobre la función de la enzima, se propuso que los cuatro residuos de arginina presentes en este dominio de 21-hidroxilasa (entre los que se encuentra R356) podrían participar de forma semejante en la interacción redox, mediante las fuerzas electrostáticas que aportan los residuos de aminoácidos cargados positivamente (Lajic *et al.*, 1997).

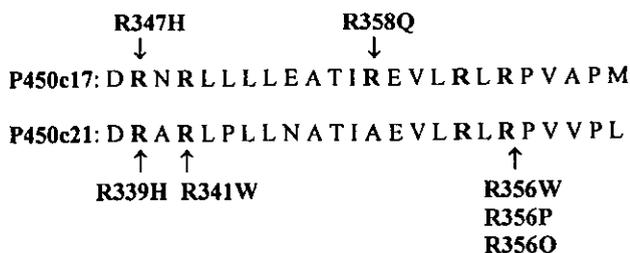


Figura 4. Alineamiento de aminoácidos 346-369 y 338-361 de las proteínas 17 $\alpha$ -hidroxilasa (P450c17) y 21-hidroxilasa (P450c21) de humano. Se muestran los residuos de Arginina ( R ) conservados en ambas proteínas y además las sustituciones de aminoácidos como resultado de las mutaciones identificadas en paciente.

Sin embargo, basados en el modelo de estructura tridimensional que se propuso para la enzima humana, el residuo de R356 en P450c21, no podría estar involucrado directamente en la interacción redox, por lo tanto, se proponen otras explicaciones al posible papel que pudiera jugar este residuo de la proteína: 1) tener efecto sobre la estructura tridimensional de la proteína, 2) participar como dominio de unión a sustrato o bien, 3) interferir con el flujo de electrones entre la reductasa y el hemo (Mornet and Gibrat 2000).

En la siguiente tabla se resumen las características estructurales y funcionales propuestas para las distintas mutantes de la enzima 21-hidroxilasa

<b>CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES</b>	<b>I172N</b>	<b>V281L</b>	<b>Cluster</b>	<b>R356W</b>
<b>Efecto sobre la estructura tridimensional</b>	Parcialmente desplegada (Hsu <i>et al.</i> , 1996)  Menos compacta (Hsu <i>et al.</i> , 1996)  Posiblemente desestabiliza a la hélice I, provocando un defecto en la incorporación del hemo (Mornet and Gibrat, 2000)	Probablemente modifica débilmente la orientación de la hélice I, provocando un defecto en la incorporación del hemo (Mornet and Gibrat, 2000)	Podría desestabilizar la hélice G, la cual es importante para el reconocimiento del sustrato (Mornet and Gibrat, 2000)	Posible efecto sobre la estructura 3D (altamente conservado en los distintos P450s (Mornet and Gibrat, 2000)
<b>Niveles de hemoproteína %</b>	10	20	NE	NE
<b>Unión a sustrato</b>	NE	NE	Podría provocar un efecto indirecto sobre la unión a sustrato (Mornet and Gibrat, 2000)	Posible participación (Mornet and Gibrat, 2000)
<b>Transporte de electrones</b>	NE	NE	NE	Posible interferencia entre la reductasa y el hemo (Mornet and Gibrat, 2000)

Tabla 3. Características estructurales y funcionales de las mutantes de la enzima 21-hidroxilasa. Se muestran las características estructurales descritas para las distintas mutantes de la enzima 21-hidroxilasa. NE= no se ha estudiado.

## Constantes cinéticas descritas de la enzima silvestre y dos mutantes de 21-hidroxisilasa

Mediante el sistema de expresión de proteínas recombinantes con el virus de vaccinia en células COS-1, se determinaron a partir del lisado celular y usando 17-hidroxiprogesterona como sustrato las constantes cinéticas para la enzima silvestre y dos mutantes de 21-hidroxisilasa mostradas en la siguiente Tabla.

CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS	WT	V281L	I172N
Actividad %	100	50	2
K <sub>m</sub> (μM)	1.2	1.2	2.4
V <sub>max</sub> (pmol/min/mg)	53.0	27.7	0.6

Tabla 4. Características cinéticas de las enzimas silvestre y mutantes de 21-hidroxisilasa. Se determinaron utilizando ensayos de expresión de proteínas recombinantes como se describe en Tusié-Luna (1990).

## Planteamiento del problema

La HSC se debe a mutaciones en el gen de la enzima 21-hidroxilasa en más del 90% de los pacientes. Este padecimiento se hereda de forma autosómica recesiva donde ambos padres son portadores de un alelo mutante. La expresión de la enzima 21-hidroxilasa se restringe a la corteza suprarrenal. Por lo tanto no es posible estudiar el efecto de distintas mutaciones sobre la actividad enzimática directamente en pacientes con HSC. Por ello, se han realizado estudios de expresión *in vitro* de distintas formas mutantes de la enzima y con estos resultados se ha correlacionado la actividad enzimática con el fenotipo clínico de las pacientes. En estos estudios se han identificado pacientes donde el fenotipo clínico es más severo del que podría predecirse por la disminución de la actividad de las formas mutantes expresadas *in vitro*. Esto sugiere que la combinación de algunas formas mutantes podría tener un efecto mayor sobre el abatimiento de la actividad enzimática, de lo que se anticipa en función de su expresión de manera independiente.

## **HIPÓTESIS**

Existen formas mutantes de la enzima 21-hidroxilasa con un posible efecto dominante negativo.

## **OBJETIVOS**

- Construcción del virus recombinante conteniendo el clon silvestre de la enzima 21-hidroxilasa.
- Evaluar el posible efecto de la combinación de distintas formas mutantes sobre la actividad de la enzima 21-hidroxilasa.

## **HIPÓTESIS**

Existen formas mutantes de la enzima 21-hidroxilasa con un posible efecto dominante negativo.

## **OBJETIVOS**

- Construcción del virus recombinante conteniendo el clon silvestre de la enzima 21-hidroxilasa.
- Evaluar el posible efecto de la combinación de distintas formas mutantes sobre la actividad de la enzima 21-hidroxilasa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CONSTRUCCIÓN DEL VIRUS RECOMBINANTE DE VACCINIA

Las líneas celulares COS-1 y Tk-143 se obtuvieron de American Type Culture Cell collection (ATCC). Las células fueron crecidas en medio DMEM (*In Vitro*, México) y suplementadas 1X con; antibiótico antimicótico (Gibco BRL), L-glutamina (*In Vitro*), aminoácidos no esenciales (*In Vitro*) y 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco BRL). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C, en atmósfera de bióxido de carbono. Ambos tipos celulares crecen en monocapa.

El virus recombinante de vaccinia se obtuvo a través de recombinación homóloga mediante la co-transfección del plásmido pC21-T7 linearizado (10 µg) (conteniendo el cDNA de 21-hidroxilasa) y un virus nativo de vaccinia a una multiplicidad de infección de tres virus por célula 3:1 (Fig. 5). Después de 48 horas, las células se despegaron del plato con espátula, se recuperaron con el medio de cultivo en un tubo cónico y se lisaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación, obteniéndose un lisado celular con las partículas virales.

Este lisado se analizó para determinar la presencia del virus recombinante (virus con el fenotipo TK-) mediante la infección de un cultivo de células TK-143 crecidas en presencia de 25 µg/ml de 5-bromodideoxiuridina (Amersham).

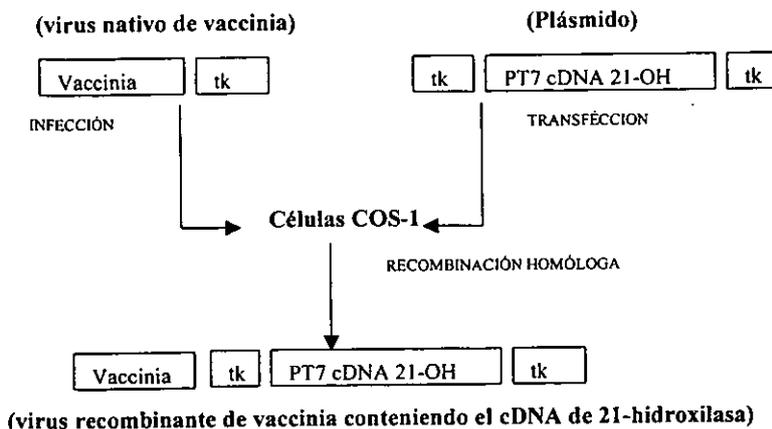


Figura 5. Introducción del cDNA de 21-hidroxilasa (P450c21) dentro del genoma del virus de vaccinia. El cDNA está dentro del vector pC21-T7, se encuentra flanqueado por regiones del promotor y terminador T7, las cuales son reconocidas por la T7 RNA polimerasa. El plásmido pC21T7 se transfecta en células COS-1 previamente infectadas con el virus nativo de vaccinia. Dentro de las células se lleva a cabo el proceso de recombinación homóloga entre el gen de timidina kinasa (tk) viral y la porción del gen tk del vector, lo cual da como resultado la incorporación del cDNA P450c21 dentro del genoma viral.

## IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS RECOMBINANTE

Ya que durante el proceso de selección con BrDú se obtienen virus con el fenotipo TK- que corresponden a mutantes espontáneos y no contienen el inserto de cDNA deseado, se realiza una segunda selección a través de amplificar a partir de DNA viral secuencias específicas del cDNA de 21-hidroxilasa por medio de PCR.

Para ello se infectaron células TK-143 con distintas diluciones del lisado celular, con el fin de identificar la dilución a la cual se obtienen placas de lisis independientes (Fig. 6). Se obtuvo crecimiento de placas independientes a la dilución  $10^{-2}$ . A esta dilución se infectaron múltiples cajas para recobrar DNA viral de 48 placas individuales (clonas).

Posteriormente estas clonas (en series de 12) se amplificaron infectando células TK-143, hasta tener una densidad que permitiera extraer DNA total por el método de fenol. Este DNA se utilizó como molde para la amplificación de un fragmento específico del cDNA de 21-hidroxilasa a través de PCR. El fragmento de amplificación corresponde a un segmento de los exones 3 al 5 y tiene una longitud de 323 pb.

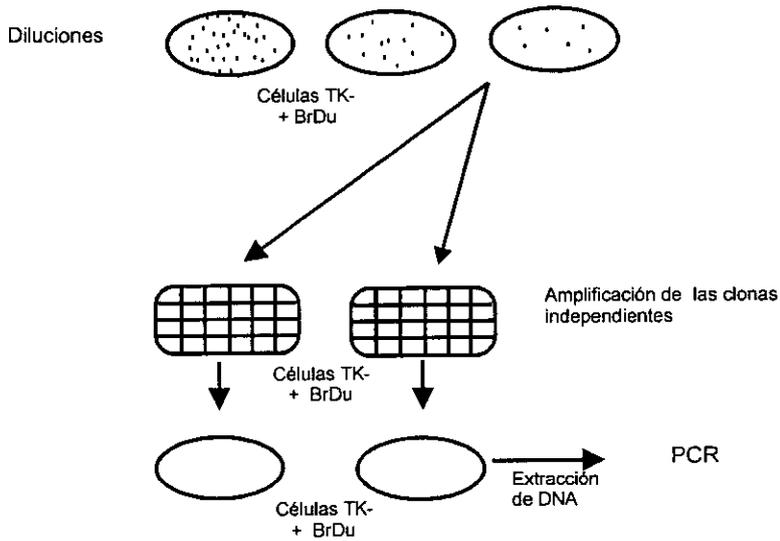


Figura 6. **Procedimiento de identificación del virus recombinante.** Se probaron distintas diluciones del lisado celular en células TK- en presencia de BrDu, posteriormente se aislaron cada una de las clonas y se infectaron por separado con cada una de ellas múltiples cajas de cultivo de células TK-, de las cuales se extrajo el DNA viral que se usó como molde para amplificar mediante PCR una región del cDNA de 21-hidroxilasa.

### **Extracción de DNA viral a partir de los lisados celulares**

Como controles de amplificación se seleccionaron lisados celulares de células infectadas con un virus de vaccinia que tiene integrado el gen de la T7 polimerasa (vTF7, control negativo), así como un lisado celular de células infectadas con un virus recombinante de vaccinia conteniendo una mutante del cDNA de 21-hidroxilasa (vC21-V281L, control positivo). Para llevar a cabo la obtención del DNA total se infectaron células con los distintos virus (virus provenientes de las distintas placas a seleccionar, vTF7 o vC21-V281L) y después de 48 hrs. las células fueron lavadas con PBS frío y despegadas del plato con espátula. El lisado celular se centrifugó a 1,500 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla se congeló en etanol-hielo seco por 30 segundos, se resuspendió en amortiguador hipotónico (Hepes 10 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.9) y se centrifugó a 3,500 rpm por 10 minutos. En este paso en la pastilla quedaron proteínas nucleares y en el sobrenadante las proteínas citoplasmáticas a partir del cual se extrae el DNA.

Al sobrenadante se adicionó un volumen igual de la mezcla fenol:cloroformo:isoamílico (50:48:2), se centrifuga a 3,000 rpm por 30 minutos y se recupera la fase acuosa a la cual se le añade un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se centrifuga a 3,000 rpm por 30 minutos, recuperando la fase acuosa a partir de la cual se precipita el DNA con acetato de sodio (0.3 M) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío mediante centrifugación a 3,000 rpm por 30 minutos. La pastilla de DNA se lavó con 50 µl de etanol al 70%, se resuspendió en amortiguador TE (Tris 10 mM-EDTA 0.1mM). Se cuantificó el DNA por espectrofotometría a 260 nm y se almacenó a 4°C hasta su utilización.

### **Amplificación en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción de PCR se realizó con el kit de PCR Ampligene de Perkin Elmer. La mezcla de reacción se hizo con 40 ng de DNA viral, 5 µl de amortiguador II para PCR 10X, 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl de cada dNTPs 10mM, 1.5 µl de formamida, 0.5 µl de albúmina 0.1 mg, 1 µl de cada uno de los oligos E3s y E5a a una concentración de

50 ng/μl y 0.5 μl de Taq polimerasa 5 U/μl de Perkin Elmer. Las condiciones de amplificación fueron, una desnaturalización inicial de 94°C 5 min. seguida de 35 ciclos de desnaturalización (94°C x 1 min.), alineamiento (57°C x 1.5 min.), extensión (72°C x 3 min.) y una extensión final a 72°C por 10 min. utilizando un equipo de PCR GeneAmp 9600 (Perkin-Elmer). El volumen final fue de 50 μl. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Secuencia	Localización	Fragmento de amplificación
5'TGTCCTTGGGAGACTAC 3'	E3	323 pb
5'CTGACTAAGGGAAAGAGTCC 3'	E5	

Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para amplificar la región del gen de 21-hidroxilasa. Se indica la localización y el tamaño del fragmento de amplificación. E3 =exón 3, E5 =exón 5.

#### Amplificación y titulación de las clonas virales.

Para llevar a cabo la amplificación de las clonas virales (vC21 clona silvestre y las distintas mutantes: V281L, I172N, R356W y Cluster), se infectaron células COS-1 (20 a 25 cajas de 100 mm) sembradas a una confluencia de 85-90% con cada uno de los virus, después de 48 horas, las células se despegaron del plato con espátula y se recuperaron junto con el medio en un tubo cónico y se obtuvo un lisado celular mediante tres ciclos de congelación-descongelación.

Para conocer el título de cada uno de los lisados celulares (número de partículas virales en cada uno de ellos) se infectaron células con diferentes diluciones, se contó el número de placas de infección en el plato de cultivo (previamente fijado con formaldehído al 2% y teñido con cristal violeta) y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de partículas virales (ml)} = \frac{\text{Número de placas de infección}}{\text{dilución}}$$

## VIRUS RECOMBINANTES DISPONIBLES CONTENIENDO EL cDNA DE LA FORMA SILVESTRE Y LAS DISTINTAS MUTANTES DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA

Se tienen en el laboratorio 5 distintos virus recombinantes: 1) vC21 conteniendo el cDNA de la forma silvestre o normal del cDNA, (el cual se obtuvo como uno de los objetivos de esta tesis), 2) vC21-V281L que contiene una sustitución de una G → T que da como resultado la sustitución de una Valina por Leucina en el codon 281 (Val 281 → Leu), 3) vC21-I172N que contiene una sustitución de una T → A que da como resultado la sustitución de una Isoleucina por Asparagina en el codon 172 (Ile 172 → Asn), 4) vC21-R356W que contiene una sustitución de una C → T que da como resultado la sustitución de una Arginina por Triptofano en el codon 356 (Arg 356 → Trp) y 5) vC21-Cluster que contiene tres sustituciones de una T → A que dan como resultado sustituciones en los codones 236, 237 y 239 (Ile-Val-Met → Asn-Glu-Lys). Los últimos cuatro virus recombinantes se diseñaron y aislaron como resultado de un trabajo previo, Tusié-Luna (1990).

## EXPRESIÓN DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA EN CÉLULAS EN CULTIVO

La infección del virus de vaccinia a células en cultivo genera un sistema de expresión transitoria, que se basa en la síntesis intracelular de una T7 RNA polimerasa codificada por un virus de vaccinia (vTF7) bajo el control de un promotor viral (p7.5). La polimerasa T7 tiene una especificidad estricta por su promotor. La expresión del cDNA de 21-hidroxilasa está dirigida por este promotor. Por lo tanto, la expresión de la enzima 21-hidroxilasa (P450c21) ocurre solamente en células infectadas con ambos virus recombinantes vC21 y vTF7 (Fig. 7).

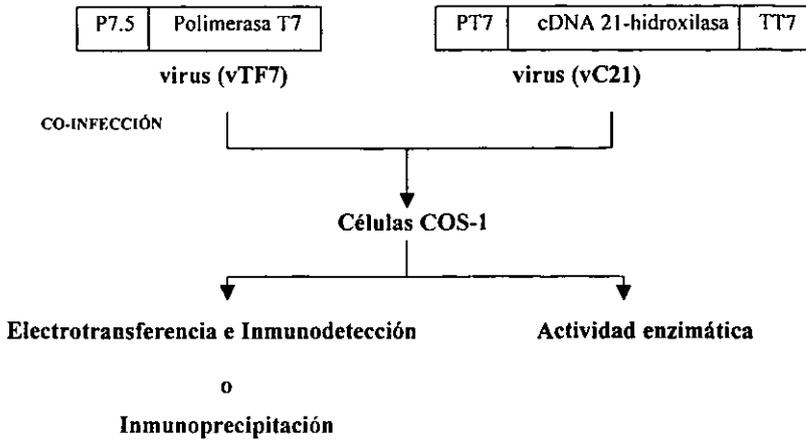


Figura 7. Expresión de la enzima 21-hidroxilasa en cultivo celular. Se lleva a cabo en células COS-1, mediante la coinfección del virus de vaccinia que codifica para la polimerasa T7 (vTF7) y el virus que contiene el cDNA de 21-hidroxilasa bajo el control del promotor de la polimerasa T7 (vC21). La síntesis de la proteína puede ser monitoreada por inmunodetección o mediante un ensayo de actividad enzimática.

### ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Consistió en evaluar la actividad de la enzima 21-hidroxilasa en células COS-1 18 horas después de la infección. El virus vTF7 es introducido simultáneamente con el vC21 silvestre o con cada uno de los virus recombinantes conteniendo los cDNA de las distintas mutantes V281L, R356W, I172N y Cluster, respectivamente, a una multiplicidad de infección de 500:1 en el ensayo funcional de la clona silvestre o 500:0.25 para la co-expresión (vTF7: vC21). Después de 18 hrs. de infección, se adiciona a las células medio que contiene  $0.5 \mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -17-hidroxiprogesterona (0.25 mCi/mmol de actividad específica, New England Nuclear) y  $2 \mu\text{M}$  de esteroide no marcado,  $10 \mu\text{g/ml}$  de protoporfirina IX y  $18 \mu\text{g/ml}$  de transferrina, se incuba por 6 a 8 hrs. El medio se colecta para extraer la fase orgánica con cloruro de metileno. El sustrato y el producto son resueltos por cromatografía en capa fina en placas de sílica gel con indicador de fluorescencia, empleando como fase móvil una mezcla de

cloroformo:acetona 70:30 y como controles estándares sustrato y producto no marcados.

La actividad enzimática se determinó como porcentaje de conversión de sustrato a producto, al recortar de la cromatografía en capa fina el área que ocupan el sustrato y el producto, cuantificando la radioactividad, empleando un contador de centelleo de emisiones  $\beta$  modelo MINAXI  $\beta$  TRI-CARB 4000 SERIES (Packard).

Para considerar las variaciones intra-ensayo, tanto la co-expresión de diferentes mutantes de la enzima como la expresión de manera independiente, se hizo por duplicado en al menos tres procesos de infección independientes.

### **ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CO-EXPRESANDO DISTINTAS FORMAS DE LA ENZIMA ( SILVESTRE O MUTANTES)**

Los ensayos de actividad enzimática para valorar el efecto de la co-expresión de distintas mutantes se hizo en células completas. Para estos ensayos se probaron distintas multiplicidades de infección así como distintos tiempos de incubación con el sustrato marcado, con el fin de seleccionar aquellas condiciones experimentales que nos permitieran determinar la actividad enzimática durante la fase lineal de la reacción, como se muestra en las figuras 8 y 9. La multiplicidad de infección seleccionada fue de 0.25:1 (una partícula viral por cada 4 células) y un tiempo de incubación de 6 hrs.

El efecto de la co-expresión de las distintas formas mutantes sobre la actividad enzimática se comparó con la actividad exhibida por cada una de las formas de la enzima (silvestre y mutantes) de manera independiente. Es decir, en un mismo experimento se determina por duplicado la actividad de la enzima silvestre y de la mutante (o bien de dos mutantes) cuando se expresa de manera independiente a multiplicidad de infección de 0.25. Simultáneamente, se determina la actividad cuando ambas enzimas se expresan en la misma célula a multiplicidad de infección de 0.25 por cada una. Si la co-expresión de la enzima mutante no muestra ningún efecto sobre la actividad de la enzima silvestre (o de otra mutante) el porcentaje de conversión de

sustrato a producto no se modifica, es decir, este es similar al porcentaje de conversión resultado de la suma de ambas. Por el contrario, si la co-expresión de la enzima mutante con la silvestre (o con otra mutante) tiene algún efecto sobre la actividad enzimática, el porcentaje de conversión de sustrato a producto será distinto a la suma de ambas cuando son expresadas de manera independiente. Asumimos que la presencia o ausencia de este efecto refleja indirectamente la alteración (estructural o funcional) de la proteína mutante.

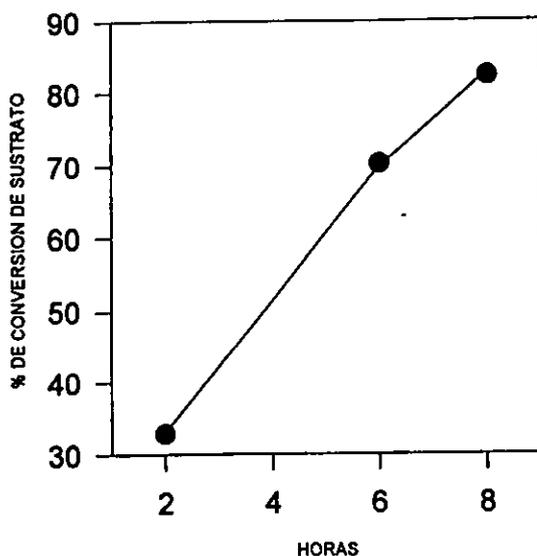


Figura 8. Porcentaje de conversión de sustrato de la enzima silvestre (WT) a distintos tiempos de incubación. Las células COS-1 se infectaron con el virus vTF7 como control negativo, (a una multiplicidad de infección de 500 virus por célula) o simultáneamente con los virus vTF7 y vC21 silvestre WT (a una multiplicidad de infección de 500:1 vTF:vC21 por célula). El porcentaje de conversión de sustrato ( $^3\text{H}$  17-hidroxiprogesterona) a producto (11-desoxicortisol), se determinó a las 2, 6 y 8 horas después de la adición del sustrato marcado.

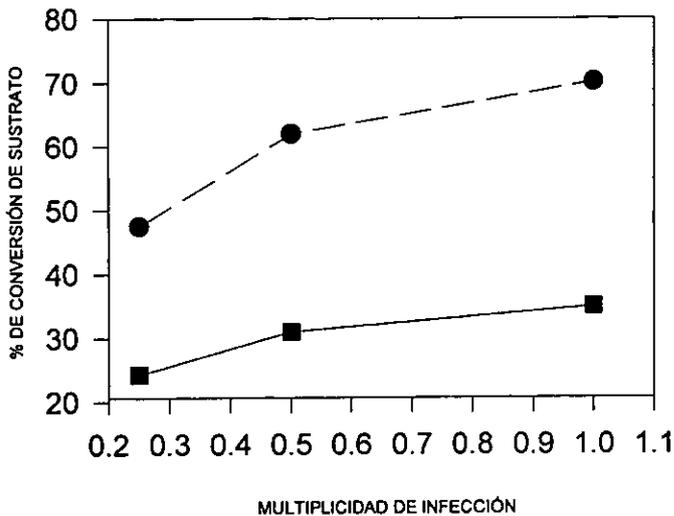


Figura 9. Porcentaje de conversión de sustrato de la enzima silvestre (WT) y V281L utilizando distintas multiplicidades de infección. Las células COS-1 se infectaron con el virus vTF7 como control negativo (a multiplicidad de infección de 500 virus por célula), o simultáneamente con los virus vTF7 (a multiplicidad de infección de 500 virus por célula) y vC21 silvestre WT o vC21 V281L a distintas multiplicidades de infección (0.25, 0.5 y 1). La determinación del porcentaje de conversión se hizo 6 horas después de la adición del sustrato. Las células infectadas únicamente con el virus VTF no muestran conversión de sustrato a producto. CIRCULOS Conversión de sustrato a producto por la enzima silvestre Y CUADROS conversión de sustrato a producto por la enzima mutante V281L.

## RESULTADOS

### IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS RECOMBINANTE DE VACCINIA CONTENIENDO EL CLON SILVESTRE

De seis clonas analizadas, se identificaron dos clonas virales conteniendo el inserto del cDNA de la enzima 21-hidroxilasa de un análisis inicial de 6 clonas, por lo que la eficiencia de incorporación viral del inserto en el virus con fenotipo TK- se calculó en un 30% (Fig. 10).

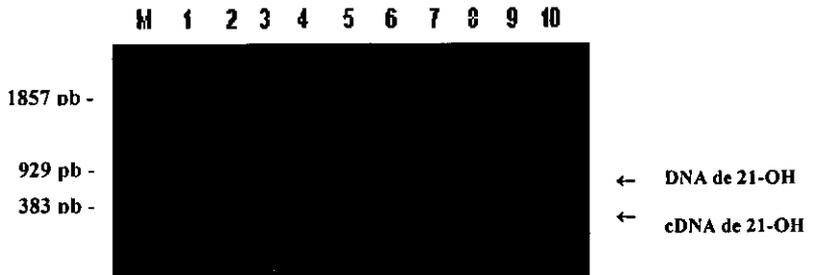


Figura 10. Productos de amplificación de PCR para la identificación de la clona viral conteniendo el cDNA silvestre de la enzima 21-hidroxilasa. La amplificación se realizó como se describe en materiales y métodos. Se corrió una alícuota (10µl) en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se observa un producto de amplificación de 540 pb correspondiente al DNA genómico de 21-hidroxilasa que se encuentra dentro de un cósmido, en el carril 2 se observa el control negativo sin DNA, en el carril 3 la amplificación del virus vC21-V281L, en el carril 4 el control de DNA de células infectadas con vTF7, y en los carriles 5 al 10 las distintas clonas de virus con el fenotipo TK-. M: marcador de peso molecular pBR322 DNA-Bst NI, de New England. Las flechas indican la posición del producto de amplificación del DNA genómico (540 pb) y del cDNA (323 pb) de 21-hidroxilasa. 21-OH= 21-hidroxilasa.

## ENSAYO FUNCIONAL DE LA CLONA SILVESTRE

Una de las clonas identificada como positiva fue amplificada y titulada para determinar a través de ensayos de expresión la actividad enzimática. La actividad enzimática de la clona silvestre fue comparada con la actividad de una de las mutantes (V281L) con las condiciones que se describen en materiales y métodos. Este ensayo nos permitía confirmar si la nueva clona silvestre construida en el laboratorio tenía la misma actividad que la clona silvestre originalmente caracterizada (Tusié-Luna *et al.*, 1990). En la figura 11, se observa el porcentaje de conversión de sustrato a producto después de 8 horas de la adición del sustrato. Para la clona seleccionada (vC21 silvestre o WT) se observó un 80% conversión, el doble de la actividad mostrada por la mutante V281L tal como se había medido previamente (Tusié-Luna *et al.*, 1990). Como control negativo se utilizaron células que se infectaron únicamente con el virus vTF7.

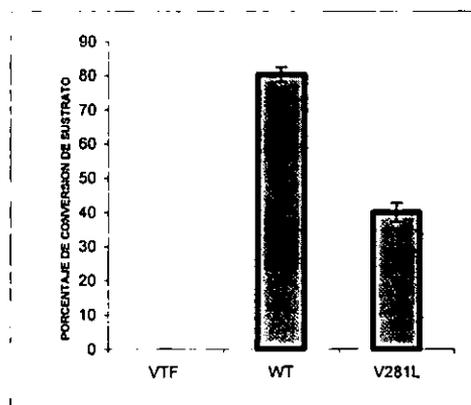


Figura 11. Actividad enzimática de la clona vC21 silvestre (WT) en células COS-1. Se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos. Las barras representan el porcentaje de conversión de 17-hidroxiprogesterona a 11-desoxicortisol (el porcentaje de conversión de sustrato se restó de la conversión que muestran células que se infectaron solo con vTF7). WT= vC21 silvestre, V281L= vC21-V281L. Estos valores se obtuvieron en dos determinaciones independientes por duplicado.

## ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS DISTINTAS FORMAS DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA

Se determinaron las actividades enzimáticas de cada una de las formas de 21-hidroxilasa, utilizando las condiciones de expresión empleadas para la co-expresión (igual multiplicidad de infección y tiempo de incubación con el sustrato marcado).

La mutante I172N no mostró actividad enzimática cuando se utilizó 0.25 de multiplicidad de infección y la actividad se determinó 6 hrs. después de la adición del sustrato, sin embargo esta mutante muestra un 2% de actividad cuando se utiliza una multiplicidad de infección de 1:1 y la actividad se mide 8 horas después de la adición del sustrato, semejante a lo observado por Tusié-Luna *et al* (1990). La mutante V281L mostró el 50% de actividad enzimática con respecto a la enzima silvestre semejante a lo descrito por Tusié-Luna *et al* (1990), es decir utilizando estas condiciones de expresión se observó un 24.3% vs. 48.9%. Las mutantes R356W y Cluster son proteínas que no muestran actividad enzimática bajo ninguna de las condiciones experimentales probadas (Chiou *et al.*, 1990; Tusié-Luna *et al.*, 1990).

## CO-EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS FORMAS DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA

### Co-expresión de la enzima silvestre (WT) con las mutantes V281L, I172N, Cluster y R356W

La enzima silvestre (WT) se co-expresó con las mutantes V281L, I172N, Cluster y R356W. Tres de ellas (V281L, I172N y Cluster) mostraron un efecto negativo (reducción en el porcentaje de conversión de sustrato) de diferente magnitud. Por el contrario la co-expresión de la enzima R356W con la enzima silvestre no mostró ningún efecto. Para la combinación WT-V281L se observó un 30.6% de reducción,

para la combinación WT-I172N se observó una reducción del 11.5%, mientras que para la combinación WT-Cluster se observó una reducción del 34.7%, como se muestra en la Tabla 6.

COMBINACIÓN	% DE ACTIVIDAD <sup>3</sup> H17-OHP		% DE REDUCCIÓN DE ACTIVIDAD (± DS)
WT-V281L	WT	48.9	30.6 (2.87) n=7
	V281L	24.3	
	Co-exp.	50.9	
WT-I172N	WT	48.9	11.5 (1.03) n=6
	I172N	0	
	Co-exp.	41.6	
WT-Cluster	WT	48.9	34.7 (2.49) n=3
	Cluster	0	
	Co-exp.	29.6	
WT-R356W	WT	48.9	SIN EFECTO n=7
	R356W	0	
	Co-exp.	49.6	

**Tabla 6. Co-expresión de la enzima silvestre con las mutantes V281L, I172N, Cluster y R356W.** Se muestran los porcentajes de conversión de sustrato cuando se expresan de manera independiente a multiplicidad de infección de 0.25 las distintas formas de la enzima (silvestre y mutantes) y al co-expresarse a multiplicidad de infección de 0.25 de cada una. Se muestra también el porcentaje de reducción en la actividad enzimática obtenido como se describe en materiales y métodos. n = número de experimentos o determinaciones independientes. Los números entre paréntesis representan el valor de desviación estándar.

## Co-expresión de la enzima mutante V281L con las mutantes I172N, Cluster y R356W

La enzima mutante V281L se co-expresó con las mutantes I172N, Cluster y R356W. Dos de ellas (I172N y Cluster) mostraron un efecto negativo sobre la actividad de la mutante V281L (reducción en el porcentaje de conversión de sustrato), mientras que la co-expresión con la mutante R356W no mostró ningún efecto, semejante a lo observado cuando se co-expresó R356W con la enzima silvestre. Para la combinación V281L-I172N se observó un 38.2% de reducción, y para la combinación V281L-Cluster una reducción de un 33.5%, como se muestra en la tabla siguiente (Tabla 7).

COMBINACIÓN	% DE ACTIVIDAD <sup>3</sup> H17-OHP		% DE REDUCCIÓN DE ACTIVIDAD (± DS)
V281L-I172N	V281L	24.3	38.2 (1.83) n=6
	I172N	0	
	Co-exp.	14.8	
V281L-Cluster	V281L	24.3	33.5 (2.37) n=3
	Cluster	0	
	Co-exp.	15.9	
V281L-R356W	V281L	24.3	SIN EFECTO n=5
	R356W	0	
	Co-exp.	24.9	

Tabla 7. Co-expresión de la enzima mutante V281L con las mutantes I172N, Cluster y R356W. Se muestran los porcentajes de conversión de sustrato cuando se expresan de manera independiente a multiplicidad de infección de 0.25 cada una de las mutantes y al co-expresarse a multiplicidad de infección de 0.25 cada una. Se muestra también el porcentaje de reducción en la actividad enzimática obtenido como se describe en materiales y métodos. n = número de experimentos o determinaciones independiente. Los números entre paréntesis representan el valor de desviación estándar.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se examinó el efecto de la combinación de distintas formas mutantes de la enzima 21-hidroxilasa sobre la actividad enzimática. Estos datos pueden arrojar información valiosa tanto para la correlación fenotipo-genotipo en aquellos pacientes portadores de distintas mutaciones en ambos alelos (heterocigotos compuestos) así como para la comprensión de la alteración estructural de las distintas formas mutantes y el funcionamiento del sistema de oxido-reducción en el cual esta enzima participa.

### IMPLICACIONES DE ESTE ESTUDIO PARA LA CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO EN LA DEFICIENCIA DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA

Como se mencionó anteriormente la correlación fenotipo-genotipo en pacientes con mutaciones en el gen de la 21-hidroxilasa es compleja por tres razones fundamentales: 1) la enzima se expresa de manera tejido-específica en la corteza suprarrenal por lo que no es posible determinar la actividad enzimática directamente de la glándula suprarrenal del paciente, 2) más del 45% de los pacientes presentan heterocigocidad compuesta, es decir son portadores de distintas mutaciones en cada uno de los alelos (paterno y materno) y 3) aproximadamente el 20% de los pacientes portan mutaciones múltiples en cada uno de los alelos.

Los estudios de expresión *in vitro* con distintas formas mutantes han sido útiles para establecer el efecto funcional de cada una de las mutaciones descritas en pacientes, sobre la actividad de la enzima, principalmente aquellas que causan la sustitución de un aminoácido (Tusié-Luna *et al.*, 1990; Chiou *et al.*, 1990; Higashi *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1991; Lajic *et al.*, 1997; Nikoshkov *et al.*, 1997). A través de estos estudios se ha podido entender como algunas mutaciones se encuentran con más frecuencia asociadas a un determinado fenotipo clínico. Por ejemplo, la mutación R356W que en estudios de

expresión *in vitro* no muestra actividad enzimática, se asocia frecuentemente al cuadro clínico más severo (Chiou *et al.*, 1990), mientras que la mutación de V281L cuyo efecto es el de reducir en un 50% la actividad enzimática, se encuentra frecuentemente en pacientes con el fenotipo más atenuado de la enfermedad (Speiser *et al.*, 1988; Tusié-Luna *et al.*, 1990).

A pesar de que existe de manera general una correlación entre el tipo de mutación o mutaciones que presenta el paciente, en diversos estudios se reportan pacientes cuyas mutaciones no parecen correlacionar con el fenotipo clínico que expresan. Es decir, presentan combinaciones de mutaciones cuyo efecto individual (determinado por ensayos de expresión *in vitro*) predice una actividad enzimática residual, sin embargo, estos pacientes presentan el fenotipo clínico más severo (Wilson *et al.*, 1995b). El hallazgo de estos pacientes ha llevado a proponer que pudieran existir mutaciones adicionales en la región promotora del gen que abatieran su transcripción. El probar esta hipótesis, requeriría sin embargo, la determinación de los niveles de RNA mensajero directamente de la corteza suprarrenal de estos pacientes.

Una posibilidad adicional es que la combinación de distintas mutaciones (provenientes de cada uno de los alelos materno y paterno) pudiera tener un efecto distinto sobre la actividad enzimática *in vivo*. Es decir, que algunas enzimas mutantes pudieran tener un efecto dominante negativo. En este respecto, existe un solo artículo en la literatura donde se reporta un efecto aditivo sobre el abatimiento de la actividad enzimática para dos mutantes de la enzima 21-hidroxilasa, cada una de ellas con actividad enzimática parcial (Nikoshkov *et al.*, 1997). En este estudio la mutante P105L expresada *in vitro* tiene una reducción de la actividad enzimática del 62% para hidroxilar 17-hidroxiprogesterona, mientras que la mutante P453S muestra una reducción de la actividad del 68%. Sin embargo, cuando ambas mutantes son co-expresadas, la actividad se reduce hasta un 7%. Es interesante que en este reporte no se postule ningún mecanismo que pudiera explicar este efecto.

## COMO EXPLICAR UN EFECTO DOMINANTE NEGATIVO PARA UNA ENZIMA ACTIVA EN ESTADO MONOMÉRICO

La enzima 21-hidroxilasa es un citocromo P450 integrado a la membrana de retículo endoplásmico que forma parte del sistema de oxido-reducción que involucra una reductasa dependiente de NADPH y el componente lipídico de membrana necesario para el transporte de electrones. Ya que la enzima forma parte de un complejo funcional, puede postularse que algunas formas mutantes pudieran ejercer un efecto dominante negativo sobre la enzima silvestre (en un portador heterocigoto) o sobre otra mutante (en un paciente heterocigoto compuesto) a través de al menos cinco mecanismos: 1) competencia por la incorporación del grupo hemo, 2) competencia por la translocación a membrana microsomal, 3) interferencia con la disposición en membrana, 4) competencia o interferencia por la captación del sustrato y 5) competencia o interferencia por la unión con la NADPH reductasa.

### **Mecanismos alternos que pudieran explicar el decremento en actividad enzimática cuando son co-expresadas dos variantes de la enzima 21-hidroxilasa**

Aunque nuestros resultados pudieran explicarse por un posible efecto dominante negativo de algunas formas mutantes de la enzima 21- hidroxilasa a través de afectar algunos de los cinco procesos arriba mencionados, es posible también postular mecanismos alternos que pudieran alterar el proceso de transcripción o traducción. En este sentido se ha reportado una mutación en la unión intrón-exón antes del inicio del exón 3 en el gen TPO (trombopoyetina) en la enfermedad trombocitemia hereditaria. Esta mutación trae como resultado una mayor eficiencia traduccional del mensajero (Cazzola and Skoda, 2000). Recientemente, se identificó también un polimorfismo en el intrón 3 del gen de la calpaina 10, en pacientes con diabetes tipo 2. Este cambio de secuencia provoca aparentemente una disminución en la transcripción del gen, siendo este un posible mecanismo nuevo de regulación a nivel transcripcional (Horikawa *et al.*, 2000). Estos dos ejemplos sin embargo, involucran cambios de secuencia dentro de la

región del intrón. No se tienen antecedentes de mutaciones puntuales dentro del exón capaces de provocar un efecto similar.

Para los estudios de co-expresión que se realizaron en esta tesis se utilizaron vectores virales que contienen el cDNA de las distintas formas silvestre o mutantes de la enzima 21-hidroxilasa. Adicionalmente, en el trabajo previo realizado por Tusié-Luna y col. (1990) se demostró que existen las mismas cantidades de proteína silvestre y mutantes de 21-hidroxilasa al expresarse de manera independiente. Esto excluiría la posibilidad de que algunos mensajeros tuvieran una mayor eficiencia traduccional y que a través de este efecto se abatiera la síntesis de proteína silvestre.

## **EL SISTEMA DE CO-EXPRESIÓN DE DISTINTAS FORMAS DE LA ENZIMA PARA ENTENDER LA EXPRESIÓN DE FENOTIPOS CLÍNICOS VARIABLES**

Nuestros resultados muestran que tres de las cuatro mutantes estudiadas (I172N, V281L y la mutante en Cluster) muestran un aparente efecto dominante negativo sobre la actividad de la enzima silvestre, mientras que la mutante R356W no parece tener este efecto. Es interesante también que la enzima I172N tiene un efecto menor sobre la reducción de la actividad de la enzima silvestre (11.5 % en la reducción de la actividad), comparada con el abatimiento de la actividad ejercida por la mutante V281L y Cluster (30.6 y 34.7% respectivamente, Tabla 6 y Fig. 12). De acuerdo a estos resultados un individuo portador de la mutación I172N de forma heterocigota (en uno de los alelos) tendrá una reducción sutil de la actividad de la enzima normal, mientras que portadores heterocigotos de las mutaciones V281L o la mutación en Cluster, tendrán una reducción más significativa de la actividad de la enzima silvestre (Fig. 12). Estos hallazgos podrían explicar la heterogeneidad observada en los niveles séricos de 17-hidroxiprogesterona en heterocigotos obligados (padres de pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa, Fig. 13).

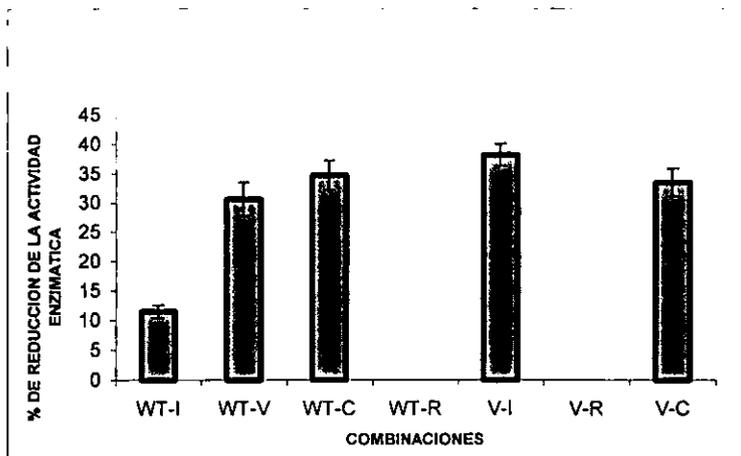


Figura 12. Porcentaje de reducción en la actividad de 21-hidroxilasa al co-expresar formas de la enzima. Se muestra el porcentaje de reducción en la actividad de la enzima silvestre al co-expresarla con las mutantes: I172N, V281L, Cluster y R356W, se muestra también el porcentaje de reducción de la enzima mutante V281L cuando se co-expresó con las mutantes I172N, R356W y Cluster. I= I172N, V= V281L, C= Cluster, R= R356W, WT= enzima silvestre.

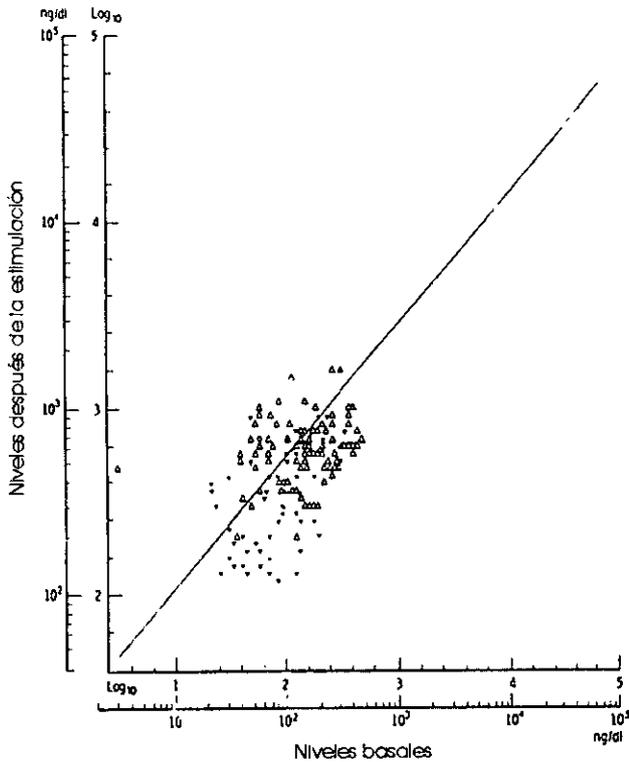


Figura 13. Correlación de la concentración de 17-hidroxiprogesterona en diferentes individuos. Se muestran las concentraciones de 17-hidroxiprogesterona determinados en el suero de los diferentes individuos, después de la estimulación con ACTH.  $\Delta$  = Heterocigotos,  $\nabla$  = Población general. Figura modificada de White, 1987b.

De acuerdo a estos resultados es posible proponer también que la combinación de mutaciones en distintos alelos repercutirá directamente sobre los niveles de actividad enzimática *in vivo*, existiendo combinaciones de mutaciones más deletéreas que otras. Por ejemplo, un paciente con la mutación V281L en un alelo y la mutación I172N en el otro, tendrá una actividad enzimática menor (de aproximadamente la mitad) que aquél portador de la mutación V281L acompañada de la mutación R356W en el segundo alelo (14.8 vs. 24.3% de actividad enzimática, Tabla 7 y Fig. 14). En este caso la correlación

fenotipo-genotipo considerando únicamente la sumatoria de las actividades determinadas de manera independiente sugiere que el paciente portador de la combinación V281L/I172N tendría una actividad enzimática mayor (50 + 2) que la de un paciente portador de la combinación V281L/R356W (50 + cero), sin embargo mientras que la mutante I172N parece ejercer un efecto dominante negativo sobre la actividad de la mutante V281L abatiendo su actividad en un 38.2%, la enzima mutante R356W no modifica la actividad de esta enzima mutante V281L (Fig. 14).

Es posible entonces que la identificación de la combinación de mutaciones en pacientes sea un mejor predictor del grado de severidad clínica. Por ejemplo, portadores de la mutación V281L generalmente presentan el fenotipo no clásico, pero algunos de ellos son diagnosticados por esterilidad mientras que otros son clínicamente imperceptibles. En este caso el grado de afectación clínica se postula dependerá de la mutación presente en el otro alelo.

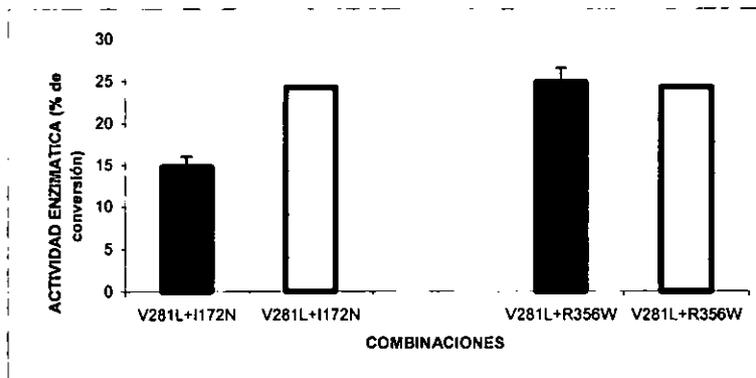


Figura 14. Co-expresión de la mutante V281L con las mutantes I172N y R356W. Se muestra el porcentaje de actividad de la mutante V281L al co-expresarse con las mutantes I172N y R356W. En las barras vacías se muestran los valores esperados y en las barras llenas los valores obtenidos.

## **EL SISTEMA DE EXPRESIÓN DE VACCINIA PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE DISTINTAS MUTANTES DE LA ENZIMA**

El sistema de expresión de proteínas mutantes utilizando al virus de vaccinia como vehículo de transferencia de DNA ha resultado ser muy útil en la evaluación del posible efecto dominante negativo de algunas formas mutantes de la enzima 21-hidroxilasa. A diferencia de otros sistemas de expresión transitorios en los que el cDNA es introducido a través del tratamiento de las células con fosfato de calcio, electroporación o liposomas, el sistema de infección celular con el virus de vaccinia esta mediado por receptores membranales que aseguran un menor grado de variabilidad en la eficiencia de transfección (introducción del cDNA) inter e intra ensayo. A pesar de ello los resultados presentados son producto de al menos tres determinaciones independientes donde la actividad enzimática fue determinada por duplicado para cada condición experimental.

Considerando que este es un sistema de expresión transitoria en el que la célula es finalmente lisada por partículas virales nuevas, se determinó a través de curvas dosis respuesta, la dosis viral optima de infección, en la que la determinación de la actividad enzimática se realizó durante la fase lineal de la reacción (Figs. 8 y 9).

## EL SISTEMA DE CO-EXPRESIÓN DE DISTINTAS FORMAS DE LA ENZIMA COMO HERRAMIENTA DE ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y LA FUNCIÓN DE DISTINTAS MUTANTES

Nuestros resultados muestran que no todas las enzimas mutantes ejercen un efecto dominante negativo sobre la actividad de la enzima silvestre y que este efecto es de distinta magnitud en algunas mutantes. Esto sugiere que distintas formas mutantes pudieran tener mecanismos distintos para abatir la actividad de la enzima silvestre y que esto pudiera estar relacionado con la alteración en la estructura o funcionalidad de cada mutante. Por ejemplo, una mutación que altera sustancialmente la estructura tridimensional de la proteína podría tener efecto sobre la disposición e interacción de la enzima silvestre en la membrana del retículo endoplásmico, mientras que una mutación que no alterara dramáticamente la estructura tridimensional de la mutante no tendría efecto sobre la disposición en membrana de la enzima silvestre. En este sentido es interesante la correlación del efecto en estructura a partir de modelos tridimensionales para las distintas formas mutantes de la enzima 21-hidroxilasa.

Para las tres mutantes que mostraron efecto dominante negativo sobre la actividad de la enzima silvestre (I172N, V281L y Cluster) se ha postulado un efecto sobre la estructura tridimensional alterando el plegamiento o la compactación de la proteína, mientras que para la mutante que no mostró efecto dominante negativo (R356W), la hipótesis más plausible de acuerdo a nuestros resultados, es la alteración de la unión con el sustrato o en el transporte de electrones, efecto sugerido a través del análisis del modelo tridimensional (Tabla 3). En este sentido el sistema de co-expresión de proteínas mutantes ha sido útil para establecer el efecto funcional de esta mutante no atribuible a la alteración de la estructura tridimensional.

Adicionalmente, para dos de estas mutantes (I172N y V281L) se ha demostrado reducción en los niveles de hemoproteína (Wu *et al.*, 1991; Hsu *et al.*, 1996), lo que sugiere que cambios estructurales pudieran alterar la incorporación del grupo hemo en estas enzimas mutantes. Asimismo, estos datos sugieren que el efecto dominante negativo mostrado por estas dos mutantes no puede ser explicado a través de una competencia por la incorporación del grupo hemo.

Para la mutante en Cluster donde se han propuesto posibles cambios estructurales de la proteína, así como un posible efecto sobre la unión al sustrato, los estudios de co-expresión de distintas mutantes apoyan la hipótesis de un cambio estructural.

## CONCLUSIONES

En esta tesis se estudió el efecto de la co-expresión de distintas formas mutantes de la enzima 21- hidroxilasa utilizando un sistema de expresión transitorio con el virus de vaccinia para infectar células eucariontes COS-1 en cultivo. Los resultados obtenidos apoyan el hecho de que algunas formas mutantes de la enzima (identificadas en pacientes) y estudiadas como proteínas recombinantes, ejercen un efecto dominante negativo sobre la actividad de la enzima silvestre y las mutantes. Esto representa un hallazgo novedoso tratándose de una proteína funcional en su estado monomérico ya que este fenómeno ha sido descrito únicamente para proteínas diméricas (Tomura *et al.*, 1999; Navas *et al.*, 1999; Barroso *et al.*, 1999).

Estos resultados ayudan a explicar las diferencias fenotípicas exhibidas por algunos pacientes en donde el tipo de mutación (es) encontrada (s) no explican el fenotipo clínico basados únicamente en la actividad enzimática determinada en proteínas mutantes, a través de estudios de expresión *in vitro* de forma independiente.

Este modelo de estudio ha sido útil también para explicar posibles alteraciones estructurales en algunas formas mutantes de la enzima 21-hidroxilasa.

## REFERENCIAS

- Amor M., Parder L.K., Globerman H., New I.M., White P.C. (1988) Mutation in the CYP21B gene (Ile172→Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1600-1604.
- Araujo M., Sánchez M., Sisiki L., Guerra G., Farra S., De mello M. (1996). Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Brazilian J Med Biol Research* 29: 1-13.
- Asseffa A., Smith S.J., Nagata K., Gillette J., Gelboin H.V., Gonzalez F.J. (1989) Novel endogenous heme-dependent expression of mammalian cytochrome P450 using baculovirus. *Arch Biochem Biophys* 274:481-490.
- Barroso I., Gurnell M., Crowley V.E.F., Agostini M., Schwabe M.A., Soos M.A., Maslen G.LI., Williams M., Lewis H., Shafer A.J., Chatterjee and O'rahilly S. (1999) Dominant negative mutations in human PPAR $\gamma$  associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402: 880-883.
- Carrera P., Bordone L., Azzani T. M., Brunelli V., Garancini M., Chiumello G., Ferrari M. (1996) Point mutations in Italian patients with classic non-classic and criotic forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet* 98: 662-665.
- Cazzola M. and Skoda R.C. (2000) Translational pathophysiology: a novel mechanism of human disease. *Blood* 95:3280-3288.
- Chiou S.H., Hu M.C. and Chung B.C. (1990) A missense mutation at Ile172 →Asn or Arg356 →Trp causes steroid 21-Hydroxylase deficiency. *J Biol Chem* 265: 3549-3552.
- Cupp-Vicker J.R., Li H., Poulos T.L. (1995) Structure of cytochrome P450eryf involved in erythromycin biosynthesis. *Nature Struct Biol* 2:144-153.
- Finkelstein M. and Schaefer J.M. (1979) Inborn errors of steroid biosynthesis. *Physiol Rev* 59: 353-406.
- 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.
- Globerman H., Amor M., Parker L.K., New I.M., White P.C. (1988) Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 82:139-144.
- Gotoh O. (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 267: 83-90.
- Graham-Lorence S., Amarneh B., White P.C., Jospe N. and Migeon C.J. (1995) A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450. *Protein Sci* 4: 1065-1080.
- Hasemann C.A., Ravichandran K.G., Peterson J.A., Deisenhofer J. (1994) Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* 236: 1169-1185.

Helmberg A., Tusié L., Tabarelli M., Kofler R., White P. C. (1992) R339 and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. *Mol Endo* 6:1318-1322.

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

Higashi y., Tanae A., Inoue H., Fujii-Kuriyama Y. (1988a) Evidence for frequent gene conversion in the steroid 21-hydroxylase P450 (c21) gene: implications for steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 42:017-025.

Higashi Y., Tanae A., Inoue H., Hiromasa T., Fujii-Kuriyama Y. (1988b) Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450 (c21)] deficiency in humans: Possible gene conversion products. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7486-7490.

Higashi Y., Hiromasa T., Tanae A., Miki T., Fujii-Kuriyama Y. (1991) Effects of individual mutations in the P450 (C21) pseudogene on the congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biochem* 109:638-644.

Horikawa Y., Oda N., Cox N.J., Li X., Melander M.O., Hara M., Hinokio Y., Lindner T.H., Mashima H., Schwart E.H., Del Bosque-Plata L., Horikawa Y., Oda Y., Yoshiuchi I., Colilla S., Polonsky K.S., Wei S., Concannon P., Iwasaki N., Schulze J., Baier L.J., Bogardus C., Groop L., Boerwinkle E., Hanis C.L. and Bell G.I. (2000) Genetic variation in the calpain 10 gene (CAPN10) is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genet* 2:163-75.

Hsu L.C., Hsu N.C., Guzova J.A., Guzov V.M., Chang S.F. and Chung B.C. (1996) The common I172N mutations causes conformational change of cytochrome P450c21 revealed by systematic mutations, kinetic and structural studies. *J Biol Chem* 271: 3306-3310.

Hu M.C., Hsu L.C., Hsu N.C., and Chung B.C. (1996) Function and membrane topology of wild-type and mutated cytochrome P-450c21. *Biochem J* 316: 325-329.

Jones H. M. and Jones G.E.S. (1954) The gynecological aspects of adrenal hyperplasia and allied disorders. *Am J Obstet Gynecol* 68: 330-1365.

Lajic S., Levo A., Nikoshkov A., Lundberg Y., Partanem J., Wedell A. (1997) A cluster of mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. *Hum Genet* 99:704-709.

Lajic S. and Wedell A. (1997) An intron 1 splice mutation and a nonsense mutation (W23X) in CYP21 causing severe congenital adrenal hyperplasia. *Hum Genet* 98:182-184.

Li H. and Poulos T.L. (1997) The structure of the cytochrome P450<sub>bm-3</sub> haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nature Struct Biol* 4: 140-146.

Mackett M., Smith G.L., Moss B. (1984) General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol* 49:857-864.

Mellon S.H., Miller W.L. (1989) Extraadrenal steroid 21-hydroxylation is not mediated by P450c21. *J Clin Invest* 84: 1497-1502.

Miller L.W and Morel Y. (1989) The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Annu Rev Genet* 23:371-393.

Miller W.L., Auchus R.J. and Geller D.H. (1997). The regulation of 17, 20 lyase activity. *Steroid* 62: 133-142.

Monier S., Van Luc P., Kreibich G., Sabatini D.D. and Adesnik M. (1988) Signals for incorporation and orientation of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 107: 457-470.

Morel Y., André J., Uring-Lambert U., Hauptmann G., Büttel H., Tossi M., Forest G.M., David M., Bertrand J., Miller L.W. (1989) Rearrangements and point mutations of P450c21 genes distinguished by five restriction endonuclease haplotypes identified by a new probing strategy in 57 families with adrenal hyperplasia. *J Clin Invest* 83:527-536.

Mornet E., Creté P., Kuttent F., Raux-Demay M.C., Boué J., White P.C., Boué A. (1991) Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 48:79-88.

Mornet E., and Gibrat J.F. (2000) A 3D of human P450c21: study of the putative effects of steroid 21-hydroxylase gene mutations. *Hum Genet* 106:330-339.

Navas M.A., Muñoz E.J., Kim J., Shih D. and Stoffel M. (1999) Functional characterization of the MODY1 gene mutations HNF4 (R127W), HNF4 (V255M), and HNF4 (E276Q). *Diabetes* 48: 1459-1465.

Nelson D.R. and Strobel H.W. (1988) On the membrane topology of vertebrate cytochrome P450 proteins. *J Biol Chem* 263: 6038-6050.

New M.I., White P.C., Dupont B., Speiser P.W. (1989) *The Metabolic Bases of Inherited Disease*. Chapter 74 McGraw-Hill, New York pp:1881-1918.

Nykoshkov A., Lajic S., Holst M., Wedell A., Luthman H. (1997) Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 194-199.

Nykoshkov A., Lajic S., Vlamis-Gardikas A., Tranebjaerg L., Holst M., Wedell A., Luthman H. (1998) Naturally occurring mutants of human steroid 21-hydroxylase (P450c21) pinpoint residues important for enzyme activity and stability. *J Biol Chem* 273:6163-6165.

Okano Y., Eisensmith R.C., Guttler F., Lichter-Konecki U., Konecki D.S., Trefz F.K., Dasovich M., Wang T., Henriksen K., Lou H. and Woo S.L.C. (1991) Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *New Engl J Med* 324:1232-1238.

Omura T. and Sato R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: I Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239:2370-2378.

Ordóñez M.L., Ramírez S., López A.U., Gamboa S., Cerrillo M., Altamirano N., Calzada R., Robles C., Mendoza F., Tusié-Luna M.T. (1998) Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. *Hum Genet* 102:170-177.

- Ortiz de Montellano P.R. (1986) Cytochrome P450 structure, mechanism and biochemistry ed. Plenum Press, New Y.
- Owerbach D., Crawford Y., Draznin M. (1990) Direct analysis of the CYP21B genes in 21-hydroxylase deficiency using polimerasa chain reaction amplification. *Mol Endocrinol* 4:125-131.
- Pang S., Wallace M.A., Hofman L., Thuline H.C., Dorche C., Lyon C.T.Y., Dobbins R.H., Kling S., Fujieda K., Suwa S. (1988) Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 81:866-874.
- Park S.Y., Shimizu H., Adachi S.I., Nakagawa A., Tanaka I., Soun H., Obayashi E., Nakamura H., Tetsutaro I., Shiro Y. (1997) Crystal structure of nitric oxide reductase from denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*. *Nature struct Biol* 4: 827-832.
- Picado L. and Miller W.L. (1988) Homologous sequences in steroidogenic enzymes, steroid receptors and a steroid binding protein suggest a consensus steroid-binding sequence. *Mol Endocrinol* 2: 1145-1150.
- Poulos T.L. (1995) Cytochrome P450. *Current Opinion in Structural Biology* 5:767-774.
- Raag H., Li H., Jones B.C., Poulos T.L. (1993) Inhibitor induced conformational change in cytochrome P450cam. *Biochemistry* 32:4571-4578.
- Ravichandran K.G., Boddupalli S.S., Hasemann C.A., Peterson J.A., Deisenhofer J. (1993) Crystal structure of hemoprotein domain of P450bm-3, a prototype for microsomal P450s. *Science* 261:731-736.
- Rodrigues R. N., Dunham I., Yu C.Y., Carrol C. M., Proter R.R., Campbell D.R. (1987) Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene form an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO J* 6:1653-1661.
- Ruckpaul K., Rein H. (1989) *Frontiers in Biotransformation: Basis and mechanism of regulation of cytochrome P450*. Vol 1 Taylor Francis, London pp: 151-175.
- Speiser P.W., White P.C. and New M.I. (1992) *Congenital adrenal hyperplasia, The adrenal gland* Second Edition, Raven Press N.Y. 327-371.
- Speiser P. W., White C.P., New I. M. (1992a) *The Genetic Basis of Common Diseases*. Chapter. 24 Oxford University Press pp: 529-550.
- Speiser P.W., Dupont B., Zhu D., Serrat J., Buegeleisen M., Tusié L., Lesser M., New I. M., White P. C. (1992b) Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 90:584-595.
- Speiser P.W., Dupont B., Rubistein P., Piiazza A., Kastelan A., New I.M. (1985) High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet* 37: 650-657.
- Speiser P. W., New M. I., White P.C. (1988) Molecular genetics analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14, DRI. *N Engl J Med* 319: 19-23.

- Tomura H., Nishigori H., Sho K., Yamagata K., Inoue I. and Takeda. (1999) Loss-of-function and dominant-negative mechanism associated with hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$  mutations in familial type 2 diabetes mellitus. *J Biol Chem* 274: 12975-12978.
- Tusié-Luna., Traktman P., White P.C. (1990) Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem* 265:20916-20922.
- Tusié-Luna, Speiser W.P., Dumic M., New I.M., White P.C. (1991) A mutation (Pro 30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endo* 5:685-692.
- Verrey F. (1999) Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am J physiol* 9:880-5.
- Wedell A. and Luthman H. (1993) Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Hum Mol Genetics* 2:499-504.
- Wedell A., Ritzén M.E., Haglund-Stengler B., Luthman H. (1992) Steroid 21-hydroxylase deficiency: three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7232-7236.
- White P.C., Grossberger D., Onufer J.B., Chaplin D.D., New I.M., Dupont B., Strominger L.J. (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., New M.I. and Dupont B. (1987a) Congenital adrenal hyperplasia. *New Engl J Med* 316:1519-524, 1580-1586.
- White P.C. (1987b) Genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency. Recent progress in hormone research 43:305-336.
- White P.C., Vitek A., Dupont B., New I.M. (1988) Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4436-4440.
- Wilson R.C., Wei J.Q., Cheng K.C., Mercado A., New M.I. (1995a) Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1635-1640.
- Wilson R.C., Mercado A.B., Cheng K.C., New M.I. (1995b) Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2322-2329.
- Wu D.A. and Chung B.C. (1991) Mutations of P450c21 (steroid 21-Hydroxylase) at Cys428, Val281, and Ser 268 results in complete, partial no loss of enzymatic activity, respectively. *J Clin Invest* 88: 519-523.
- Wu D.A., Hu M.C. and Chung B.C. (1991) Expression and functional study of wild-type and mutant human cytochrome P450c21 in *saccharomyces cerevisiae*. *DNA and Cell Biology* 10:201-209.

Zuber M.X., Simpson E.R., Hall P.F., Waterman M.R. (1987) Effects of adrenocorticotropin on 17 alpha-hydroxylase activity and cytochrome P45017 alpha synthesis on bovine adrenocortical cells. J Biol Chem 260: 1842-1848.

Zuber M.X., Mason I.A., Simpson E.R., Waterman M.R. (1988) Simultaneous transfection of Cos-1 cells with mitochondrial and microsomal steroid hydroxylases: incorporation of a steroidogenic pathway into nonsteroidogenic cells. Proc Natl Acad Sci USA 85:699-703.

Zurutuza L., Muller F., Gibrat J.F., Taillandier A., Simon-Bouy B., Serre J. L., Mornet E. (1999) Correlations of genotype and phenotype in hypophosphstasia. Hum Mol Genet 8: 1039-1046.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA