

11 00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS MOLECULAR DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS DE
PACIENTES CON SÍNDROME DE INSENSIBILIDAD A ANDRÓGENOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA

BERTHA ALICIA CHÁVEZ CANO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFREDO ANTONIO ULLOA AGUIRRE

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE, 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental del presente estudio, se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Este trabajo fue financiado por el CONACYT (proyecto 0010P-M).

Mi reconocimiento al Dr. Alfredo A. Ulloa Aguirre, por su apoyo en la elaboración del presente trabajo de tesis.

Agradezco a los miembros del comité tutorial; Dr. Alfredo Ulloa Aguirre, Dra. Rosario Rodríguez Arnaíz y Dr. Enrique A. Pedernera, su interés, sus comentarios y tiempo dedicado al proyecto de tesis.

Agradezco a los profesores :

Dra. Rosario Rodríguez Arnaíz
Dr. Luis Felipe Jiménez García
Dr. Enrique A. Pedernera Astegiano
Dr. Alfredo A. Ulloa Aguirre
Dra. María del Carmen Méndez Herrera
Dra. María de Lourdes Segura Valdéz
Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta

Por la lectura y corrección del manuscrito presentado como tesis.

ABREVIATURAS

AcTR-----	Activador del receptor de hormonas tiroideas (Activator of thyroid receptor)
AF-1 -----	Función de activación 1 (Activation function-1)
AF-2 -----	Función de activación 2 (Activation function-2)
AIB-----	Coactivador amplificado en cáncer de mama (Amplified in breast cancer)
AMPc-----	Adenosina cíclica monofosfato (cyclic Adenine monophosphate)
ARA70 -----	Proteína 70 asociada al receptor de andrógenos (Androgen receptor associated protein 70)
ARE -----	Elemento de respuesta a andrógenos (Androgen response element)
3 β HSD -----	3 β Hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β Hydroxy steroid dehydrogenase)
17 β HSD -----	17 β Hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β Hydroxy steroid dehydrogenase)
CAF -----	Factor asociado a CBP (CBP associated factor)
CBP -----	Proteína de unión a CREB (CREB binding protein)
cDNA -----	Ácido desoxirribonucleico complementario (Complementary deoxyribonucleic acid)
CREB -----	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (cAMP-response element binding protein)
dATP -----	Desoxiadenosina trifosfatada (deoxyadenosine triphosphate)
dCTP-----	Desoxicitidina trifosfatada (deoxycytidine triphosphate)
ddATP -----	Didesoxiadenosina trifosfatada (dideoxyadenosine triphosphate)
ddCTP -----	Didesoxiacitidina trifosfatada (dideoxycytidine triphosphate)
ddGTP -----	Didesoxiguanina trifosfatada (dideoxyguanine triphosphate)
ddTTP-----	Didesoxitimidina trifosfatada (dideoxythymidine triphosphate)
dGTP-----	Desoxyguanidina trifosfatada (deoxyguanine triphosphate)
DGGE -----	Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (Denaturing gradient gel electrophoresis)
DHEA -----	Dehidroepiandrosterona
DHT-----	5 α -Dihidrotestosterona
DNA -----	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
dTTP -----	Desoxytimidina trifosfatada (deoxythymidine triphosphate)

TEMA CON
FALLA DE ORIGEN

EDTA -----	Etilendiamina tetra acetato
ERAP -----	Proteína asociada al receptor de estrógenos (Estrogen receptor associated protein)
GnRH -----	Hormona liberadora de gonadotrofinas (Gonadotropin releasing hormone)
GRIP -----	Proteína que interactúa con el receptor de glucocorticoides (Glucocorticoid receptor interacting protein)
H1-H12-----	Hélices α de la uno a la doce
HRE -----	Elementos de respuesta a hormonas (Hormone responsive elements)
Hsp-----	Proteína de choque térmico (Heat shock protein)
LDL -----	Lipoproteína de baja densidad (Low density lipoprotein)
LH -----	Hormona luteinizante (Luteinizing hormone)
NADPH -----	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfatada, forma reducida (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form)
NCoA -----	Coactivador de receptor nuclear (Nuclear receptor coactivator)
NLS -----	Señales de localización nuclear (Nuclear localization signals)
pb -----	pares de bases
pCIP -----	Proteína asociada con el cointegrador p300/CBP (p300/CBP cointegrator associated protein)
PCR -----	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
RA -----	Receptor de andrógenos
RAC3 -----	Coactivador 3 asociado al receptor (Receptor associated coactivator 3)
RE -----	Receptor de estrógenos
RG -----	Receptor de glucocorticoides
RM -----	Receptor de mineralocorticoides
RNA -----	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
RP -----	Receptor de progesterona
SF-1 -----	Factor esteroideogénico 1 (Steroidogenic factor 1)
SIA -----	Síndrome de insensibilidad a andrógenos
SICA -----	Síndrome de insensibilidad completa a andrógenos
SIPA -----	Síndrome de insensibilidad parcial a andrógenos
SRC -----	Coactivador de receptor a esteroides (Steroid receptor coactivator)
SRY -----	Región del cromosoma Y determinante del sexo (Sex determining region of the Y chromosome)
SSCP -----	Polimorfismo conformacional de cadena simple (Single stranded conformational polymorphism)
TBE -----	Solución amortiguadora con Tris-base, ácido bórico y EDTA
TBP -----	Proteína que se une a la región TATA (TATA binding protein)

TeBG -----	Globulina que une a testosterona y estradiol (Testosterone-estradiol binding globulin)
TEMED-----	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TFII -----	Factor de transcripción II (Transcription factor II)
TGFβ-----	Factor de crecimiento transformante β (Transforming growth factor β)
TIF -----	Factor intermediario transcripcional (Transcriptional intermediary factor)
TRAM -----	Molécula activadora del receptor de hormonas tiroideas (Thyroid receptor activator molecule)
TRIP -----	Proteína que interactúa con el receptor de hormonas tiroideas (Thyroid receptor interaction protein)
TTE -----	Solución amortiguadora con Tris-base, Taurina y EDTA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ANTECEDENTES	3
Andrógenos	3
Mecanismo de acción de los andrógenos	7
Receptor de andrógenos	10
Dominio amino-terminal del RA	14
Dominio de unión al DNA del RA	15
Región bisagra del RA	17
Dominio de unión al ligando del RA	18
PAPEL DEL RA Y LOS ANDRÓGENOS EN EL DESARROLLO DEL FENOTIPO MASCULINO	22
SÍNDROME DE INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS	24
Estudios moleculares del RA en individuos con SIA	26
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	28
OBJETIVO DEL ESTUDIO	29
Objetivos particulares	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
Sujetos	30
Extracción de DNA	33
Obtención de RNA	34
Amplificación del gen del RA	34
Polimorfismo conformacional de cadena simple	36
Secuenciación de DNA	36
Cultivo de fibroblastos	37
Análisis por RT-PCR	37
RESULTADOS	39
DISCUSIÓN	57
Mutaciones en el dominio de unión al DNA	57
Mutaciones en la región bisagra del RA	60
Mutaciones en el dominio de unión al ligando del RA	60
Mutaciones en el dominio amino-terminal del RA	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
PUBLICACIONES	

RESUMEN

Los pacientes con el síndrome de insensibilidad a los andrógenos (SIA) son individuos con cariotipo 46XY, que no han tenido una diferenciación sexual masculina normal y presentan un amplio rango en el fenotipo, que puede ser desde el totalmente femenino en la forma completa (SICA) con genitales externos femeninos, vagina terminada en fondo de saco ciego y desarrollo mamario al llegar a la pubertad, hasta individuos con diferentes grados de ambigüedad genital y que presentan la forma parcial (SIPA) de este síndrome.

La clonación del receptor de andrógenos (RA) ha permitido el estudio de los defectos moleculares del RA en individuos con SIA, y se ha observado que mutaciones en este gen originan el síndrome. La proteína del RA que es codificada por 8 exones, tiene varios dominios con una función específica. La región N-terminal codificada por el exón 1, está involucrada en la activación transcripcional; una región central, codificada por los exones 2 y 3, contiene dos dedos de zinc con los cuales el RA se une al DNA; la región bisagra codificada por parte del exón 3 y 4 que media la transferencia del RA del citoplasma al núcleo; y la región C-terminal, codificada por los exones 4 al 8, es el dominio de unión al ligando y también está involucrado en la dimerización y en la activación de la transcripción. En el presente trabajo se llevó a cabo el análisis molecular del RA en 35 sujetos con diagnóstico de SIA que provienen de 28 familias no relacionadas. Se utilizó DNA genómico aislado de sangre periférica. Los 8 exones del gen fueron amplificados individualmente por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sometidos al análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP). Los productos de PCR que se encontraron alterados se secuenciaron directamente.

El estudio del DNA de estos pacientes permitió la identificación de 19 mutaciones puntuales que resultaron en cambio de aminoácido (A596T, R615H, P682T, L701I, Q711E, G724D, G743R, G743E, A765S, A765V, R774H, S791P, Q802R, F827V, L830V, L838F, A870V, H874R, D879Y), una mutación intrónica (g→c, +5 intrón 6), dos mutaciones puntuales que no originaron cambio de aminoácido (E211E y S888S), una mutación sin sentido (Q657Stop), una delección de 3 pb (Δ 582 TTC), y una delección de 7 pb con una inserción de 11 pb. De las 28 mutaciones identificadas, 15 resultaron en SICA, en dos casos el fenotipo fue femenino con virilización parcial (codones 682 y 711), y 11 se presentaron en individuos con fenotipo masculino con virilización incompleta de los genitales.

Estos datos sugieren que los sitios donde ocurrieron las mutaciones son determinantes para la actividad funcional del receptor de andrógenos.

ABSTRACT

Androgen insensitivity syndrome (AIS) is an X-linked genetic disorder of male sexual differentiation caused by mutations in the androgen receptor (AR) gene. The phenotype in 46 XY affected individuals varies depending on the extent of the AR defect, ranging from subjects with complete androgen insensitivity syndrome (CAIS) where a female phenotype is observed, to patients with genital ambiguity who present partial androgen insensitivity syndrome (PAIS). A reliable genotype-phenotype correlation in these patients does not exist as yet.

The AR belongs to the nuclear receptor superfamily and has four functional domains encoded by eight exons. The N-terminal domain encoded by exon 1 is involved in transcriptional activation of target genes by androgens. The central section encoded by exons 2 and 3 comprises two "zinc fingers"-like structures; this domain is responsible for binding to androgen response elements in the promoter region of target genes. A hinge region, located between the DNA-binding domain and the steroid binding domain (SBD). The C-terminal domain, encoded by exons 4 to 8, is involved in high-affinity ligand binding.

Nucleotide sequence analysis of the AR coding region was carried out in 35 individuals with AIS, from 28 different families. Exon-specific polymerase chain reaction (PCR), single-strand conformation polymorphism, and sequencing analysis were performed. In two cases, total cellular RNA was extracted from genital skin fibroblasts and reverse transcribed to obtain cDNA.

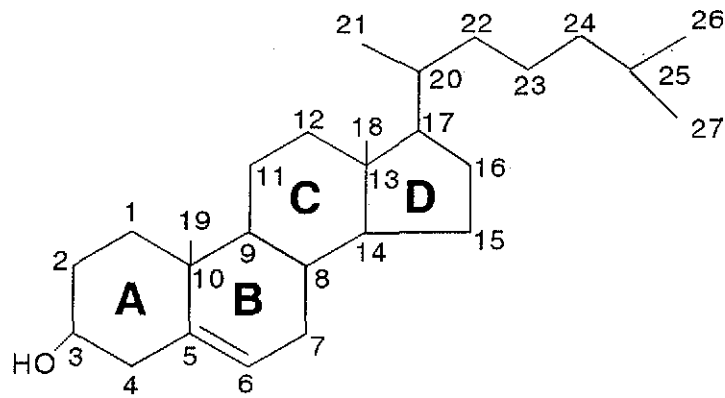
Nineteen different point mutations leading to amino substitutions (A596T, R615H, P682T, L701I, Q711E, G724D, G743R, G743E, A765S, A765V, R774H, S791P, Q802R, F827V, L830V, L838F, A870V, H874R, D879Y), one splice junction mutation (g→c at +5, exon 6/intron 6), two missense mutations without amino acid substitution (E211E, S888S), one non sense mutation (Q657Stop), one 3 bp deletion (Δ 582 TTC), and one 7bp deletion with insertion of 11pb were identified. Of the 28 mutations identified, fifteen resulted in CAIS (codons 582 deletion, 615 , 657, 743 in two patients, 765, 774 in three individuals, 791, 827, 830, 874, donor splice site +5, and deletion of 7bp with insertion of 11bp), two were detected in phenotypic females with partial virilization (codons 682 and 711), and eleven were present in phenotypic male subjects with undervirilized external genitalia (codons 211, 596 in two individuals, 701, 724, 765, 802, 838, 870, 879 and 888), thus indicating that all of these sites are critical for complete AR functional activity.

ANTECEDENTES

ANDRÓGENOS

Los andrógenos, al igual que otras hormonas esteroides como los glucocorticoides, los mineralocorticoides, los estrógenos y la progesterona, son sintetizados a partir de colesterol. La poza de colesterol puede provenir de la síntesis *de novo*, la cual se efectúa a partir de acetil coenzima A, o bien de la reserva plasmática que se adquiere por endocitosis de la lipoproteína de baja densidad (LDL)(Goldstein *et al.*, 1979). Las reacciones iniciales se efectúan dentro de la mitocondria, en este organelo la presencia de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) que es un transportador activo de colesterol a través de la membrana interna mitocondrial, efectúa un papel muy importante al proveer el sustrato (colesterol) para la síntesis de esteroides (Miller, 1998). El primer paso en la síntesis de esteroides es el rompimiento de la cadena lateral del colesterol, este es un paso limitante en la formación de los esteroides y es efectuada por la enzima citocromo P450_{scc} (Miller, 1988), el producto de la reacción es la pregnenolona, esteroide de 21 átomos de carbono (C₂₁) que es transportada fuera de la mitocondria para ser metabolizada por enzimas microsomales.

La síntesis de testosterona a partir de pregnenolona, se puede efectuar por varias rutas, ya que las reacciones pueden ocurrir indistintamente dependiendo de la localización de los sustratos y de la disponibilidad de las enzimas. En el humano la ruta predominante para la formación de andrógenos es la llamada vía de los Δ^5 (Fig 1), aquí la pregnenolona se hidroxila en 17α y se rompe la cadena lateral dando lugar a un esteroide de 19 átomos de carbono (C₁₉), inicialmente se creía que esta reacción era efectuada por dos enzimas, la 17α hidroxilasa y la 17, 20 liasa, pero la purificación y reconstitución *in vitro* de la actividad enzimática indican la presencia de una sola enzima 17α -hidroxilasa (P450_{c17}) codificada por el gen CYP17 (Miller, 1988). El esteroide C₁₉ formado; dehidroepiandrosterona (DHEA), se reduce en el grupo 17 ceto por la actividad de la 17β hidroxisteroide deshidrogenasa (17β HSD) para formar el Δ^5 -androstendiol, es importante hacer notar que hasta ahora se conocen cinco isoenzimas 17β HSDs que catalizan la



Colesterol

P450_{scc} ↓ (Enzima que rompe la cadena lateral del colesterol)

Pregnenolona

↓ 17 α -hidroxilasa

17-OH-Pregnenolona

↓ 17,20-liasa

Dehidroepiandrosterona

17 β -HSD
(17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa)

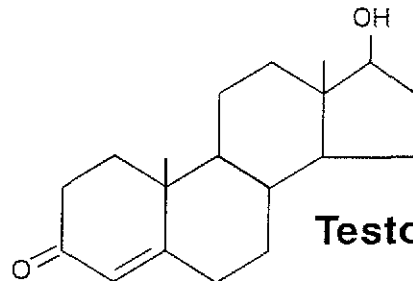
Δ^5 **Androstendiol**

3 β -HSD
(3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa)

Androstendiona

3 β -HSD ↓

17 β -HSD ↓



Testosterona

Figura 1. Biosíntesis de testosterona a partir de colesterol. Vía de los Δ^5 (izquierda), predominante en testículo humano

reducción de androstendiona, DHEA y estrona en la posición 17β , los genes que codifican cada una de ellas están en diferentes cromosomas, la que tiene mayor actividad en testículo es la 17β HSD-3 que tiene localización microsomal, utiliza NADPH como cofactor y es codificada por un gen localizado en el cromosoma 9, región q22 (Andersson *et al.*, 1996). El androstendiol formado, posteriormente se oxida en el anillo A por la actividad del complejo 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ^{4-5} isomerasa (3β HSD) para formar finalmente la testosterona. La actividad de la 3β HSD y la 17β HSD, es indistinta sobre la DHEA o sus metabolitos.

La síntesis de testosterona ocurre principalmente en las células de Leydig del testículo, y es regulada a nivel membranal por la hormona luteinizante (LH) proveniente de la adenohipófisis, que a su vez es liberada por la actividad de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que se genera en el hipotálamo, la liberación de estas hormonas está determinada por los niveles circulantes de testosterona, de esta manera se ejerce una retroalimentación negativa por parte del esteroide (Matsumoto y Bremner, 1984).

La estimulación aguda en la producción de andrógenos por hormonas hipofisarias, depende exclusivamente de la disponibilidad aumentada de colesterol para el rompimiento de la cadena lateral y no por el cambio en la cantidad de P450scc. Estímulos mas lentos, involucran un incremento en la cantidad de enzimas esteroidogénicas, incluyendo la P450scc, y esto es debido a un incremento a nivel transcripcional de los genes que codifican para las enzimas, el nivel basal de expresión de las enzimas en los tejidos esteroidogénicos es dependiente de la estimulación continua de hormonas peptídicas de origen hipofisario (Omura y Morohashi, 1995). El AMPc es el mayor mediador de la inducción hormonal de las enzimas esteroidogénicas en las células gonadales y adrenocorticales. Se han identificado secuencias de respuesta a AMPc (CRE), en la región promotora de los P450s involucrados en la síntesis de hormonas esteroides (Waterman *et al.*, 1992). También se ha demostrado que algunos factores de transcripción están involucrados en la expresión tejido-específico de las enzimas esteroidogénicas P450s, el factor esteroidogénico 1 (SF-1) tiene una especial importancia no solo para la expresión de enzimas esteroidogénicas sino también en la diferenciación y el desarrollo de

tejidos esteroideogénicos fetales y postnatales (Lala *et al.*, 1992).

La testosterona sintetizada en testículo es secretada al torrente sanguíneo en donde viajará unida a proteínas, la mayoría a albúmina y a TeBG (Globulina de unión de testosterona-estradiol) que es una β globina compuesta de dos subunidades no idénticas, cada molécula tiene un solo sitio de unión a testosterona, tiene un peso molecular de 95 kDa y contiene aproximadamente un 30% de carbohidratos (Rosner y Smith, 1975).

En la sangre de un hombre normal el 2% de testosterona transita de forma libre (sin unión a proteínas), el 44% viaja unida a TeBG y el 54% unida a albúmina y otras proteínas. Aunque es sabido que la testosterona libre es la que ejerce su acción, se ha observado que la unida a TeBG se puede separar fácilmente a nivel de capilares y de esta manera penetrar a las células, también existen mecanismos por los cuales se aumenta la formación de AMPc al unirse el complejo TeBG-esteroide a receptores específicos en la membrana celular (Rosner *et al.*, 1992). La unión a proteínas transportadoras es un proceso muy importante ya que de ésta manera se impide el metabolismo del esteroide en el hígado o que pueda ser desechado por el riñón, por lo que se aumenta el tiempo de vida media del esteroide.

La testosterona al introducirse en las células blanco puede aún metabolizarse, se puede aromatizar para formar estradiol, o bien puede reducirse en el anillo A en la posición 5α , dando lugar a la 5α -dihidrotestosterona (DHT).

El metabolismo de testosterona a DHT se efectúa mediante la actividad de la enzima 5α - reductasa, hasta ahora se conocen dos isoenzimas que efectúan la misma reacción, la 5α - reductasa 1 y la 5α -reductasa 2 . La 5α -reductasa 1, se localiza en la mayoría de tejidos y de una manera general se piensa que su actividad es enfocada al metabolismo de degradación de los esteroides, tiene una actividad óptima a pH neutro o ligeramente alcalino, el gen (SRD5A1) que codifica para esta proteína se encuentra en el cromosoma 5 en la posición p15, y está formado por 5 exones y 4 intrones. La 5α -reductasa 2 se localiza en los tejidos andrógeno-sensibles, tiene una actividad óptima a un pH ácido (5.5), el gen (SRD5A2) que la codifica se localiza en el cromosoma 2 (posición p23) y al igual que el gen SRD5A1, contiene 5 exones y 4 intrones (Wilson *et al.*, 1993) . Se ha observado que mutaciones en este gen, originan un tipo de pseudohermafroditismo masculino,

debido a una deficiente actividad de la enzima mutada (Vilchis *et al.*, 1997), esta actividad es de suma importancia durante la embriogénesis, ya que se ha observado que la DHT es un andrógeno esencial en la masculinización de los genitales externos.

La testosterona y la DHT son esteroides con alta actividad androgénica, se sabe que cada uno tiene una actividad específica, la testosterona regula los niveles de gonadotrofinas, permite la espermatogénesis, el desarrollo de características sexuales masculinas al llegar a la pubertad; a nivel embrionario contribuye al desarrollo de los derivados wolfianos. La DHT masculiniza genitales externos a nivel embrionario, permite el desarrollo de la próstata, y junto con la testosterona, actúa en la maduración sexual durante la pubertad. El desarrollo del acné y la calvicie son debidos a la actividad de la DHT (Griffin y Wilson 1989).

Para ejercer su acción tanto DHT como testosterona, se unen a un receptor en común, el receptor de andrógenos (RA). La DHT, considerada como el andrógeno natural más potente, se une con mayor avidéz al receptor de andrógenos y este complejo tiene una velocidad de disociación menor al del complejo RA-testosterona (Wilbert *et al.*, 1983), además se ha observado que el complejo RA-DHT activa mas eficientemente un sistema de gen reportero (Deslypere *et al.*, 1992).

La regulación de la actividad androgénica de la DHT es muy fina, ya que mediante la actividad de la 5α reductasa 2, se sintetiza directamente en las células blanco para andrógenos, se ha observado que la concentración de DHT en éstas células es relativamente alta, y este hecho combinado con la potencia androgénica incrementada de la DHT como ligando, significa que el RA será transcripcionalmente más activo cuando une DHT que cuando une testosterona (MacLean *et al.*, 1997).

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANDRÓGENOS

Los andrógenos como otras hormonas esteroides, inician sus efectos a nivel celular en los tejidos blanco, al unirse con alta afinidad a proteínas receptoras específicas. La entrada de los andrógenos a la célula es por difusión pasiva, se cree que la naturaleza lipídica de los esteroides permiten la entrada a la célula sin requerimiento energético.

Dentro de la célula, el andrógeno se une a su receptor específico (RA), esta unión induce cambios en el RA que lo convierten de un receptor inactivo a un receptor activo con capacidad de unirse al DNA, la unión de testosterona al RA da como resultado la remoción de proteínas asociadas al receptor. El RA cuando no está unido a su ligando, se encuentra en un complejo que consiste en varias proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70, y Hsp56).

Se ha observado que este complejo es una forma "lista" para responder al ligando, esto sugiere que las proteínas mantienen al receptor de andrógenos en una forma competente para la unión del ligando y también mantiene al receptor en un estado transcripcionalmente inactivo.

Una vez que se une la hormona, el RA se disocia del complejo, se dejan al descubierto dominios funcionales, con lo que se inician los cambios conformacionales necesarios para la importación al núcleo, aquí el RA se une como un homodímero al DNA a través de los dedos de zinc del dominio de unión al DNA, la dimerización del RA se requiere para la activación transcripcional, ésta ocurre de manera antiparalela mediada por secuencias de los dominios amino terminal y de unión al ligando (Langley *et al.*, 1995).

Estudios *in vitro*, han demostrado que el RA se une a sitios específicos localizados en la región 5' río arriba de los genes blanco para andrógenos, son llamados elementos de respuesta a hormonas esteroideas (HREs), estos sitios tienen quince pares de bases que muestran palíndromes parciales; 5'-AGNACAnnnTGTNCT-3'. Se ha observado que a esta secuencia también se unen los receptores de glucocorticoides (RG) y progesterona (RP) (Gronemeyer, 1992), además se han encontrado algunos elementos de respuesta a andrógenos (ARE) específicos para la respuesta androgénica (Kasper *et al.*, 1994). Los elementos de respuesta de los receptores nucleares, son muy similares, están organizados como palíndromes o repeticiones directas de dos secuencias centrales de reconocimiento, relacionadas muy estrechamente. El espaciamiento y orientación de estas secuencias determinan no sólo si un receptor dado puede unirse a su respectivo elemento de respuesta, sino también si esta interacción permite la activación, o la represión transcripcional.

La unión homodimérica del RA al DNA inicia la respuesta de los andrógenos a nivel transcripcional, se sintetiza el RNA mensajero (RNAm) específico del gen

activado, que se traducirá en proteínas andrógeno reguladas (Fig. 2).

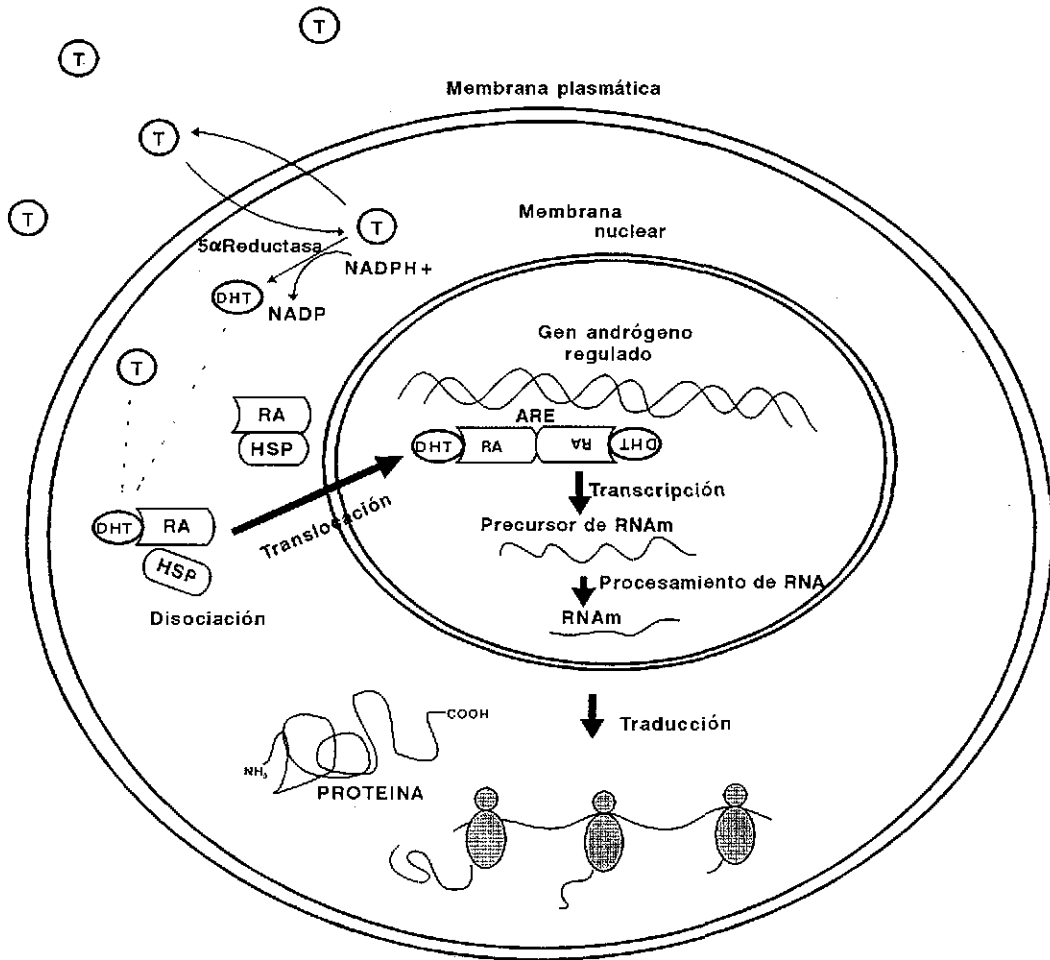


Figura 2. Mecanismo de acción de andrógenos. El paso inicial dentro de la célula blanco es la unión del andrógeno (T o DHT) al receptor de andrógenos intracelular (RA). Esto induce la disociación de proteínas de choque térmico (HSP), el complejo DHT-RA se transloca al núcleo en donde se homodimerizará y se unirá a los elementos de respuesta a los andrógenos (ARE). Esta interacción del dímero con los genes blanco regula la transcripción génica.

RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

El RA forma parte de una familia compuesta de proteínas receptoras nucleares con actividad de transactivadores. El estudio de este grupo de receptores, en base a la comparación de secuencias de sus proteínas y mediante análisis evolutivo con algoritmos en programas de computación (Amero *et al.*, 1992), ha demostrado que proceden de un ancestro común, que probablemente solo mediaba un mecanismo de transducción simple. Así mismo estos estudios indican que el precursor en común de los receptores nucleares, es diferente al de otros factores de transcripción. Dentro de la familia de receptores nucleares, el RA se encuentra en un grupo en donde los otros miembros son el receptor de mineralocorticoides (RM), el RG y el RP. Este grupo está relacionado, no sólo por la homología en la secuencia de bases, principalmente en el dominio de unión al DNA y el dominio de unión al ligando, sino que también por su habilidad de activar la transcripción génica mediante los mismos HREs (Thorton y Kelly, 1998). Este grupo forma parte de una subfamilia de factores de transcripción nuclear mas diversos como el receptor de estrógenos (RE), los receptores de hormonas tiroideas, el receptor de vitamina D, el receptor de ácido retinoico y otros receptores relacionados de los cuales aún no se conocen sus ligandos (Fig. 3).

El RA, como los demás receptores, nucleares tiene seis regiones en su estructura primaria (llamadas de la A a la F), las cuales pueden contener uno o mas dominios funcionales (Fig.4). La región A/B está localizada en la porción NH₂-terminal y contiene una función de activación de transcripción (AF-1). La región C que contiene dos dedos de zinc esenciales para el reconocimiento de los elementos de respuesta a los andrógenos y constituye el dominio de unión al DNA. La región D en donde se encuentran los sitios de localización nuclear. La región E/F que contiene el dominio de unión al ligando y constituye la región C-terminal del receptor, es altamente hidrofóbica, aquí se encuentra la AF-2, en ésta región se unen las proteínas de choque térmico (Gronemeyer, 1992).

El DNA complementario (cDNA) que codifica para el RA humano, se clonó en 1988 (Lubahn *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1988; Trapman *et al.*, 1988). Con el conocimiento de la secuencia de bases del cDNA, el gen se localizó con precisión en el brazo largo del cromosoma X, en la región q11-12 (Lubahn *et al.*, 1988) y en

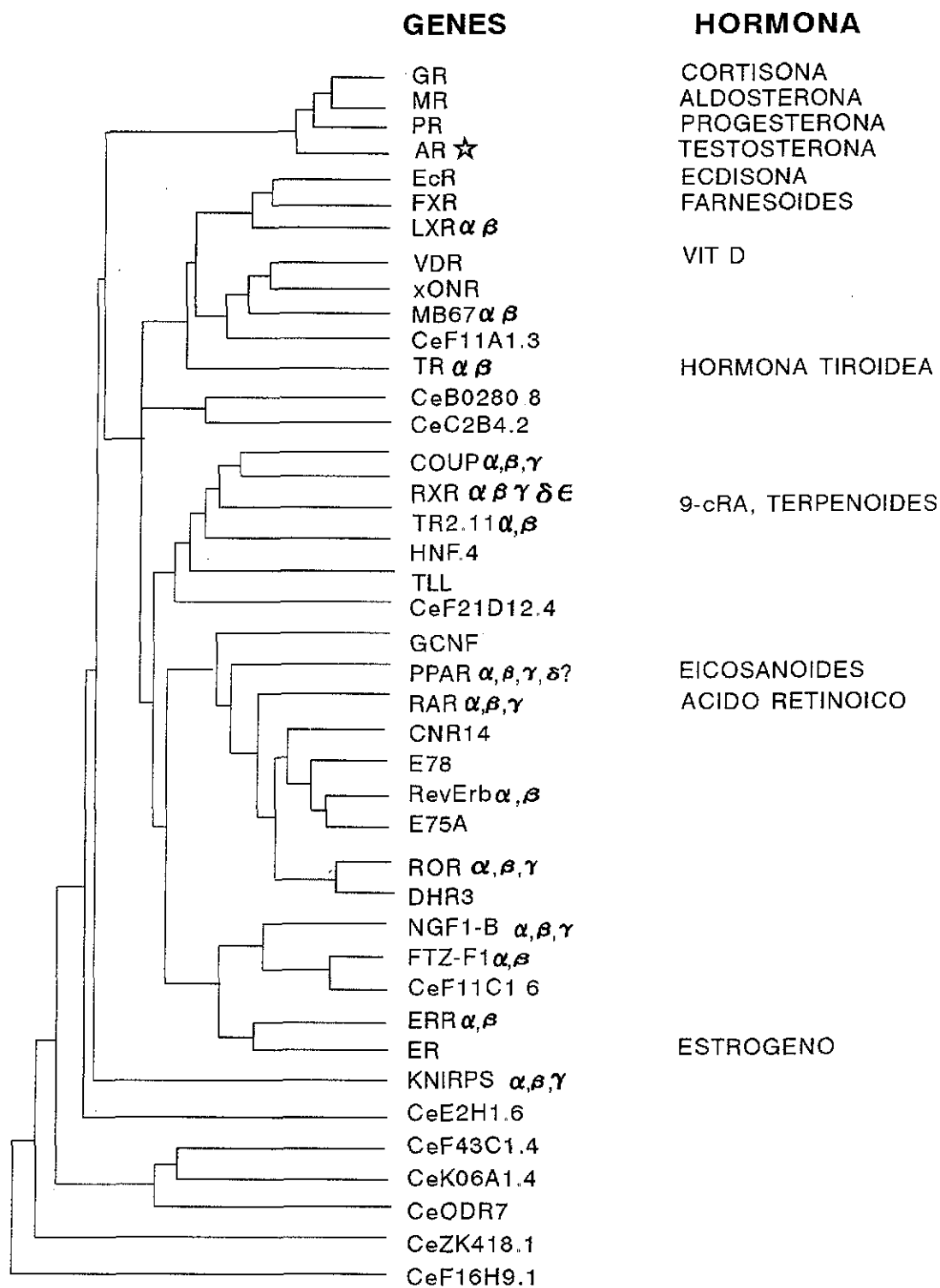


Figura 3 Filogenia del receptor de andrógenos. Esquema del árbol filogenético de los receptores nucleares, se da el nombre de los genes y la hormona al cual se une el receptor nuclear. Esta filogenia sugiere que los receptores a estrógenos se separaron primero de otros receptores de esteroides, seguido un tiempo después por el receptor de andrógenos y los receptores de progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides.

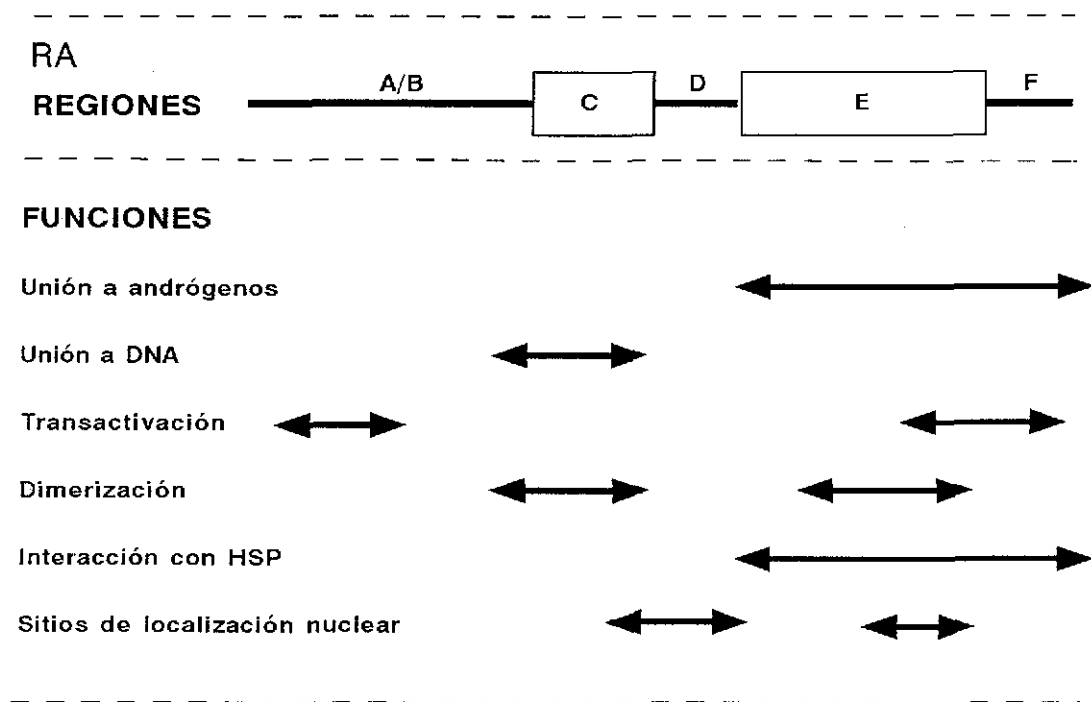


Figura 4. Representación esquemática del receptor de andrógenos, en la que se indica las diferentes regiones del receptor, así como sus funciones.

1989 (Lubahn *et al.*) se informó de las uniones intrón-exón del RA humano (Fig. 5). Con ésta información y con el uso de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha habido una evolución rápida en el conocimiento y comprensión de la estructura del gen del RA y del mecanismo de acción de los andrógenos.

El gen del RA es un gen de copia simple que abarca 75-90 kilobases (kb) de DNA genómico (Kuiper *et al.*, 1989; Brinkmann *et al.*, 1989). La región codificante para proteína, contiene aproximadamente 2757 pares de bases (pb), que se encuentran distribuidas en 8 exones, estos exones están separados por 7 intrones de tamaño variable, que van desde más de 26 kb a 0.7 kb (Fig. 5).

La proteína que codifica el gen del RA tiene un peso molecular de 110-114 kDa (Quarmby *et al.*, 1990; Jenster *et al.*, 1991) que comprende de 910 a 919 amino-

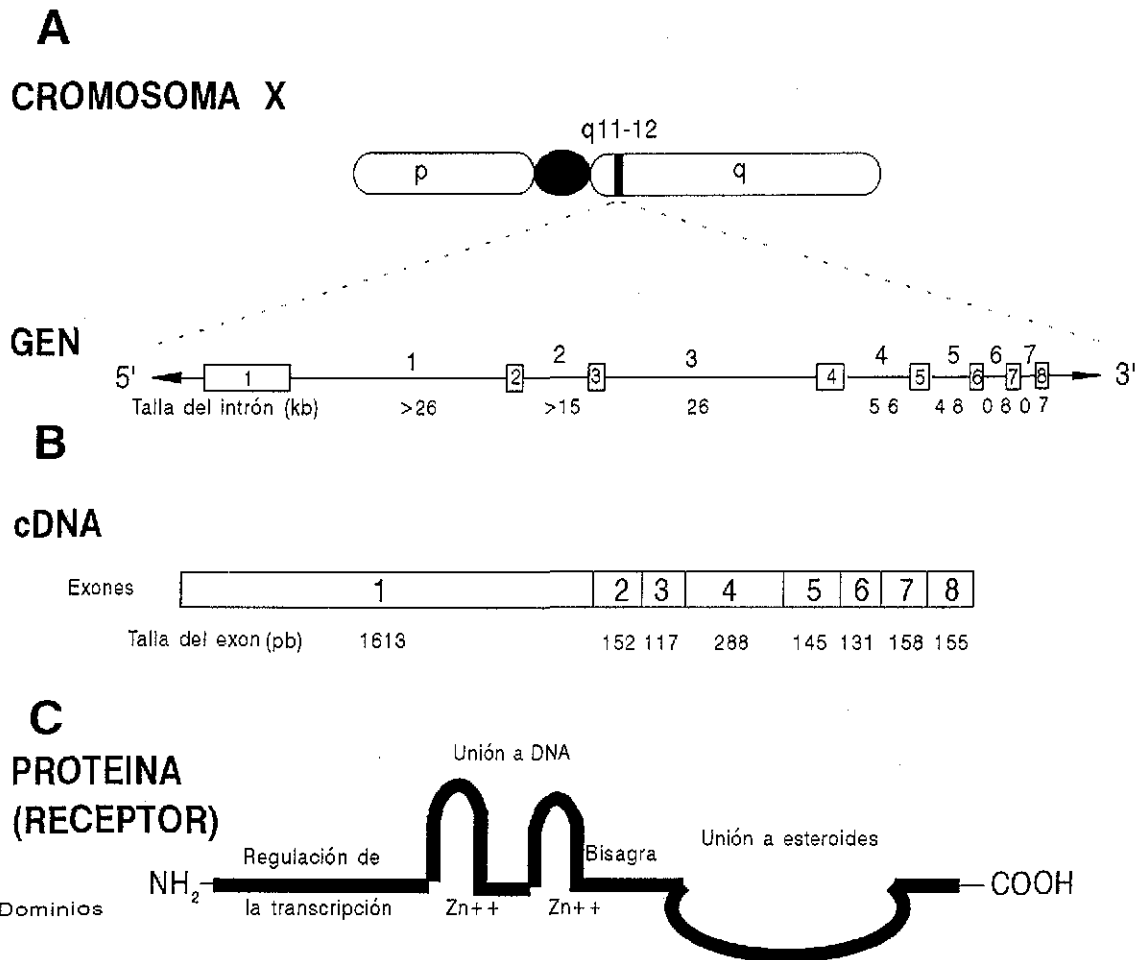


Figura 5. Receptor de andrógenos, su localización en el cromosoma X y la organización estructural del gen y de la proteína. A: el gen del RA se localiza cerca del centrómero del cromosoma X en Xq11-12. B: el gen del RA abarca de 75 a 90 kb de DNA genómico, los 8 exones del gen del RA están separados por 7 intrones. El DNA complementario (cDNA) comprende la región codificante de aproximadamente 2760 pb. C: representación esquemática del RA con sus dominios funcionales.

anteriormente descrita (110-114 kDa) y una más pequeña de 87 kDa (Wilson y McPhaul, 1994). Estas isoformas parecen ser producidas debido a un codón de iniciación alternativo (ATG) dentro de la región codificante del gen del RA. El nivel de expresión relativa de las dos isoformas parece variar considerablemente de una célula a otra. En general, el RA más grande predomina cinco veces sobre el RA pequeño. Las dos isoformas al parecer son idénticas en su respuesta a agonistas y antagonistas y no se han observado marcadas consecuencias en su coexpresión en células de respuesta a andrógenos.

El RA tiene una alta afinidad ($K_d=0.2$ nmol/L) y especificidad por andrógenos (especialmente DHT y testosterona), con una baja capacidad (un sitio de unión por molécula de RA). El análisis del complejo hormona-receptor en gradientes de sacarosa, muestra un coeficiente de sedimentación de $\sim 8S$ en ausencia de KCl y de $\sim 4.5S$ en presencia de sales.

Dominio amino-terminal del RA

El dominio amino-terminal es el más grande del RA, es codificado por el exón 1 y comprende más de la mitad de la proteína receptora (amino-ácidos 1 a 537), es el menos homólogo en su secuencia y el más variable en tamaño entre todos los receptores a esteroides. Contiene una función de activación (AF-1), existe otra en el dominio de unión al ligando (AF-2) y estudios recientes sugieren una interacción entre el dominio amino-terminal y el dominio de unión al ligando que puede jugar un papel muy importante en la actividad transcripcional de los receptores nucleares (Langley *et al.*, 1995; Ikonen *et al.*, 1997). En el dominio amino-terminal del RA la AF-1 se localiza en dos distintas regiones que despliegan una especificidad de línea celular y de promotor, y se encuentran entre los amino-ácidos 110 a 379 y 369 a 494 (Jenster *et al.*, 1995). Alen y colaboradores (1999) demostraron que el dominio amino-terminal interactúa físicamente con coactivadores y con el dominio de unión al ligando, lo que sugirió que esta interacción puede ser un prerrequisito para el reclutamiento eficiente de coactivadores para el receptor nativo y para la actividad transcripcional.

El dominio amino-terminal del RA, en contraste con otros miembros de su subfamilia de receptores a esteroides, contiene trechos con amino-ácidos

homopoliméricos, el trecho que se encuentra más cerca del amino-terminal es el de poliglutaminas (poliGln) y están entre los aminoácidos 58 a 79, son en promedio 21 ± 2 residuos de glutamina (La Spada *et al.*, 1992), aunque se considera normal de 11 a 31 repeticiones. Esta región es altamente polimórfica, existen 20 diferentes tamaños del alelo y el 90% de las mujeres son heterocigotas para el tamaño de esta repetición (Edwards *et al.*, 1992). Existe variación en el promedio del tamaño de repetición entre grupos raciales; el tamaño más frecuente en la población negra es de 18 repeticiones comparado con 21 repeticiones en la raza blanca (Edwards *et al.*, 1992). La región de poliGln se encuentra expandida en pacientes con enfermedad de Kennedy (atrofia muscular espinal y bulbar ligada al cromosoma X), en los que se encuentran entre 40 a 62 las repeticiones (La Spada *et al.*, 1992).

Un poco más adelante (hacia el lado 3') en el dominio amino-terminal, hay un trecho pequeño de nueve prolina, localizadas aproximadamente en los aminoácidos 372 a 379, el cual no varía en tamaño, y cerca del dominio de unión al DNA se encuentra otra región polimórfica, un trecho de 24 glicinas (aminoácidos 449 a 472). Aunque las funciones de estas regiones en el RA todavía no se conocen con exactitud, hay evidencias de que los trechos de poliGln y poliprolinas, pueden ser importantes en la regulación de la transcripción, vía interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción (Gerber *et al.*, 1995), tal vez formando láminas β que actúan como una cremallera polar para acoplar proteínas específicas complementarias, involucradas en la activación de la transcripción (Perutz *et al.*, 1994).

Dominio de unión al DNA del RA

El dominio de unión al DNA, que es una región rica en cisteínas, se encuentra entre los aminoácidos 538 a 627, es codificado por los exones 2 y 3 del gen del RA. La secuencia de aminoácidos en este dominio es la región más altamente conservada entre los miembros de la familia de receptores a esteroides, los dedos de zinc del RA tienen aproximadamente 80% de similitud en aminoácidos con el RG, el RM y el RP (Freedman, 1992). Esta región está conformada por dos dedos de zinc, el primero (aminoácidos 559-579) es codificado por el exón 2 y el segundo (aminoácidos 595-614) por el exón 3. Este dominio reconoce específicamente los HREs

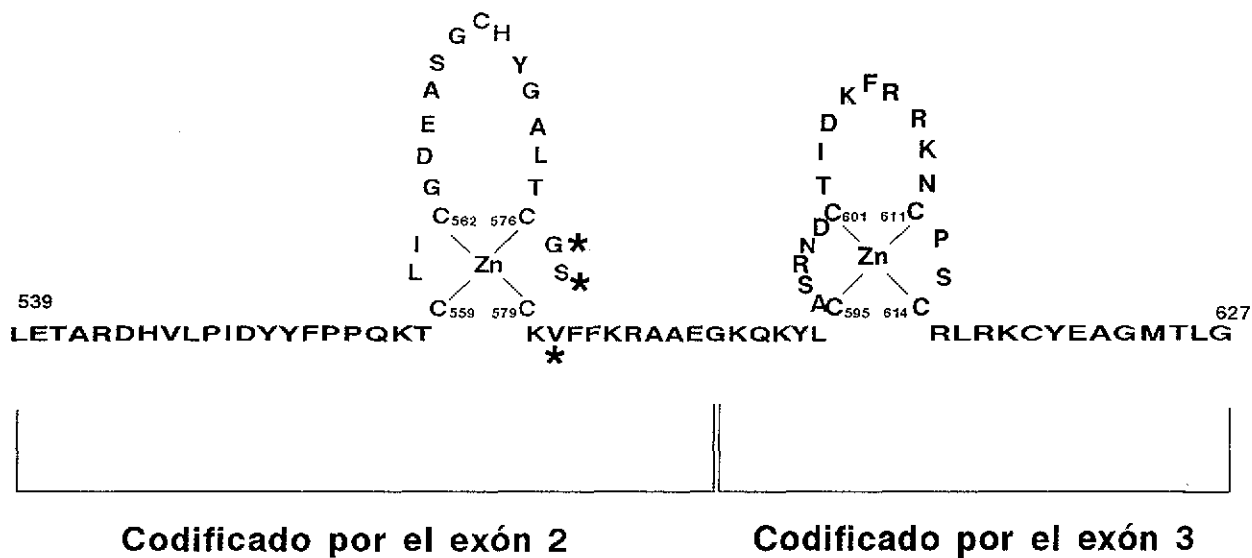


Figura 6. Dominio de unión al DNA del gen del receptor de andrógenos. Es codificado por el exón dos en donde se forma el primer dedo de zinc, y por el exón 3 en donde se forma el segundo dedo de zinc. Los asteriscos indican los sitios de reconocimiento de los elementos de respuesta a esteroides (HRE)

que se encuentran en la región promotora de los genes andrógeno-regulados. El primer dedo de zinc (Fig. 6) contiene la información primaria para el reconocimiento de los HREs específicos, éste incluye los amino-ácidos discriminatorios en la base de este dedo de zinc en el RA (Gly 577, Ser 578 y Val 581) lo que le confiere especificidad en el reconocimiento del DNA (Umesono y Evans, 1989), a estos residuos se les ha llamado la “caja P” (por dedo Proximal), basados en la secuencia de la caja P, el RA, el RG, el RP y el RM, se han clasificado como el grupo “GSCKV” (Jenster *et al.*, 1995). El segundo dedo de

zinc estabiliza la unión del receptor al DNA contactando las uniones azúcar-fosfato de las secuencias adyacentes (Beato, 1989), y también contiene 5 amino-ácidos en el tallo del dedo de zinc que provee discriminación del espacio intermedio entre los dedos de zinc (Umesono y Evans, 1989).

El RA se une como un homodímero a elementos de respuesta a andrógenos (AREs) específicos, en una manera cooperativa, el RA puede reconocer el elemento de respuesta a glucocorticoides consenso, 5'-GGTACAnnnTGTTCT (Beato, 1989) y también se une los AREs más específicos, como la unión del RA que se encuentra en la región promotora del gen de probasina (Kasper *et al.*, 1994), además de los amino-ácidos requeridos para el reconocimiento del ARE y del interespacio, otros amino-ácidos en los dedos de zinc son necesarios también para la función normal de RA. Estudios de mutagénesis *in vitro* han determinado que la cistina 569, que se encuentra en medio del primer dedo de zinc, juega un papel esencial en la estabilidad DNA-receptor (Warriar *et al.*, 1994). El estudio de mutaciones que ocurren naturalmente también han identificado otros amino-ácidos necesarios para la unión al DNA, incluyendo los residuos de cistina requeridos para mantener la arquitectura de los dedos de zinc (Zoppi *et al.*, 1992; Baldazzi *et al.*, 1994; Lumbroso *et al.*, 1993). Las secuencias fuera de los dedos de zinc pueden también contribuir a la unión del RA al DNA, se ha observado que deleciones en el dominio amino-terminal reducen de dos a seis veces la afinidad por el DNA (Kellio *et al.*, 1994), sugiriendo que este dominio del receptor contribuye a la estabilidad del complejo unido al DNA. Extractos nucleares de varios tejidos y líneas celulares pueden aumentar la interacción del RA (dominio de unión al DNA) con AREs del gen C3 de la proteína de unión prostática regulada por andrógenos (De Vos *et al.*, 1994), lo que sugiere que existen factores ubicuos que interactúan con el dominio de unión al DNA y estabilizan la unión del DNA de una manera cooperativa.

Región Bisagra del RA.

La región bisagra se encuentra entre el dominio de unión al DNA y el dominio de unión al ligando, tiene una baja homología entre el RA y otros receptores. Esta región está codificada por la porción 5' del exón 4 (~ aminoácidos 628 al 670), y contiene la mayor parte de las señales de localización nuclear del RA, que es un

conjunto de amino-ácidos básicos en las posiciones 629-633: Arg, Lys, Leu, Lys, Lys (Simental *et al.*, 1991; Jenster *et al.*, 1993). Estos aminoácidos tienen homología con los sitios de localización nuclear (NLS) del antígeno T grande del SV-40, la mutagénesis de cualquiera de los dominios básicos en los NLS implica la permanencia del RA en citoplasma en ausencia de hormona, y poca localización en el núcleo en presencia de hormona, los NLS se han observado también en el RG, en el RP, en el receptor de vitamina D y en el receptor de hormonas tiroideas (LaCasse *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 1994; Guiochon-Mantel *et al.*, 1989).

La localización del RA ha sido controversial, ya que en diferentes estudios se han encontrado diversas distribuciones (Jenster *et al.*, 1993). En células Cos-7 el RA no ligado se encuentra en citoplasma y es totalmente translocado al núcleo en 30 min al adicionar su ligando (Georget *et al.*, 1997), la cinética específica del RA ha sido relacionada con una señal nuclear bipartita entre el dominio de unión al DNA y la región bisagra. También se ha demostrado que el citoesqueleto está involucrado en el mecanismo de transporte del RA al núcleo, Ozanne y col. (2000) demostraron que la proteína de unión a actina, filamina, un componente del citoesqueleto de 280 kDa, interactúa con el RA, los autores observaron que en células deficientes de filamina el RA permanecía en el citoplasma aun después de una prolongada exposición a un andrógeno sintético, la mibolerona, y la translocación al núcleo se restauró cuando la línea celular recuperó la expresión de filamina.

Dominio de unión al ligando del RA

El dominio de unión al ligando se encuentra en la región carboxilo terminal del RA, está codificado por la porción 3' del exón 4 y por los exones 5 al 8, comprende los amino-ácidos 670 a 919. La secuencia de amino-ácidos despliega una identidad de cerca del 50% con sus correspondientes residuos del RM, del RP y del RG. Una de las principales funciones de este dominio es la unión de andrógenos con alta afinidad y alta especificidad. La unión del RA a su ligando induce una transformación del receptor, asociada a un incremento en afinidad por el DNA y un decremento en el tamaño del receptor como resultado de la disociación de proteínas de choque térmico (Grino *et al.*, 1987; Colvard y Wilson, 1987). El RA

inicialmente con un coeficiente de sedimentación de 8S, se transforma al unirse a su ligando debido a la pérdida de la Hsp90 y la Hsp56, y da como resultado un complejo intermedio de 6S, este complejo posiblemente es un heterodímero formado con el RA y una Hsp70 o alguna otra proteína aún no identificada que cuando se separa da lugar a un RA de 4.6S, con el dominio de unión al DNA expuesto, lo que le dará un carácter de receptor “activado” (Veldscholte *et al.*, 1992).

Recientemente ha sido posible el estudio del dominio de unión al ligando en receptores cristalizados (Mora y Gronemeyer, 1998), y se ha determinado su configuración tridimensional. De acuerdo a sus estructuras cristalinas, el dominio de unión al ligando tiene pliegues con 12 hélices- α (H1-H12) y una rotación β , con dos cadenas β antiparalelas, el arreglo de todos estos pliegues da lugar a una estructura de varias capas de hélices α (Fig 7). Se ha propuesto que cuando se une el andrógeno, las hélices 10 y 11 se hacen continuas, liberando la hélice 12 la cual tiene un movimiento conformacional notable, cubriendo o actuando como tapadera para la cavidad de unión del ligando, de esta manera el receptor encierra a su ligando (Fig 7, abajo). La cavidad en la cual se une el andrógeno, se compone de aminoácidos hidrofóbicos que están aproximadamente entre los codones 735 y 787, y entre los 855 y 865. Esta cavidad une al anillo A del esteroide con precisión y al anillo D con alguna flexibilidad, sustituciones en este anillo también son reconocidas, por ejemplo, la progesterona y la testosterona difieren solo en el anillo D, pero los receptores son selectivos para su propia hormona. La estabilización de la cavidad de unión al ligando es mediante fuerzas de van der Waals y por uniones de hidrógeno.

El dominio de unión al ligando, también está involucrado en la dimerización del RA. El receptor de andrógenos se une a sus AREs como un homodímero, con cada monómero que reconoce una mitad del elemento de respuesta palindrómico (Wong *et al.*, 1993). Tanto el dominio de unión al DNA como el de unión al ligando, están involucrados en la dimerización del receptor. El dominio de unión al ligando del RA tiene una potente habilidad para formar homodímeros él solo (Nemoto *et al.*, 1994), pero el dominio de unión al DNA no lo puede hacer solo, por lo que se le

DOMINIO DE UNION AL LIGANDO DEL RA

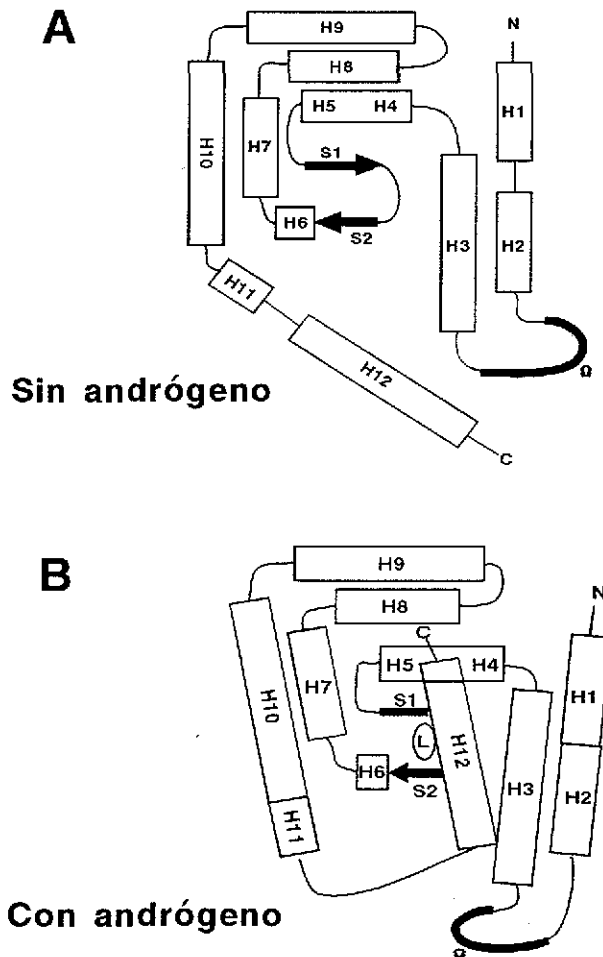


Figura 7. Configuración tridimensional del dominio de unión al ligando del receptor de andrógenos. A: El dominio de unión al ligando está conformado por 12 hélices α (H1 a H12) que forman rizos, y por dos cadenas β antiparalelas (S1 y S2). B: Al unirse el ligando (L) cambia la conformación tridimensional especialmente de la hélice H11 y H12.

considera mas débil en esta actividad. En ausencia del dominio amino terminal del RA, la dimerización ocurre constitutivamente de una manera hormono-independiente, pero el receptor entero requiere de la unión al andrógeno para efectuar la dimerización. Estos datos sugieren que el dominio amino terminal del receptor inhibe la dimerización, y que la unión del ligando y la unión al ARE cambia la conformación del receptor para vencer la inhibición impuesta por el dominio amino-terminal. La dimerización entre los monómeros estabiliza la orientación de la estructura dimérica de tal manera que el primer dedo de zinc de cada monómero se une a una mitad del ARE, con un espacio de 3pb entre los sitios de unión, proveyendo una orientación espacial correcta sobre el DNA.

Estudios recientes (Langley *et al.*, 1998) indican que para que ocurra la dimerización del RA, es necesaria una interacción entre los dominios amino y carboxilo terminal del receptor, esta interacción es dependiente de la unión al andrógeno y la interacción tiene un arreglo antiparalelo de los monómeros del RA.

Dentro del dominio de unión al ligando, se encuentra una función de activación ligando dependiente (AF-2), ésta se localiza en la región carboxilo terminal, en la hélice α 12, e incluye los aminoácidos 881 al 889 (Mac Lean *et al.*, 1997).

Las señales de transducción del RA, parecen estar mediadas a través de un número de proteínas coreguladoras, que interactúan con regiones de activación tanto en el dominio amino terminal como en el dominio de unión al ligando (AF-1 y AF-2).

Para que ocurra la transcripción, es necesaria la formación de un complejo preiniciador en la región promotora del gen blanco, que involucra numerosos factores de transcripción generales, que permitirán el ensamblaje de la RNA polimerasa II al DNA. Los receptores de esteroides activan genes blanco estabilizando este complejo de preiniciación a través de interacciones directas con la maquinaria de transcripción, incluyendo los factores TFIIB, TBP, TFIID y TFIIF (Jacq *et al.*, 1994; Schulman *et al.*, 1995; Beato y Sánchez Pacheco, 1996). Para que ocurran estas interacciones es necesario la presencia de las dos funciones de transactivación (AF-1 y AF-2) en el receptor, que actúan de manera sinérgica e interactúan con moléculas proteínicas que actúan como coreguladores.

Los coreguladores (coactivadores y correpresores), en su mayoría son

relativamente promiscuos con los receptores nucleares, son capaces de asociarse con muchos de ellos y probablemente lo hagan simultáneamente.

Algunos coactivadores relacionados con los receptores a esteroides han sido identificados y caracterizados, y se les agrupa en una familia llamada coactivadores p160, e incluyen al coactivador de receptores de esteroides-1 (SRC-1), o NCoA-1 (Kamei *et al.*, 1996; Torchia *et al.*, 1997); SRC-2 o TIF2 (Voegel *et al.*, 1996), o GRIP1 (Hong *et al.*, 1996), o NcoA2 (Torchia *et al.*, 1997); y SRC-3 o AcTR (Chen *et al.*, 1997), o RAC3 (Li *et al.*, 1997), o AIB1 (Anzick *et al.*, 1997) o p/CIP (Torchia *et al.*, 1997) o TRAM (Takeshita *et al.*, 1996).

También se han encontrado otros factores proteínicos que interactúan con los receptores a esteroides de una manera ligando dependiente e incluyen a los p160, ERAP 140, RIP160, RIP140, TRIP1/SUG1, TRIP230, TIF1, ARA70 y CBP/p300 (Halachmi *et al.*, 1994; Cavailles *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; vom Baur *et al.*, 1996; Yeh y Chang, 1997; Chakravarti *et al.*, 1996).

El mecanismo preciso por el que los coactivadores de los receptores de esteroides modulan la función de transactivación aún no se ha determinado, hallazgos recientes de que los miembros de la familia SCR-1 y los coactivadores CBP y p/CAF, poseen actividad intrínseca de histona acetil-transferasa, sugiere que los receptores activados, pueden reclutar estos coactivadores para remodelar la estructura de la cromatina, y de esta manera mejorar la accesibilidad de la maquinaria de transcripción al DNA (Chen *et al.*, 1997, Onate *et al.*, 1998).

PAPEL DEL RA Y LOS ANDRÓGENOS EN EL DESARROLLO DEL FENOTIPO MASCULINO.

La diferenciación sexual masculina se inicia al establecerse el sexo cromosómico 46XY, con este evento se inicia el funcionamiento de genes que darán origen a las gónadas masculinas (testículos), estableciéndose el sexo gonadal. El gen SRY (sex-determining region of the Y-chromosome) es el principal iniciador de la cascada de genes que determinarán la formación del testículo a partir de la gónada indiferenciada. Las células germinales primordiales, migran del saco vitelino al pliegue urogenital, el cual se desarrolla sobre la superficie ventral del mesonefros primitivo. El primer signo de la determinación testicular es la agregación de células de pre-Sertoli, que

relativamente promiscuos con los receptores nucleares, son capaces de asociarse con muchos de ellos y probablemente lo hagan simultáneamente.

Algunos coactivadores relacionados con los receptores a esteroides han sido identificados y caracterizados, y se les agrupa en una familia llamada coactivadores p160, e incluyen al coactivador de receptores de esteroides-1 (SRC-1), o NCoA-1 (Kamei *et al.*, 1996; Torchia *et al.*, 1997); SRC-2 o TIF2 (Voegel *et al.*, 1996), o GRIP1 (Hong *et al.*, 1996), o NcoA2 (Torchia *et al.*, 1997); y SRC-3 o AcTR (Chen *et al.*, 1997), o RAC3 (Li *et al.*, 1997), o AIB1 (Anzick *et al.*, 1997) o p/CIP (Torchia *et al.*, 1997) o TRAM (Takeshita *et al.*, 1996).

También se han encontrado otros factores proteínicos que interactúan con los receptores a esteroides de una manera ligando dependiente e incluyen a los p160, ERAP 140, RIP160, RIP140, TRIP1/SUG1, TRIP230, TIF1, ARA70 y CBP/p300 (Halachmi *et al.*, 1994; Cavailles *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; vom Baur *et al.*, 1996; Yeh y Chang, 1997; Chakravarti *et al.*, 1996).

El mecanismo preciso por el que los coactivadores de los receptores de esteroides modulan la función de transactivación aún no se ha determinado, hallazgos recientes de que los miembros de la familia SCR-1 y los coactivadores CBP y p/CAF, poseen actividad intrínseca de histona acetil-transferasa, sugiere que los receptores activados, pueden reclutar estos coactivadores para remodelar la estructura de la cromatina, y de esta manera mejorar la accesibilidad de la maquinaria de transcripción al DNA (Chen *et al.*, 1997, Onate *et al.*, 1998).

PAPEL DEL RA Y LOS ANDRÓGENOS EN EL DESARROLLO DEL FENOTIPO MASCULINO.

La diferenciación sexual masculina se inicia al establecerse el sexo cromosómico 46XY, con este evento se inicia el funcionamiento de genes que darán origen a las gónadas masculinas (testículos), estableciéndose el sexo gonadal. El gen SRY (sex-determining region of the Y-chromosome) es el principal iniciador de la cascada de genes que determinarán la formación del testículo a partir de la gónada indiferenciada. Las células germinales primordiales, migran del saco vitelino al pliegue urogenital, el cual se desarrolla sobre la superficie ventral del mesonefros primitivo. El primer signo de la determinación testicular es la agregación de células de pre-Sertoli, que

derivan probablemente del mesonefros adyacente, y se establecen alrededor de las células germinales, formando un cordón sexual primario a las 6 ó 7 semanas de gestación. El gen SOX9 juega un papel crucial en esta ruta, en donde a su vez es regulado por el SRY y el SF1 para iniciar la diferenciación de células de pre-Sertoli a células de Sertoli . Al final de la novena semana, el mesénquima que separa los cordones seminíferos, da lugar a las células intersticiales, las cuales se diferencian a células de Leydig. Con la proliferación de las células de Leydig, se iniciará la expresión de enzimas esteroidogénicas y la expresión del RA en las células peritubulares mioides (Murray *et al.*, 2000). La diferenciación sexual una vez formada la gónada, es casi exclusivamente hormono-dependiente.

El primordio de los ductos genitales internos, tanto en el macho como en la hembra, se encuentran inicialmente presentes, y se derivan respectivamente de los ductos mesonéfricos y el epitelio celómico, entre el pliegue genital y el mesonefros. En el macho la regresión de los ductos Müllerianos se inicia en la octava semana de gestación a través de la actividad de la hormona anti-Mülleriana secretada por las células de Sertoli, la cual se une a receptores expresados en el mesénquima que rodea a los ductos Müllerianos. La hormona anti-Mülleriana es una glicoproteína que pertenece a la superfamilia de los TGF- β (Transforming Growth Factor), en la cual se incluyen la inhibina y la activina.

La estabilización de los ductos Wolffianos, para diferenciarse a los vasos deferentes, epidídimo y vesículas seminales, depende de la actividad de la testosterona, que se sintetiza en las células de Leydig del testículo fetal, la diferenciación se efectúa aproximadamente a las 13 semanas de desarrollo embrionario, antes de que estos tejidos tengan la capacidad de formar DHT. En la hembra hay una regresión de los ductos Wolffianos al no existir andrógenos (Hughes, 2001; Hiort y Holterhus, 2000).

La diferenciación morfológica de los genitales externos masculinos es regulada por los andrógenos y se efectúa primordialmente por la actividad de la DHT, la cual se forma por la acción de la 5 α -reductasa 2 presente en estos tejidos (Wilson *et al.*, 1993). La DHT actúa en el seno urogenital para inducir el desarrollo de la uretra masculina y de la próstata, y en el tubérculo urogenital y en los pliegues, para causar el agrandamiento y la fusión labioescrotal, que eventualmente formarán el

pene y el escroto.

La presencia de un RA funcional, es estrictamente necesaria para mediar la acción tanto de testosterona como de DHT, las cuales inducirán la expresión de genes andrógeno dependientes necesarios para la masculinización tanto de genitales internos como externos. La alteración en la producción o en la actividad de los andrógenos durante este periodo crítico de diferenciación, interrumpe la secuencia ordenada de eventos y da como resultado una falla en la masculinización del individuo.

SÍNDROMES DE INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS

Los pacientes con el Síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos (SIA), han sido descritos en la literatura médica desde el siglo XIX, pero fue Morris quién en una revisión publicada en 1953, hizo un análisis de 82 casos, en donde establece por primera vez las características de los individuos con el síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos (Morris, 1953), el cual inicialmente fue denominado Feminización Testicular.

Las características descritas son las siguientes: individuos con fenotipo femenino, con depósitos de grasa femeninos, en algunos casos tienen tendencias eunucoides con extremidades largas y manos y pies grandes. Tienen desarrollo mamario normal, con tendencia a tener un crecimiento mayor que en la mujer normal, aunque con un pezón juvenil. En la mayoría de los casos no presentan vello axilar y púbico. El cabello de la cabeza es normal, sin recesión temporal, y el pelo facial, como son la barba y el bigote están ausentes, como en un niño. Los genitales externos son femeninos, los labios se encuentran subdesarrollados especialmente los labios menores. El clítoris es normal o pequeño. La vagina termina en fondo de saco ciego. Los genitales internos se encuentran ausentes o son rudimentarios. Las gónadas se encuentran en el abdomen, o en el canal inguinal, y contienen de tubulos seminíferos usualmente sin espermatogénesis, pero en la mayoría de los casos con un marcado aumento en las células intersticiales. Todo esto consistente con testículos no descendidos que frecuentemente pueden presentar adenomas. La medición hormonal que encontró en pocos casos de su revisión presentaban la producción de estrógenos y andrógenos y las gonadotrofinas eran elevadas en

pene y el escroto.

La presencia de un RA funcional, es estrictamente necesaria para mediar la acción tanto de testosterona como de DHT, las cuales inducirán la expresión de genes andrógeno dependientes necesarios para la masculinización tanto de genitales internos como externos. La alteración en la producción o en la actividad de los andrógenos durante este periodo crítico de diferenciación, interrumpe la secuencia ordenada de eventos y da como resultado una falla en la masculinización del individuo.

SÍNDROMES DE INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS

Los pacientes con el Síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos (SIA), han sido descritos en la literatura médica desde el siglo XIX, pero fue Morris quién en una revisión publicada en 1953, hizo un análisis de 82 casos, en donde establece por primera vez las características de los individuos con el síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos (Morris, 1953), el cual inicialmente fue denominado Feminización Testicular.

Las características descritas son las siguientes: individuos con fenotipo femenino, con depósitos de grasa femeninos, en algunos casos tienen tendencias eunucoides con extremidades largas y manos y pies grandes. Tienen desarrollo mamario normal, con tendencia a tener un crecimiento mayor que en la mujer normal, aunque con un pezón juvenil. En la mayoría de los casos no presentan vello axilar y púbico. El cabello de la cabeza es normal, sin recesión temporal, y el pelo facial, como son la barba y el bigote están ausentes, como en un niño. Los genitales externos son femeninos, los labios se encuentran subdesarrollados especialmente los labios menores. El clítoris es normal o pequeño. La vagina termina en fondo de saco ciego. Los genitales internos se encuentran ausentes o son rudimentarios. Las gónadas se encuentran en el abdomen, o en el canal inguinal, y contienen de tubulos seminíferos usualmente sin espermatogénesis, pero en la mayoría de los casos con un marcado aumento en las células intersticiales. Todo esto consistente con testículos no descendidos que frecuentemente pueden presentar adenomas. La medición hormonal que encontró en pocos casos de su revisión presentaban la producción de estrógenos y andrógenos y las gonadotrofinas eran elevadas en

algunos casos.

Esta descripción clínica efectuada en 1953 es vigente aún para los individuos que presentan una insensibilidad completa a la acción de los andrógenos. Actualmente también se reconocen los SIA parciales, es decir que los individuos presentan cierto grado de virilización, y se han descrito con una gama de anormalidades que van desde individuos con fenotipo femenino ligeramente virilizados (Lubs *et al.*, 1959), o individuos con hipospadias, infertilidad y ginecomastia (Gilbert-Dreyfus *et al.*, 1957; Reinfestein , 1947), hasta individuos con fenotipo masculino que al llegar a la pubertad presentan ginecomastia y una virilización por abajo de lo normal (Rosewatwer *et al.*, 1965), y en 1979, Ainman y colaboradores introducen el concepto de un SIA en hombres normales con oligo/azoospermia, lo que les produce solamente infertilidad.

La determinación etiológica de la insensibilidad a los andrógenos en estos pacientes, se estableció en 1974 (Keenan *et al.*), efectuando estudios de unión de andrógenos en fibroblastos provenientes de piel genital mantenidas en cultivo, en estos estudios se estableció la existencia de un RA intracelular con actividad defectuosa, lo que explicaba la falta de actividad androgénica. A partir de entonces se llevaron a cabo numerosos estudios de unión de andrógenos en células mantenidas en cultivo (Griffin *et al.*, 1976; Kaufman *et al.*, 1976; Brown y Migeon, 1981; Medina *et al.*, 1981), confirmando el estudio original de Keenan.

Durante más de 15 años, el estudio de unión de andrógenos en fibroblastos derivados de piel genital mantenidos en cultivo, fue la única manera de conocer si el RA de andrógenos era funcional. Se encontraron diferentes defectos en la unión del RA a su ligando; en algunos pacientes, casi todos con SIA completo, no había unión del RA a su ligando, y se les denominó como Receptor negativo, en otros pacientes se encontraron anormalidades como una disminución en la unión de RA a su ligando, a los que se les designó como Receptor deficiente o reducido, lo que denotaba un defecto cuantitativo, y otros tenían alteraciones cualitativas, como una termolabilidad (disminución de unión a más de 37°C), un aumento en la velocidad de disociación del complejo hormona-receptor o una especificidad al ligando alterada (Keenan *et al.*, 1974; Pinsky *et al.*, 1981; Brown *et al.*, 1982; Evans, 1984; Pinsky *et al.*, 1985).

También se encontró en algunos pacientes (Kaufman *et al.*, 1979) la presencia de un RA con características de unión al su ligando igual a los encontrados en los controles normales, lo que no explicaba la no funcionalidad del andrógeno, en estos pacientes se postuló que la alteración era post-receptor (Pérez-Palacios *et al.*, 1987). La correlación de las alteraciones (cuantitativas o cualitativas) en la unión del RA a su ligando, con el fenotipo de los pacientes con SIA, no ha dado resultados concluyentes. Y aunque los estudios de unión dan información valiosa con respecto a la función del RA, la falta de correlación hace que los estudios de unión tengan un valor limitado.

Estudios moleculares del RA en individuos con SIA

El estudio a nivel molecular del RA en individuos con SIA fue posible al conocer la secuencia del DNAC del gen del RA (Lubahn *et al.*, 1988), así como las secuencias de los nucleótidos en la región de corte y empalme intrón/exón (Lubahn *et al.*, 1989).

Se han establecido técnicas para conocer la integridad estructural del RA, basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), amplificando la región codificante del gen del RA, usando oligonucleótidos específicos para cada exón. La presencia de defectos estructurales mayores, como una delección, se detectan al no haber amplificación mediante la PCR, y verificando mediante el análisis de Southern blot, el DNA genómico hibridizado con una sonda específica del gen del RA.

Para detectar una mutación pequeña (puntual), en el gen del RA (mas de 2500 pb), se han establecido diversas técnicas como la electroforesis de gel en gradiente desnaturizante (DGGE) o el análisis del polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP). Una vez detectada la alteración mediante estas técnicas se procede a secuenciar el exón afectado. El uso de un secuenciador automático, que en la actualidad es mas común, permite hacer la secuenciación total de la región codificante del gen, y detectar directamente la mutación.

El estudio molecular del gen del RA, ha permitido la identificación y caracterización de una variedad de defectos en el gen del RA relacionados con el

SIA. Se ha encontrado la delección completa del gen del RA en dos familias no relacionadas (Trifiro *et al.*, 1991; Quigley *et al.*, 1992), estos individuos representan la manera mas “pura” de una resistencia completa a la acción de los andrógenos, ya que la ausencia total del RA no permitirá la actividad androgénica. Delecciones parciales en el gen del RA en el SIA también han sido observadas: Delección de los exones 4 al 8 (Brown *et al.*, 1988), delección de los exones 3 al 8 (Brown *et al.*, 1993), delección del exón 5 en algunos individuos y delección de los exones 6 y 7 en otros individuos de una misma familia (MacLean *et al.*, 1993), delección del exón 2 (Quigley *et al.*, 1995), entre otras . Estas delecciones que alteran totalmente la estructura de la proteína receptora, han causado una resistencia completa a la acción de los andrógenos.

Las delecciones o inserciones de una pequeña cantidad de nucleótidos también han sido reportadas en el gen del RA, y también han originado en su mayoría una resistencia completa a la acción de andrógenos, ya que al insertar o deletar una pequeña cantidad de bases, se altera el marco de lectura, dando como resultado una proteína truncada.

Las mutaciones puntuales en el gen del RA son las que están presentes en mayor cantidad en los pacientes con SIA, se han observado a través de todos los exones y en los sitios de corte y empalme exón/intrón.

Las mutaciones puntuales encontradas han originado codones de terminación prematuros (Marcelli *et al.*, 1990, DeBellis *et al.*, 1992, Zoppi *et al.*, 1993), cambio de aminoácidos, y también se han detectado mutaciones que originan mutaciones silenciosas (Gottlieb *et al.*, 1999).

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La virilización de individuos 46XY durante la embriogénesis, así como el desarrollo y función de los caracteres masculinos, son dependientes de la actividad de las hormonas androgénicas, principalmente testosterona y dihidrotestosterona. En ausencia de andrógenos, la diferenciación sexual masculina no se lleva a cabo, como en el caso del feto femenino normal, o bien en ausencia de un receptor funcional como ocurre en el macho genético que desarrolla genitales externos femeninos debido a una insensibilidad a los andrógenos.

La insensibilidad a los andrógenos se caracteriza por una falta de respuesta de la célula blanco a estos compuestos y se ha demostrado que es debida a una falla en el funcionamiento del RA, originada por mutaciones en su gen. Los pacientes con insensibilidad a los andrógenos, son modelos naturales valiosos, ya que en ellos se puede observar el resultado de una mutación en el gen del RA, y estas mutaciones dan una información importante concerniente a la función del RA.

La identificación de las mutaciones en el RA de pacientes con SIA permite conocer los mecanismos moleculares que causan varias formas de ambigüedad genital, optimiza el diagnóstico y permite diseñar estrategias preventivas y terapéuticas para esta enfermedad.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Identificar a nivel génico, las alteraciones en el receptor de andrógenos de pacientes con insensibilidad a la acción de andrógenos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener DNA de individuos diagnosticados con Insensibilidad a los Andrógenos, y detectar la presencia de mutaciones dentro de la secuencia codificante del gen del receptor de andrógenos, mediante estudios de Polimorfismo Conformacional de Cadena Simple (SSCP), del DNA amplificado por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
2. Caracterizar las mutaciones en el gen del Receptor de Andrógenos, mediante análisis de secuenciación del DNA de los exones portadores de la alteración.

MATERIAL Y MÉTODOS

SUJETOS

Los individuos estudiados fueron diagnosticados en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), en el Hospital General de México, en el Instituto Nacional de Pediatría (INP), en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en el Hospital Infantil Federico Gómez y en el Hospital 20 de Noviembre (ISSTE).

Se estudiaron 35 individuos que pertenecen a 28 familias diferentes (en adelante solo se referirán los casos por familia).

De los 28 diferentes casos estudiados, 15 fueron diagnosticados con Síndrome de Insensibilidad Completa a los Andrógenos (SICA) y 13 fueron diagnósticados con Síndrome de Insensibilidad Parcial a los Andrógenos (SIPA).

Las características clínicas de los pacientes, se describen en las tablas 1 y 2.

A cada uno de los pacientes se les tomó sangre periférica para la obtención de DNA. En algunos de ellos, se tomó biopsia de piel de área genital para el cultivo de fibroblastos. El DNA usado como control se aisló de sangre de individuos normales, preferentemente de sexo masculino (46XY). Los fibroblastos usados como controles normales, provenían de piel de prepucio, obtenido de circuncisiones de individuos normales.

Tabla 1. Individuos con Síndrome de Insensibilidad Completa a los Andrógenos

Sujeto	Edad	Cariotipo	Características Clínicas
1C	17 años	46 XY	Fenotipo femenino, sin vello púbico, labios mayores y menores hipoplásicos, testículos intrabdominales, sin derivados Mullerianos, desarrollo mamario Tanner 4.
2C	1 mes	46 XY	Fenotipo femenino con testículos intrabdominales.
3C	28 años	46 XY	Fenotipo femenino, sin vello axilar y púbico, desarrollo mamario Tanner 4, con antecedentes familiares relacionados al síndrome.
4C	18 años	46 XY	Fenotipo femenino, labios mayores y menores hipoplásicos, testículos en canal inguinal, escaso vello axilar y púbico, escaso vello corporal, desarrollo mamario Tanner 5 Sin antecedentes familiares.
5C	26 años	46 XY	Fenotipo femenino, testículos en canal inguinal, sin vello axilar y escaso vello púbico, desarrollo mamario Tanner 5, con remanentes de derivados Mullerianos. Antecedentes familiares.
6C	17 años	46 XY	Fenotipo femenino, testículos intrabdominales.
7C	23 años	46 XY	Fenotipo femenino, testículos uno en canal inguinal y otro intrabdominal, sin vello axilar y púbico, desarrollo mamario Tanner 5, antecedentes familiares.
8C	34 años	46 XY	Fenotipo femenino
9C	7 años	46 XY	Fenotipo femenino
10C	20 años	46 XY	Fenotipo femenino, genitales hipoplásicos, escaso vello axilar, sin vello púbico, sin derivados Mullerianos, testículos intrabdominales. Desarrollo mamario Tanner 5.
11C	32 años	46 XY	Fenotipo femenino, con antecedentes familiares
12C	17 años	46 XY	Fenotipo femenino, labios mayores y menores hipoplásicos, ausencia de vello axilar y púbico, testículos intrabdominales, desarrollo mamario Tanner 4 con areola hipopigmentada Sin antecedentes familiares.
13C	18 años	46 XY	Fenotipo femenino, sin vello axilar y escaso vello púbico, desarrollo mamario Tanner 4, con antecedentes familiares
14C	17 años	46 XY	Fenotipo femenino, hipoplasia de labios mayores y menores, clítoris no observable, desarrollo mamario Tanner 4-5
15C	16 años	46 XY	Fenotipo femenino, vello púbico escaso, desarrollo mamario Tanner 5, con remanentes Mullerianos. Con antecedentes familiares.

Tabla 2. Individuos con Síndrome de Insensibilidad Parcial a los Andrógenos

Sujeto	Edad	Cariotipo	Características Clínicas
1P	16 años	46 XY	Fenotipo masculino. Hipospadias, criptorquidia derecha. Ginecomastia bilateral Tanner III Vello axilar escaso.
2P	5 años	46 XY	Fenotipo masculino. Hipospadias perineo escrotal, testículos descendidos.
3P	6 meses	46 XY	Fenotipo masculino. Hipospadias peneoescrotal, escroto bífido, restos Mullerianos en su porción prostática.
4P	18 años	46 XY	Fenotipo femenino, con clitoromegalia y los labios fusionados en la base, testículos en canal inguinal, desarrollo mamario Tanner 5, vello púbico escaso.
5P	8 años	46 XY	Fenotipo masculino con hipospadias penoescrotal, escroto bífido, con criptorquidismo Con antecedentes familiares
6P	11 años	46 XY	Fenotipo femenino, testículos en canal inguinal, clitoromegalia, pseudo vagina, sin derivados Mullerianos
7P	32 años	46 XY	Fenotipo masculino, con hipospadias balanoprepucial corregida con cirugía, ginecomastia, pelo púbico normal, con infertilidad, espermatobioscopia: viabilidad del 40%, con oligoastenozoospermia y necrozoospermia
8P	3 años	46 XY	Fenotipo masculino, con hipospadias. Antecedentes familiares, los adultos además con ginecomastia.
9P	18 años	46 XY	Fenotipo masculino, ginecomastia, escaso desarrollo sexual secundario masculino, escaso vello axilar y corporal, vello púbico tipo ginecoide, distribución de grasa corporal tipo ginecoide.
10P	10 años	46 XY	Fenotipo masculino con hipospadias. Antecedentes de adultos con ginecomastia.
11P	24 años	46 XY	Fenotipo masculino, con ginecomastia, distribución de grasa corporal ginecoide.
12P	31 años	46 XY	Fenotipo masculino, con hipospadias, criptorquidia (corregida), pene pequeño, ginecomastia, con vello axilar, sin barba y con bigote. Grasa corporal tipo ginecoide.
13P	12 años	46 XY	Fenotipo masculino, con hipospadias perineal, pliegue labio escrotal no fusionado, con antecedentes familiares.

EXTRACCIÓN DE DNA (John *et al.*, 1991)

Se extrajeron 10 ml de sangre venosa de cada individuo estudiado, se depositaron en tubos cónicos de 50 ml estériles, que contenían 200 μ l de EDTA 0.5 M como anticoagulante, se mezclaron perfectamente (la sangre es estable hasta 36 h a 4°C, el DNA, sin embargo, debe de aislarse dentro de las primeras 24 h).

Los tubos con la sangre se depositaron sobre hielo y se llevaron a 35 ml con solución ST 2X fría (sacarosa 0.64 M, Tris-Base 0.02 M, MgCl₂ 0.01 M, Tritón X-100 2%, pH 7.6, filtrar para esterilizar, guardar a 4°C). Se llevaron a 50 ml con agua desionizada estéril y mezclaron por inversión. Se centrifugaron a 1000 xg durante 15 min a 4°C. Se decantaron los sobrenadantes y retuvo el precipitado nuclear que permanecía en el fondo del tubo (el precipitado puede congelarse a -70°C para futuras extracciones). Si era necesario, se lavaban los precipitados con 5 ml de solución ST 1X y se centrifugaban en las mismas condiciones. Se adicionaron 3 ml de solución de lisis nuclear (Tris-Base 10 mM, NaCl 400 mM, Na₂ EDTA 2 mM, pH 8.2, esterilizar en autoclave). Los precipitados se resuspendieron con una pipeta Pasteur sellada con calor. Se adicionaron 108 μ l de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% en agua y 100 μ l de proteinasa K (5mg/ml en agua) se mezclaron con la misma pipeta. Se incubaron a 37° C al menos 2 h (puede quedarse toda la noche). Los tubos se retiraron del calor y se transfirió el contenido a tubos cónicos de 15 ml estériles. Se agregó 1 ml de NaCl saturado (mezclar con agitador magnético 35 g de NaCl en 100 ml de agua, no se disolverá totalmente, esterilizar en autoclave, siempre se verá un precipitado de sal) y se agitó vigorosamente por 15 seg. Los tubos se centrifugaron a 1000xg por 15 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos de 15 ml estériles. Se adicionaron exactamente dos volúmenes de etanol absoluto y se mezclaron por inversión hasta que el DNA precipitó. Se extrajo el DNA precipitado con una pipeta Pasteur sellada y esterilizada, se lavó el DNA en etanol al 70% (v/v con agua) durante 30 seg. El DNA adherido en la pipeta Pasteur se dejó secar completamente al aire. Se agregaron 200 μ l de TE (Tris-Base, pH 8.0, 1 mM, EDTA 0.1 mM) a tubos para microcentrífuga de 500 μ l y se metió la punta de la pipeta Pasteur en donde se encontraba el DNA seco y se agitó cuidadosamente hasta que el DNA se desprendió y quedó resuspendido en el TE. El DNA se dejó disolver a temperatura ambiente durante toda la noche. Se midió la concentración de DNA en espectrofotómetro (Medir la D.O. a 260 y 280 nm. La D.O. a 260 nm dará la concentración de DNA en la muestra [1 D.O. equivale a 50 μ g de DNA/ml]. La relación 260/280 nos indicará la pureza del DNA, debe de ser de 1.7 a 2.0.)

OBTENCIÓN DE RNA

Los fibroblastos obtenidos de piel de área genital de las pacientes, así como de controles normales, se depositaron en tubos de vidrio y se agregó reactivo Trizol (GIBCO, Grand Island NY, USA) un mililitro por cada 5 millones de células. La suspensión celular se homogeneizó en un homogeneizador de vidrio con pistilo de teflón y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 0.2 ml de cloroformo por 1 ml de solución. Las muestras se agitaron vigorosamente en vortex y se centrifugaron a 12 000xg durante 15 min a 4°C. Se obtuvo la fase acuosa y se depositó en un tubo limpio y estéril, se adicionaron 0.5 ml de isopropanol por cada ml de solución inicial. Las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 12 000xg por 10 min a 4°C. Se tiraron los sobrenadantes y se lavó el precipitado con etanol al 75% (v/v en agua estéril). Se lavó el precipitado con etanol al 75%, se centrifugó a 12 000xg durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se disolvió en agua estéril tratada con dietil pirocarbonato. Se cuantificó el RNA con espectrofotómetro. Se midió a 260 y 280 nm (1 D.O. equivale a 40 µg de RNA/ml).

AMPLIFICACIÓN DEL GEN DEL RA

Los fragmentos de DNA de los exones del gen del RA se amplificaron mediante la PCR, se usaron oligonucleótidos específicos para cada exón, los que se describen en la Tabla 3.

Las reacciones se efectuaron en un volumen final de 25 µl, cada reacción contenía DNA genómico de 0.5 a 0.8 µg, desoxirribonucleótidos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) a una concentración de 2 µM, oligonucleótidos (5' y 3') 1.25 µM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl (pH 8.3) 10 mM, dimetil sulfóxido 4% (v/v) y 2.0 U de DNA polimerasa termoestable (Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA). Las reacciones se sometieron a 25 ciclos de amplificación a 94°C por 1 min, alineamiento a 58-65°C (58°C para los exones 2,3,4 y 5; 60°C para los exones 6 y 8; 62°C para el exón 7; 65°C para los diferentes fragmentos del exón 1) por un minuto y extensión a 72°C por 1 min, al último ciclo se le dio una extensión de 3 min.

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% (1 g de agarosa en 100 ml de solución TBE 1X (Tris-Base 90 mM, ácido bórico 90 mM, Na₂ EDTA pH 8, 2 mM)), se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV.

Tabla 3. Oligonucleótidos que se usaron como iniciadores para la PCR-SSCP, con sus respectivas temperaturas de alineamiento. (De Bellis *et al.*, 1992; con algunas modificaciones)

Exón	Secuencia	Localización del iniciador	Temp.
A1	5'-GCCTGTTGAACTCTTCTGAGC-3'	5'	65 °C
	5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTC-3'	3'	
A2	5'-CACAGGCTACCTGGTCCTGG-3'	5'	65 °C
	5'-CTGCCTTACACAACCTTGGC-3'	3'	
A3	5'-GCTCCCCTTCCCTCCAAGGAC-3'	5'	65 °C
	5'-CGGGTTCTCCAGCTTGATGCG-3'	3'	
A4	5'-GCTGCGTACCAGAGTCGCGACTAC-3'	5'	65 °C
	5'-CTGGGATAGGGCACTCTGCTCACC-3'	3'	
B	5'-GCCTGCAGGTTAATGCTGAAGACC-3'	5'	58 °C
	5'-CCTAAGTTATTTGATAGGGCCTTGCC-3'	3'	
C	5'-TTATCAGGTCTATCAACTCTTGT-3'	5'	58 °C
	5'-CTGATGGCCACGTTGCCTATGAA-3'	3'	
D	5'-GATAAATTCAAGTCTCTTTCCT-3'	5'	58 °C
	5'-GATCCCCCTTATCTCATGCTCCC-3'	3'	
E	5'-CAACCCGTCAGTACCCAGACTGACC-3'	5'	58 °C
	5'-AGCTTCACTGTCACCCCATCACCATC-3'	3'	
F	5'-CTCTGGGCTTATTGGTAAACTTCC-3'	5'	60 °C
	5'-GTCCAGGAGCTGGCTTTTCCCTA-3'	3'	
G	5'-CTTTCAGATCGGATCCAGCTATCC-3'	5'	62 °C
	5'-CTCTATCAGGCTGTTCTCCCTGAT-3'	3'	
H	5'-GAGGCCACCTCCTTGTCAACCCTG-3'	5'	60 °C
	5'-GGAACATGTTTCATGACAGACTGTACACTA-3'	3'	

POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SIMPLE (SSCP)

Para efectuar el análisis del DNA por SSCP (Orita *et al.*, 1989), se amplificaron por PCR los exones del gen del RA en las condiciones anteriormente descritas, usando desoxicitidina trifosfatada marcada radiactivamente (α - ^{32}P - dCTP). Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 1%. Una vez que se observó que los fragmentos se amplificaron con el tamaño correcto, se corrieron en geles de poliacrilamida al 5.4% (TBE 1X, Acrilamida-BisAcrilamida 5.4%, persulfato de amonio 0.07%, TEMED 36 μl /100 ml) con o sin glicerol al 10%; o en geles de poliacrilamida al 8% (TBE 1X, Acrilamida-BisAcrilamida 8%, persulfato de amonio 0.07%, TEMED 36 μl /100 ml) con o sin glicerol al 10%, a 200 ó 250 V respectivamente, durante toda la noche, a temperatura ambiente, usando como solución de corrida TBE 1X. Los geles se separaron de los vidrios y se adhirieron en papel de cromatografía 3MM, los geles se secaron (Slab Gel Dryer, SAVANT) durante 1 h a 75°C. Los geles secos se expusieron a placas con emulsión sensible a radiaciones (X-OMAT, Kodak) durante 2 ó 3 horas a -70°C. Las manchas obtenidas en las placas se analizaron, comparando el corrimiento de las diversas manchas con el DNA usado como control.

SECUENCIACION DE DNA

Los exones que se encontraron con alteraciones al analizarlos mediante la técnica de SSCP, se amplificaron mediante PCR, se corrieron en geles de agarosa al 1%, los productos se cortaron y se depositaron en tubos de diálisis de 8 mm de diámetro (Spectra), con volumen de exclusión de 8000, se sometieron a un campo eléctrico (90 volts) durante 20 minutos. El producto obtenido se purificó en columnas con filtro de celulosa (Centricon, Millipore, Bedford, MA, USA), y se cuantificó en espectrofotómetro.

Las reacciones para la secuenciación se efectuaron con el estuche de USB Corporation (OH, USA). Estas reacciones contenían desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en una concentración de 0.75 μM cada uno; didesoxinucleótidos marcados radiactivamente ($[\alpha$ - $^{33}\text{P}]$ -ddATP, $[\alpha$ - $^{33}\text{P}]$ - ddCTP, $[\alpha$ - $^{33}\text{P}]$ - ddGTP, $[\alpha$ - $^{33}\text{P}]$ -ddTTP) aproximadamente 0.225 μCi de cada uno; DNA purificado 100 ng; oligonucleótido iniciador, 16 pmol; termosecuensasa DNA polimerasa 8U; todo en una solución Tris-HCl 26 mM a un pH de 9.5 y MgCl_2 6.5 mM. El volumen final fue de 20 μl el cual se alcanzó con agua desionizada estéril. Las reacciones se sometieron a un ciclo de 80°C durante 30 seg, 94°C/90 seg; 30

ciclos de 94°C/45 seg, (58° C para los exones 2, 3, 4 y 5; 60°C para los exones 6 y 8; y 62°C para el exón 8)/45 seg, 72° C/45 seg, y un último ciclo similar a los anteriores pero con la última temperatura 72° C durante 3 minutos. Al terminar las reacciones, se adicionaron a cada tubo 4 μ l de solución para detener la reacción. Las muestras se calentaron a 70°C durante 5 min y posteriormente se llevaron a hielo. Se tomaron 3 μ l de cada uno y se depositaron en geles de poliacrilamida-urea (Acrilamida-BisAcrilamida 6%, urea 7 M, TTE 1X [Tris-Base 0.9 M, taurina 0.29 M, Na₂ EDTA 5mM], persulfato de amonio 0.1%, TEMED 25 μ l/100 ml), precalentados a 50°C, se usó como solución de corrida TTE 1X, se corrieron al frente a 1800V.

El gel se transfirió a papel Whatman 3MM y se secó en un desecador de geles durante 1 hora a 75°C. El gel seco, se expuso a una placa de rayos X (X-OMAT) durante 3-20 h a temperatura ambiente.

CULTIVO DE FIBROBLASTOS

Los fibroblastos se obtuvieron a partir de biopsias de piel de área genital, que se cultivaron y mantuvieron con medio esencial mínimo (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), adicionado de suero fetal de ternera 10%, penicilina 100UI/ml y estreptomycinina 100 μ g/ml.

Los estudios de unión del RA a su ligando se hicieron en células intactas y /o en citosol, se usó DHT- ³H (ae 110 Ci/mmol) como ligando (Medina *et al.*, 1981; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1988, 1990).

ANÁLISIS POR RT-PCR

Se extrajo el RNA total de los fibroblastos mantenidos en cultivo usando TRIzol. El RNA se transcribió de manera inversa a DNacomplementario (cDNA) usando el SuperScript Preamplification System (Life-Technologies, Grand Island, NY, USA) y siguiendo sus instrucciones, se tomó 1.0 μ g de RNA total, 0.5 μ g de oligonucleótido con poli-desoxitimidinas (Oligo-dT), se llevó a un volumen de 12 μ l y se incubaron a 70° C durante 10 min y se llevaron a hielo, posteriormente se adicionaron; dATP, dCTP, dGTP y dTT a una concentración 1mM de cada uno, todo esto combinado en un volumen final de 19 μ l de Tris-HCl 20 mM pH 8.4, KCl 50 mM, ditiotreitól 10 mM y MgCl₂ 2.5 mM, la mezcla se incubó a 42° C por 5 min, se agregaron 200 U de transcriptasa reversa SuperScript por tubo, se

mezclaron e incubaron a 42 °C por 50 min, después se incubó a 70 °C por 15 min y se llevó a hielo, finalmente se agregó 1 µl de RNasa H, se incubó a 37 °C por 20 min. Hasta aquí se obtuvo el cDNA total.

Para amplificar por PCR el segmento del gen del RA que nos interesaba, se tomaron alícuotas de 100ng de cDNA de la paciente 12C y de un control normal, se amplificó la región del exón 6 al 8, los oligonucleótidos que se usaron como iniciadores son : en el exón 6 (Faa), 5'-ATGTACAGCCAGTGTGTCCGAATG (para iniciar en 5') y en el exón 8 (HAR3), 5'-CTGGGTGTGGAAATAGATGGGCT, (para iniciar en 3'). Para el paciente 7C , se usaron los iniciadores: en el exón 4 (P4), 5'-GCCTCAATGAACTGGGAGAGACAG (para iniciar en 5)', y en el exón 6 (M13), 5'-AACTCTTGAGAGAGGTGCCTCATTCG (para iniciar en 3'), para amplificar la región entre los exones 4 y 6. Una vez amplificados, los productos se analizaron en geles de agarosa al 1% , se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. Posteriormente los fragmentos de DNA se purificaron y se secuenciaron como se describió anteriormente.

RESULTADOS

En todos los casos estudiados, al amplificar mediante PCR cada uno de los exones del RA se encontró la talla esperada para cada fragmento (Fig. 8), con lo cual se descartó la presencia de anomalías extensas en el RA, como podría ser una deleción o una inserción de un gran número de bases.

El análisis mediante SSCP, permitió encontrar en cada uno de los pacientes estudiados, una alteración en la movilidad electroforética (Fig. 9), de esta manera se detectó el exón dentro del gen del RA en el cual se localizaba la mutación (Tablas 4 y 5).

La secuenciación de cada uno de los exones alterados, permitió conocer de manera precisa el tipo de mutación en el gen del RA (Figuras 10.1 a 10.12, tablas 4 y 5).

Para los pacientes con SICA, se localizaron 11 mutaciones puntuales erróneas, cada mutación originó un cambio en un codón y de esta manera hubo un cambio en el aminoácido correspondiente, como se observa en la tabla 4. De las mutaciones puntuales localizadas, diez fueron transiciones (pacientes 2C, 3C, 4C, 5C, 6C, 8C, 9C, 10C, 11C, 15C: Figuras 10.2,10.3,10.5,10.6,10.8 y 10. 11) y dos fueron transversiones (pacientes 13C y 14C: Figura 10.10). La localización del nucleótido mutado dentro del triplete fue en su mayoría (7 pacientes) el nucleótido central, 4 pacientes lo presentaron en el nucleótido inicial y ninguno lo presentó en el nucleótido final.

El paciente 1C, presentó en el exón 2 la deleción del codón TTC que codifica para una fenilalanina, en el sitio 583, lugar localizado cerca del primer dedo de zinc del dominio de unión al DNA (Fig 10.1).

En el paciente 3C se encontró una mutación sin sentido en el exón 4, hubo una transición C→T que cambió el codón 657 de CAG (glutamina) a TAG (codón de terminación), originando posiblemente una terminación prematura en la traducción del RNA (Fig. 10.3).

Como se observa en la figura 10.7, en el paciente 7C, se localizó al final del exón 5 una delección de 7 pares de bases (AGGATGC) a partir del codón 760, en el nucleótido 2640, posteriormente una inserción de 11 pares de bases (TTCGCCCCTGA), esta inserción es una repetición de 11 pares de bases que se localizan en los codones 764,765,766 y dos nucleótidos del 767 (nucleótidos del 2652 al 2663). Estos cambios originaron un cambio en el marco de lectura y la formación de dos codones de terminación (TGA). Debido a que la mutación se localizó muy cerca de la región de corte y empalme exón/intrón, se sintetizó el cDNA de ésta paciente, a partir del RNA total obtenido de fibroblastos. Se amplificó y se secuenció la región entre el exón D y el exón F. Se observó que la mutación no alteró el mecanismo de corte y empalme (Datos no mostrados).

En el paciente 12C, se localizó una transversión c→g en la base +5 del intrón 6. Debido a que la mutación puntual encontrada se localizaba fuera de la región codificante del gen del RA, se aisló RNA total a partir de fibroblastos derivados de piel genital del paciente, se transcribió de manera inversa y se obtuvo el cDNA, se amplificó mediante PCR, la región del exón 6 al 8, y se observó que el producto del paciente era de mayor tamaño (1223 pb) que el usado como control normal (423 pb), la diferencia es de 800 pb, que concuerda con el tamaño del intrón 6 del RA (Fig. 10.9).

Tabla 4. Mutaciones en el gen del RA en pacientes con SICA.

Sujeto	Tipo de mutación	Localización	Cambio de base	Cambio de amino-ácido	Mutación
1C	Delección	Exón 2	TTC→ Deletada		F583Del
2C	Errónea	Exón 3	CGT→ CAT	Arg→ His	R615H
3C	Sin sentido	Exón4	CAG→ TAG	Gln→ Stop	Q657Stop
4C	Errónea	Exón 5	GGG→ AGG	Gly→ Arg	G743R
5C	Errónea	Exón 5	GGG→ GAG	Gly→ Glu	G743E
6C	Errónea	Exón 5	GCC→ GTC	Ala→ Val	A765V
7C	Delección Inserción	Exón 5			
8C	Errónea	Exón 6	CGC→ CAC	Arg→ His	R774H
9C	Errónea	Exón 6	CGC→ CAC	Arg→ His	R774H
10C	Errónea	Exón 6	CGC→ CAC	Arg→ His	R774H
11C	Errónea	Exón 6	TCT→ CCT	Ser→ Pro	S791P
12C	Intrónica	Intrón 6	c→ g		+5 Intrón 6
13C	Errónea	Exón 7	TTT→ GTT	Phe→ Val	F827V
14C	Errónea	Exón 7	CTT→GTT	Leu→ Val	L830V
15C	Errónea	Exón 8	CAT→ CGT	His→ Arg	H874R

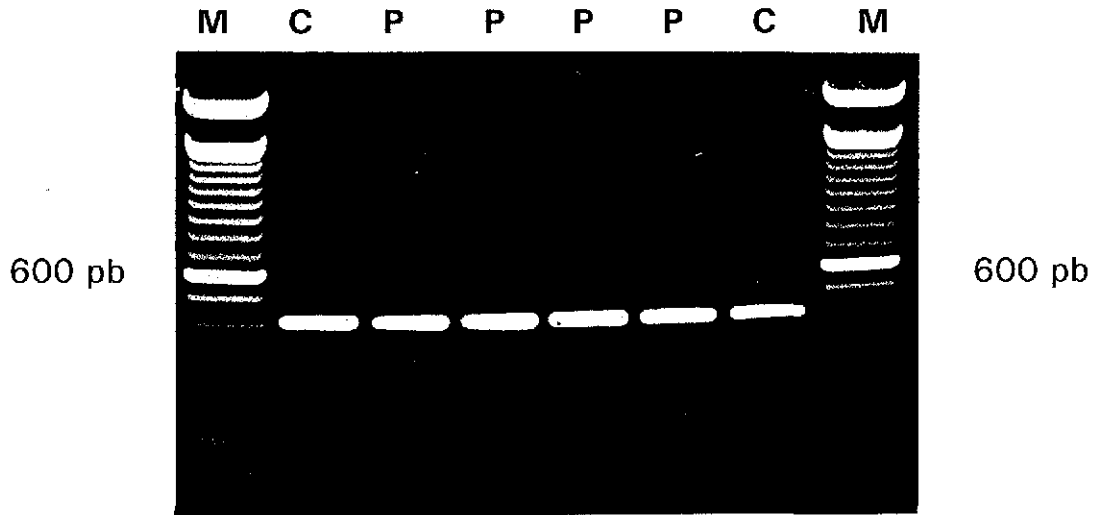
El estudio del gen del RA en pacientes con el SIPA, dió como resultado la detección en todos los casos de mutaciones erróneas (tabla 5), y solo en dos de ellas no hubo cambio de aminoácido. En el paciente 1P, en el cual se encontró una transición G→A en el codón 211, el ácido glutámico no cambia ya que tanto GAG como GAA (mutado) codifican para este aminoácido. De manera similar en el paciente 13P la transición C→T no altera para la traducción de los codones a serina (AGC y AGT)

De las mutaciones puntuales localizadas, ocho fueron transiciones (1P, 2P, 3P, 7P, 9P, 10P, 11P 13P: Figuras 10.2, 10.4, 10.8, 10.10, 10.11, 10.12) y cinco fueron transversiones (4P, 5P, 6P, 8P, 12P: Figuras 10.3, 10.4, 10.6, 10.12). La localización del nucleótido mutado dentro del triplete fueron: 8 mutaciones en el nucleótido inicial, 3 mutaciones en el nucleótido medio y 2 en el nucleótido final (tabla 5).

Tabla 5. Mutaciones en el gen del RA en pacientes con SIPA.

Sujeto	Tipo de Mutación	Localización	Cambio de base	Cambio de Amino-ácido	Mutación
1P	Errónea	Exón 1	GAG→ GAA	Glu→ Glu	E211E
2P	Errónea	Exón 3	GCC→ ACC	Ala→ Thr	A596T
3P	Errónea	Exón 3	GCC→ ACC	Ala→ Thr	A596T
4P	Errónea	Exón 4	CCA→ ACA	Pro→ Thr	P682T
5P	Errónea	Exón 4	CTC→ ATC	Leu→ Ile	L701I
6P	Errónea	Exón 4	CAG→ GAG	Gln→ Glu	Q711E
7P	Errónea	Exón 4	GGC→ GAC	Gly→ Asp	G724D
8P	Errónea	Exón 5	GCC→ TCC	Ala→ Ser	A765S
9P	Errónea	Exón 6	CAG→ CGG	Gln→ Arg	Q802R
10P	Errónea	Exón 7	CTC→ TTC	Leu→ Phe	L838F
11P	Errónea	Exón 8	GCG→ GTG	Ala→ Val	A870V
12P	Errónea	Exón 8	GAC→ TAC	Asp→ Tyr	D879Y
13P	Errónea	Exón 8	AGC→AGT	Ser→ Ser	S888S

A) EXON 3 DEL GEN DEL RECEPTOR DE ANDROGENOS



B) EXON 7 DEL GEN DEL RECEPTOR DE ANDROGENOS

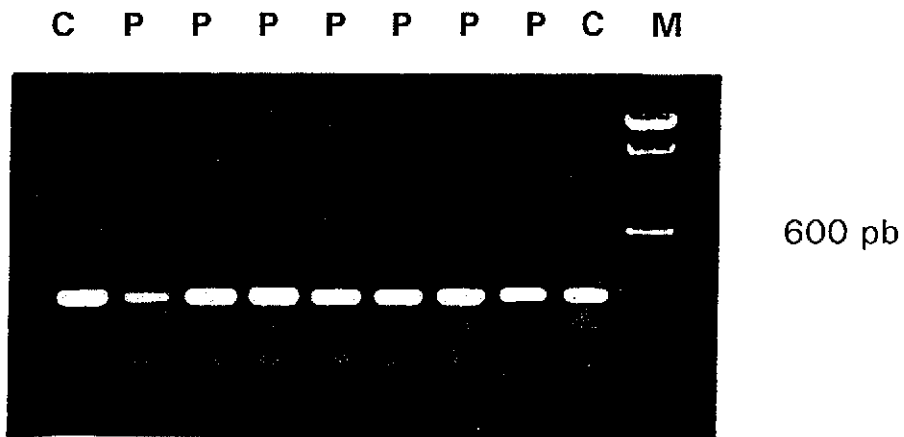


Figura 8. Análisis de los productos de PCR, en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio, visualizados con luz UV. A: Exón 3 del gen del receptor de andrógenos con una talla de 413 pb. B: Exón 7 del gen del receptor de andrógenos con una talla de 268 pb. C; DNA de sujetos control, P; pacientes estudiados, M ; escalera de DNA de 100 pares de bases (pb).

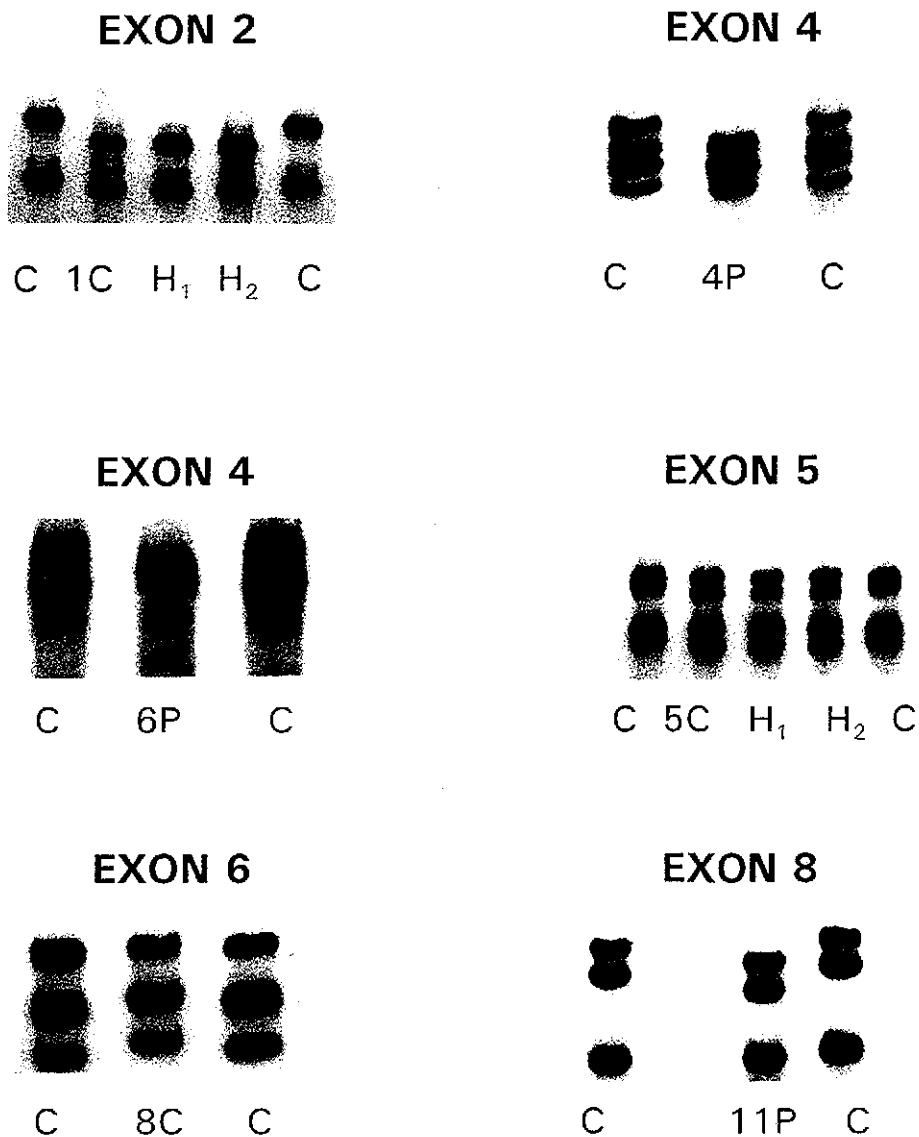


Figura 9. Análisis mediante SSCP de algunos exones del gen del receptor de andrógenos. Los productos de PCR efectuados en presencia de ^{32}P -dCTP, se corrieron en geles de poliacrilamida, posteriormente se expusieron a placas con emulsión sensible a radiaciones. En cada recuadro las manchas laterales corresponden a DNA de controles normales (C). En el exón 2 las manchas centrales con alteración en su corrimiento pertenecen al paciente 1C y a sus dos hermanas (H_1 y H_2). En el exón 4 (columna derecha) la mancha central pertenece al paciente 4P, y en el exón 4 (columna izquierda) al paciente 6P. En el exón 5 se muestra el DNA del paciente 5C y dos hermanas (H_1 y H_2). En el exón 6 se estudió al sujeto 8C y en el exón 8 al sujeto 11P.

EXON 2

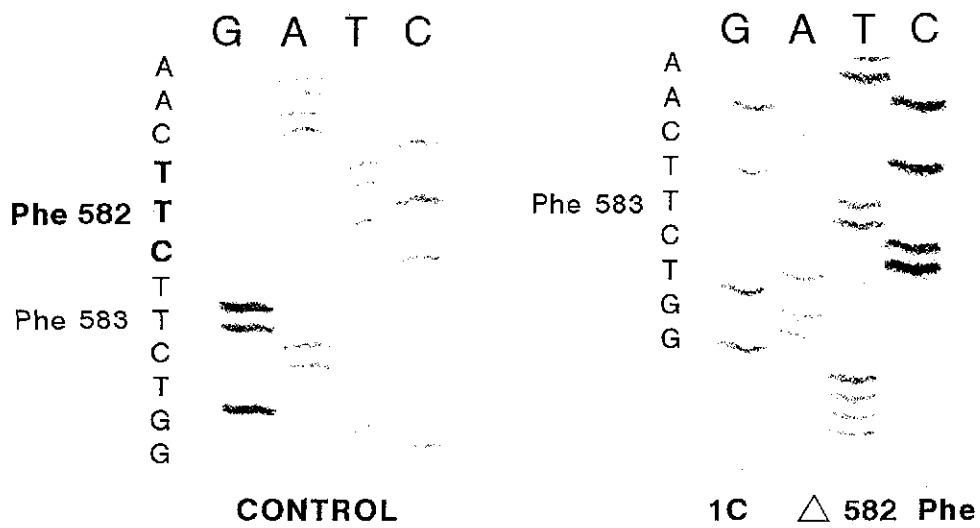


Figura 10.1. Secuencia parcial del exón 2 del gen del receptor de andrógenos. Figura derecha; Deleción del triplete TTC (codón 582) del paciente 1C; A la izquierda se muestra la porción de la secuencia en DNA normal usado como control.

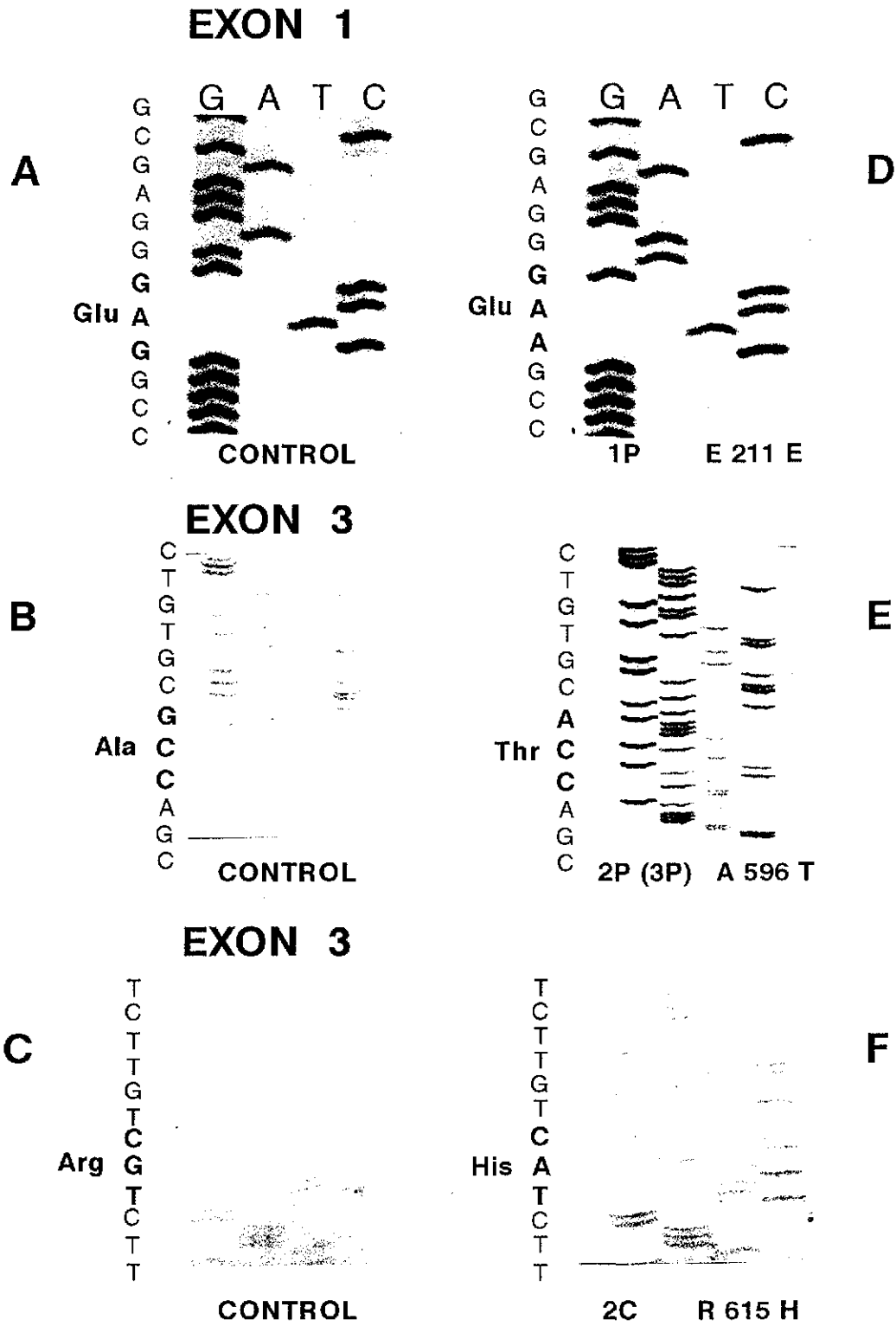


Figura 10.2. Secuencias parciales de los exones 1 y 3 del gen del receptor de andrógenos. En el exón 1 (panel D), en el sujeto 1P se localizó una mutación silenciosa en el codón 211 (Glu/GAG→GAA/Glu). En el codón 596 se observó la transición G→A que originó el cambio de alanina a treonina (panel E), en dos sujetos no relacionados genéticamente (2P y 3P). En el codón 615 del exón 3 (panel F) se encontró una mutación puntual G→A que dio lugar al cambio de una arginina por una histidina en el paciente 2C. A la izquierda (A, B y C) DNA de controles normales.

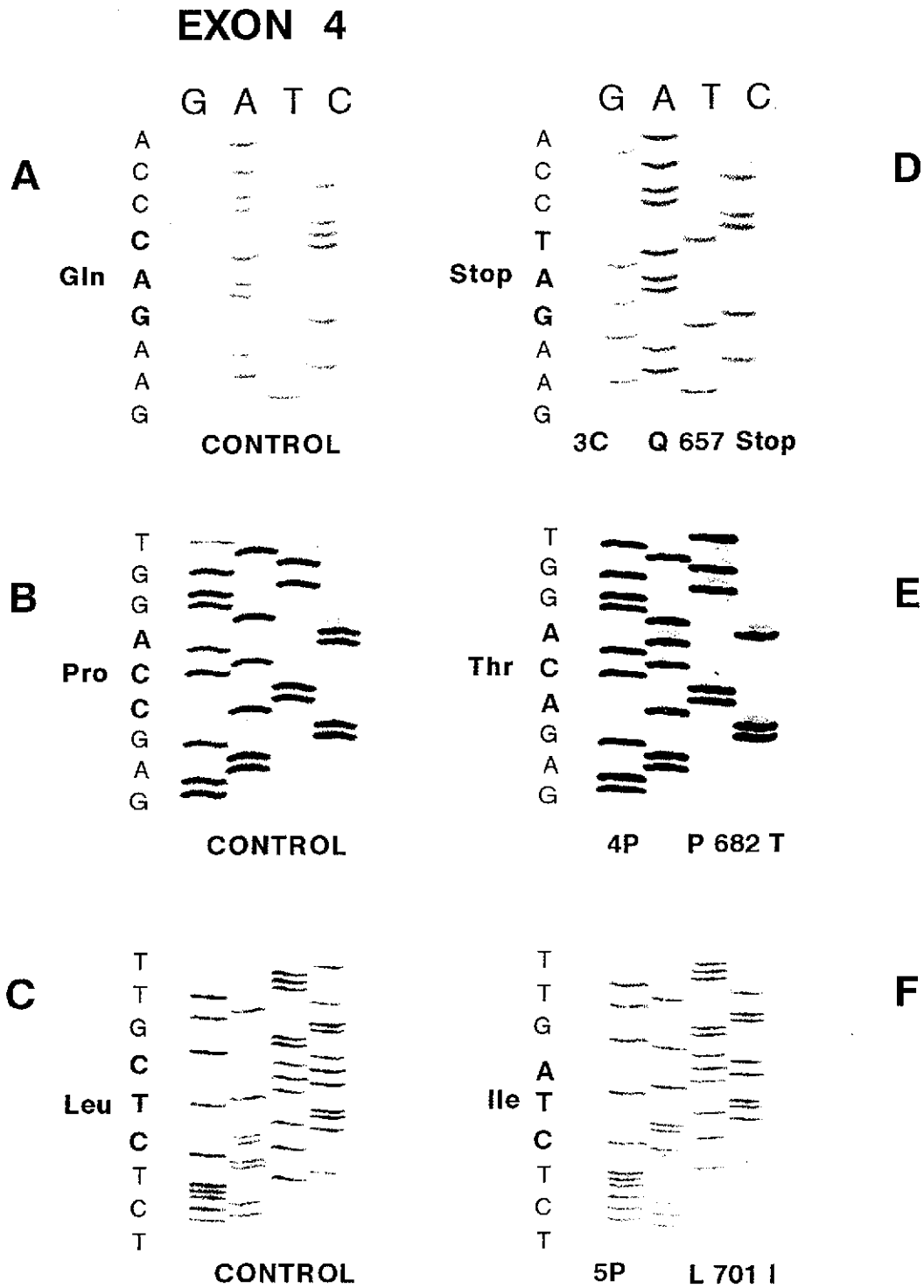


Figura 10.3. Secuencia parcial del exón 4 del gen del receptor de andrógenos, que muestra una transición C→T en el codón 657, que origina el cambio de una glutamina a un codón de terminación (Stop), en el paciente 3C (panel D). En medio (panel E), el paciente 4P presenta una transversión C→A, que da un cambio de prolina 682 a treonina 682. Abajo (panel F), el paciente 5P tiene un cambio C→A que da como resultado la sustitución de una leucina por una isoleucina en el codón 701. A la izquierda, DNA de controles normales no relacionados (A,B,C).

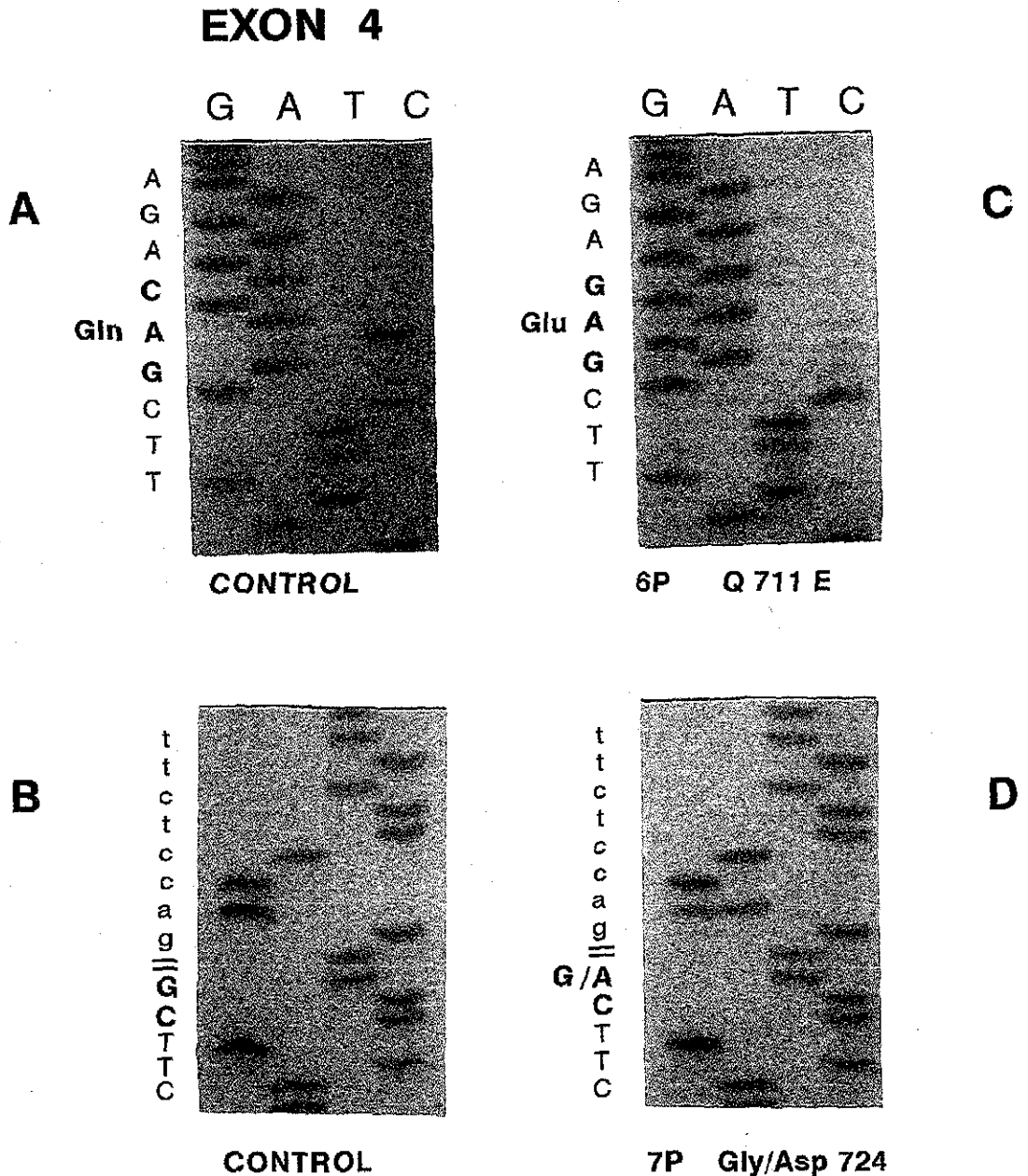


Figura 10.4. Secuencia parcial del exón 4 del gen del receptor de andrógenos. En el panel C, se muestra en el paciente 6P, la transversión C→G en el codón 711 que origina el cambio de glutamina por un ácido glutámico. En el paciente 7P se encontró una transición G→A al inicio del exón 5, en el codón 724 (GGC→GAC) que da un cambio de glicina a ácido aspártico (panel D), en la figura se puede observar que el paciente tiene tanto el codón normal como el codón mutado. Las letras minúsculas indican la secuencia parcial del intrón 4. A la izquierda secuencia parcial del DNA control (A y B).

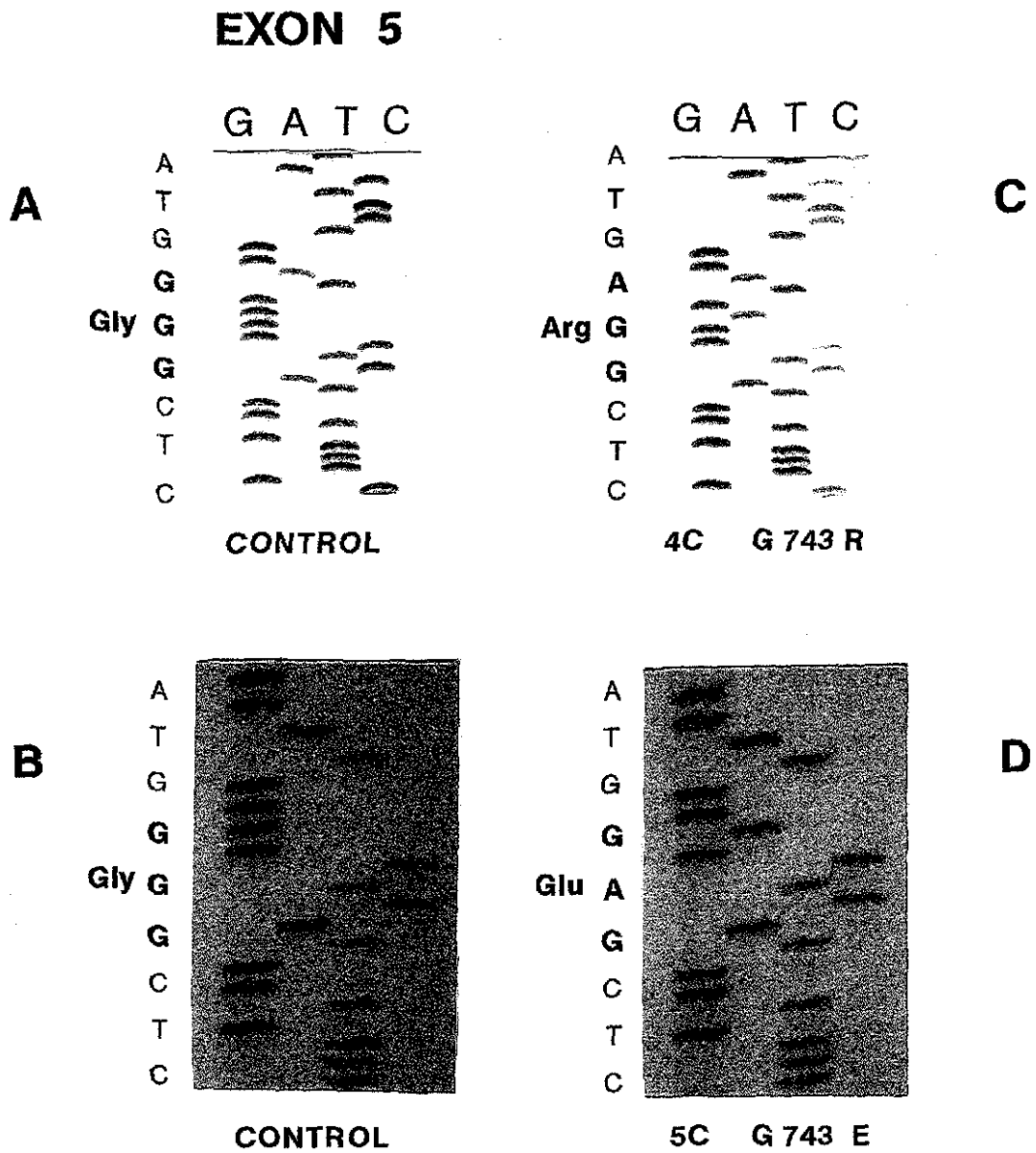


Figura 10.5. Secuencia parcial del exón 5 del gen del receptor de andrógenos. Tanto el paciente 4C (panel C) como el 5C (panel D) presentaron transición G→A en el codón 743. En el paciente 4C, el cambio fue en la primera base del codón y originó un cambio de glicina a arginina, en el paciente 5C el cambio fue en la base intermedia del codón y el cambio de aminoácido fue de glicina a ácido glutámico. A la izquierda, DNA de controles normales (A y B).

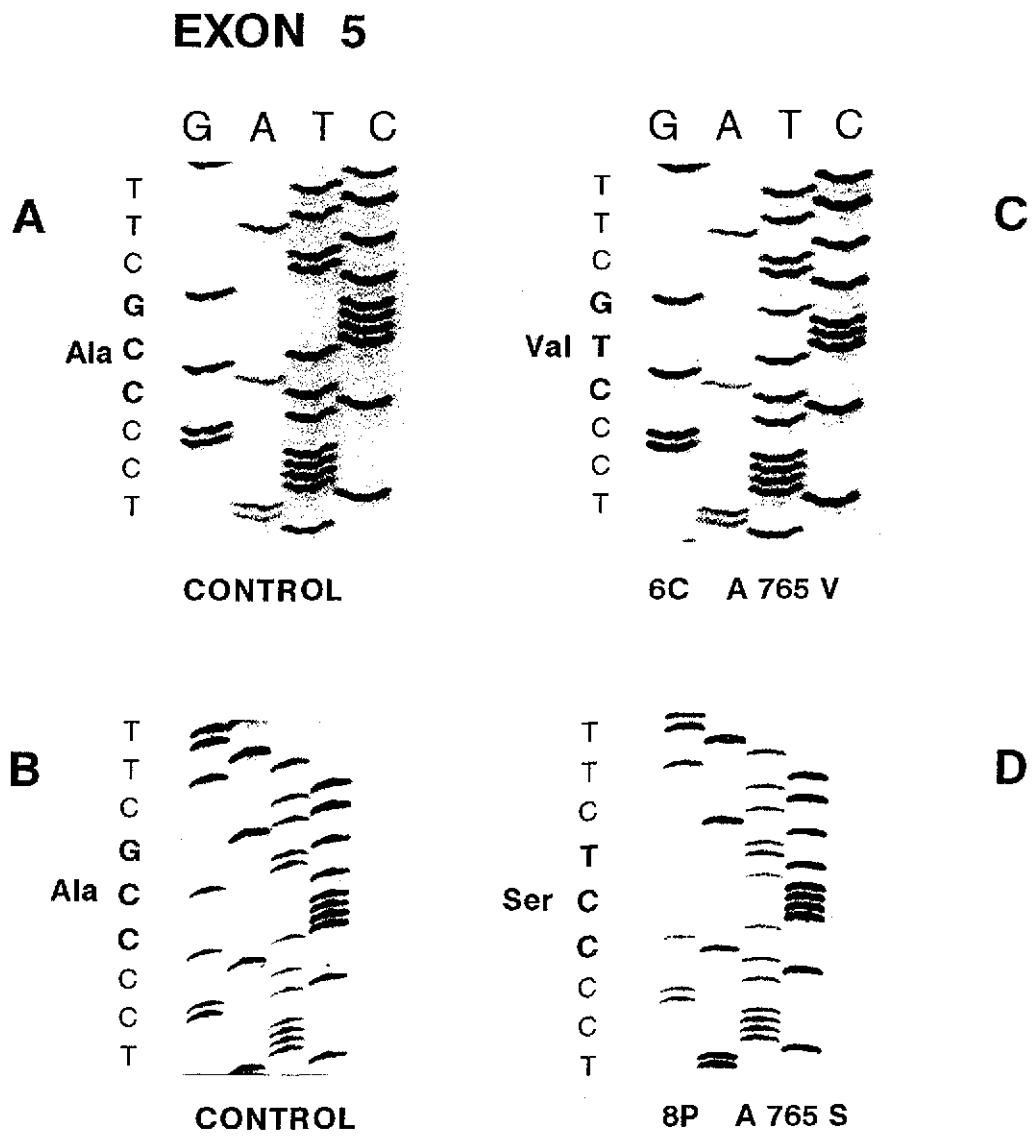
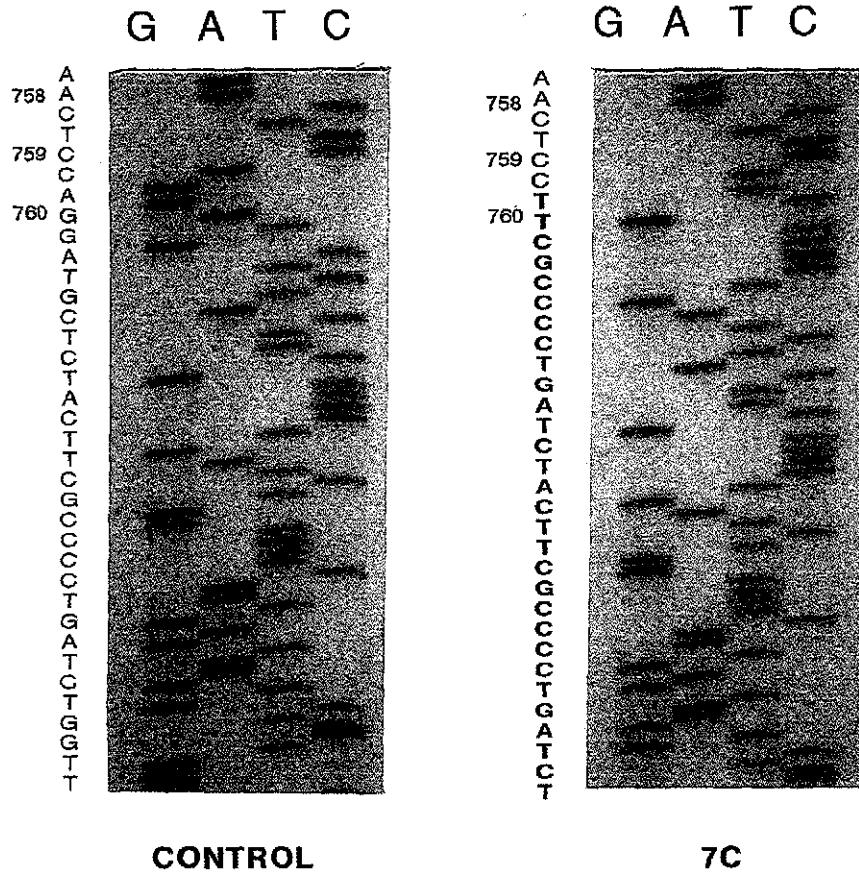


Figura 10.6. Secuencia parcial del exón 5 del gen del receptor de andrógenos. Se muestran dos mutaciones en el exón 765, una transición C→T en el paciente 6C (panel C) en el segundo nucleótido del codón, que origina un cambio de alanina a valina, y una transversión G→T, en el primer nucleótido del codón que da como resultado un cambio de alanina a serina (panel D). Izquierda, secuencia parcial de DNA normal usado como control (A y B).

EXON 5



NORMAL

GTC AAC TCC AGG ATG CTC TAC TTC GCC CCT GAT CTG GTT TTC AAT GA gtaagtg

MUTADO

GTC AAC TCC TTC GCC CCT GAT CTA CTT CGC CCC TGA TCT GGT TTT CAA TGA gtaagtg

AGG ATG C Inserción
 Delección

Figura 10.7. Secuencia parcial del exón 5 del gen del receptor de andrógenos. El paciente 7C (derecha) presenta alteraciones en la secuencia de DNA a partir del codón 760. Al compararse con el DNA control (izquierda), se observa que existen una delección de 7 pb y una inserción de 11 pb, estos cambios alteran el marco de lectura desde el exón 760 y se forman dos codones de terminación prematuros (TGA). Abajo, esquema de las alteraciones moleculares encontradas en el paciente 7C.

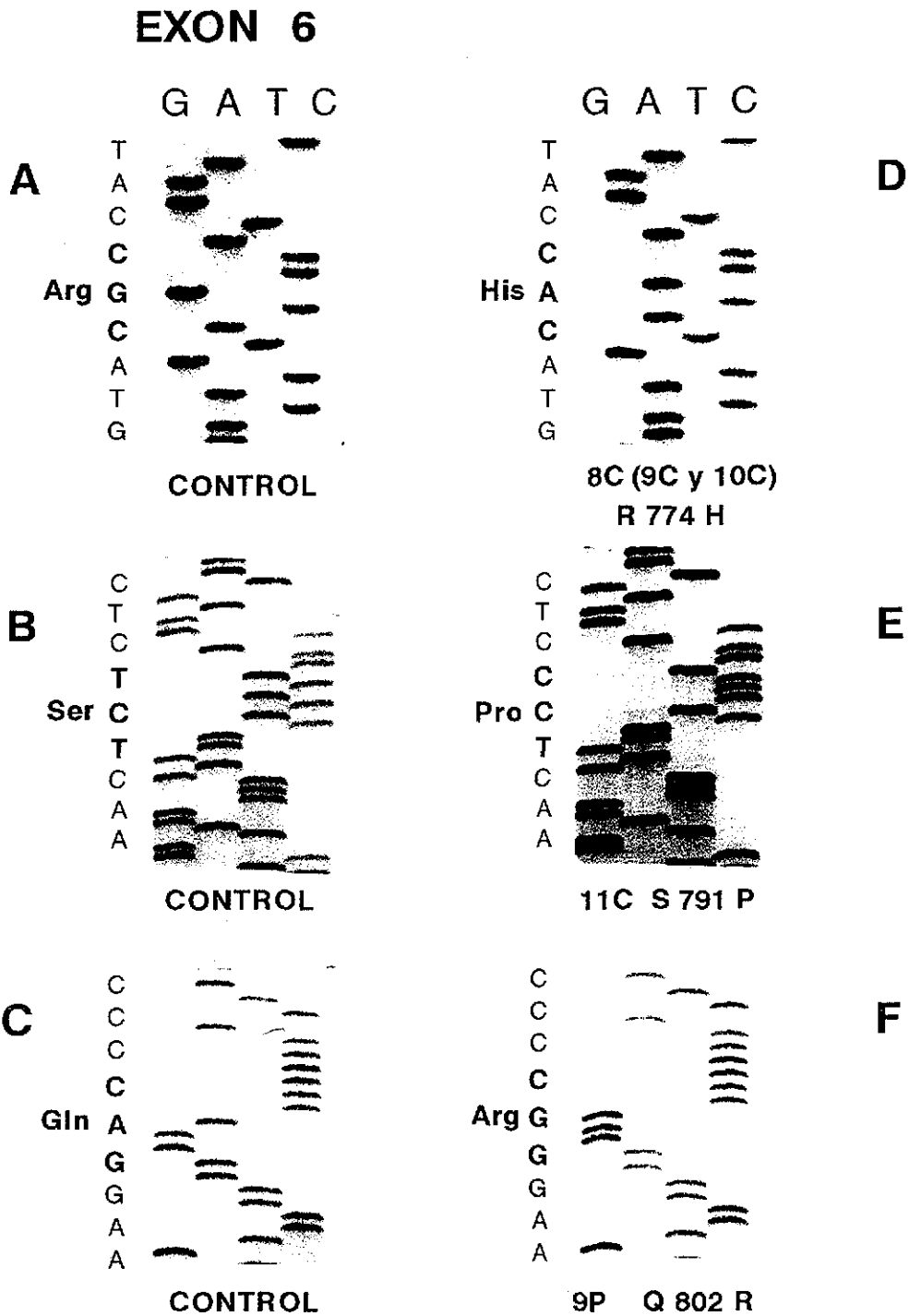


Figura 10.8. Secuencia parcial del exón 6 del gen del receptor de andrógenos. En el panel D, se muestra la transición G→A en el codón 774 que originó el cambio de arginina a histidina, esta mutación se presentó en tres pacientes no relacionados genéticamente (8C, 9C y 10C), en el panel E se observa en el codón 791 la mutación puntual T→C en el paciente 11C que induce el cambio de serina a prolina. En el panel F, la transición A→G en el codón 802 originó el cambio de glutamina a arginina en el paciente 9P. A la izquierda (A,B y C) se muestra la secuencia de DNA de controles normales.

Empalme EXON 6/INTRON 6

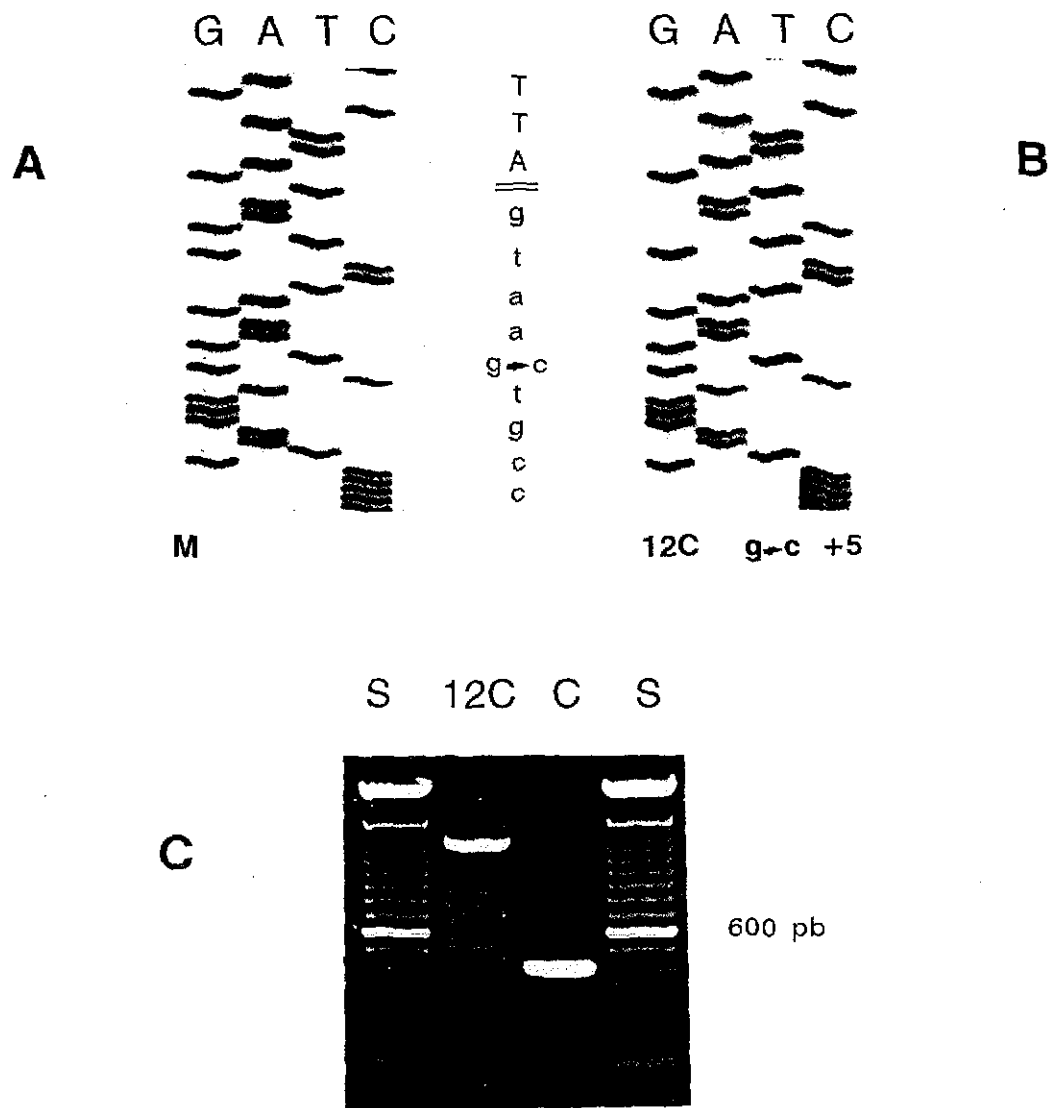


Figura 10.9. Comparación de secuencias de la unión exón 6/intrón 6 del gen del receptor de andrógenos en el paciente 12C (panel B), quién presenta una substitución de una base ($g \rightarrow c$) en la posición +5 del intrón, esta mutación no se encuentra presente en la madre del paciente (panel A). En el panel C se muestra la comparación en la talla del cDNA del RA (exones 6-8) amplificado por PCR-transcriptasa inversa. El cDNA control (C) produjo el fragmento esperado de 432 pb, mientras que el del paciente 12C dió una banda de 1223 pb que abarca del exón 6 al 8 incluyendo todo el intrón 6 (800pb). A los lados de esta figura se muestra una escalera de DNA de 100 pb (S).

EXON 7

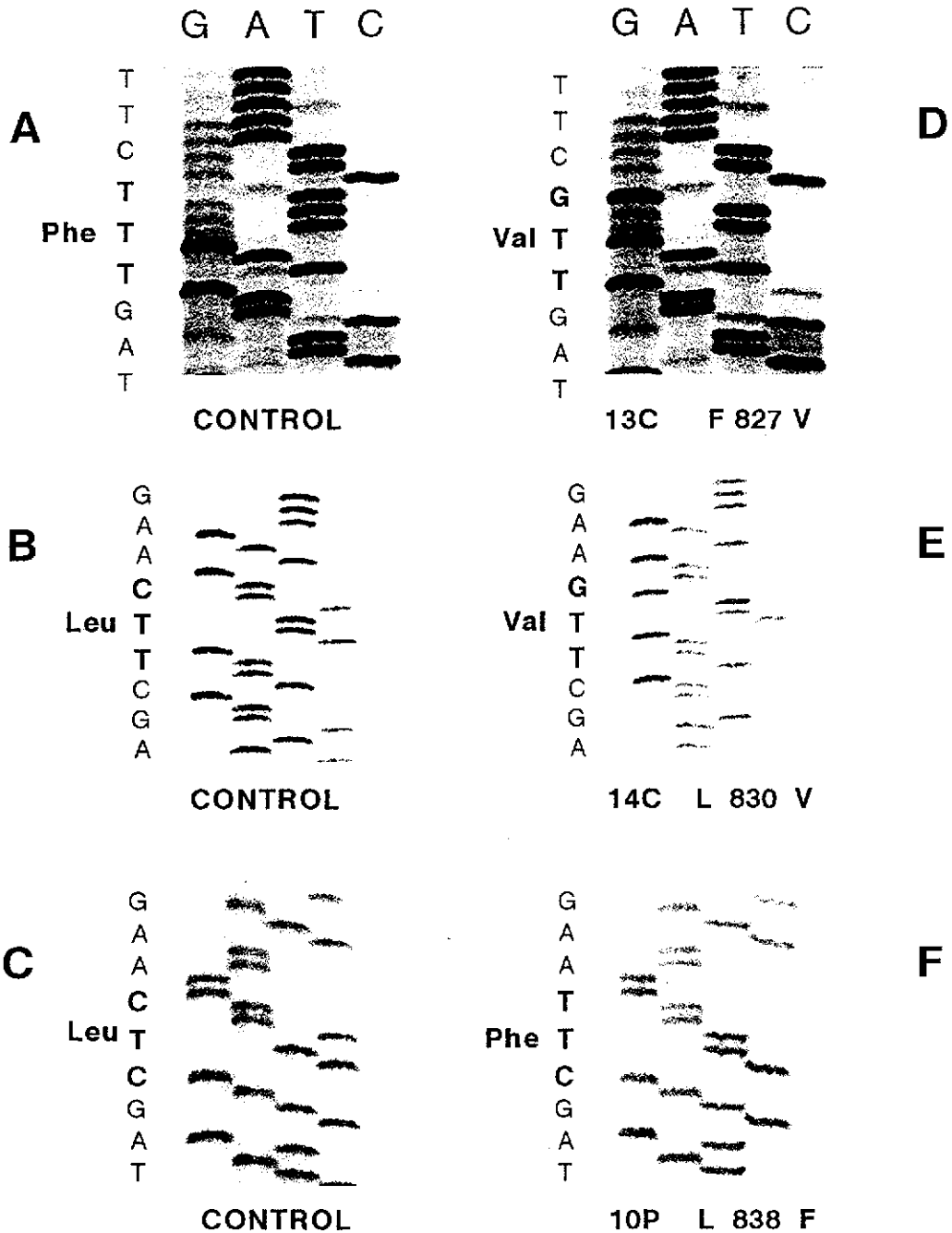


Figura 10.10. Secuencia parcial del exón 7 del gen del receptor de andrógenos que muestra para el paciente 13C (panel D) una transversión T→G en el codón 827, que origina el cambio de fenilalanina a valina; para el paciente 14C una transversión C→G en codón 830 que da lugar al cambio de una leucina por una valina (panel E), y para el paciente 10P la transición C→T en el codón 838 induce el cambio de leucina a fenilalanina (panel F). A la izquierda (A,B y C) DNA control.

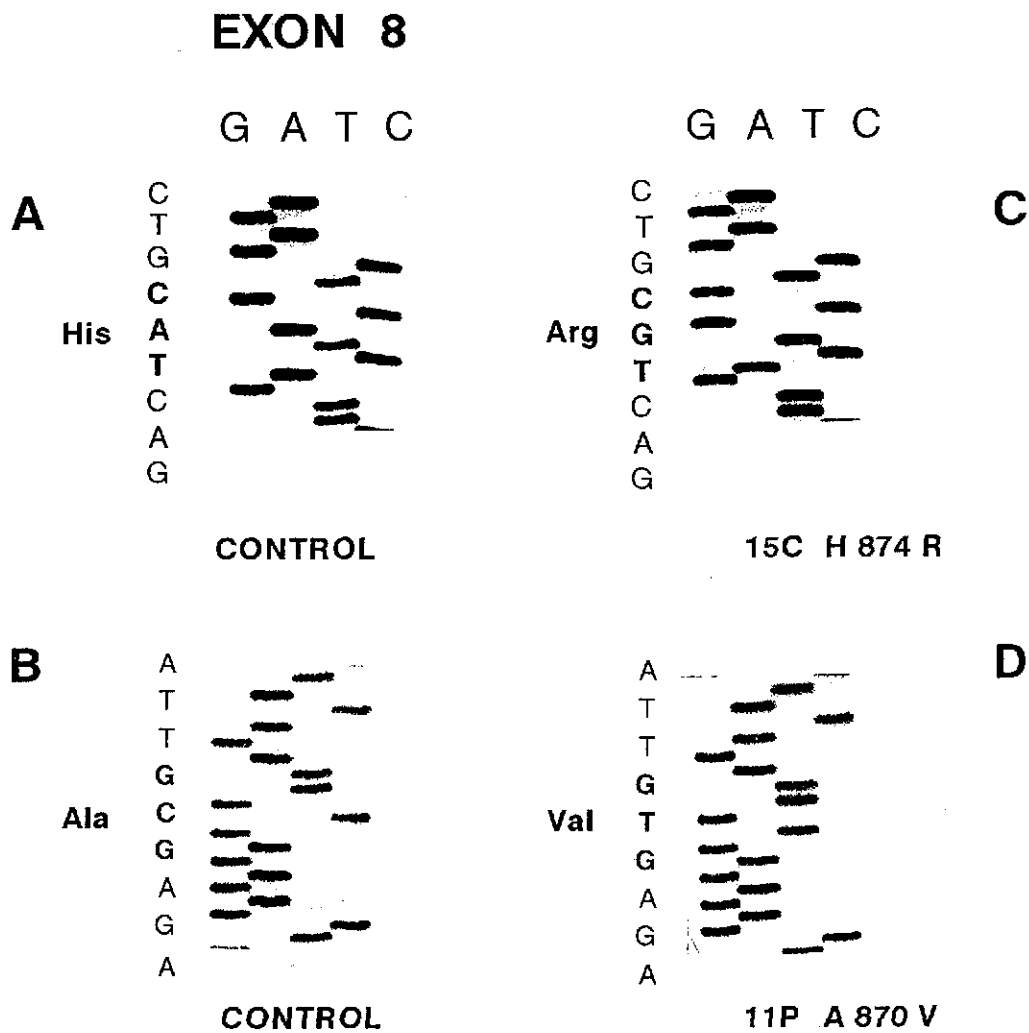


Figura 10.11. Secuencia parcial del exón 8 del gen del receptor de andrógenos que muestra para el paciente 15C una transición de A→G en el codón 874 (panel C), lo que dió origen a la sustición de una histidina por una arginina y en el paciente 11P un cambio de C→T en el codón 870 lo que originó la substitución de alanina por valina (panel D). A la izquierda secuencia de DNA de individuos control (A y B).

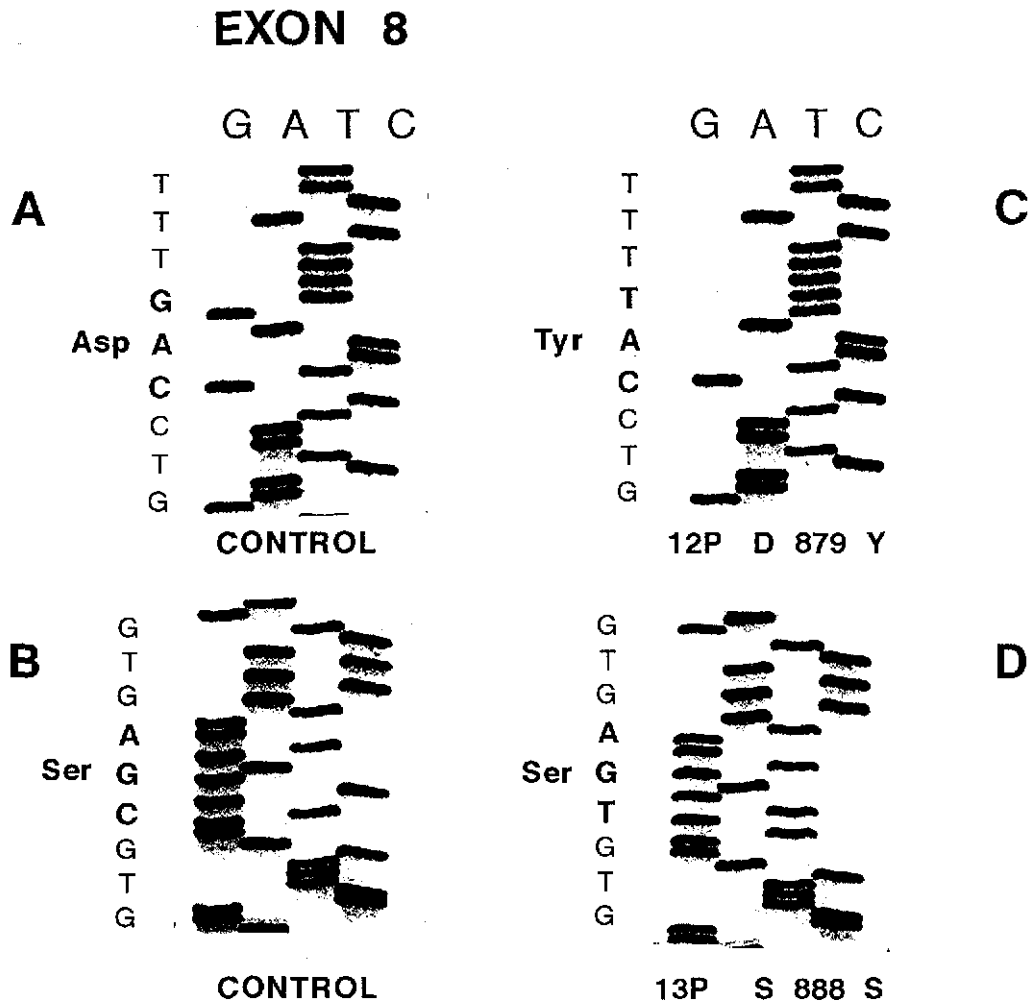


Figura 10.12. Secuencia parcial del exón 8 del gen del Receptor de Andr6genos que muestra una trasversi3n G→T en el sujeto 12P que cambia en el cod3n 879 un 6cido asp6rtico a tirosina (panel C). El paciente 13P (panel D) muestra una mutaci3n C→T que no origina cambio de amino6cido (Ser888Ser). Las muestras control de DNA se obtuvieron de individuos normales (A y B).

DISCUSIÓN

La insensibilidad a los andrógenos en individuos con cariotipo 46 XY, da como resultado un bloqueo total en la virilización (SICA) o una virilización incompleta (SIPA). El estudio a nivel molecular en estos individuos, permite conocer el tipo de mutación y su localización dentro del gen del RA. El conocimiento de estas mutaciones es importante para poder establecer una correlación entre el genotipo y el fenotipo del individuo, así estos estudios contribuyen a la elaboración de un mapa estructura-función del RA, basada en las mutaciones naturales que se presentan en individuos con SIA.

Hasta ahora se han descrito mas de 400 mutaciones en el gen del RA, éstas han sido agrupadas en una base de datos (Gottlieb *et al.*, 1999. Internet: MC33@musica.mcgill.ca), en donde se han incluido además, polimorfismos de un solo nucleótido, mutaciones silenciosas o mutaciones con significado desconocido en las regiones 5' o 3' del RA. Además incluyen mutaciones en el RA asociadas con cáncer de próstata y cáncer de mama. Las mutaciones publicadas del presente trabajo (Chávez *et al.*, 2001a y 2001b) se encuentran en esta base de datos.

Mutaciones en el dominio de unión al DNA

El dominio de unión al DNA es codificado por los exones 2 y 3 del gen del RA, en esta región se forman los dos dedos de zinc característicos de los factores de transcripción nuclear, el primer dedo de zinc se une directamente al DNA y se ha observado que en su base carboxilo terminal, existen tres aminoácidos esenciales para esta unión (CGSCKV) en la llamada caja P, la mutación encontrada en el paciente 1C se localizó inmediatamente después de la valina de la caja P (Fig. 11); la mutación consistió en la deleción de un triplete (TTC) que codifica para fenilalanina, es interesante hacer notar que en ésta región (codones 582 y 583) se encuentran dos fenilalaninas consecutivas por lo que no fue posible determinar cual de las dos se encuentra deletada. Este par de fenilalaninas se encuentran estrictamente conservadas y se cree que contribuyen a formar una zona hidrofóbica que estabiliza la estructura tridimensional del dominio de unión al DNA (Freedman 1992), en el paciente 1C, la ausencia de una fenilalanina posiblemente impidió la

unión adecuada a los HREs y por lo tanto la transcripción se alteró notablemente. Este tipo de deleción ha sido informada en otros dos pacientes con SICA (Beitel *et al.*, 1994: Ahmed *et al.*, 2000). Se han reportado además en este codón, dos mutaciones erróneas en las que hay sustitución de amino ácidos, Phe(TTC)→Ser (TCC) (Hiort *et al.*, 1994) y Phe(TTC)→Tyr(TAC) (Imasaki *et al.*, 1996), cabe hacer notar en estos dos casos, la mutación permitió un cierto grado de virilización, lo que originó un síndrome parcial a la acción de andrógenos.

Estudios de unión de DHT- ³H al RA en fibroblastos provenientes de piel genital de la paciente 1C, y de dos hermanas con el mismo padecimiento, demostraron que no se encuentra alterada, ya que mostraron una unión similar al control normal (25.53 fmol/mg proteína; 33.73 fmol/mg proteína; 56.01 fmol/mg proteína; N= 34.5±20.5 fmol/mg proteína). Esto se explica con el conocimiento de que la mutación está en el dominio de unión al DNA y no en el dominio de unión al esteroide.

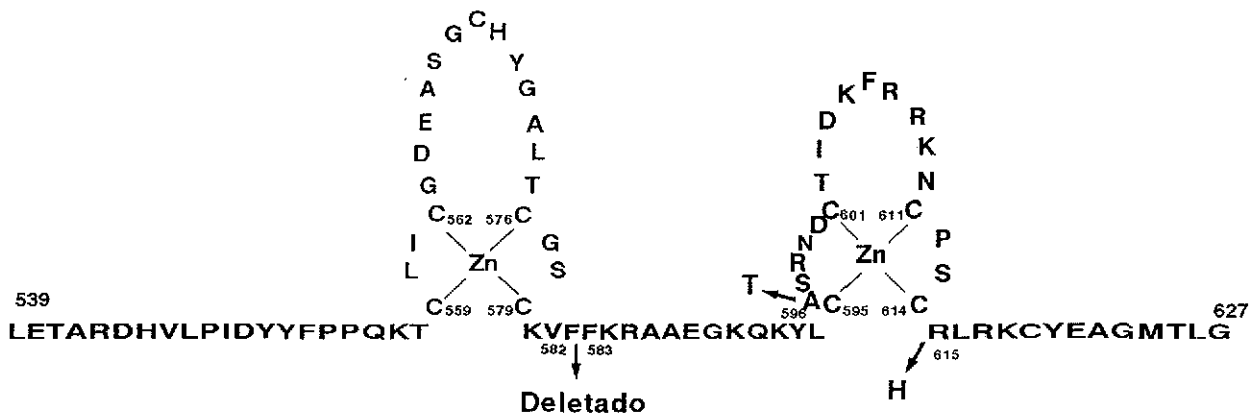


Figura 11. Dominio de unión al DNA del gen del receptor de andrógenos. Las flechas indican el lugar en donde se localizaron las mutaciones (F582→ Deletada; Alanina 596→Treonina; Arginina 615→Histidina). También se indican los sitios en los cuales están las cisteínas que se unen a una molécula de zinc, dando lugar a las estructuras llamadas dedos de zinc.

En el codón 596, que se encuentra en el exón 3, en la base del segundo dedo de zinc (Fig. 11), se encontró una transición G→A que cambia el codón GCC a ACC dando como resultado la conversión de una alanina altamente conservada a una treonina. Basado en el análisis de la estructura tridimensional del RG, se sabe que este sitio es muy importante para la dimerización de los RA monoméricos (Hard *et al.*, 1990; Luisi *et al.*, 1991). Estudios de cotransfección con un vector reportero de respuesta a andrógenos, demostraron que el RA mutado en este sitio retiene un 30% de actividad transcripcional comparado con el RA normal (Quigley *et al.*, 1995). Los pacientes 2P y 3P, que pertenecen a diferentes familias, presentaron la misma mutación y tienen un fenotipo masculino con hipospadias y escroto bífido, la virilización alcanzada por estos pacientes al parecer es debida a que la actividad transcripcional no se abate totalmente con esta mutación. Esta mutación ha sido reportada en otros tres individuos, los cuales también presentan el SIPA, y en ellos se hicieron estudios de unión del RA a su ligando, encontrándose en los tres casos una unión normal (Gast *et al.*, 1995; Holterhus *et al.*, 1999; Giwercman *et al.*, 2000).

Otra mutación que se localizó en el dominio de unión al DNA, fue en el codón 615, en la base 3' del segundo dedo de zinc (Fig. 11), el cambio de CGT(Arg) a CAT(His) originó una insensibilidad completa a los andrógenos, lo que hace sobresalir la importancia de una arginina en 615, ya que este aminoácido se encuentra altamente conservado dentro de la subfamilia de receptores.

La unión del RA a DHT-³H medida en fibroblastos de piel genital, se encontró dentro del rango normal (43.33 fmol/mg proteína). El sitio 615 presenta alta incidencia en mutaciones, ya que se han descrito una delección del codón 615 (Beitel *et al.*, 1994); un cambio de Arg→Gly (CGT→GGT), 8 cambios de Arg→His similar al encontrado en este trabajo y dos cambios de Arg→Pro (CGT→CAT), todos estos cambios excepto dos individuos con SIPA han originado un fenotipo totalmente femenino (Giwerman *et al.*, 2000; Mowszowicz *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1993; Cabral *et al.*, 1998; Hiort *et al.*, 1998; Hiort *et al.*, 1996; Ahmed *et al.*, 2000).

Mutaciones en la región bisagra del RA

La región bisagra que es codificada por la región 5' del exón 4 (aminoácidos 628 a 670), es importante por contener los sitios de localización nuclear (~ 629-633), y es la que muestra menos homología en su secuencia de bases, al compararla entre los diversos receptores a esteroides (Fig. 12).

En el paciente 3C, que presentó un síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos y que se estudió junto con una hermana que presentaba las mismas características clínicas, se localizó una mutación sin sentido, debido a una transversión (C→T) en el nucleótido 2331. Esta mutación posiblemente originó una proteína truncada, debido al codón de terminación prematuro en 657 (CAG→TAG). Estudios de unión del RA a DHT-³H en fibroblastos mantenidos en cultivo, apoyan lo anterior, ya que en estas pacientes, la unión del esteroide fue nula. Estudios *in vitro* efectuados por Simental y colaboradores (1991), en el cual deletan la región carboxilo terminal del RA y obtienen una proteína con los aminoácidos 1 al 660, indican también la ausencia de unión al ligando (R1881-³H). Los autores también estudian la localización de la proteína truncada y observan que se encuentra dentro del núcleo, y que tiene una actividad transcripcional muy baja (10%) determinada en ensayos de cotransfección transitoria utilizando el cDNA del RA mutante y un gen reportero que contiene el gen MMTV-CAT. La proteína receptora originada en el paciente 3C, posiblemente siga el mismo patrón que la obtenida *in vitro*, ya que la talla es casi igual (aminoácidos 1 al 657), una diferencia que se encuentra entre las dos, es que la proteína del paciente al parecer tiene una actividad transcripcional nula, ya que no presentó ningún signo de virilización.

Mutaciones en el dominio de unión al ligando del RA

El dominio de unión al ligando es muy extenso, se inicia en el codón 671 que se codifica a partir de la mitad del exón 4 y termina en el codón 919 codificado por el exón 8. Debido a esto, se discutirán las mutaciones de los pacientes estudiados en cada exón del dominio de unión al ligando.

En el exón 4, se localizaron cuatro mutaciones en individuos con insensibilidad parcial a los andrógenos (4P, 5P, 6P, 7P), como se observa en la figura 12, todos

ellos tuvieron un cambio de aminoácido en lugares en donde el aminoácido original se encuentra altamente conservado en toda la familia de receptores a esteroides. Es interesante hacer notar que los pacientes 4P y 6P tuvieron tan poca virilización que conservaron un papel femenino. En estos pacientes se midió la unión del RA a DHT- ^3H , para el sujeto 4P (P682T) se encontró una unión normal baja (14.3 ± 1.9 fmol/mg proteína) mientras que para el 6P (Q711E) fue totalmente normal (31.0 ± 7.7 fmol/mg proteína). El cambio de aminoácidos en estos sitios, no impidió la unión del RA al ligando, posiblemente en esta región todavía influya más la actividad de región bisagra.

El paciente 5P (L701I), conservó un papel masculino, con ambigüedad genital, se estudió un primo por rama materna con las mismas características clínicas. En este mismo sitio se han informado mutaciones, pero con cambios que dan aminoácidos diferentes. En un paciente con resistencia completa a los andrógenos, el cambio es Leu701Phe (CTC \rightarrow TTC) (Ahmed *et al.*, 2000) y en tres casos de mutaciones somáticas que han sido encontradas en cáncer de próstata, el cambio es Leu701His (CTC \rightarrow CAC) (Suzuki *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1997; Zao *et al.*, 1999). Al parecer este sitio es muy importante para la actividad del RA y dependiendo del aminoácido cambiado en los individuos afectados, dará como resultado un fenotipo diferente. En el individuo aquí estudiado, el cambio de leucina a isoleucina no resulta tan radical, ya que estos aminoácidos son muy parecidos en su cadena lateral y en su polaridad. De manera diferente ocurre en el paciente reportado con SICA, ya que el cambio es de una leucina a una fenilalanina, este último aminoácido contiene un radical cíclico que le da una conformación y polaridad diferente. En el caso de cáncer de próstata también el cambio es drástico, ya que la histidina es mas polar y básica que la leucina .

En el sujeto 7P, en el cual se detectó una transición G \rightarrow A en el nucleótido 2533 y que originó el cambio Gly \rightarrow Asp en el codón 724, es un individuo con fenotipo masculino al cual le fueron corregidas hipospadias y ginecomastia, acudió al médico por infertilidad. En la espermatobioscopia se observó una viabilidad del 40%, necrozoospermia y oligoastenozoospermia, lo cual explica la infertilidad y posiblemente sea el resultado de una actividad alterada del RA el cual contiene una mutación en el dominio de unión al ligando. Cuando se analizó la secuencia de

nucleótidos en este paciente, se observó que en el mismo sitio de la mutación también existía la secuencia normal (Fig. 10.4, abajo) lo que indica un carácter de heterocigosis, esto resulta poco probable ya que el gen del RA se encuentra en el cromosoma X, se descartó un mosaico con Klinefelter (XXY) analizando un mayor número de metafases. Este evento se ha explicado como un mosaicismo somático (Boehmer *et al.*, 1997; Hölterhus *et al.*, 1997) y puede representar un factor substancial para el fenotipo del individuo permitiendo un mayor grado de virilización que lo esperado para el genotipo con el alelo mutado solamente. Esto último se ilustra al comparar el sujeto aquí estudiado con dos casos informados (Ahmed *et al.*, 2000) en los cuales en uno existe una mutación idéntica (Gly724Asp) al sujeto 7P y da como resultado una resistencia completa a la acción de los andrógenos, la otra mutación GGC→AGC (Gly724Ser) también origina un fenotipo femenino.

En el exón 5, se localizaron 5 mutaciones erróneas, cuatro de ellas (4C, 5C, 6C, 7C) originaron una resistencia completa a la acción de los andrógenos y una (8P) originó una resistencia parcial.

En los sujetos 4C y 5C las mutaciones se localizaron en el mismo codón (743) pero en diferente nucleótido, en el sujeto 4C fue una transversión G→C en el nucleótido 2589 y para el 5C fue una transición G→A en el nucleótido 2590, este sitio es muy importante para la actividad del RA, ya que en los dos casos originó un bloqueo total en la virilización.

Con el paciente 5C se estudiaron dos hermanas afectadas por el mismo síndrome, en el análisis de unión del RA a su ligando, todas ellas mostraron unión normal del RA en preparaciones citosolicas, sin embargo no se detectó unión a nivel nuclear (Ulloa-Aguirre *et al.*, 1990), lo que sugiere que esta mutación en particular puede alterar el transporte del complejo hormona-RA al núcleo. A este respecto, estudios moleculares usando mutantes del RA construidos por mutagénesis con PCR, han demostrado que los 48 aminoácidos del exón 5 en el dominio de unión al esteroide juegan un papel muy importante en la translocación nuclear (Zhou *et al.*, 1994b), ya que cuando deletan el exón 5, la localización del receptor es predominantemente citoplasmática y la actividad transcripcional es nula.

En el codón 765 se localizaron dos mutaciones, una para un SICA (6C), Ala→Val y una para un SIPA (8P) Ala→Ser.

El sitio 765 tiene alta incidencia en mutaciones, ya que se han informado nueve casos de la mutación GCC(Ala)→ACC(Thr) y una mutación para el cambio GCC(Ala)→GTC(Val) (Gottlieb *et al.*, 1999), además es muy importante para la actividad del RA, ya que todas dan como resultados SICA . A diferencia de todas las demás mutaciones, en el paciente 8P se observa una resistencia parcial, la actividad androgénica puede ser debida a que el aminoácido sustituido (Ala→Ser) altere de una manera menos radical la estructura del RA, ya que en estudios de unión del RA a su ligando, en el paciente con SIPA se encontró una unión positiva (23.08 fmol/mg proteína) mientras que para la paciente 6C (Ala→Val) la unión fue de cero.

La mutación encontrada en el paciente 7C, fue con alteraciones moleculares más severas, ya que hubo una deleción de 7 pb y una duplicación de 11 pb (Fig. 10.7). Se han propuesto diversos mecanismos para explicar las deleciones de poca cantidad de nucleótidos, la secuencia de bases que rodean a la deleción es muy importante, ya que se ha observado que la existencia de palíndromos o cuasipalindromos originan la formación de horquillas, en las cuales las secuencias que no tienen homólogo se eliminan y generan una deleción. También se ha encontrado que en la vecindad de algunas deleciones, la presencia de “elementos simétricos”, que pueden ser desde 5 pb hasta 18 pb, y que de alguna manera influyen durante la replicación del DNA a la formación de la deleción.

En el análisis de la secuencia de bases del exón 6, no se determinaron secuencias palindromicas, pero si la presencia de elementos simétricos de 6 pb, en la región 5' de la deleción:

Codón	756	757	758	759	760	761	762
	AAT	G <u>TC</u>	<u>AAC</u>	T CC	AGG	ATG	C TC
		<i>Elemento simétrico</i>		<i>Deleción</i>			

Esta secuencia probablemente influyó en la deleción de 7pb localizadas en el exón

6 del RA en el paciente 7C.

En cuanto a la duplicación ocurrida corriente abajo de la deleción, es difícil explicar su presencia, ya que la mayoría de duplicaciones se establecen en genes completos o para varios exones de un mismo gen y se ha postulado que es debido a una recombinación homóloga desigual (Levinson y Gutman, 1987).

Ya que en la actualidad, es posible efectuar estudios moleculares en una mayor cantidad de genes, la detección de alteraciones moleculares similares a la observada en el paciente 7C, y su análisis, permitirá conocer sitios o secuencias específicas que influyan en este tipo de mutaciones.

Como resultado de la deleción y duplicación en el gen del RA, se originó un cambio en el marco de lectura, con la formación de dos codones de terminación prematuros que dieron lugar a una proteína receptora truncada sin capacidad de unión al ligando, como se verificó al hacer estudios de unión del RA a DHT-³H, en donde la unión fue negativa.

En el exón 6 del RA, se localizaron 5 mutaciones, cuatro que originaron SICA (8C, 9C, 10C, 11C) y una que originó SIPA (9P).

Los pacientes 8C, 9C y 10C presentaron la misma mutación Arg→His en el codón 774, este codón parece ser particularmente propenso a presentar mutaciones puntuales, ya que hasta ahora se han presentado 9 mutaciones en la que la arginina 774 es cambiada por una cisteína y 7 casos en la que cambia a histidina (Gottlieb *et al.*, 1999). El cambio de aminoácido ha originado en todos los casos, excepto uno, una resistencia completa a la acción de los andrógenos, lo que indica que este lugar dentro del dominio de unión al ligando es muy importante. Basado en el análisis comparativo *in vitro* de receptores de andrógenos a los cuales mutaron artificialmente introduciendo una cisteína o una metionina, Marcelli y col. (1991) concluyen que la arginina es crucial para mantener estable la conformación del dominio de unión al esteroide. De los tres pacientes analizados aquí, solo en uno (8C) se estudió la unión del RA a su ligando, y se encontró que la unión es prácticamente nula (2.3 fmol/mg proteína), lo que indica que el cambio de

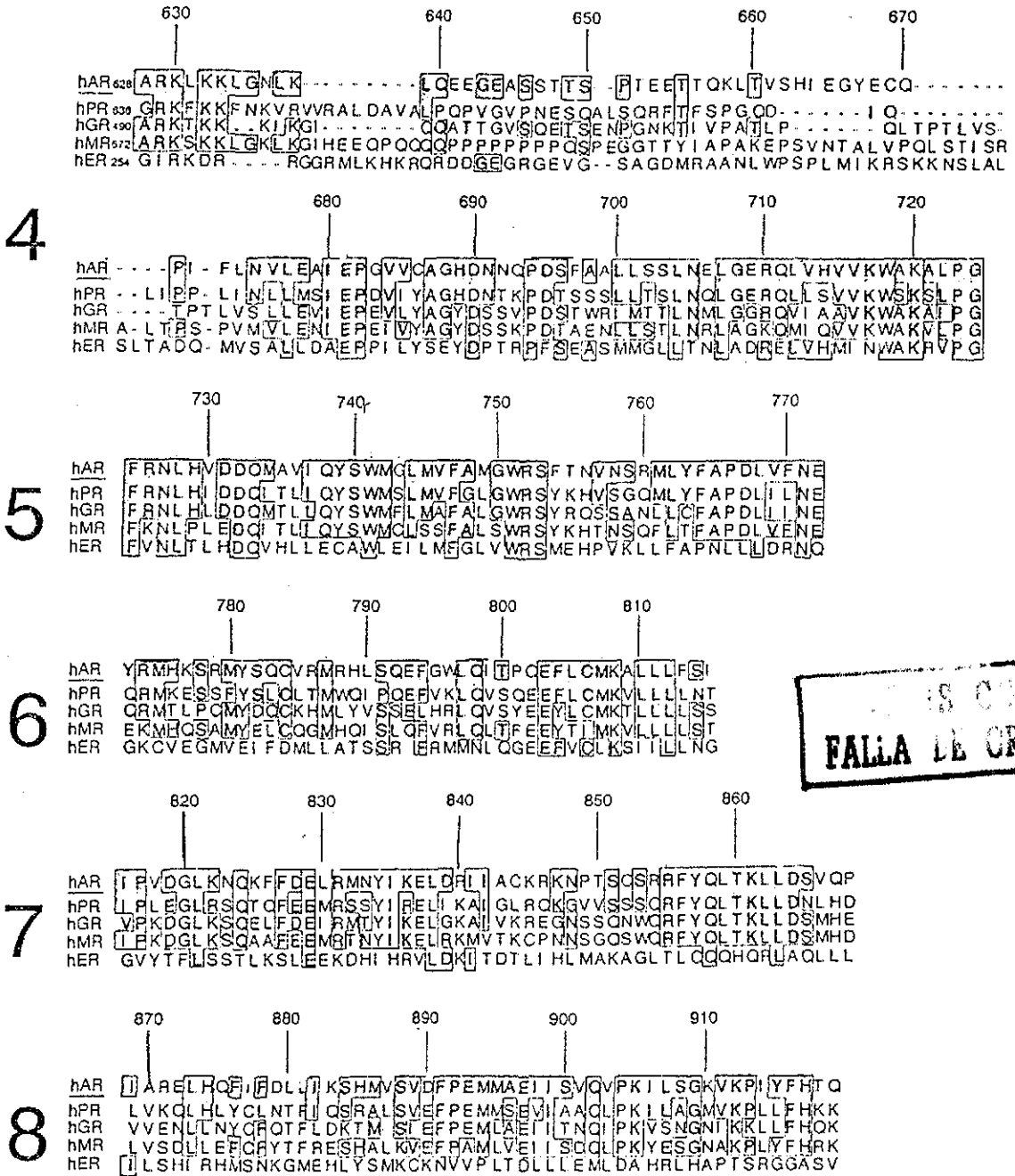


Figura 12. Sustitución de aminoácidos en el dominio de unión al ligando. Secuencia de aminoácidos del dominio de unión al ligando del receptor de andrógenos humano (hAR), receptor de progesterona humano (hPR), receptor de glucocorticoides humano (hGR), receptor de mineralocorticoides humano (hRM), y receptor de estrógenos humano (hRE), codificados por los exones 4 al 8 en el hAR. Las áreas dentro de los cuadros indican zonas de identidad entre el receptor de andrógenos y otros receptores.

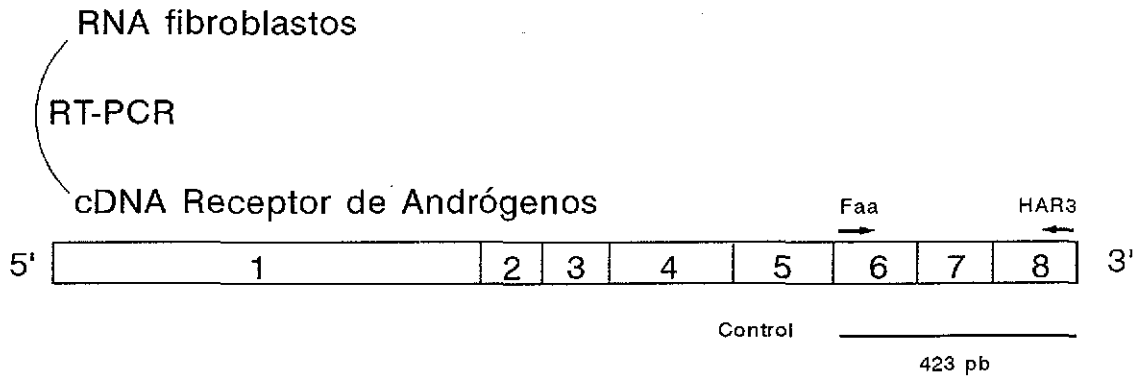
aminoácido altera de manera significativa la interacción entre el esteroide y el RA.

En el paciente 11C se localizó una transición T→C en el codón 791, que cambia una serina por una prolina, la serina en esta posición (dentro de la α -hélice 7) se encuentra muy conservada en el grupo de receptores a esteroides (Fig. 12), indicando la importancia de las características del aminoácido en esta posición.

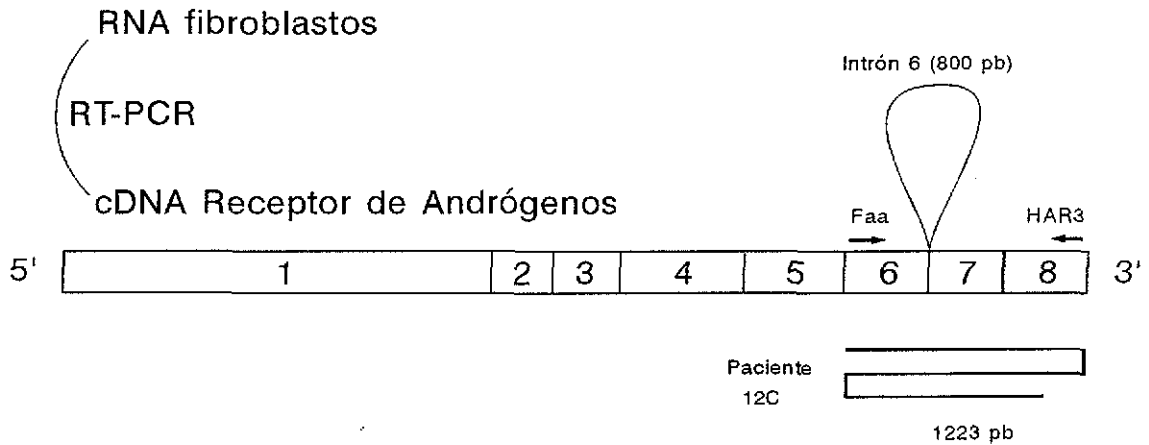
En el paciente 9P, que presentó un importante desarrollo mamario a pesar de tener genitales masculinos normales, se encontró una transición A→G en el segundo nucleótido del codón 802 en el exón 6. Además de la ginecomastia y la distribución ginecoide de la grasa corporal, este paciente tuvo niveles elevados tanto de testosterona (14.1 ng/ml) como de estradiol (67.0 pg/ml). Esta mutación que se localiza en el dominio de unión al ligando del RA, puede causar anomalías en la unión RA-andrógeno (como afinidad o capacidad de unión reducidas) o alteraciones cualitativas como un incremento en la velocidad de disociación del ligando o una especificidad alterada (Quigley *et al.*, 1995; Thorton y Kelly, 1998). Al igual que este paciente, la mayoría de casos de SIPA con ginecomastia, se localizan en el dominio de unión al esteroide (Grino *et al.*, 1988; Giwerzman *et al.*, 2000).

Estudios moleculares en el paciente 12C, mostraron una mutación en el gen del RA en la región de corte y empalme entre el exón 6 y el intrón 6. La mutación es una transversión que cambió una guanina de la posición +5 del sitio donador a una citosina. Este cambio impidió el corte (splicing) del intrón 6; estudios con el RNAm del RA que se transcribió de manera inversa mostró que se formó un solo producto de ~1223 pb, tamaño que concuerda con el control normal (443 pb) más 800 pb del intrón 6 (Fig. 13). No se encontraron más bandas, lo que hace suponer que no hubo formación de RNAm del RA normal, y está de acuerdo con los estudios de unión del RA, los cuales mostraron una total ausencia de unión.

Debido a la escasa cantidad de fibroblastos con la que se contaba, no fue posible analizar la proteína mediante la técnica de western blot, aunque se podría predecir para este RA un tamaño menor al normal, ya que existe un codón de terminación



A



B

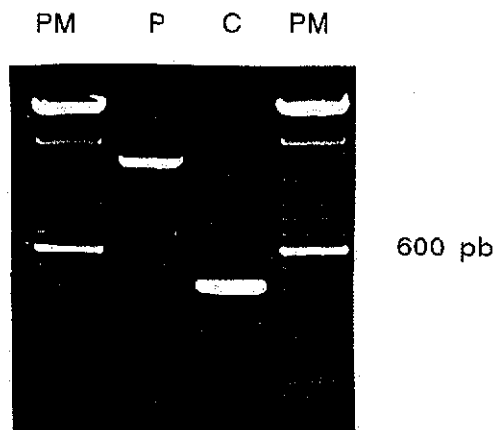


Figura 13. Representaci6n esquemática de la amplificaci6n del cDNA del receptor de andr6genos en el paciente 12C y de un control normal (panel A). En el panel B se muestran los productos de PCR corridos en gel de agarosa y visualizados con bromuro de etidio, (P) paciente, (C) control, (PM) escalera de DNA de 100 pb.

(TAG) en el intrón, 79 bases río abajo del sitio de corte. Una proteína truncada con estas características fue encontrada por Sammarco y colaboradores (2000). Ellos estudiaron una mutación localizada en el mismo sitio que la encontrada en el paciente 12C, pero el cambio de base fue de guanina a tirosina. El sujeto estudiado por estos autores tiene un fenotipo con un cierto grado de virilización, lo que indica actividad androgénica, esta actividad concuerda con el hallazgo de una pequeña cantidad de RA normal sintetizado por las células mutantes, la mutación $g \rightarrow t$ permitió el procesamiento del RNAm en una pequeña cantidad.

En el paciente 12C, la mutación $g \rightarrow c$ bloqueó totalmente el corte del intrón 6, dando como resultado una ausencia total de virilización en este sujeto.

Por otro lado es interesante hacer notar que esta mutación ocurrió *de novo*, ya que no existen antecedentes familiares y el gen del RA materno resultó normal al analizarlo mediante la técnica de SSCP y secuenciación (Fig. 10.9). Hiort y colaboradores (1998) encontraron un alto porcentaje (26.7%) de mutaciones *de novo* en el gen del RA en individuos sin antecedentes familiares, lo que indica que la formación de nuevas mutaciones en el gen del RA no es un evento raro.

En el exón 7, se localizaron 3 mutaciones, dos originaron SICA (13C y 14C) y una originó una insensibilidad parcial a los andrógenos (10P).

En el paciente 13C se encontró una transversión $T \rightarrow G$, el reemplazo conservativo de fenilalanina por valina en el aminoácido 827, el cual es sitio muy conservado, causó una alteración importante, ya que se encuentra en un segmento crítico para la actividad del RA (Zhou *et al.*, 1994a,b; Thorton y Kelly, 1998). Este sitio se encuentra en la α hélice -9 del dominio de unión al ligando, el cambio de aminoácido no impidió la unión del RA a DHT- 3H , ya que exhibió una unión normal (25.2 ± 5.9 fmol/mg proteína). En la misma región se localizó la mutación Leu830Val, que también dio como resultado una resistencia completa a los andrógenos (14C), lo que subraya la importancia de este segmento de nucleótidos en el RA.

La mutación conservativa Leu838Phe encontrada en un paciente con resistencia parcial a los andrógenos (10P), permitió la virilización con presencia de hipospadias, indicando que el cambio de base (C→T) no abolió totalmente la actividad del RA.

En el exón 8, se localizaron 4 mutaciones, una (15C) originó una resistencia completa a los andrógenos y las tres restantes (11P, 12P y 13P) originaron resistencia parcial.

La mutación del paciente 15C fue una transición A→G en el nucleótido 2980 del exón 8; este cambio no se había detectado antes en pacientes con SICA, este sitio dentro de la hélice 11, es muy importante ya que al haber la mutación se nulificó totalmente la actividad de unión del RA a su ligando.

Las mutaciones en los codones 870 (Ala Val) y 879 (Asp Tyr) originaron insensibilidad parcial, y no afectaron la unión del RA a su ligando, ambas mutaciones se localizan cerca de la función de activación 2 (AF-2), una región involucrada en la interacción con el coactivador TIF-2 (Slagsvold *et al.*, 2000).

La última mutación identificada fue una transición C→T en el nucleótido 3026, encontrado en un niño de 12 años de edad que presentó hipospadias perineal como estigma principal. Aunque esta mutación afectó a un residuo altamente conservado (Ser888), no hubo cambio de aminoácido, sin embargo, es conocido que un cambio en codones sinónimos puede afectar la transcripción, el procesamiento o la traducción del RNAm (Beaudet *et al.*, 1995). El paciente 13C presentó una mutación silenciosa AGC→AGT (Ser→Ser), que se describe por primera vez, por lo que no se podía excluir la posibilidad de un polimorfismo. Sin embargo el estudio del exón 8 en más de 130 cromosomas de individuos normales (preferentemente hombres), descartó un polimorfismo y sugiere fuertemente que el cambio en el codón 888 del RA, influyó considerablemente en el fenotipo del paciente. En apoyo a lo anterior evidencias moleculares indican que la mutagénesis en el residuo 888 no influye en la unión del andrógeno (como se verificó en el paciente 13P; unión

interacción con el coactivador TIF2 y con el dominio amino terminal (Berrevoets *et al.*, 1998).

Mutaciones en el dominio amino-terminal del RA.

El dominio amino-terminal del RA comprende aproximadamente la mitad de los 919 aminoácidos que forman el RA y su función es principalmente la regulación de la transcripción. Este dominio es codificado solo por el exón 1, en donde se han encontrado relativamente pocas mutaciones, esto en parte se atribuye a la dificultad en su análisis, ya que es muy grande, contiene una alta cantidad de guaninas y citosinas así como varios polimorfismos. También es pertinente mencionar que el dominio amino terminal es el menos conservado entre los miembros de la familia de receptores a esteroides, lo que sugiere que alguna variabilidad en la estructura proteínica es tolerada en esta región.

En el paciente 1P, se detectó una mutación silenciosa en el codón 211 que cambia una guanina por una adenina. Esta mutación se ha considerado como un polimorfismo ya que se ha observado entre un 8% (Batch *et al.*, 1992) hasta un 14% (Hiort *et al.*, 1994) en una población control. Sin embargo también se ha informado como única alteración molecular en el RA de individuos con insensibilidad parcial a los andrógenos (Gottlieb *et al.*, 1999), como en el sujeto aquí estudiado, y aún en resistencia completa a la acción de los andrógenos (Wang *et al.*, 1998; Gottlieb *et al.*, 1999). La influencia de esta mutación silenciosa (Glu/GAG→GAA/Glu) en la actividad del RA permanece aún sin esclarecerse.

En la figura 14 se muestra un esquema del RA con la localización de las mutaciones encontradas en los pacientes con insensibilidad a los andrógenos. Se observaron 28 mutaciones en total; una deleción de 3 pb, una deleción de 7 pb con repetición de 11 pb y 26 mutaciones puntuales de las cuales 24 son mutaciones erróneas, una mutación sin sentido y una mutación en un intrón.

La distribución de estas mutaciones en el gen del RA es: una en el exón 1, una en exón 2, tres en exón 3, cinco en el exón 4, cinco en el exón 5, cinco en el exón 6, una en el intrón 6, tres en el exón 7 y cuatro en el exón 8.

La mayoría de mutaciones se localizaron el dominio de unión al esteroide, y no se

encontró que en algún exón predominara la incidencia de mutaciones, y solo en el codón 774 del exón 6, se presentaron tres mutaciones idénticas (Arg774His) en individuos de diferentes familias, este sitio ya se ha documentado como alto en prevalencia de mutaciones o puntos calientes (hot spots) (Quigley *et al.*, 1995).

El análisis de las mutaciones puntuales por su posición en el codón mostró que la mayoría se localizaron en el primer nucleótido del lado 5' (n=13) y en el segundo nucleótido (n=10). En el tercer nucleótido sólo se encontraron 2 mutaciones y en ellas no hubo cambio de aminoácido. El código genético es degenerado (un aminoácido puede ser especificado por más de un codón) y cuando un aminoácido tiene múltiples codones, la diferencia se encuentra normalmente en la tercera base, debido a esto, una mutación en la tercera base tiene mas probabilidades de originar una mutación silenciosa.

En cuanto al cambio de base en las mutaciones se observaron:

18 transiciones (G→A; 10 / C→T; 5 / T→C; 1 / A→G; 2) que dan un porcentaje de 69.23 %.

8 transversiones (G→T; 2 / C→A; 2 / C→G; 3 / T→G; 1) que dan un porcentaje de 30.76 %.

El análisis de estos resultados muestra que hay un mayor porcentaje de transiciones en relación a las transversiones. Esto mismo se ha observado en el análisis de otros genes (Antonarakis *et al.*, 2001), y la mayor cantidad de transiciones se ha atribuido a la hipermutabilidad del nucleótido CpG, pero al restar las mutaciones originadas por los CpGs, el número de transiciones sigue siendo mayor al esperado. Por otro lado en el cromosoma X, que es donde se encuentra el gen del RA, se ha observado que contiene una cantidad menor de CpGs con respecto a los cromosomas autosómicos. Este aumento en el porcentaje de transiciones no se ha podido explicar, pero es importante puntualizar que los estudios de mutaciones, solo se han efectuado en individuos con alguna patología, lo que no refleja el total de mutaciones que se han efectuado en los diferentes genes, ya que los cambios pueden llevar a una mutación silenciosa o a un cambio de aminoácido que no altere notablemente la actividad o función de la proteína de la cual es integrante.

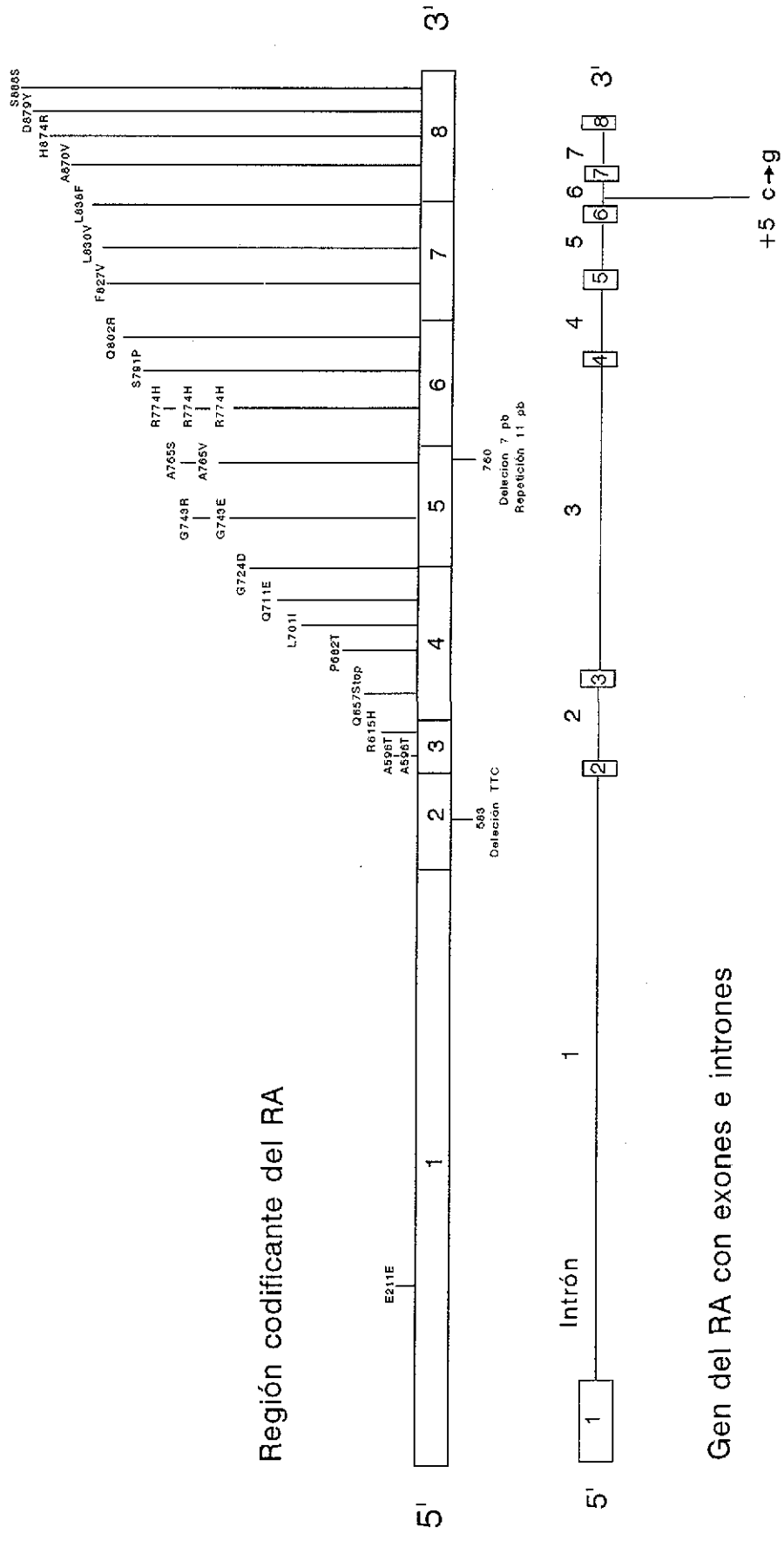


Figura 14. Representación esquemática del receptor de andrógenos. Arriba se muestra la localización de mutaciones en la región codificante del gen del receptor de andrógenos. Abajo se muestra la localización de la mutación encontrada en la región de corte y empalme del exón 6/intrón 6 del receptor de andrógenos.

El estudio molecular del gen del RA en individuos con resistencia a los andrógenos, ha permitido conocer los sitios de mayor importancia para el funcionamiento adecuado de la proteína receptora, también ha ofrecido conocimientos para un mejor entendimiento del mecanismo de acción de los andrógenos, el cual va adquiriendo una mayor complejidad debido a todas las interacciones entre las diversos dominios del mismo receptor así como con otras moléculas como son las de choque térmico y todos los coactivadores y correpresores necesarios para la transcripción de proteínas andrógeno reguladas.

Además, los estudios moleculares han hecho posible relacionar al RA con otras patologías como la enfermedad de Kennedy en el cual el RA tiene un mayor número de repeticiones del triplete CAG en el exón 1, y da como resultado una distrofia muscular bulbar, o como el cáncer de próstata y de mama, en los cuales se han encontrado mutaciones somáticas del RA, en estos últimos casos la mutación le confiere al RA una mayor actividad o una menor especificidad, dando como resultado el crecimiento anormal del tejido.

Uno de los objetivos de los estudios moleculares del RA en pacientes con SIA, desde el punto de vista clínico, es el de hacer una correlación fenotipo-genotipo, el cual no se ha podido cubrir de una manera satisfactoria ya que no siempre es posible encontrar esta relación, por ejemplo, se ha visto que una misma mutación da diferentes fenotipos aún en una misma familia, y por el otro lado, diferentes mutaciones dan un mismo fenotipo. Lo que por ahora se puede concluir es que los síndromes que anteriormente eran tratados como entidades diferentes (Reifenstein, Lubs, Rosewater, Gilbert-Dreyfus, Feminización testicular completa, Feminización testicular incompleta) se pueden agrupar en una sola entidad, que es la resistencia a los andrógenos, y que presenta una gama de fenotipos que van desde el totalmente femenino hasta un fenotipo masculino con infertilidad o ginecomastia, y que esto es originado por mutaciones en el RA, o en proteínas relacionadas con su mecanismo de acción, por ejemplo, los coactivadores.

Desde el punto de vista genético, se ha observado que el RA entre todos los miembros de la familia de factores de transcripción nuclear, es único en cuanto a la gran cantidad de diferentes mutaciones que han sido definidas en él, y que dan

como resultado el síndrome de resistencia a andrógenos. La relativa alta frecuencia de lesiones encontradas en este gen, se puede atribuir a que al localizarse en el cromosoma X, los varones (46XY) que tienen una copia simple del gen, al heredar la mutación necesariamente la expresan, además de que al parecer los andrógenos no son requeridos para la vida, y aunque el paciente con defectos en la función del RA puede desplegar anormalidades en la virilización, no tiene la viabilidad comprometida.

El hecho de que el RA se encuentre en un gen desprotegido de su par en un cromosoma homólogo, aparentemente le da cierta fragilidad, pero esta característica sirve, a nivel de especie, como una protección para una reproducción adecuada, ya que las mutaciones en el gen del RA impiden la reproducción por lo que es genéticamente letal, y al no transmitirse a la siguiente generación se reduce la acumulación de mutaciones deletéreas en el gen del RA.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, Hawkins JR, Martin H, Rowland J, Shimura N, Tait AD, Hughes IA. 2000 Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome **J Clin Endocrinol Metab** 85:658-665.
- Aiman J, Griffin JE, Gazak JM, Wilson JD, MacDonald PC. 1979 Androgen insensitivity as a cause of infertility in otherwise normal men. **N Engl J Med** 300:223-227.
- Alen P, Claessens F, Verhoeven G, Rombauts W, Peeters B. 1999 The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription. **Mol Cell Biol** 19:6085-6097.
- Amero SA, Kretsinger RH, Moncrief ND, Yamamoto KR, Pearson WR. 1992 The origin of nuclear receptor proteins. A single precursor distinct from other transcription factors **Mol Endocrinol** 6:3-7.
- Andersson S, Russell DW, Wilson J. 1996. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency **Trends Endocrinol** 7:121-125.
- Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN. 2001. The nature and mechanisms of human gene mutation. En: The metabolic and molecular bases of inherited disease. Scriver, Beaudet, Valle Sly Eds. 8^a Edición Mc Graw-Hill, pp 343-377
- Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Metzger PS. 1997. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer **Science** 277:965-968.
- Baldazzi L, Baroncini C, Pirazzoli P, Balsamo A, Capelli M, Marchetti G, Bernardi F, Cacciari E. 1994 Two mutations causing complete androgen insensitivity: a frame-shift in the steroid binding domain and a Cys \rightarrow Phe substitution in the second zinc finger of the androgen receptor **Hum Mol Genet** 3:1169-1170.
- Batch JA, Williams DM, Davies HR, Brown BD, Evans BAJ, Hughes IA, Patterson MN. 1992. Androgen receptor gene mutations identified by SSCP in fourteen subjects with androgen insensitivity syndrome **Hum Mol Genet** 1:497-503.
- Beato M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. **Cell** 56:335-344.
- Beato M, Sánchez-Pacheco A. 1996. Interactions of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex **Endocr Reviews** 17:587-609.

- Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D. 1995. Genetics, biochemistry and molecular basis of variant human phenotypes. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* McGraw-Hill, New York, pp 53-118.
- Beitel LK, Prior L, Vasiliou DM, Gottlieb B, Kaufman M, Lumbroso R, Alvarado C, McGillivray B, Trifiro M, Pinsky L. 1994. Complete androgen insensitivity due to mutations in the probable α -helical segments of the DNA-binding domain in the human androgen receptor **Hum Mol Genet 3:21-27.**
- Berrevoets CA, Doesburg P, Steketeer K, Trapman J, Brinkman AO. 1998. Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor 2) **Mol Endocrinol 12:1172-1183.**
- Boehmer ALM, Brinkmann AO, Niermeijer NF, Bakker L, Halley DJJ, Drop SLS. 1997. Germ-line and somatic mosaicism in the androgen insensitivity syndrome: Implications for genetics counseling. **Am J Hum Genet 60:1003-1006.**
- Brinkmann OA, Faber PW, van Rooij HCJ, Kuiper GGJM, Ris C, Klaassen P, van der Korput JAGM, Voorhorst MM, van Laar JH, Mulder E, Trapman J. 1989. The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression **J Steroid Biochem 34:307-310.**
- Brown TR, Migeon CJ. 1981. Cultured human skin fibroblasts: a model for the study of androgen action **Mol Cell Biochem 36:3-22.**
- Brown TR, Maes M, Rothwell SW, Migeon CJ. 1982. Human complete androgen insensitivity with normal dihydrotestosterone receptor binding capacity in cultured genital skin fibroblasts: evidence for qualitative abnormality of the receptor. **J Clin Endocrinol Metab 55:61-69.**
- Brown TR, Lubhan DB, Wilson EM, Joseph DR, French FS, Migeon CJ. 1988. Deletion of the steroid-binding of the human androgen receptor gene in one family with complete androgen insensitivity syndrome: evidence for further genetic heterogeneity in this syndrome. **Proc Natl Acad Sci USA 86:9534-9538.**
- Brown TR, Scherer PA, Chang YT, Migeon CJ, Ghirri P, Muroso K, Zhou Z. 1993. Molecular genetics of human androgen insensitivity. **Eur J Pediatr 152 (Suppl 2) : S62-S69.**
- Cabral DF, Maciel-Guerra AT, Hackel C. 1998. Mutations of androgen receptor gene in Brazilian patients with male pseudohermaphroditism. **Brazilian J Med Biol Res 31:775-778.**
- Cavailles V, Dauvois S, L'Horset F, Lopez G, Hoare S, Kushner PJ, Parker MG. 1995. Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. **EMBO J 14:3741-3751.**

- Colvard DS, Wilson EM. 1987 Transformation of 10S androgen receptor in a hamster ductus deferens tumor cell line **Endocrinology** **121:931-940**.
- Chakravarti D, LaMorte VJ, Nelson MC, Nakajima T, Schulman IG, Juguilon H, Montminy M, Evans RM. 1996. Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. **Nature** **383:99-103**.
- Chang C, Kokontis J, Liao S. 1988. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors **Science** **240:324-32**.
- Chávez B, Vilchis F, Zenteno JC, Larrea F, Kofman-Alfaro S. 2001a. Novel molecular defects in the androgen receptor gene of Mexican patients with androgen insensitivity. **Clin Genet** **59:185-188**.
- Chávez B, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A, Larrea F, Vilchis F. 2001b. Eight novel mutations of the androgen receptor gene in patients with androgen insensitivity syndrome. **J Hum Genet** **46:560-565**.
- Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM. 1997 Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with p/CAF and CBP/p300. **Cell** **90:569-580**.
- De Bellis A, Quigley CA, Cariello NF, El-Awady M, Sar M, Lane MV, Wilson EM, French FS. 1992 Single base mutation in the human androgen receptor insensitivity: Rapid detection by a modified denaturing gradient gel electrophoresis technique. **Mol Endocrinol** **6:1009-1920**.
- De Vos P, Claessens F, Celis L, Peeters B, Rombauts W, Heyns W, Verhoeven G, 1994. Nuclear extracts enhance the interactions of fusion proteins containing the DNA-binding domain of the androgen and glucocorticoid response elements. **J Steroid Biochem Molec Biol** **48:317-323**.
- Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ 1992 Testosterone and 5 α -dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. **Mol Cell Endocrinol** **88:15-22**.
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. 1992 Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeats loci in four human populations groups. **Genomics** **12:241-253**.
- Evans BAJ, Jones TR, Hughes IA 1984. Studies of the androgen receptor in dispersed fibroblasts: investigation of patients with androgen insensitivity **Clin Endocrinol (Oxford)** **30:93-105**.
- Freedman LP. 1992 Anatomy of the steroid receptor finger region. **Endocr Rev** **13:129-145**.

- Gast A, Neuschmid-Kaspar F, Klocker H, Cato AC 1995. A single amino acid exchange abolishes dimerization of the androgen receptor and causes Reifenstein syndrome. **Mol Cell Endocrinol** 111:93-98.
- Georget JM, Lobaccaro B, Terouanne B, Mangeat P, Nicolas JC, Sultan C. 1997. Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor. **Mol Cell Endocrinol** 129:17-26.
- Gerber HP, Seipel K, Georgiev O, Hofferer M, Hug M, Rusconi S, Schaffner W. 1995. Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. **Science** 263:808-811.
- Gilbert-Dreyfus S, Sébaoun CA, Balisch J. 1957. Etude d'un cas familial d'androgynoidisme avec hypospadias grave, gynecomastie et hyperoestrogénie. **Ann Endocrinol (Paris)** 18:93-101.
- Giwercman A, Kledal T, Schwartz M, Giwercman YL, Leffers H, Zazzi H, Wedell A, Sakkebaek NE. 2000. Preserved male fertility despite decreased androgen sensitivity caused by a mutation in the ligand-binding domain of the androgen receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab** 85:2253-2259.
- Giwercman YL, Nikoshkov A, Lindsten K, Bystrom B, Pousette A, Knudtzon J, Alm J, Wedell A. 2000. Response to treatment in patients with partial androgen insensitivity due to mutations in the nDNA-binding domain of the androgen receptor. **Hormone Res** 53:83-88.
- Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS. 1979. Coated pits, coated vesicles, and receptor mediated endocytosis. **Nature** 279:679-685.
- Gottlieb B, Beitel LK, Lumbroso R, Pinsky L, Trifiro M. 1999. Update of the androgen receptor gene mutations database. **Hum Mutat** 14:103-114.
- Griffin JE, Punyashtiti K, Wilson JD. 1976. Dihydrotestosterone binding by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from control subjects and from patients with hereditary male pseudohermaphroditism due to androgen resistance. **J Clin Invest** 57:1342-1351.
- Griffin JE, Wilson JD. 1989. The androgen resistance syndromes: 5 α -reductase deficiency, testicular feminization, and related syndromes. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) *The metabolic basis of inherited disease*, 6a Edición Mc Graw Hill, New York, pp1919-1944.
- Grino PB, Griffin JE, Cushard WG, Wilson JD. 1988. A mutation of the androgen receptor associated with partial androgen resistance, familial gynecomastia, and fertility. **J Clin Endocrinol Metab** 66:754-761.

- Gronemeyer H. 1992. Control of the transcription activation by steroid hormone receptors. **FASEB J** 6:2524-2529.
- Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Lescop P, Sar S, Arger M, Perrot-Applanat M, Milgrom E. 1989. Mechanism of nuclear localization of the progesterone receptor, evidence for interaction between monomers. **Cell** 57:1147-1154.
- Halachmi S, Marden E, Martin G, MacKay H, Abbondanza C, Brown M. 1994. Estrogen receptor-associated proteins: Possible mediators of hormone-induced transcription. **Science** 264:1455-1458.
- Hard T, Kellenbach E, Boelens R, Maler BA, Dahlman K, Feedman LP, Carlstedt-Duke J, Yamamoto KR, Gustafsson JA, Kaptein R. 1990. Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. **Science** 249:157-160.
- Hiort O, Holterhus PM. 2000. The molecular basis of male sexual differentiation. **Eur J Endocrinol** 142:101-110.
- Hiort O, Wodtke A, Struve D, Zollner A, Sinnecker GHG. 1994. Detection of point mutations in androgen receptor gene using non-isotopic single strand conformation polymorphism analysis. **Hum Mol Genet** 3:1163-1166.
- Hiort O, Sinnecker HGH, Holterhus PM, Nitsche EM, Kruse K. 1996. The clinical and molecular spectrum of androgen insensitivity syndromes. **Am J Med Genet** 63:218-222.
- Hiort O, Sinnecker HGH, Holterhus P-M, Nitsche EM, Kruse. 1998. Inherited and *de novo* androgen receptor gene mutations: investigation of single-case families. **J Pediatr** 131:939-943.
- Holterhus PM, Bruggenwirt HT, Hiort O, Kleinkauf-Houcken A, Kruse K, Sinnecker GHG, Brinkman AO. 1997. Mosaicism due to a somatic mutation of the androgen insensitivity syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 82:3584-3589.
- Holterhus PM, Wiebel J, Sinnecker GH, Bruggenwirth HT, Sippell WG, Brinkmann AO, Kruse K, Hiort O. 1999. Clinical and molecular spectrum of somatic mosaicism in androgen insensitivity syndrome. **Pediatric Res** 46:684-690.
- Hong H, Kohli K, Trivedi A, Johnson DL, Stallcup MR. 1996. GRIP1, a novel mouse protein that serves as transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. **Proc Natl Acad Sci USA** 93:4948-4952.
- Hughes IA. 2001. Minireview: Sex differentiation. **Endocrinology** 142:3281-3287.

- Ikonen T, Palvimo JJ, Janne OA 1997. Interactions between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators **J Biol Chem** 272:29821-29828.
- Imasaki K, Okabe T, Murakami H, Tanaka Y, Haji M, Takayanagi R, Nawata H 1996. Androgen insensitivity syndrome due to new mutations in the DNA binding domain of the androgen receptor. **Mol Cell Endocrinol** 120:15-24.
- Jacq X, Brou C, Lutz Y, Davison I, Chambon P, Tota L. 1994. Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. **Cell** 79:107-117.
- Jenster G, van der Korput HA, van Vroonhoven C, van der Kwast TH, Trapman J, Brinkmann AO. 1991. Domains of the androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization **Mol Endocrinol** 5:510-518.
- Jenster G, Trapman J, Brinkmann AO 1993 Nuclear import of the human androgen receptor **Biochem J** 302:191-197
- Jenster G, van der Korput HA, Trapman J, Brinkmann AO. 1995. Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. **J Biol Chem** 270:7341-7346.
- John SWM, Weizner G, Rosen R, Scriver CR. 1991. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes **Nucleic Acids Res** 19:408.
- Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG. 1996 A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. **Cell** 85:403-414.
- Kasper S, Rennie PS, Bruchosvsky N, Sheppard PC, Cheng H, Lin L, Shiu RP, Snoek R, Matusik RJ 1994. Cooperative binding of androgen receptors to two DNA sequences is required for androgen induction of the probasin gene. **J Biol Chem** 269:31763-31769.
- Kaufman M, Straisfeld C, Pinsky L, 1976 Male pseudohermaphroditism presumably due to target organ unresponsiveness to androgens. Deficient 5 α -dihydrotestosterone binding in cultured skin fibroblasts **J Clin Invest** 58:345-350.
- Kaufman M, Pinsky L, Baird PA, McGillivray BC. 1979. Complete androgen insensitivity with normal amount of 5-alpha-dihydrotestosterone-binding activity in labium majus skin fibroblasts **Am J Med Genet** 4:401-411.
- Keenan BS, Meyer III WJ, Jones HW, Migeon CJ 1974. Syndrome of androgen insensitivity in man: absence of 5 α -dihydrotestosterone binding protein in skin fibroblasts. **J Clin Endocrinol Metab** 38:1143-1146.

- Kellio PJ, Palvino JJ, Mehto M, Janne OA. 1994. Analysis of androgen receptor-DNA interactions with receptor proteins produced in insect cells. **J Biol Chem** 269:11514-11522.
- Kuiper GGJ, Faber PW, van Rooij HJC, Van der Korput JAGM, Ris-Stalpers C, Klassen P, Trapman J, Brinkmann AO. 1989. Structural organization of the human androgen receptors gene. **J Mol Endocrinol** 2:R1-R4.
- LaCasse EC, Lochnan HA, Walker P, Lefebvre YA. 1993. Identification of binding proteins for nuclear localization signals of the glucocorticoid and thyroid hormone receptors. **Endocrinology** 132:1017-1025.
- Lala DS, Rice DA, Parker KL. 1992. Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression is the mouse homolog of fusi tarazu factor 1. **Mol Endocrinol** 6:1249-1258.
- Langley E, Zhou ZX, Wilson EM. 1995. Evidence for an anti-parallel orientation of the ligand-activated human androgen receptor dimer. **J Biol Chem** 270:29983-29990.
- Langley E, Kempainen JA, Wilson EM. 1998. Intermolecular NH₂-/Carboxyl-terminal interactions in androgen receptor dimerization revealed by mutations that cause androgen insensitivity. **J Biol Chem** 273:92-101.
- LaSpada AR, Roling DB, Harding AE, Warner CL, Spiegel R, Hausmanowa-Petrusewicz I, Yee WC, Fischbeck KH. 1992. Meiotic instability and genotype-phenotype correlation of the trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. **Nat Genet** 2:301-304.
- Lee JW, Ryan F, Swaffield JC, Johnston SA, Moore DD. 1995. Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. **Nature** 374:91-94.
- Levinson G, Gutman GA. 1987. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. **Mol Biol Evol** 4:203-221.
- Li H, Gomes PJ, Chen JD. 1997. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. **Proc Natl Acad Sci USA** 94:8479-8989.
- Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM. 1988. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. **Science** 240:327-330.
- Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, Higgs HN, Migeon CJ, Wilson EM, French FS. 1989. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. **Proc Natl Acad Sci USA** 85:8151-8155.

- Lubs HA, Vilar O, Bergenstal DM. 1959. Familial male pseudohermaphroditism with labial testes and partial feminization: endocrine studies and genetic aspects. **J Clin Endocrinol Metab** **19:1110-1120**.
- Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freeman LP, Yamamoto KR, Sigler PB. 1991. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. **Nature** **352:497-505**.
- Lumbroso S, Lobaccaro JM, Belon C, Martin D, Chaussain JL, Sultan C. 1993. A new mutation within the deoxyribonucleic acid-binding domain of the androgen receptor gene in a family with complete androgen insensitivity syndrome. **Fert Steril** **60:814-819**.
- Luo Z, Rouvinen J, Maenpaa PH. 1994. A peptide C-terminal to the ZN finger of human vitamin D receptor is able to specify nuclear localization. **Eur J Biochem** **223:381-387**.
- Ma H, Hong H, Huang SM, Irvine RA, Webb P, Kushner PJ, Coetzee GA, Stallcup MR. 1999. Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins. **Mol Cell Biol** **19:6164-6173**.
- MacLean HE, Chu S, Warne GL, Zajac JD. 1993. Related individuals with different androgen receptor gene deletions. **J Clin Invest** **91:1123-1128**.
- MacLean HE, Warne GL, Zajac JD. 1997. Localization of functional domains in the androgen receptor. **J Steroid Biochem Mol Biol** **62:233-242**.
- Marcelli M, Tilley WD, Zoppi S, Griffin JE, Wilson JD, McPhaul MJ. 1991. Androgen resistance associated with a mutation of the androgen receptor at amino acid 772 (Arg--Cys) results from a combination of decreased messenger ribonucleic acid levels and impairment of receptor function. **J Clin Endocrinol Metab** **73:318-325**.
- Matsumoto AM, Bremner WJ. 1984. Modulation of pulsatile gonadotropin secretion by testosterone in man. **J Clin Endocrinol Metab** **58:609-614**.
- Medina M, Chávez B, Pérez Palacios G. 1981. Defective androgen action at the cellular level in the androgen resistance syndromes. I. Differences between the complete and incomplete testicular feminization syndromes. **J Clin Endocrinol Metab** **53:1243-1246**.
- Miller WL. 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. **Endocrine Rev** **9:295-318**.
- Miller WL. 1998. Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. **Bailliere's Clin Endocrinol Metab** **12:67-81**.
- Mora D, Gronemeyer H. 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. **Curr Opin Cell Biol** **10:384-391**.

- Morris JM. 1953. The syndrome of testicular feminization in male pseudohermaphrodites. **Am J Obstet Gynecol** 65:1192-1211.
- Mowszowicz I, Lee HJ, Chen HT, Mestayer C, Portois MC, Cabrol S, Mauvais-Jarvis P, Chang C. 1993. A point mutation in the second zinc finger of the DNA-binding domain of the androgen receptor gene causes complete androgen insensitivity in two siblings with receptor-positive androgen resistance. **Mol Endocrinol** 7:861-869.
- Murray TJ, Fowler PA, Abramovich DR, Haites N, Lea RG. 2000. Human fetal testis: second trimester proliferative and steroidogenic capacities. **J Clin Endocrinol Metab** 85:4812-4817.
- Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Shimazaki S, Ota M, 1994. Dimerization characteristics of the DNA- and steroid-binding domains of the androgen receptor. **J Steroid Biochem Mol Biol** 50:225-233.
- Omura T, Morohashi K. 1995. Gene regulation of steroidogenesis. **J Steroid Biochem Mol Biol** 53:19-25.
- Onate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai MJ, Edwards DP, O'Malley BW. 1998. The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF 1) and AF 2 domains of steroid receptors. **J Biol Chem** 273:12101-12108.
- Orita M, Suzuki Y, Hayashi K. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics** 5:874-879.
- Ozanne DM, Gbrady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE, Robson CN, 2000. Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. **Mol Endocrinol** 14:1618-1626.
- Pérez-Palacios G, Chávez B, Méndez JP, Imperato-McGinley J, Ulloa-Aguirre A. 1987. The syndromes of androgen resistance revisited. **J Steroid Biochem** 27: 1101-1108.
- Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT. 1994. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. **Proc Natl Acad Sci USA** 91:5355-5358.
- Pinsky L, Kaufman M, Summitt RL, 1981. Congenital androgen insensitivity due to a qualitatively abnormal androgen receptor. **Am J Med Genet** 10:91-99.
- Pinsky L, Kaufman M, Chudley AE. 1985. Reduced affinity of the androgen receptor 5-alpha-dihydrotestosterone but not methyltrenolone in a form of partial androgen resistance studies on cultured genital skin fibroblasts. **J Clin Invest** 75:1291-1296.

- Quarmby VE, Kempainen JA, Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM. 1990. Expression of recombinant androgen receptor in cultured mammalian cells. **Mol Endocrinol** 4:1399-1407.
- Quigley CA, Friedman KJ, Johnson A, Lafrienera RG, Silverman LM, Lubahn DB, Brown TR, Wilson EM, Willard HF, French FS. 1992. Complete deletion of the androgen receptor gene: definition of the null phenotype of the androgen insensitivity syndrome and determination of carrier status. **J Clin Endocrinol Metab** 74:927-933.
- Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS. 1995. Androgen receptor defects: Historical, clinical, and molecular perspectives. **Endocrine Rev** 16:271-321.
- Reifenstein EC. 1947 Hereditary familial hypogonadism **Proc Am Fed Clin Res** 3:86.
- Rosewater S, Gwinup G, Hamwi GJ. 1965 Familial gynecomastia. **Ann Intern Med** 63:377-385.
- Rosner W, Smith RN. 1975. Isolation and characterization of the testosterone-estradiol binding globulin from human plasma: use of a novel affinity column. **Biochemistry** 14:4813-4820.
- Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, et al 1992. Sex hormone-binding globulin: Binding to cell membranes and generation of a second messenger. **J Androl** 13:101-106.
- Sammarco I, Grimaldi P, Rossi P, Cappa M, Moretti C, Frajese G, Geremia R. 2000. Novel point mutation in the splice donor site of exon-intron junction 6 of the androgen receptor gene in a patient with partial androgen insensitivity syndrome. **J Clin Endocrinol Metab** 85:3256-3261.
- Schulman IG, Chakravarti D, Juguilon H, Romo A, Evans RM. 1995. Interactions between the retinoid X receptor and a conserved region of the TATA-binding protein mediate hormone-dependent transactivation. **Proc Natl Acad Sci USA** 92:8288-8292.
- Simental JA, Sar M, Lane M, French FS, Wilson EM. 1991. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. **J Biol Chem** 266:510-518.
- Slagsvold T, Kraus I, Bentzen T, Palvimo J, Saatcioglu F. 2000. Mutational analysis of the androgen receptor AF-2 (activation function 2) core domain reveals functional and mechanistic differences of conserved residues compared with other nuclear receptors. **Mol Endocrinol** 14:1603-1617.
- Suzuki H, Sato N, Watanabe Y, Masai M, Seino S, Shimazaki J. 1993. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol** 46:759-765.



- Takeshita A, Yen PM, Misiti S, Cardona GR, Liu Y, Chin WW. 1996. Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. **Endocrinology** **137**:3594-3597.
- Thorton JW, Kelley DB. 1998. Evolution of the androgen receptor structure-function implications. **BioEssays** **20**:860-869.
- Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, Rosenfeld MG. 1997. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. **Nature** **387**:677-684.
- Trapman J, Klassen P, Kuioer GGJM, van der Korput JAGM, Faber PW, van Rooij HCJ, Geurts van Kessel A, Voorhorst MM, Mulder E, Brinkmann AO. 1988. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. **Biochem Biophys Res Commun** **153**:241-248.
- Trifiro M, Gottlieb B, Pinsky L, Kaufman M, Prior L, Belsham DD, Wrogemann K, Brown CJ, Willard HF, Trapman J, Brinkmann AO, Chang C, Liao S, Sergovich F, Jung J. 1991. The 56/58 kDa androgen-binding protein in male genital skin fibroblasts with a deleted androgen receptor gene. **Mol Cell Endocrinol** **75**:37-47.
- Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Angeles A, Fernández del Castillo C, Chávez B, Pérez palacios G. 1986. The presence of Müllerian remnants in the complete androgen insensitivity syndrome: a steroid hormone mediated defect? **Fertil Steril** **45**:302-305.
- Ulloa-Aguirre A, Chávez B, Méndez JP, Saavedra D, Pérez-Palacios G. 1988. Inherited impairment of nuclear androgen uptake as a cause of familial androgen insensitivity. **Eur J Obstet Gyn Rep Biol** **28**:317-329.
- Ulloa-Aguirre A, Méndez JO, Chávez B, Carranza Lira S, Angeles A, Pérez palacios G. 1990. Incomplete regression of Müllerian ducts in the androgen insensitivity syndrome. **Fertil Steril** **53**:1024-1028.
- Umesono K, Evans RM. 1989. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. **Cell** **57**:1139-1146.
- Veldscholte J, Berrevoets CA, Zegers ND, van der Kwast TH, Grootegoed JA, Mulder E. 1992. Hormone-induced dissociation of androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from non transformed receptors. **Biochemistry** **31**:7422-7430.
- Vilchis F, Canto P, Chávez B, Ulloa-Aguirre A, Méndez JP. 1997. Molecular analysis of the 5 α -steroid reductase type 2 gene in a family with deficiency of the enzyme. **Am J Med Genet** **69**:69-72.

- Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H. 1996. TIF2, a **160kDa** transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors **EMBO J 15:3667-3675**.
- Vom Baur E, Zechel C, Heery D, Heine MJ, Garnier JM, Vivat V, LeDouarin B, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R. 1996. Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF, **EMBO J 15:110-124**.
- Wang O, Ghaddesy FJ, Yong EL. 1998. Analysis of the transactivation domain of the androgen receptor in patients with male infertility **Clin Genet 54:185-192**.
- Warriar N, Yu C, Page N, Govindan MV. 1994. Substitution of Cys-560 by Phe, Trp, Tyr, and Ser in the first zinc finger of human androgen receptor affects hormonal sensitivity and transcriptional activation **J Biol Chem 269:31763-31769**.
- Watanabe M, Ushijima T, Shiraishi T, Yatani R, Shimazaki J, Kotake T, Sugimura T, Nagao M. 1997. Genetic alterations of androgen receptor gene in Japanese human prostate cancer **Jpn J Clin Oncol 27:389-393**.
- Waterman MR, Kagawa N, Zanger UN, Momoi K, Lund J, Simpson ER. 1992. Comparison of cAMP-responsive DNA sequences and their binding protein associated with expression of the bovine CYP21B genes. **J Steroid Biochem Mol Biol 43:931-935**.
- Wilbert DM, Griffin JE, Wilson JD. 1983. Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate **J Clin Endocrinol Metab 56:113-120**.
- Wilson CM, McPhaul MJ. 1994. A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci USA 91:1234-1238**.
- Wilson JD, Griffin JE, Russell DW. 1993. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency **Endocr Rev 14:577-593**.
- Wong CI, Zhou Z-X, Sar M, Wilson EM. 1993. Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH₂-terminal and steroid-binding domains **J Biol Chem 268:19004-19012**.
- Yeh S, Chang C. 1996. Cloning and characterization of a specific, ARA 70, for the androgen receptor in human prostate cells. **Proc Natl Acad Sci USA 93:5517-5521**.
- Zhao XY, Boyle B, Krishnan AV, Navone NM, Peehl DM, Feldman D. 1999. Two mutations identified in the androgen receptor of the new human prostate cancer cell line MDA PCa 2a. **J Urol 162:2192-2199**.

- Zhou Z-X, Wong C-I, Sar M, Wilson EM 1994a. The androgen receptor: an overview. **Recent Prog Horm Res 49:249-274.**
- Zhou Z-X, sar M, Simental JA, Lane MV, Wilson EM 1994b. A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. **J Biol Chem 269:13115-13123.**
- Zoppi S, Marcelli M, Deslypere JP, Griffin JE, Wilson JD, McPhaul MJ. 1992. Amino acid substitutions in the DNA binding domain of the human androgen receptor are a frequent cause of receptor-binding positive androgen resistance. **Mol Endocrinol 6:409-415.**
- Zoppi S, Wilson CM, Harbison MD, Griffin JE, Wilson JD, McPhaul MJ, Marcelli M 1993. Complete testicular feminization caused by amino-terminal truncation of the androgen receptor with down stream initiation. **J Clin Invest 91: 1105-1112.**

Short Report

Novel molecular defects in the androgen receptor gene of Mexican patients with androgen insensitivity

Chávez B, Vilchis F, Zenteno JC, Larrea F, Kofman-Alfaro, S. Novel molecular defects in the androgen receptor gene of Mexican patients with androgen insensitivity
Clin Genet 2001; 59: 185–188. © Munksgaard, 2001

The androgen insensitivity syndrome (AIS) is an X-linked form of male pseudohermaphroditism caused by mutations in the androgen receptor (AR) gene. In the present study, we analyzed the AR gene in 8 patients, 4 sporadic and 2 familial cases with the syndrome, using exon-specific polymerase chain reaction, single-stranded conformational polymorphism and sequencing analysis and identified six new single base mutations, including one nonsense mutation at the hinge region of the receptor. These molecular lesions occurred in the steroid-binding domain (SBD) and all but one affected the first nucleotide of their respective codons. A nonsense mutation in exon 4, which converts a glutamine into a premature termination signal (Q657stop), a missense mutation changing arginine instead of glycine (G743R) and a conservative substitution of leucine with valine at amino acid 830 (L830V) were detected in patients with CAIS. Three other missense mutations located in exons 4 (L701I), 5 (A765S), and 6 (Q802R) were present in individuals bearing a partial form of AIS. These data allow us to reaffirm the view that nonsense mutations in the AR results almost invariably in a CAIS phenotype and underly the importance of the SBD for the AR functional activity

**B Chávez^a, F Vilchis^a,
JC Zenteno^b, F Larrea^a and
S Kofman-Alfaro^b**

^a Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán and

^b Department of Genetics, Hospital General SSA-Facultad de Medicina, UNAM, México D.F., México

Key words: androgen insensitivity syndrome – androgen receptor – androgen receptor mutations – male pseudohermaphroditism

Corresponding author: Bertha Chávez, Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición S. Zubirán Vasco de Quiroga # 15, C.P. 14000 México D.F., México
Fax: +525 655 9859

Received 25 September 2000, revised and accepted for publication 20 October 2000

Male sex differentiation, sexual maturation, and gametogenesis are directly controlled by androgens. The androgen receptor (AR), which belongs to the superfamily of ligand-dependent transcription factors, mediates the action of the androgenic hormones by interacting with specific DNA sequences and stimulating tissue specific gene transcription, thus promoting male-specific effects (1). In the androgen insensitivity syndromes (AIS), molecular alterations in the AR gene prevent the normal development of both internal and external genitalia in genetic males (2). Subjects with androgen insensitivity present with a 46,XY karyotype, bilateral testes, normal or elevated serum testosterone levels and impairment of the usual response to androgens, associated with various defects on male differentiation and virilization that range from slightly undervirilized men to phenotypic females (3).

The complete form of AIS (CAIS) is characterized by external female phenotype, intrabdominal testes, blind ending vagina, and breast development with absence of axillary and pubic hair (4). Individuals with partial AIS (PAIS) may present a predominantly male phenotype with severe hypospadias or else, a predominantly female phenotype with clitoromegaly, ambiguous genitalia, and gynecomastia of variable degrees (4, 5). In addition, constitutional mutations in the AR gene can also cause mild AIS phenotypes as gynecomastia or infertility (6–8). To date, reliable genotype–phenotype correlations do not exist, and the clinical picture can vary even in different AIS patients carrying the same mutations (9, 10).

Here we describe the molecular analysis of the AR gene in patients with AIS in which six different new mutations were detected, one of them leading to a stop codon within the hinge region in the

5'-end of exon 4. This is the second mutation detected in this region causing a CAIS phenotype.

Patients and methods

Eight subjects of Mexican mestizo origin were included in the study (Table 1). All of them had a normal 46,XY karyotype. In family 1, patients 1A and 1B were siblings; in family 2, patients 2A and 2B were first cousins. Patients 3–6 were sporadic cases.

Four adult patients (1A, 1B, 3, and 6) had completely female external genitalia, pubertal breast development and absence of pubic and axillary hair, corresponding to AIS type 5b in the classification suggested by Sinnecker et al. (5). In all patients, testosterone levels were in the upper limit for normal males and luteinizing hormone (LH) serum concentrations were increased. Patients 2A, 2B, and 4, exhibiting a PAIS phenotype, were of pre-pubertal age and were raised as boys. They had severe hypospadias in conjunction with micropenis, bifid scrotum, and palpable testes (AIS type 2b). Patient 5 exhibited a female-like distribution of the body fat, bilateral gynecomastia (Tanner stage 3–4) and completely virilized external genitalia. In all cases, informed consent was obtained for molecular studies.

DNA analysis

Genomic DNA samples from each patient and from normal male controls were used as templates to PCR-amplify the exons 2–8 of the AR. Primer sets used in the PCR have been reported elsewhere (11). Amplification was performed on 25 μ l reactions each containing 500 ng DNA, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1.25 μ M of each primer, 2.5 units of Taq DNA polymerase, 4% DMSO, and 100 μ M of each dNTP. Reactions were denatured for 2 min and subjected to 25 cycles of amplification

at 94°C for 45 s, annealing between 56 and 65°C for 45 s and extension at 72°C for 45 s, followed by a final extension step at 72°C for 3 min. For mutation detection, an isotopic single-stranded conformational polymorphism (SSCP) method (12) was employed as previously described (13). Briefly, 2 μ l aliquots of ³²P-labeled PCR-products were diluted to 30 μ l (95% formamide, 20 mM EDTA and 0.05% bromophenol blue), and loaded on neutral 0.4-mm thick 5–8% polyacrylamide gels containing or not containing 10% glycerol. After electrophoresis at 200 V for 16 h, the gels were dried and autoradiographed for 2–4 h at –70°C.

PCR products showing altered migration patterns on SSCP were purified and submitted to direct sequencing using the Thermosequenase [α -³³P]ddNTP terminator cycle sequencing kit (Amersham Life Sciences Inc., Cleveland, OH, USA). Sequencing reactions were run on 6% polyacrylamide 7.5 M urea gels. After electrophoresis, gels were dried onto Whatman 3MM paper and exposed to Kodak BioMax X-ray films for 12–16 h.

Results

In all cases, the exons examined were amplified to the expected sizes by PCR, indicating the absence of gross abnormalities in the AR. By SSCP analysis, it was possible to detect PCR products with an altered electrophoretic mobility in each of the patients studied. Sequencing analysis of the mutant fragments showed six different single base substitutions, all of them novel mutations, including one nonsense and five missense mutations (Table 1). Patients 1A and 1B presented a C \rightarrow T transition within exon 4, changing codon 657 from CAG (glutamine) to TAG (premature termination signal). In subjects 2A and 2B, a C \rightarrow A transversion was detected at codon 701, also in exon 4. This mutation was responsible for a leucine to isoleucine substitution. Subject 3 pre-

Table 1 AR gene mutations in subjects with androgen insensitivity

Subject	Age (year)	Form**	Type	Location	Base change	Amino acids change	Mutation ^a
1A ^b	28	cAIS	Nonsense	Exon 4	CAG-TAG	Gln-STOP	Q657Stop ^c
1B ^b	34	cAIS	Nonsense	Exon 4	CAG-TAG	Gln-STOP	Q657Stop ^c
2A ^c	8	pAIS	Missense	Exon 4	CTC-ATC	Leu-Ile	L701I ^c
2B ^c	8	pAIS	Missense	Exon 4	CTC-ATC	Leu-Ile	L701I ^c
3	19	cAIS	Missense	Exon 5	GGG-AGG	Gly-Arg	G743R ^c
4	3	pAIS	Missense	Exon 5	GCC-TCC	Ala-Ser	A765S ^c
5	19	pAIS	Missense	Exon 6	CAG-CGG	Gln-Arg	Q802R ^c
6	17	cAIS	Missense	Exon 7	CTT-GTT	Leu-Val	L830V ^c

*Novel mutation

**CAIS and PAIS

^aAccording to the numeration of Lubahn et al. (11)

^bSiblings

^cCousins

sented a G→A transition in exon 5 that changes the sense of codon 743 from glycine to arginine. Patient 4 had a G→I transversion in exon 5, involving codon 765 which corresponds to alanine that changes to serine. The presence of an additional faint G band similar to that found in the wild type sequence, suggests a mosaicism in this patient. The fifth mutation was an A→G transition in exon 6, the normal codon, CAG, coding for glutamine at position 802 changes to an arginine. Finally, in patient 6, a C→G transversion in exon 7 resulted in a change from leucine to valine at amino acid 830.

Discussion

To date, about 200 different molecular lesions have been described in the AR gene causing AIS. Moreover, certain AR mutations have been also detected in some types of cancer, including those of the prostate, breast and larynx (4, 14).

In the present study, we examined a group of Mexican AIS patients and identified six new AR alterations. A nonsense mutation present in two siblings with CAIS was a result of a C→T substitution at nucleotide 2331 in exon 4. This gene defect predicts a truncated receptor with only 657 amino acids of the AR protein, which in theory would be devoided of androgen binding activity by not having the steroid binding domain (SBD). Data from *in vitro* studies have showed that deletion of the SBD results in truncated AR proteins (87 kDa) with undetectable [³H]R1881 binding activity (15). To our knowledge the Q657stop mutation is the first alteration detected within the 5'-end of exon 4 causing a CAIS. These and other observations already reported confirm the view that most, if not all, nonsense mutations of the AR lead to a CAIS phenotype (4, 16).

The second mutation identified in our study was a C→A change in exon 4 at nucleotide 2463, detected in a familial case of PAIS. The L701I mutation was identified in two first cousins, who exhibited a very similar phenotypic appearance characterized by penoscrotal hypospadias, bifid scrotum and palpable testes. This change has not been detected in AIS; however, a different mutation at the same codon 701 (T→A), which results in the substitution of histidine for leucine (L701H), has been found in prostatic DNA from patients with prostate cancer (17), as well as in a human prostate cancer cell line (MDA PCa 2a) recently established from a bone metastasis (18).

Patient 3, who presented a complete female phenotype, had a G→A substitution at position 2589 in exon 5 leading to a mutation Gly743 (GGG)→

Arg743 (AGG). Previous studies had documented at least two molecular lesions affecting the second or third nucleotide of codon 743, one of them was found in AIS patients (G743V) and the other in prostate cancer (14, 19).

In patient 4, a G→T transversion at codon 765 (nucleotide 2655) was recognized. This missense mutation is found at a region considered as a 'hot spot' of the AR gene (14, 20). It has been suggested that a small segment within the SBD (residues 761–764) may contain regions important for both receptor stability and for the stable association of the receptor with the androgen (20–23). Patient 4 showed evidence for somatic mosaicism as mutant and wild type AR sequences were observed. Somatic mosaicism of the AR gene seems to be a rare event in individuals with AIS and not only influences significantly the genotype–phenotype correlation in these subjects but also has important implications for genetic counseling (24). It is thought that somatic mosaicism of the AR could represent a substantial factor for the individual phenotype by shifting it to a larger degree of virilization than expected from the genotype of the mutant allele alone (25, 26).

In subject 5, who presented an important breast development in spite of having normal male external genitalia, we found a hitherto unreported A→G transition at the second nucleotide of codon 802 in exon 6. Apart from gynecomastia and a female-like distribution of the body fat, this patient had elevated serum levels of both estradiol (67.0 pg/ml) and testosterone (14.1 ng/ml). This mutation is located in the SBD of AR and is predicted to cause either androgen-binding abnormalities (reduced affinity or capacity of binding) or qualitative disturbances as altered steroid specificity or increased rate of ligand dissociation (4, 27). Several studies indicate that alterations in the SBD impair not only ligand binding but also the receptor dimerization, transcriptional activity and interactions of the AR with its coactivators, leading to phenotypic variability observed in PAIS (4, 8, 27–29). As it was shown in patient 5, most cases of subjects with gynecomastia because of AIS have mutations within the SBD (6, 29).

Mutation analysis in patient 6 with a CAIS phenotype showed a C→G transversion at nucleotide 2850 in exon 7 (L830V). This mutation had not been previously reported. Seemingly, the conservative replacement of leucine with valine at amino acid 830, which is a non-conserved residue, being unique to AR, causes an important functional alteration, as it lies within a segment considered determinant for the AR activity (20, 27).

In summary, we have identified six new mutations in the AR gene of Mexican patients clinically

diagnosed with AIS. Our data together with others previously described support that alterations in the SBD impair normal AR function leading to the phenotypical expression of the disease. The description of these and further mutations in the human AR may help to more clearly define specific regions involved in the androgen-receptor interaction.

Acknowledgements

This work was supported by the CONACYT (México), Grants 0010P-M and G-28494-M.

References

- Griffin JE et al. The androgen resistance syndromes: steroid 5 α -reductase 2 deficiency, testicular feminization, and related disorders. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th Edn, vol II. New York: McGraw-Hill, 1995: 2967–2998.
- Pinsky L et al. Androgen resistance due to mutation of the androgen receptor. *Clin Invest Med* 1992; 15: 456–473.
- Hiort O et al. The clinical and molecular spectrum of androgen insensitivity syndromes. *Am J Med Genet* 1996; 63: 218–222.
- Quigley CA et al. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev* 1995; 16: 271–321.
- Sinnecker GH et al. Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. *Eur J Pediatr* 1997; 156: 7–14.
- Grino PB et al. A mutation of the androgen receptor associated with partial androgen resistance, familial gynecomastia, and fertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66: 754–761.
- Tsukada T et al. An androgen receptor mutation causing androgen resistance in undervirilized male syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1202–1207.
- Ghadessy FJ et al. Oligospermic infertility associated with an androgen receptor mutation that disrupts interdomain and coactivator (TIF2) interactions. *J Clin Invest* 1999; 103: 1517–1525.
- Rodien P et al. Different phenotypes in a family with androgen insensitivity caused by the same M780I point mutation in the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2994–2998.
- Evans BA et al. Phenotypic diversity in siblings with partial androgen insensitivity syndrome. *Arch Dis Child* 1997; 76: 529–531.
- Lubahn DB et al. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9534–9538.
- Orita M et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874–879.
- Vilchis F et al. Codon 89 polymorphism of the human 5 α -steroid reductase type 2 gene. *Clin Genet* 1997; 51: 399–402.
- Gottlieb B et al. Update of the androgen receptor gene mutations database. *Human Mutat* 1999; 14: 103–114.
- Simental JA et al. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 1991; 266: 510–518.
- Yaegashi N et al. Point mutations in the steroid-binding domain of the androgen receptor gene of five Japanese patients with androgen insensitivity syndrome. *Tohoku J Exp Med* 1999; 187: 263–272.
- Suzuki H et al. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 46: 759–765.
- Zhao X-Y et al. Androgen insensitivity due to a double mutation in the androgen receptor of a new human prostate cancer cell line MDA PCa 2a. 81st Annual Meeting, The Endocrine Society, San Diego CA, 1999, Abstract P1–613.
- Lobaccaro JM et al. Complete androgen insensitivity syndrome associated with a de novo mutation of the androgen receptor gene detected by single strand conformation polymorphism. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 44: 211–216.
- McPhaul MJ et al. The spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 17–23.
- Batch JA et al. Androgen receptor gene mutations identified by SSCP in fourteen subjects with androgen insensitivity syndrome. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 497–503.
- Sweet CR et al. A unique point mutation in the androgen receptor gene in a family with complete androgen insensitivity syndrome. *Fertil Steril* 1992; 58: 703–707.
- Bevan CL et al. Wide variation in androgen receptor dysfunction in complete androgen insensitivity syndrome. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1997; 61: 19–26.
- Hiort O et al. Inherited and de novo androgen receptor gene mutations: investigation of single-case families. *J Pediatr* 1998; 131: 939–943.
- Boehmer ALM et al. Germ-line and somatic mosaicism in the androgen insensitivity syndrome: implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1003–1006.
- Holterhus PM et al. Mosaicism due to a somatic mutation of the androgen receptor gene determines phenotype in androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3584–3589.
- Thornton JW, Kelley DB. Evolution of the androgen receptor: structure – function implications. *BioEssays* 1998; 20: 860–869.
- Ahmed SF et al. Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 658–665.
- Giwercman A et al. Preserved male fertility despite decreased androgen sensitivity caused by a mutation in the ligand-binding domain of the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2253–2259.

ORIGINAL ARTICLE

Bertha Chávez · Juan Pablo Méndez
Alfredo Ulloa-Aguirre · Fernando Larrea · Felipe Vilchis

Eight novel mutations of the androgen receptor gene in patients with androgen insensitivity syndrome

Received: May 7, 2001 / Accepted: June 28, 2001

Abstract Androgen insensitivity syndrome (AIS) is an X-linked genetic disorder of male sexual differentiation caused by mutations in the androgen receptor (*AR*) gene. A reliable genotype–phenotype correlation in these patients does not exist as yet. Here we report the molecular studies performed on eight individuals with AIS. Exon-specific polymerase chain reaction (PCR), single-strand conformation polymorphism, and sequencing analyses, were performed in exons 2 to 8 of the *AR* gene. In one case, total cellular RNA was extracted from genital skin fibroblasts and reverse transcriptase-PCR was performed. Six different point mutations leading to amino acid substitutions (P682T, Q711E, G743E, F827V, H874R, D879Y), one splice-junction mutation (g→c at +5, exon 6/intron 6), and a missense mutation without amino acid substitution (S888S) were identified. All mutations, including a de novo mutation, were previously undescribed on the steroid binding domain. Of the eight mutations identified, four led to a complete female phenotype (codons 743, 827, 874 and the donor splice site +5), two were detected in phenotypic females with partial virilization (codons 682 and 711), and two were present in phenotypic male subjects with undervirilized external genitalia, thus indicating that all of these sites determine AR functional activity.

Key words Steroid receptors · Male pseudohermaphroditism · Splice-junction mutation · Silent mutation · Ambiguous genitalia

B. Chávez · A. Ulloa-Aguirre · F. Larrea · F. Vilchis (✉)
Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga #15, Tlalpan, CP 14000, México D.F., México
Tel. +1-525-573-1200 ext. 2423; Fax +1-525-655-9859
e-mail: vilchisuf@prodigy.net.mx

J.P. Méndez
Medical Research Unit in Developmental Biology, Hospital de Pediatría, IMSS, México City, Mexico

Introduction

Androgen insensitivity syndrome (AIS) is an X-linked hereditary disorder that leads to male pseudohermaphroditism with variable phenotypes. This defective response results from the impairment of androgen receptor (AR) function in activating androgen responsive genes in target cells (McPhaul et al. 1993). The phenotype in 46,XY affected individuals varies depending on the extent of the AR defect, ranging from subjects with complete androgen insensitivity syndrome (CAIS) where a female phenotype is observed, to patients with genital ambiguity who present with partial androgen insensitivity syndrome (PAIS). Patients with CAIS exhibit female external genitalia with a short vagina, usually sparse or absent pubic hair, normal-sized testes located in the abdominal or inguinal area with hypoplastic Wolffian derivatives; Müllerian ducts are generally absent. Patients with PAIS have a spectrum of virilization defects ranging from clitoromegaly and posterior fusion of labia majora to hypospadias with gynecomastia (French et al. 1990; Quigley et al. 1995).

The AR belongs to the nuclear receptor superfamily and has four functional domains encoded by eight exons (Lubahn et al. 1989). The N-terminal domain encoded by exon 1 is involved in transcriptional activation of target genes by androgens. The central section encoded by exons 2 and 3 comprises two “zinc-finger”-like structures; this domain is responsible for binding to androgen response elements in the promoter region of target genes. A hinge region, located between the DNA-binding domain and the steroid binding domain (SBD), is encoded by the 5′ region of exon 4, and contains the major part of the AR nuclear targeting signal. The C-terminal domain, encoded by exons 4 (3′ region) to 8, is involved in high-affinity ligand binding (Simental et al. 1991). The cloning of cDNA for human AR (Lubahn et al. 1988; Chang et al. 1988) has allowed detection of numerous molecular lesions, most of them being missense mutations spread throughout the coding region, although some “hot spots” have been identified (Quigley et al. 1995). In this study, we identified mutations in the *AR*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

97

gene of a group of patients with AIS and found eight new single-base mutations, all of them located within the SBD.

Subjects and methods

Patients

Molecular studies were performed on eight 46,XY individuals who were previously diagnosed with AIS. Patient 1 presented at 9 months of age with bilateral inguinal herniae, clitoromegaly, and slight labial fusion. Patient 2 presented at 11 years of age, having bilateral inguinal herniae, pseudovagina, and clitoromegaly. Patients 3 and 6, with CAIS phenotypes, were previously described (Ulloa-Aguirre et al. 1986, 1990). Patient 4 (CAIS) presented at 16 years old with primary amenorrhea, absence of sexual hair, a short vagina, and hypoplasia of labia majora and minora; breast development was Tanner 4. Patient 5 presented at 18 years of age with a female phenotype, absence of axillary hair, and scarce pubic hair. She was diagnosed with CAIS. Patient 7 was born with a penoscrotal hypospadias and cryptorchidism. At puberty, he developed bilateral gynecomastia and exhibited a female-like distribution of body fat. His facial and axillary hair was scarce. Patient 8 was admitted to the hospital at 3 years of age, presenting with perineal hypospadias and left cryptorchidism. The study was approved by the Medical Ethics Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán and informed consent was obtained from each of the patients or their parents.

Methods

DNA isolation was performed from ethylenediamine tetraacetate (EDTA) blood samples or genital skin fibroblasts of the patients and controls by standard methods (John et al. 1991). DNA fragments from exons 2–8 of the *AR* gene were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using primers previously reported (DeBellis et al. 1992). Reactions were carried out in a final volume of 25 μ l containing 0.5–0.8 μ g genomic DNA, 2 μ M each deoxyribonucleotide triphosphate, 1.25 μ M of each oligonucleotide primer, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 4% dimethylsulfoxide, and 2.0 U of ThermoStable DNA polymerase (Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA). Reactions were subjected to 25 cycles of amplification at 94°C for 1 min, annealing at 58–62°C (58°C for exons 2, 3, 4 and 5; 60°C for exons 6 and 8; 62°C for exon 7) for 1 min, and extension at 72°C for 1 min.

Single-stranded conformational polymorphism (SSCP) analysis of PCR products was performed according to the method of Orita (1989), using [α -³²P] deoxycytidine triphosphate as described elsewhere (Vilchis et al. 2000). Sequencing of the mutant and normal PCR fragments was carried out with the ThermoSequenase ([α -³³P] dideoxynucleotide triphosphate) terminator cycle sequencing kit (Amersham,

Cleveland, OH, USA), following the manufacturer's recommendations. Genital skin fibroblasts were propagated in cell culture from normal foreskin (46,XY control subjects) or a biopsy specimen from patients as previously described (Medina et al. 1982; Ulloa-Aguirre et al. 1988). Androgen-binding activity in cultured fibroblasts was determined under conditions similar to those described previously (Ulloa-Aguirre et al. 1988, 1990). Briefly, normal or mutant cellular pellets were resuspended in a buffer Tris HCl, 20 mmol/l [pH 7.4], containing; 1.5 mmol/l EDTA, 0.25 mmol/l dithiothreitol, 10% glycerol, 10 mmol/l sodium molybdate and then homogenized with a teflon pestle. The resulting homogenates were centrifuged at 105 000 *g* for 1 h at 4°C to obtain the soluble fraction. Aliquots of cytosol (100 μ l) were incubated at 4°C with 2.0 nmol/l [³H]-Dihydrotestosterone ([1,2,4,5,6,7-³H(N)]5 α -DHT; sp. act. 110 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, USA), with or without an excess (200-fold) of nonlabeled DHT to assess nonspecific binding. Bound and free steroid fractions were separated by dextran-coated charcoal method. Each determination was carried out in triplicate and repeated at least twice. Results were expressed as femtomoles of bound [³H]-DHT per milligram of protein (mean values \pm S.D.)

Total cellular RNA was extracted from genital skin fibroblasts using Trizol reagent (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA). RNA was reverse-transcribed into cDNA with the SuperScript preamplification system (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Aliquots (100 ng) of the cDNA from patient 4 and from a normal control were amplified by PCR using a set of primers designed from exon 6 (sense, 5'-ATGTACAGCCAGTGTGTCCGAATG) and exon 8 of the *AR* (antisense 5'-CTGGGTGTGGAAATGATGGGCT). After amplification, PCR products were analyzed in a 1.0% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized by UV fluorescence. Subsequently, both mutant and control DNA fragments were purified and sequenced as described earlier.

Results

No gross deletions of the *AR* gene were detected by PCR in any of the patients studied. Abnormalities in migration were detected by SSCP in all individuals. Sequencing analysis demonstrated eight new single-base mutations including a de novo mutation (Table 1). Patient 1 presented a C→A transversion within exon 4, changing codon 682 from proline to threonine (Fig. 1). Patient 2 had a C→G transversion at codon 711, also in exon 4, which was responsible for a glutamine to glutamic acid substitution (Fig. 1). In patient 3, a G→A transition was detected at position 743 in exon 5. This change was responsible for a glycine to glutamic acid substitution (Fig. 1).

Patient 4 had a mutation (g→c) at position +5 of the (exon 6/intron 6) splice donor site, which was not found in his mother (Fig. 2); this intronic mutation appears to prevent the splicing of intron 6. Amplification of the *AR* from

Table 1. Mutations in the *AR* gene from patients with AIS

Patient	Form	Exon	Nucleotide ^a	Base change	aa change	Binding ^b	Mutation
1	PAIS	4	2406	CCA→ACA	Pro→Thr	↓(14.3 ± 1.9)	P682T
2	PAIS	4	2493	CAG→GAG	Gln→Glu	+(31.0 ± 7.7)	Q711E
3	CAIS	5	2590	GGG→GAG	Gly→Glu	+(28.5 ± 6.2)	G743E
4	CAIS		+5	g→c		-(0.00)	+5 intron 6
5	CAIS	7	2841	TTT→GTT	Phe→Val	+(25.2 ± 5.9)	F827V
6	CAIS	8	2980	CAT→CGT	His→Arg	-(0.00)	H874R
7	PAIS	8	2997	GAC→TAC	Asp→Tyr	+(26.8 ± 2.6)	D879Y
8	PAIS	8	3026	AGC→AGT	Ser→Ser	+(18.7 ± 7.8)	S888S

CAIS, complete androgen insensitivity syndrome; PAIS, partial androgen insensitivity syndrome; aa, amino acid.

^aAccording to the numeration of Lubahn et al. 1989

^bAR binding: +, positive binding (15–55 fmol/mg protein); ↓, diminished binding (4–15 fmol/mg protein); –, negative binding (<3.0 fmol/mg protein). AR binding in normal control individuals (34.5 ± 20.5 fmol/mg protein)

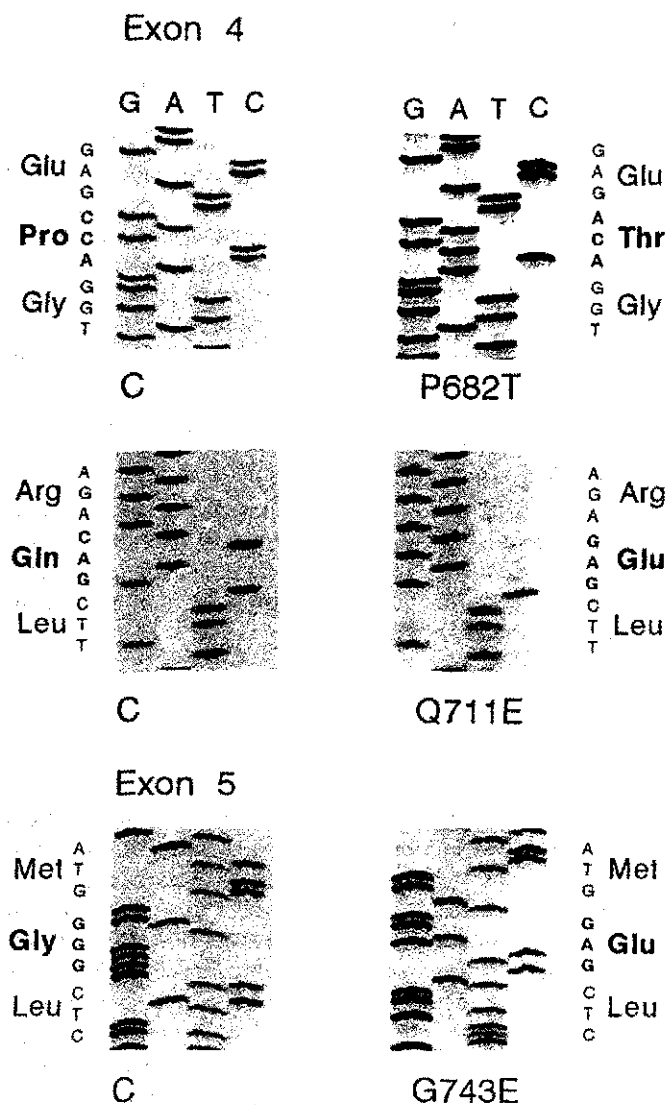


Fig. 1. Partial sequence of exons 4 and 5 of the *AR* gene. A C→A mutation in patient 1 that converts proline to threonine at position 682 is observed in the upper panel. A C→G transversion in patient 2 causing Gln711-Glu is shown in the middle panel. A G→A transition in patient 3 causing Gly743-Glu is depicted in the lower panel. Portions of sequencing gels with control DNAs (C) are shown on the left.

patient 4's cDNA (enclosing exons 6–8) by reverse transcriptase-PCR resulted in an amplicon of 1223 bp (normal control = 423 bp), which comprises the whole of intron 6 (about 800 bp) together with a coding segment of 423 bp (Fig. 2). Sequencing analyses of this DNA fragment (data not shown) essentially conforms to the sequence of the exon/intron junction reported previously (Lubahn et al. 1989), thus indicating a defective splicing. Subject 5 presented a T→G transversion in exon 7 that changes the sense of codon 827 from phenylalanine to valine (Fig. 3). The sixth mutation was an A→G transition in exon 8, changing histidine at position 874 to arginine (Fig. 3). In patient 7, a G→T transversion in exon 8 resulted in a change from aspartic acid to tyrosine at amino acid 879 (Fig. 4). Finally, a C→T missense mutation that leaves intact serine 888 (AGT instead of AGC) was the only alteration found in the AR of patient 8 (Fig. 4).

Discussion

Androgen insensitivity leads to incomplete virilization of individuals with a normal 46,XY karyotype. Molecular studies in patients with AIS are critical for generating a correlation between AR genotypes and clinical phenotypes, and these studies contribute to the elaboration of a structure–function map of the AR based on naturally occurring mutations. Thus far there are more than 200 different reported molecular lesions throughout the eight exons that constitute the gene. Diverse mutations of the AR have been described, not only in AIS, but also in prostate and breast cancers (French et al. 1990; López-Otin and Diamandis 1998; Ahmed et al. 2000; Sawai et al. 2000).

In our eight patients, a single-base mutation was always identified and all except one were within the region that corresponds to the SBD. Patients 1 and 2 presented a mutation in exon 4 and a PAIS phenotype. Patient 1 had a C→A substitution at nucleotide 2406 that leads to a nonconservative mutation of residue 682, which is highly conserved among the steroid receptor subgroup. It is thought that highly conserved residues are the most com-

Exon 6/Intron 6 junction

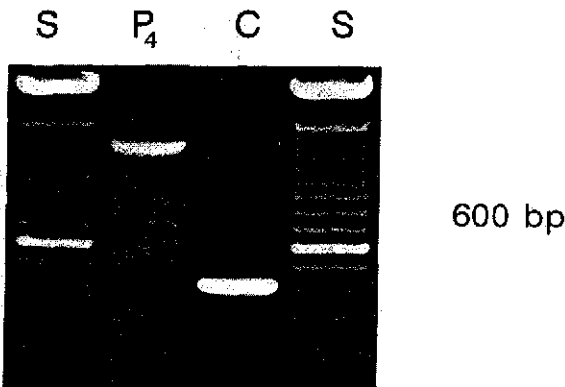
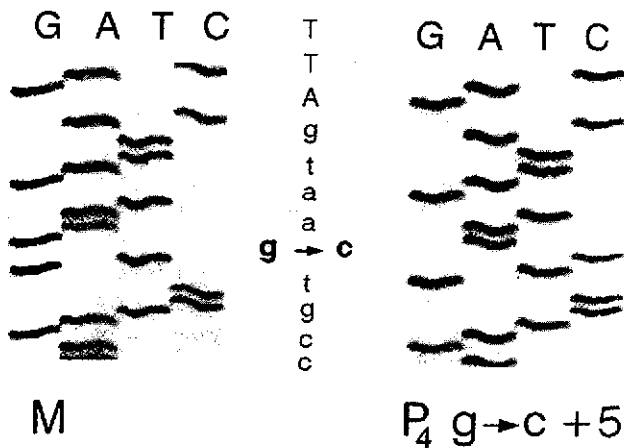
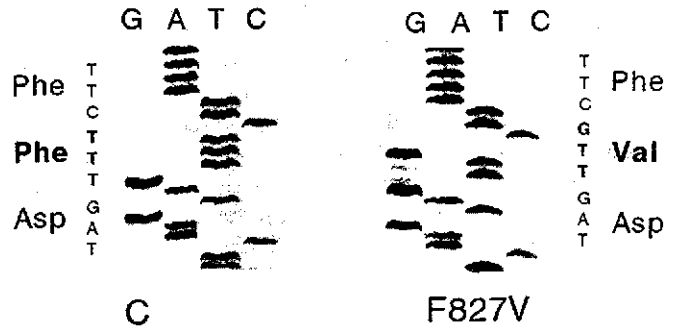


Fig. 2. Sequencing comparison of the exon 6/intron 6 boundaries of the mutant and normal *AR* gene. Patient 4 presents a single-base substitution ($g \rightarrow c$) at position +5 of the splice donor site, which is not present in the DNA of the patient's mother (*M*) (upper panel). The lower panel shows the size comparison of the *AR* cDNA (exons 6–8) amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Control cDNA yielded an expected fragment of 432 bp, whereas that of patient 4 (*p₄*) yielded a band of 1223 bp that spans from exon 6 through exon 8, including the entire intron 6. Outer lanes are 100-bp DNA markers (*S*)

mon sites of amino acid substitution in the *AR* gene. As analyzed in mutant fibroblasts, the Pro682→Thr substitution renders the AR with limited binding activity. The second disorder detected was a C→G change at nucleotide 2493 in exon 4. Apparently, the nonconservative replacement of glutamine with glutamic acid at amino acid 711, which is also a conserved residue, does not affect the AR binding activity. As in these cases, it has been estimated that about 75% of the mutations in the SBD have occurred at residues identical in at least two other members (i.e., PR, GR) of the steroid receptor subfamily (Quigley et al. 1995). Both mutations P682T and Q711E lie on the hinge region, an area known to be important for dimerization and nuclear translocation of the AR (Simental et al. 1991; Wong et al. 1993; Zhou et al. 1994a).

Exon 7



Exon 8

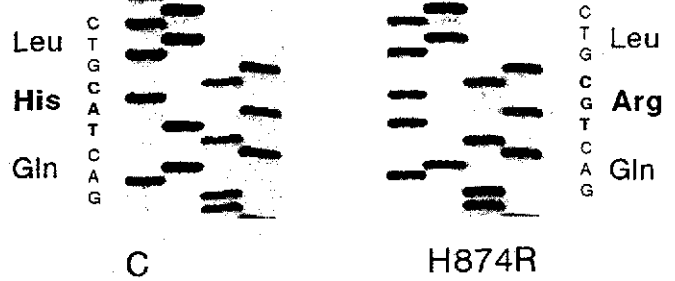


Fig. 3. Partial sequence of exons 7 and 8 of the *AR* gene showing a T→G transversion in patient 5 causing Phe827-Val and an A→G transition in patient 6 causing His874-Arg. Control DNA samples (*C*) were obtained from unrelated normal males

Exon 8

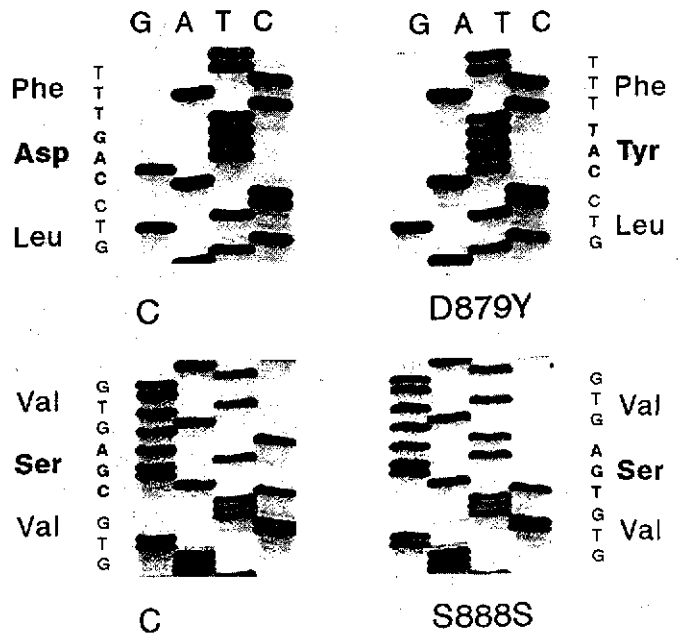


Fig. 4. Partial sequence of exon 8 of the *AR* gene showing a G→T transversion in subject 7 that changes the sense of codon 879 from aspartic acid to tyrosine. Patient 8 had a C→T replacement leading to Ser888-Ser. Control DNA samples (*C*) were obtained from unrelated normal males

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

95

Patient 3, with a completely female phenotype, presented a Gly743→Glu mutation in exon 5. Interestingly, a different molecular lesion affecting this codon has been reported in prostatic cancer (Gottlieb et al. 1999). The mutated receptor of our patient showed a positive binding activity in cytosolic preparations; however, no specific binding at the nuclear level could be detected, which suggests that this particular substitution might be altering AR nuclear transport. In this regard, molecular studies using AR mutants, constructed by PCR mutagenesis, have shown that the 48 amino acids of exon 5 in the SBD play a major role not only in binding specificity, but also in inhibiting target signal activity in the absence of androgen binding (Zhou et al. 1994b). It is noteworthy that patient 3 as well as patient 6, both with CAIS, presented remnants of Müllerian derivatives (Ulloa-Aguirre et al. 1986, 1990).

Sequence analysis in patient 4 showed a single mutation in position +5 of the 5' splicing region. The g→c nucleotide replacement abolishes normal splicing at the exon 6/intron 6 boundary and is associated with a CAIS phenotype with total absence of androgen binding. This change was not found in the maternal DNA, which is consistent with a de novo mutation. By studying AIS families with only one affected member, Hiort et al. (1998) found a high rate of de novo mutations (about 27%) in the AR gene. Likewise, in a recent study, a different g→t transversion in the splice donor site of intron 6 was detected in a French child with AIS (Sammarco et al. 2000). Unlike the receptor in our patient, the mutated receptor from this patient exhibited reduced binding capacity (B_{max}), thus indicating that the replacement of guanine with cytosine at this position (+5) is deleterious for receptor functioning. Most splice-junction mutations identified to date are associated with a CAIS phenotype (Gottlieb et al. 1999).

In patient 5, who presented complete AIS, we found a hitherto unreported T→G transversion in exon 7. The conservative replacement of phenylalanine with valine at amino acid 827, which is a well-conserved site, seems to cause an important alteration, as it lies within a segment considered critical for AR activity (Zhou et al. 1994a,b; Thornton and Kelley 1998).

The sixth mutation was detected in an individual with CAIS (Quigley's grade 7), having an A→G transition at nucleotide 2980 in exon 8; this change has never been detected in AIS. Nevertheless, the mutation is located in the same codon as a mutation previously reported in prostatic cancer, although with a different amino acid substitution. Functional studies show that this change (at nucleotide 2981) alters the hormone specificity in such a way that mutant receptors could also be activated by estrogens, progesterone, and hydroxyflutamide (Taplin et al. 1995; Tan et al. 1996). That the mutation H874R impairs ligand specificity appears unlikely since it is associated with a total lack of binding activity (Table 1).

Finally, two mutations in exon 8 that do not affect AR binding were observed in subjects with PAIS. Both mutations lie within or nearby the activation function-2 (AF-2) core domain, a region involved in the interaction with the coactivator TIF2 (Slagsvold et al. 2000). A G→T

replacement in the first nucleotide (2997) of codon 879 was detected in two siblings who were raised as males and exhibited a similar phenotype. As observed in patient 7, most males with gynecomastia resulting from PAIS have molecular lesions in the SBD (Giwerzman et al. 2000). Likewise, adjacent residues (i.e., 877 and 880) are predicted to be in contact with the ligand (Thornton and Kelley 1998).

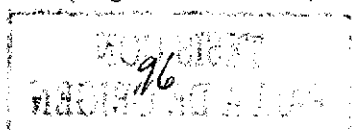
The last mutation identified was a C→T transition at nucleotide 3026, found in a 3-year-old child who presented with perineal hypospadias as the main stigma. Although this silent mutation affected a highly conserved residue (Ser888), there was no amino acid replacement. However, it is well recognized that changes in synonym codons might influence transcription, processing, or translation (Beaudet et al. 1995). Patient 8 had the AGC→AGT mutation in exon 8. Such a change has not been described previously; therefore we cannot exclude the possibility of a polymorphism. However, molecular screening of exon 8 performed on more than 130 chromosomes of karyotypic males suggests strongly that the change found at codon 888 represents a mutation with phenotypic expression and not a genetic polymorphism. In support of this view, molecular evidence indicates that mutagenesis of residue 888 does not influence androgen binding or LBD homodimerization, but decreases the interaction with the coactivator TIF2 and with the NH₂-terminal domain (Berrevoets et al. 1998). Furthermore, recent molecular studies suggest the existence of a functional element centered around this residue (Met886), which could have a role, not in ligand binding, but in interdomain and coactivator interactions (Ghadessy et al. 1999). More than 12 different silent mutations in the AR have been reported that result in partial or complete AIS and even in prostatic cancer: the mutations R210R, E211E, V511V, and L838L are among the AR alterations that may impair the normal phenotypic development in males (Gottlieb et al. 1999).

In summary, we identified eight new missense mutations in the AR gene of Mexican patients clinically diagnosed with AIS. Our data support the view that these disorders result in a nonfunctional or subfunctional protein, causing masculinization defects of varying degrees. The results also underline the importance of the existence of an entire SBD for proper AR functional activity.

Acknowledgments This work was supported by CONACYT (México), Grant 0010P-M.

References

- Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, Hawkins JR, Martin H, Rowland J, Shimura N, Tait AD, Hughes IA (2000) Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85:658-665
- Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D (1995) Genetics, biochemistry and molecular basis of variant human phenotypes. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 53-113



- Berrevoets CA, Doesburg P, Steketeer K, Trapman J, Brinkmann AO (1988) Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor 2). *Mol Endocrinol* 12:1172-1183
- Chang C, Kokontis J, Liao S (1988) Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* 240:324-326
- DeBellis A, Quigley CA, Cariello NF, El-Awady MK, Sar M, Lane ML, Wilson EM, French FS (1992) Single base mutations in the human androgen receptor gene causing complete androgen insensitivity: rapid detection by a modified denaturing gradient gel electrophoresis technique. *Mol Endocrinol* 6:1909-1920
- French FS, Lubahn DB, Brown TR, Simental AJ, Quigley CA, Yarbrough WG, Tan J, Sar M, Joseph DR, Evans BAJ, Hughes IA, Migeon CJ, Wilson EM (1990) Molecular basis of androgen insensitivity. *Recent Prog Horm Res* 46:1-42
- Ghadessy FJ, Lim J, Abdullah AAR, Paner-Raymond V, Choo CK, Lumbroso R, Tut TG, Gottlieb B, Pinsky L, Trifiro MA, Yong L (1999) Oligospermic infertility associated with an androgen receptor mutation that disrupts interdomain and coactivator (TIF2) interactions. *J Clin Invest* 103:1517-1525
- Giwerzman A, Kledal T, Schwartz M, Giwerzman YL, Leffers H, Zazzi H, Wedell A, Skakkebaek NE (2000) Preserved male fertility despite decreased androgen sensitivity caused by a mutation in the ligand-binding domain of the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2253-2259
- Gottlieb B, Beitel LK, Lumbroso R, Pinsky L, Trifiro M (1999) Update of the androgen receptor gene mutations database. *Hum Mutat* 14:103-114
- Hiort O, Sinneker GHS, Holterhus P-M, Nitsche EM, Kruse K (1998) Inherited and de novo androgen receptor gene mutations: investigation of single-case families. *J Pediatr* 131:939-943
- John SWM, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR (1991) A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res* 19:408
- López-Otín C, Diamandis EP (1998) Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological, genetic, and biochemical features. *Endocr Rev* 19:365-396
- Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM (1988) Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240:327-330
- Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, Higgs HN, Migeon CJ, Wilson EM, French FS (1989) Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9534-9538
- McPhaul MJ, Marcelli M, Zoppi S, Griffin JE, Wilson JD (1993) Genetic basis of endocrine disease: 4. The spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 76:17-23
- Medina M, Chávez B, Pérez-Palacios G (1981) Defective androgen action at the cellular level in the androgen resistance syndromes: I. Differences between the complete and incomplete testicular feminization syndromes. *J Clin Endocrinol Metab* 53:1243-1246
- Orita M, Suzuki Y, Hayashi K (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879
- Quigley C, DeBellis A, Marschke KB, El-Awady MK, Wilson EM, French FS (1995) Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16:271-321
- Sammarco I, Grimaldi P, Rossi P, Cappa M, Moretti C, Frajese G, Geremia R (2000) Novel point mutation in the splice donor site of exon-intron junction 6 of the androgen receptor gene in a patient with partial androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3256-3261
- Sawai H, Komori S, Sakata K, Nakae K, Shima H, Matsumoto F, Matsumoto H, Onishi Y, Okada Y, Yoshida O, Koyama K (2000) Molecular analysis of familial androgen insensitivity syndrome due to replacement of glutamic acid 802 by lysine. *J Hum Genet* 45:342-345
- Simental JA, Sar M, Lane ML, French FS, Wilson EM (1991) Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 266:510-518
- Slagsvold T, Kraus I, Bentzen T, Palvimo J, Saatcioglu F (2000) Mutational analysis of the androgen receptor AF-2 (activation function 2) core domain reveals functional and mechanistic differences of conserved residues compared with other nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 14:1603-1617
- Tan J-A, Sharief Y, Hamil KG, Gregory CW, Zang D-Y, Sar M, Mohler JL, French FS (1996) Altered ligand specificity of a mutant androgen receptor (AR) in the androgen dependent human prostate cancer xenograft, CWR-22: comparison with the LNCaP mutant AR. *Proc Am Urol Assoc* 155 Suppl 340A (120)
- Taplin M-E, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, Balk P (1995) Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 332:1393-1398
- Thornton JW, Kelley DB (1998) Evolution of the androgen receptor: structure-function implications. *Bioessays* 20:860-869
- Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Angeles A, Fernández del Castillo C, Chávez B, Pérez Palacios G (1986) The presence of Müllerian remnants in the complete androgen insensitivity syndrome: a steroid hormone-mediated defect? *Fertil Steril* 45:302-305
- Ulloa-Aguirre A, Chávez B, Méndez JP, Saavedra D, Pérez-Palacios G (1988) Inherited impairment of nuclear uptake as a cause of familial androgen insensitivity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 28:317-329
- Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Chávez B, Carranza-Lira S, Angeles A, Pérez Palacios G (1990) Incomplete regression of Müllerian ducts in the androgen insensitivity syndrome. *Fertil Steril* 53:1024-1028
- Vilchis F, Méndez JP, Canto P, Lieberman E, Chávez B (2000) Identification of missense mutations in the SRD5A2 gene from patients with steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Clin Endocrinol* 52:383-387
- Wong C-I, Zhou Z-X, Sar M, Wilson EM (1993) Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. *J Biol Chem* 268:19004-19012
- Zhou Z-X, Wong C-I, Sar M, Wilson EM (1994a) The androgen receptor: an overview. *Recent Prog Horm Res* 49:249-274
- Zhou Z-X, Sar M, Simental JA, Lane MV, Wilson EM (1994b) A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. *J Biol Chem* 269:13115-13123