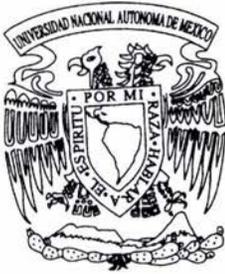


00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“EXPRESION Y REGULACION DE LA FERROQUELATASA EN EL HAMSTER SIRIO (*Mesocricetus auratus*)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:
LUIS RAMOS TAVERA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. FELIPE DE JESUS VILCHIS URIBE

MEXICO, D. F.



NOVIEMBRE, 2004



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

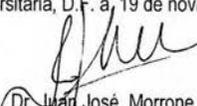
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de octubre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Ramos Tavera Luis**, con número de cuenta **91338624** con la tesis titulada: **"Expresión y Regulación de la Ferroquelatasa de Hamster"**, bajo la dirección del(a) **Dr. Felipe de Jesús Vilchis Uribe**.

Presidente:	Dr. Julio Granados Arriola
Vocal:	Dra. Bertha Alicia Chávez Cano
Secretario:	Dr. Felipe de Jesús Vilchis Uribe
Suplente:	Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta
Suplente:	Dra. María del Carmen Méndez Herrera

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 19 de noviembre del 2004


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTOS

El trabajo experimental del presente estudio se llevo a cabo en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Mi agradecimiento a los revisores de la tesis:

Dr. Felipe de Jesús Vilchis Uribe.

Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta.

Dr. Julio Granados Arriola.

Dra. Bertha Alicia Chávez Cano.

Dra. María del Carmen Méndez Herrera.

El presente trabajo fue apoyado a través de la Beca-Crédito (Reg. 167215) otorgada al sustentante por el CONACYT. Este proyecto fue financiado parcialmente por el CONACYT (No. 44975).

ÍNDICE

SUMMARY

I. RESUMEN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2-13
Glándula de Harder.....	2-5
Porfirinas.....	5-8
Biosíntesis de Porfirinas.....	9-10
Ferroquelatasa (Protohemo-ferroliasa, E.C. 4.99.1.1).....	10-12
Mecanismo de Acción de los Andrógenos.....	12-13
III. JUSTIFICACIÓN.....	14
IV. HIPÓTESIS.....	15
V. OBJETIVO.....	16
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17-28
Animales y tejidos.....	17
Obtención de RNA.....	17
Análisis por transferencia Northern (Northern blot).....	17-18
Marcaje e hibridación de ácidos nucleicos.....	18
Preparación de cDNA.....	19
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19-21
Purificación de los productos PCR.....	21
Análisis por transferencia Southern (Southern blot).....	22
Amplificación de los extremos 5' y 3' mediante RACE.....	22-25
Secuenciación.....	25
Clonación del DNA complementario de Ferroquelatasa.....	25-27
Purificación del plásmido.....	27-28
VII. RESULTADOS.....	29-41
VIII. DISCUSIÓN.....	42-47
IX. REFERENCIAS.....	48-58

SUMMARY

Ferrochelatase catalyzes the insertion of ferrous iron into protoporphyrin IX to form heme which serves as the prosthetic group of numerous hemoproteins. The Harderian gland of Syrian hamster is known by its ability to produce and accumulate large amount of protoporphyrins. In this species, the female gland contains up to 120 times more porphyrin than the male gland. Data from biochemical studies have suggested that the gland possesses the enzymatic complex to synthesize heme but that it lacks of ferrochelatase activity, however the abundance of intraglandular hemoproteins disagree with such proposal. To gain more insight into this process we isolated a cDNA for Ferrochelatase from hamster liver using the 5', 3'-RACE system and investigated its expression in Harderian glands from males and from females throughout the estrous cycle. The full-length cDNA comprises an open reading frame of 1266 bp encoding a polypeptide of 422 amino acid residues. Hamster DNA sequence exhibits a 92% identity to mouse enzyme and a 93% identity to rat enzyme. By sequence comparisons, the hamster enzyme showed to have structural features of mammalian ferrochelatase, including a central core of about 330 amino acid residues, a putative NH₂-terminal presequence and the [2Fe-2S] cluster. RNA blotting experiments indicated that this cDNA hybridized to a liver mRNA of about 2.1 kb while a weak hybridization signal was observed with glandular preparations. Further RT-PCR assays confirmed the expression of specific transcripts in both tissues. Male glands contained approximately two-fold more enzyme mRNA than the female glands. Likewise, the intraglandular content of mRNA showed marked differences along the estrous cycle with the highest levels found at proestrus. These cyclic variations were less evident in liver. Based on expression levels, we conclude that the Harderian ferrochelatase may play an active role by maintaining the physiological pool of heme required for processing of cytochromes and other glandular hemoproteins. Likewise, the sex-steroid hormones appear to achieve a modest influence on ferrochelatase and heme output in the Harderian gland of hamster.

RESUMEN

La glándula de Harder del hámster Sirio (*Mesocricetus auratus*) es conocida por su capacidad para producir y almacenar grandes cantidades de protoporfirinas. En esta especie, la glándula femenina contiene hasta 120 veces más porfirinas que la glándula masculina y se ha observado que la concentración de pigmentos intraglandulares varían en respuesta a cambios hormonales dependientes de andrógenos. Datos a partir de estudios bioquímicos, han sugerido que la glándula posee el complejo enzimático para sintetizar hemo, pero no ha sido posible demostrar la actividad de la ferroquelatasa, enzima que cataliza la inserción del Fe^{2+} en la protoporfirina IX para formar hemo, el cual sirve como grupo prostético de numerosas hemoproteínas.

Para determinar si la glándula Harderiana tiene la capacidad de exhibir actividad enzimática de la ferroquelatasa, se aisló y clonó el cDNA para la ferroquelatasa a partir del hígado de hámster, usando el sistema 5',3'-RACE y se investigó su expresión en la glándula Harderiana de machos y de hembras durante el ciclo estral mediante análisis de Northern blot y RT-PCR/Southern blot.

Los datos obtenidos indicaron que la longitud total del cDNA de la ferroquelatasa de hámster comprende un marco de lectura abierto de 1266 pb que codifica para un polipéptido de 422 residuos de amino ácidos. La señal de poliadenilación AATAAA fue localizada a 817 bases corriente abajo del codón de terminación TGA en la región 3'. La secuencia de DNA exhibe un 92% de identidad con la enzima del ratón y un 93% de identidad con la enzima de la rata. Mediante la comparación de la secuencia deducida de amino ácidos, la enzima del hámster mostró tener características estructurales similares a la ferroquelatasa de otros mamíferos, incluyendo una presecuencia NH₂-terminal, una región central de 330 residuos y un grupo Hierro-Azufre [2Fe-2S] ubicado en la porción COOH-terminal. Así mismo, la secuencia deducida de amino ácidos de la ferroquelatasa del hámster indicó la presencia de un dominio estructural putativo de 4 cisteínas coordinadas (NH₂-Cys-X206-Cys-X2-Cys-X4-Cys-COOH), asociadas al grupo [2Fe-2S].

Con el uso de una sonda específica y utilizando el método de Northern blot, se demostró la presencia de un transcrito de aproximadamente 2.1 kb cuya expresión se detectó de manera clara en hígado y más débilmente en glándula Harderiana. Experimentos adicionales de RT-PCR/Southern blot confirmaron la expresión de un transcrito específico en ambos tejidos; así mismo se observaron patrones de expresión similares en otros tejidos como pulmón y glándula suprarrenal. Se encontró que la glándula Harderiana de macho contiene aproximadamente el doble de transcrito específico que la de hembra, y que en ésta, existen marcadas variaciones durante el ciclo estral. Tales diferencias cíclicas fueron menos evidentes en preparaciones de hígado. En base a los niveles de expresión del RNAm, se puede concluir que la ferroquelatasa Harderiana juega un papel activo para mantener la poza fisiológica de hemo requerido para el procesamiento de los citocromos y otras hemoproteínas glandulares.

ANTECEDENTES

Glándula de Harder

La glándula de Harder o Harderiana fue descrita originalmente por Johann Jacob Harder en 1694 (Harder, 1694), quien la observó en el venado y la reportó como "*glandula nova lachrymalis*". Se trata de una estructura tubulo-alveolar rodeada por una cápsula de tejido conectivo, localizada en la órbita ocular de vertebrados terrestres que poseen membrana nictitante (Fig 1). Se acepta que evolucionó conjuntamente con la glándula lagrimal (Kennedy, 1970), por lo que estas glándulas presentan un origen común a partir del ectodermo embrionario (Wight & cols., 1971). Se ha propuesto a esta glándula como una parte integral de un eje conformado por la retina-pineal-glándula Harderiana-gónada (Wetterberg & cols., 1970; Reiter & Klein, 1971).

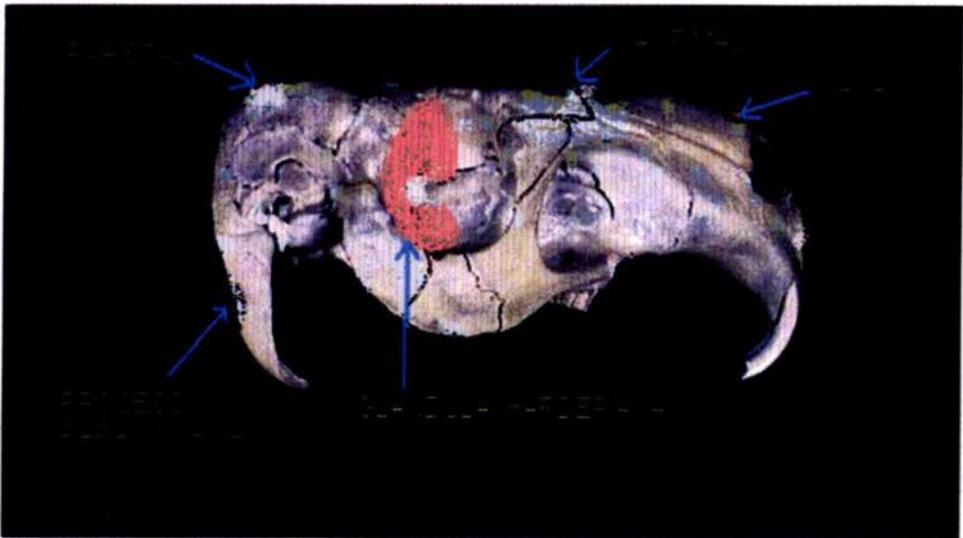


Fig 1. Localización esquemática de la glándula Harderiana en la órbita ocular del hámster.

No obstante su amplia distribución en vertebrados, esta glándula está ausente en quiropteros, bovidos, perosidactilos, carnívoros terrestres y primates (en el mono es una estructura rudimentaria y en el humano es una estructura vestigial en etapas tempranas del desarrollo embrionario) (Kennedy, 1970). En mamíferos, la glándula Harderiana está poco desarrollada mientras que en anfibios, reptiles y aves esta glándula es muy prominente.

En la glándula Harderiana se han caracterizado diversos tipos celulares como: células secretoras, células mioepiteliales, mastocitos (Payne & cols., 1982), macrófagos, melanocitos (Shirama & cols., 1988) y linfocitos (Burns & Maxwell, 1979). Presenta una gran cantidad de inervaciones colinérgicas (Norvell & Clabough, 1972; Huhtala & cols., 1977), adrenérgicas (Bucana & Nadakavukaren, 1972; Sakai & Yohro, 1981) y peptidérgicas (Webb & cols., 1992) y se ha informado que la anatomía y la fisiología de la glándula está regulada por la glándula pineal (Clabough & Norvell, 1973), los esteroides gonadales (Hoffman, 1971; Payne & cols., 1977; Vilchis & cols., 1992), las hormonas hipofisarias (Marr & cols., 1995) y por el fotoperíodo (Payne, 1994).

Las funciones de la glándula Harderiana son las de lubricar y humedecer la cornea y la nasofaringe, de ser una estructura productora de feromonas (Ebling & cols., 1975; Payne, 1977), de ser estructura fotosensible (Wetteberg & cols., 1970), de ser una fuente extrapineal de melatonina (Kvetnoy, 1999), de ser un sitio de osmoregulación (Chieffi & cols., 1992) y un sitio de respuesta inmune (Wight & cols., 1971; Burns, 1992).

En general las secreciones de la glándula son seromucoides en reptiles, mucoides en aves y lipoides en mamíferos. Sin embargo, en roedores se han caracterizado principalmente tres productos de secreción: lípidos, índoles y porfirinas (Johnston & cols., 1987; Payne, 1994) y se ha observado que la composición de lípidos en la glándula Harderiana del hámster Sirio presenta un dimorfismo sexual (Lin & Nadakavukaren, 1981).

En el hámster Sirio la glándula Harderiana presenta un marcado dimorfismo sexual caracterizado por: la presencia de 2 tipos celulares epiteliales en el macho (denominados tipo I y tipo II) y un solo tipo celular en la hembra (denominado tipo I), el tipo celular epitelial I está caracterizado por presentar pequeñas vacuolas secretoras de lípidos y el tipo celular II presenta grandes vacuolas secretoras de lípidos; la glándula Harderiana del macho presenta un complejo politubular derivado del retículo endoplásmico liso mientras que en la hembra este complejo politubular está ausente; los cuerpos

lamelares derivados del retículo endoplásmico rugoso están presentes en la hembra y ausentes en el macho; la glándula del hámster dorado hembra presenta 40 veces más mastocitos que la glándula de macho; (Payne & cols., 1982; 1992); así mismo, la concentración de sodio, manganeso y calcio es menor en el macho que en la hembra, mientras que el hierro y molibdeno se encuentra más elevado en el macho (Hoffman & Jones, 1981); la presencia de una hemoproteína de 156 kDa en el macho y su ausencia en la hembra (Vilchis & cols., 1996); la actividad enzimática de la 5 α -reductasa se encuentra más elevada en la hembra que en el macho (Vilchis & cols., 1994); la actividad enzimática para la formación de melatonina se encuentra más elevada en la hembra que en el macho (Menéndez-Pelaez & Buzzell, 1992) y por último los niveles de porfirinas y la actividad de las enzimas porfirinogénicas son más elevadas en la hembra que en el macho (Hoffman, 1971; Thompson & cols., 1984; Rodríguez & cols., 1993). En general, existe una tendencia en la glándula Harderiana de algunos roedores caracterizada por la presencia de altas concentraciones de porfirinas en las hembras y bajas concentraciones de porfirinas en los machos (Shirama & cols., 1981; Johnston & cols., 1983; 1985; Thompson & cols., 1984).

Se ha observado que este dimorfismo sexual, se modifica con la castración de los machos y con la administración de testosterona a las hembras, adicionalmente diversos reportes han demostrado la localización del receptor de andrógenos en la glándula Harderiana del hámster de ambos sexos, además de esto se ha demostrado la localización del receptor de andrógenos en especies como: la rata, el ratón, el pollo, el pato y lagartijas, por tales motivos es consistente afirmar la dependencia de la testosterona sobre la morfología y fisiología de este tejido (Hoffman, 1971; Vilchis & cols., 1987; Vilchis & Perez-Palacios 1989; Vilchis & cols., 1991).

Se ha observado, que en la glándula Harderiana del hámster macho castrado, los niveles de porfirinas son similares a los de las hembras, y que la administración de andrógenos (como testosterona, 5 α -dihidrotestosterona y Δ^4 -androstendiona) restablece los niveles normales de porfirinas (Payne & cols., 1975). Mientras que en el hámster hembra, la ovariectomía no genera masculinización de la glándula Harderiana (Hoffman, 1971; Spike & cols., 1985) y sus efectos son menos dramáticos sobre la actividad y estructura de la glándula (Spike & cols., 1986). Pero cuando se les administra testosterona, la glándula Harderiana adquiere características de la glándula masculina y reduce los niveles de porfirinas hasta en un 80% (Sun & Nadakavukaren, 1980; Spike & cols., 1985).

Las porfirinas son el mayor producto de secreción en la glándula Harderiana de algunos roedores, como el hámster, el gerbo, el ratón y la rata; por lo que esta glándula posee todas las enzimas necesarias para la formación de porfirinas *de novo* (Tomio & Grinstein, 1968; Tomio & cols., 1968), y se sugiere, que la glándula funciona como una estructura almacenadora de porfirinas, las cuales entran a la circulación a través de vasos sanguíneos intersticiales o linfáticos (Olcese & Wesche, 1989). Algunos trabajos han demostrado, que la protoporfirina IX, es la porfirina predominante (aproximadamente en un 95%) en la glándula Harderiana de la rata (Kennedy, 1970), del ratón (Johnston & cols., 1985) y del hámster (Spike & cols., 1990). Diversas investigaciones, han demostrado la existencia de diferencias sexuales en la actividad de varias enzimas, involucradas en la biosíntesis de porfirinas en la glándula Harderiana del hámster (Thompson & cols., 1984; Lin & Nadakavukaren, 1982; Olcese & Wesche, 1989), y no obstante que existe evidencia de la expresión de varias hemoproteínas en la glándula Harderiana (Vilchis & cols., 1996; 2002), hasta ahora, no se ha podido demostrar la incorporación del Fe^{2+} a la protoporfirina IX en este tejido, por lo que se sugiere, que existe un mecanismo regulador sobre la biosíntesis de porfirinas en la glándula Harderiana, que permita una sobreproducción de protoporfirinas.

Porfirinas

Hacia finales del siglo XIX, se describió por primera vez en la glándula Harderiana del ratón, un pigmento que estaba presente en grandes cantidades. En 1924 se notificó, que este pigmento Harderiano presentaba una fluorescencia rojiza a la luz ultra violeta, la cual era debida a las altas concentraciones de porfirinas, y que este pigmento únicamente se encontraba en roedores (Kennedy, 1970); ahora se sabe, que las porfirinas y metaloporfirinas, constituyen una importante ruta metabólica en la síntesis de hemoproteínas (hemoglobina, mioglobina, peroxidasa, catalasa, hidroxilasa y citocromos). Su función biológica principal, es el transporte de oxígeno y de electrones, además de actuar como moléculas fototransductoras y fotoprotectoras (Payne, 1994). El núcleo básico de las porfirinas y porfirinogenos (compuestos completamente reducidos), esta formado de cuatro anillos designados A, B, C y D, unidos por 4 puentes metileno designados α , β , γ y δ (núcleo tetrapirrólico), dando lugar a una estructura plana y rígida (Fig 2) (Moore, 1980).

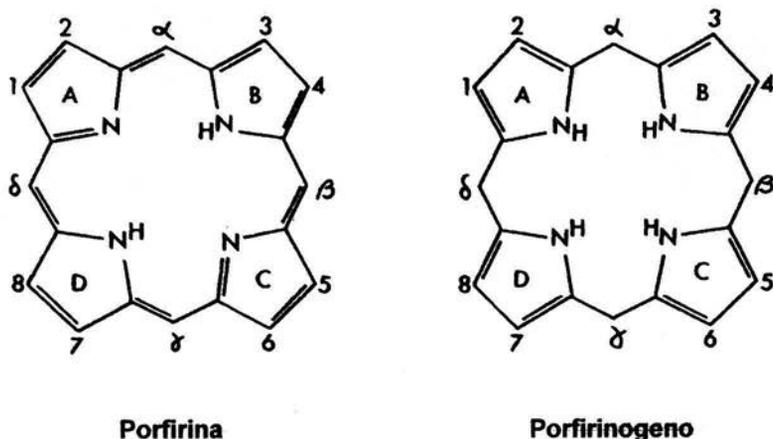


Fig 2. Estructura del núcleo básico de las porfirinas y porfirinogenos. Los números indican las ocho posiciones disponibles para las cadenas laterales. Los cuatro anillos están designados con las letras A, B, C y D. Los puentes metileno están designados con los símbolos α , β , γ y δ .

Las porfirinas, son clasificadas en base a los sustituyentes que forman las cadenas laterales (por ejemplo, etioporfirinas, uroporfirinas, coproporfirinas, protoporfirinas, mesoporfirinas, hematoporfirinas y deuteroporfirinas), de esta gran variedad de porfirinas, las protoporfirinas son las más abundantes, y sus sustituyentes están formados por cuatro grupos metilo, dos grupos vinilo y dos grupos de ácido propiónico. De los quince posibles isómeros de la protoporfirina, únicamente la protoporfirina IX presenta un significado fisiológico (Fig 3), y se encuentra presente en la hemoglobina, mioglobina, cobalaminas, precursores de la vitamina B12, y en la mayoría de los citocromos mitocondriales y microsomales; no obstante, una gran diversidad de isómeros de la protoporfirina IX, pueden funcionar como sustrato, con sustituciones en las posiciones 2 y 4 de los anillos A y B (Taketani & Tokunaga, 1981). La diferencia fundamental entre los quince isómeros de la protoporfirina, esta basada en la sustitución de los grupos metilo, vinilo y ácido propiónico.

De todas las porfirinas conocidas, únicamente 5 son de importancia en la fisiología y patofisiología humana: 2 isómeros de uroporfirinas (I y III), 2 isómeros de coproporfirinas (I y III) y un isómero de protoporfirina (IX) (Dailey, 2001; Moore, 1993).

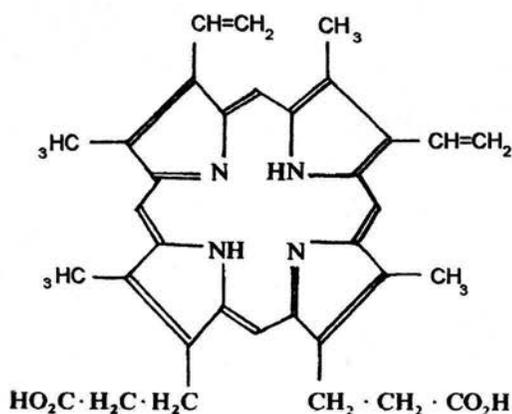


Fig 3. Estructura de la protoporfirina IX. La figura muestra la composición de las cadenas laterales.

Los anillos tetrapirrólicos, como el uroporfirinógeno I y el coproporfirinógeno I, son menos utilizados en la biosíntesis de hemo, mientras que los anillos tetrapirrólicos como el uroporfirinógeno III y el coproporfirinógeno III son biológicamente funcionales (Fig 4). La diferencia fundamental entre los isómeros del tipo I y III está basada en la estructura del anillo D. En los isómeros del tipo I las posiciones 7 y 8 contienen acetato y propionato, respectivamente, mientras que en los isómeros del tipo III las posiciones 7 y 8 contienen propionato y acetato, respectivamente. En la protoporfirina IX, la posición 7 está compuesta por propionato y la posición 8 está compuesta por un grupo metilo formado a partir de la descarboxilación del grupo acetato (Milgrom, 1997). Las protoporfirinas forman compuestos activos al unirse a iones hierro (Fe), zinc (Zn), magnesio (Mg) y cobalto (Co), los cuales se mantienen unidos a la molécula de protoporfirina por cuatro enlaces coordinados (Kappas & Sassa, 1995).

Biosíntesis de Porfirinas

La biosíntesis del hemo, es esencial para unirse como grupo prostético a una proteína y de esta manera formar hemoglobina, mioglobina, citocromos mitocondriales y microsomales, catalasas, peroxidasas y triptofano pirrolasa; las cuales funcionan como transportadoras de oxígeno y electrones, en el metabolismo oxidativo de varios compuestos químicos endógenos y exógenos, en la descomposición de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos y en la oxidación del triptofano (Bottomley & Muller-Eberhard, 1988).

Aproximadamente un 85% de hemo, es sintetizado en eritroblastos y reticulocitos de médula ósea, y el restante es sintetizado en células hepáticas. La actividad bioenzimática para la formación de hemo en mamíferos es más elevada en la eritropoyesis y en la funcionalidad hepática, donde las necesidades de hemo son altas debido a la síntesis de hemoglobina y citocromos P-450, respectivamente (Bloomer, 1998; Magness & cols., 2000). Además, se ha descrito la formación y acumulación de protoporfirinas en la glándula Harderiana de algunos vertebrados terrestres (Payne, 1994).

La regulación en la biosíntesis de hemo, se lleva a cabo por dos isozimas denominadas ALA sintetasa 1 (ALA-S1) y ALA sintetasa 2 (ALA-S2). En células hepáticas, la formación de hemo esta regulada por la actividad de la isozima ALA-S1, a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (Sassa, 1988), mientras que en células eritroides, la adquisición de hierro es una etapa limitante en la síntesis de hemo (Ponka, 1997; Haile, 1999; Ponka, 1999). La degradación de hemo se lleva a cabo por dos enzimas, hemo oxigenasa (EC 1.14.99.3) y biliverdina reductasa (EC 1.3.24), para así formar biliverdina presente como producto de excreción en anfibios, reptiles y aves, y para formar bilirubina presente únicamente en mamíferos (Schacter, 1988; Shibahara, 1988). En el hígado, la biosíntesis de hemo es necesaria para su incorporación a los citocromos P450 microsomales y mitocondriales que desempeñan una importante función en la biotransformación de hormonas esteroides, vitaminas, ácidos biliares, ácidos grasos y prostaglandinas (Piper, 1988; Kappas & Sassa, 1995).

La biosíntesis de hemo (Ferroprotoporfirina IX) (Fig 4) y porfirinas a partir de succinil Coenzima A y glicina, involucra la presencia de ocho enzimas esenciales para su conversión [δ -aminolevulinato (ALA) sintetasa (EC 2.3.1.3.7); ALA deshidratasa (EC 4.2.1.24); Porfobilinogeno desaminasa (EC 4.3.1.8); Uroporfirinogeno III cosintetasa (EC 4.2.1.75); Uroporfirinogeno descarboxilasa (EC 4.1.1.37); Coproporfirinogeno oxidasa (EC 1.3.3.3); Protoporfirinogeno oxidasa (EC 1.3.3.4);

Ferroquelatasa (EC 4.99.1.1)] (Deybach & Puy, 1995; Elder & Roberts, 1995; Ferreira & Gong, 1995; Grandchamp & cols., 1995; Jaffe, 1995; Shoolingin-Jordan, 1995). Diversos reportes, han confirmado que la glándula Harderiana presenta diferencias sexuales en 6 de las 8 enzimas necesarias para la biosíntesis de hemo (ALA-S, PBG-D, URO-C, URO-D, COPRO-D y PROTO-O), y se ha observado que la actividad porfirinogénica para cada una de estas enzimas es más elevada en la hembra que en el macho (Thompson & cols., 1984; Spike & cols., 1992).

En eucariontes cuatro enzimas están asociadas a la mitocondria y cuatro enzimas están asociadas al citosol (Fig 4) (Ferreira, 1995). En el humano, con la excepción de la enzima ALA sintetasa, todas las enzimas involucradas en la biosíntesis de hemo pueden presentar alteraciones metabólicas comúnmente denominadas como porfirias (Grandchamp & Nordmann, 1988).

Ferroquelatasa (Protohemo-ferroliasa, E.C. 4.99.1.1)

La etapa final en la biosíntesis de hemo es la inserción de Fe^{2+} en la protoporfirina IX, esta reacción libera dos protones y es catalizada por la ferroquelatasa (FQ) (Fig 4), una enzima mitocondrial perteneciente a la familia de las metaloenzimas, que se encuentra presente en procariontes y eucariontes, con la excepción de algunos patógenos obligados y algunos procariontes (Jones & Jones, 1968; Ferreira & cols., 1994; Ponka & cols., 2001). Así mismo, esta enzima además de utilizar Fe^{2+} como sustrato, también utiliza metales divalentes como el Co^{2+} y el Zn^{2+} , pero no metales monovalentes o trivalentes, y su actividad es inhibida por algunos metales divalentes como el Pb^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} y Hg^{2+} (Camadro & cols., 1984; Taketani & Tokunaga, 1981). La FQ de mamíferos es altamente selectiva y utiliza únicamente isómeros IX de las porfirinas (protoporfirina, hematoporfirina, mesoporfirina y deuteroporfirina) como sustrato (Dailey & cols., 1989). La FQ de eucariontes es codificada en el núcleo, sintetizada en los ribosomas citoplasmáticos con un peso molecular de 47 kDa y después es importada a la matriz mitocondrial (Schatz, 1996), donde es procesada proteolíticamente a una especie madura con un peso molecular de 42 kDa (Camadro & Labbe, 1988; Dailey & cols., 1989; Karr & Dailey, 1988; Prasad & Dailey, 1995), que puede actuar en forma homodimérica o monomérica (Ferreira & cols., 1995). En plantas aparentemente se sintetizan dos FQs, una con dirección a la mitocondria y otra hacia los cloroplastos (Dailey & cols., 2000).

Con excepción de la FQ de *B. subtilis*, esta enzima se encuentra asociada a la membrana plasmática de procariontes, y se localiza en la membrana mitocondrial interna de eucariontes, con su sitio activo hacia

la matriz mitocondrial (Ferreira, 1999). La actividad de la FQ, es estimulada por la incorporación de ácidos grasos (Taketani & Tokunaga, 1981; Mathews-Roth & cols., 1987). La FQ ha sido purificada a partir de organismos procariontes y eucariontes y se ha demostrado que a excepción de la FQ de *R. spheroides* (115 kDa) todas las FQs de eucariontes y dos de procariontes (*B. subtilis* y *E. coli*) presentan masas moleculares similares de entre 35 y 42 kDa (Taketani & Tokunaga, 1981; Dailey, 1982; Dailey & Fleming, 1983; Mathews-Roth & cols., 1987; Camadro & Labbe, 1988; Hansson & Hederstedt, 1994).

El gen de la FQ de diversas especies de arqueobacterias, eubacterias y eucariontes ha sido aislado y secuenciado (Nakahashi & cols., 1990; Brenner & Frasier, 1991; Smith & cols., 1994; Day & cols., 1998; Dailey & cols., 2000; Ruepp & cols., 2000). Se ha demostrado que el promotor del gen de la FQ humana carece de las cajas CAAT/TATA (-75, -30), pero potencialmente contiene elementos reguladores como la caja GC (-90), que es un sitio de reconocimiento para el factor de transcripción Sp1 para su expresión en células no eritroides, además de contener sitios de unión para GATA1 y NF-E2, importantes para la inducción de la FQ durante la diferenciación eritroide (Tugores & cols., 1994; Taketani & Fujita, 1995). Adicionalmente, se ha descrito que en mamíferos la regulación de la FQ, esta basada en función a las concentraciones de Fe^{2+} intracelular, esto ocurre a través del grupo [2Fe-2S] ubicado en la región carboxilo terminal de la enzima (Taketani & cols., 2000).

Al realizar un análisis comparativo de la secuencia de las FQs, se observó la existencia de tres regiones distintas: En la región amino terminal, se localiza una secuencia topogénica de señalización, que esta presente en todos los eucariontes y la cual es eliminada dentro de la mitocondria. La segunda región, la constituye un centro de aproximadamente 330 residuos de amino ácidos, que esta presente en todas las FQs. La tercera región, es una secuencia de 30-50 amino ácidos en el extremo carboxilo terminal de algunas FQs (Dailey & Dailey, 2002). En mamíferos, la región carboxilo terminal contiene tres de las cuatro cisteínas ligadas al grupo [2Fe-2S] (C196, C403, C406 y C411) y la cuarta cisteína se encuentra ubicada en la región amino terminal (Dailey & cols., 1994; Ferreira & cols., 1994; Sellers & cols., 1998). A diferencia de la FQ de mamíferos, el grupo [2Fe-2S] no esta presente en levaduras y plantas (Ferreira & cols., 1995). Diversas investigaciones han demostrado, que este grupo [2Fe-2S] representa un posible sensor del óxido nítrico (Sellers & cols., 1996) y posteriormente se le asignó una posible dependencia para la actividad de la enzima (Medlock & Dailey, 2000); no obstante, se le ha adjudicado una importancia estructural como posible elemento regulador de hierro (Dailey & cols., 2000).

Recientemente, la resolución estructural a 2 Å de la FQ humana, ha propuesto a esta región como un motivo regulador en la homodimerización de la enzima (Wu & cols., 2001), esto tal vez explica el porque la FQ de algunas especies sin esta región son monoméricas, tal es el caso de la FQ de *Bacillus subtilis* (Hansson & Hederstedt, 1994).

La secuencia de amino ácidos de la FQ del ratón, contiene una histidina (H207) altamente conservada, esencial para la unión de iones hierro; una fenilalanina (F281), importante para interactuar con la protoporfirina y contiene ácido glutámico (E287), esencial para la función catalítica y la unión al sustrato (Ferreira, 1999; Franco & cols., 2000). En la rata se presenta un alto porcentaje de amino ácidos hidrofóbicos (48%) y un alto porcentaje de lisinas (11%) (Taketani & Tokunaga, 1981). En mamíferos, los residuos de arginina de la FQ son necesarios para la unión a la protoporfirina a través de la interacción de sus cargas (Dailey & Fleming, 1986).

Se ha observado que en humanos, el decremento en la actividad de la FQ (25-50% de lo normal), está asociado con la protoporfiria eritropoietica, una enfermedad que se hereda de manera autosómica dominante. Los individuos con este síndrome presentan acumulación masiva de protoporfirina en eritrocitos, plasma y heces. Clínicamente, presentan fotosensibilidad cutánea en la adolescencia, y en algunas ocasiones presentan disfunciones hepatobiliares (Rüfenacht & cols., 1998; Gouya & cols., 1999).

Mecanismo de acción de los andrógenos

Durante el desarrollo embrionario los andrógenos, testosterona y 5 α -dihidrotestosterona, contribuyen a la determinación y diferenciación del sistema reproductor, así como al desarrollo del fenotipo masculino (Wilson & cols., 1981). En el adulto los andrógenos permiten el desarrollo del dimorfismo sexual, desarrollo de caracteres sexuales secundarios y controlan la reproducción (Bardin & Catterall, 1981; Wilson, 1999).

Los andrógenos son sintetizados a partir del colesterol en los órganos esteroideogénicos, como la glándula suprarrenal (Keegan & Hammer, 2002) y principalmente en las células de Leydig del testículo (Haseltine & Ohno, 1981), en su biosíntesis intervienen tres miembros de la superfamilia de los citocromos P450 [CYP 11A1, CYP17 (17 α -hidroxilasa) y CYP17 (17,20-liasa)] (Chung & cols.,

1986; Chung & cols., 1987; Hanukoglu, 1992) y dos hidroxisteroide deshidrogenasas (3 β -HSD y 17 β -HSD) (Simpson & cols., 1991; Geissler & cols., 1994; Omura & Morohashi, 1995); la síntesis de los andrógenos en el testículo, es regulada mediante la hormona luteinizante (LH), que se une a su receptor transmembranal acoplado a proteínas G, para estimular la señalización celular por segundos mensajeros, como el adenosin monofosfato cíclico (AMPC) (Hughes, 2001). Además de esto, se ha informado que la esteroidogenesis es regulada por la proteína StAR (por sus siglas en inglés Steroidogenic Acute Regulatory Protein), la cual promueve el movimiento del colesterol de la membrana mitocondrial externa hacia la membrana mitocondrial interna (Arakane & cols., 1998; Christenson & Strauss, 2001). De esta manera los andrógenos biosintetizados son secretados a la circulación general, en donde se asocian a proteínas plasmáticas para ser transportados hacia los órganos blanco (Frairia & cols., 1994). El transporte se lleva a cabo por la globulina transportadora de hormonas esteroideas sexuales (SHBG) y por la albúmina.

Los andrógenos entran a la célula blanco por difusión pasiva en donde se unen intracelularmente al receptor de andrógenos (RA) (Kempainen & cols., 1992). La unión de los andrógenos al receptor, promueve un cambio conformacional de la proteína, de una forma inactiva (estado no transformado) a una forma activa (estado transformado), una fosforilación de los residuos de serina 16, 81, 94, 256, 308, 424 y 650 (Gioeli & cols., 2002) y la disociación de las proteínas de choque térmico HSP90, HSP70, HSP56/P59 las cuales mantienen inactivo al receptor en ausencia del ligando (Smith & Toft, 1993; Pratt & Toft, 1997).

El complejo andrógeno-receptor puede formar homodímeros a través de la interacción antiparalela entre el dominio amino y carboxilo terminal, esta interacción es necesaria para la formación estable del complejo RA a los elementos de respuesta para andrógenos (Wong & cols., 1993; Langley & cols., 1995; 1998) y de esta manera estimular la biogénesis de proteínas andrógeno-reguladas, las cuales inducen efectos sobre la diferenciación, el crecimiento y el metabolismo.

JUSTIFICACIÓN

Historicamente se ha considerado que la glándula Harderiana tiene la capacidad de biosintetizar protoporfirinas *de novo* y se ha observado que la histología y la concentración de porfirinas presentan diferencias sexuales. Así mismo, Hoffman (1971) mostró que los niveles de porfirinas intraglandulares varían en respuesta a la manipulación hormonal; además de esto, Thompson & cols., (1984) informaron la existencia de diferencias sexuales en la actividad de varias enzimas porfirinogénicas y conjuntamente con los estudios efectuados sobre la presencia y localización del receptor de andrógenos en esta estructura (Vilchis & cols., 1987; Vilchis & Pérez-Palacios, 1989) han sugerido que este dimorfismo sexual es regulado de manera dependiente de andrógenos. Sin embargo, aunque Vilchis & cols., (1996; 2002) han demostrado la expresión de una hemoproteína citosólica de 156 kDa y del citocromo P450_{scc} en la glándula Harderiana del hámster, hasta el momento no se ha podido demostrar de manera concluyente la incorporación de Fe²⁺ a la protoporfirina IX. Debido a que la ferroquelatasa cataliza el último paso de la vía biosintética del hemo, en este trabajo se aisló el cDNA de la enzima como un paso inicial para el estudio de su expresión y regulación en esta glándula intraorbital.

HIPÓTESIS

Si consideramos que la glándula Harderiana del hámster tiene la capacidad de sintetizar porfirinas, citocromos y otras hemoproteínas, la actividad transcripcional de ferroquelatasa se vera reflejada en los niveles de expresión de su RNAm específico.

OBJETIVO

El objetivo principal del presente estudio fue el de identificar, clonar y analizar la expresión génica de la ferroquelatasa del hámster Sirio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y tejidos

Se utilizaron hámsters dorados (*Mesocricetus auratus*), hembras y machos adultos intactos, los cuales fueron mantenidos en condiciones de luz: 12 h, oscuridad: 12 h, con agua y alimento *ad libitum*. Cuando fue necesario, se castraron bajo anestesia con éter, 5 hámster macho (4 y 30 días de castración). En 20 hembras, se estableció la fase del ciclo estral (proestro, estro, metaestro y diestro) mediante frotis vaginal. Los animales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se obtuvieron los diferentes tejidos, los cuales se limpiaron en papel filtro y se congelaron sobre hielo seco. Estos se usaron inmediatamente o se guardaron a -70°C hasta su utilización.

Obtención de RNA total

Los tejidos se pesaron y se les agregó 1 ml de trizol (Life technologies, Grand Island, NY) por cada 50 mg de tejido. Se homogeneizaron en politrón (Brinkmann Instruments Co) y los homogenados se incubaron por 5 min a temperatura ambiente (TA); al término de la incubación se adicionaron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de solución inicial. Las muestras se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 12000 xg durante 15 min a 4°C , se obtuvo la fase acuosa y se le adicionaron 0.5 ml de isopropanol por cada ml de solución inicial. Las mezclas se dejaron reposar durante 10 min a TA y se centrifugaron a 12000 xg por 10 min a 4°C , al terminar la centrifugación, se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de solución inicial. Se centrifugó a 12000 xg por 10 min a 4°C y al terminar se desechó el sobrenadante y se permitió que se evaporara el etanol remanente. El RNA precipitado se disolvió en H_2O dd tratada con DEPC (0.1%) y se cuantificó espectrofotométricamente.

Análisis por transferencia Northern (Northern blot)

Las muestras de RNA (20 a 30 μg en 7 μl) se mezclaron con 13 μl de solución desnaturalizante (100 μl de formamida, 37.4 μl de formaldehído al 37%, 16.6 μl de MOPS 12X [28.25 g de MOPS, 30 ml de acetato de sodio 1 M pH 7 y 12 ml de EDTA 0.5 M; pH 8, llevados a 500 ml de H_2O dd, esterilizada por filtración]) y se calentaron a 60°C durante 10 min a baño maría, al terminar la incubación se

depositaron en hielo. A cada muestra se le adicionaron 3 μ l de solución de carga [glicerol al 50% (v/v) azul de bromofenol 0.25% (p/v), cianol xileno FF 0.25% (p/v), EDTA 1 mM pH 8 en H₂O dd] y 1 μ l de bromuro de etidio (1 mg/ml). Las muestras se depositaron en un gel de agarosa al 1% (0.8 g de agarosa, 60 ml de H₂O dd, 6.64 ml de MOPS 12X y 13 ml de formaldehído al 37%) y se corrieron a 40 volts durante 4-5 h, usando MOPS 1X como solución de corrida. Al terminar la corrida, el gel se lavó varias veces en H₂O dd y los ácidos nucleicos se transfirieron por capilaridad a una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham, UK), usando una solución de SSC 10X (87.65 g de NaCl, 44.1 g de citrato de sodio, pH 7 en 500 ml de H₂O dd, esterilizada en autoclave). Al terminar la transferencia (16-20 h), la membrana se lavó con una solución SSC 2X y se dejó secar a TA (aproximadamente 20 min). Los ácidos nucleicos fueron fijados con luz UV (UV Stratagene 1800, la Jolla CA).

Marcaje e hibridación de ácidos nucleicos

Se utilizó una sonda obtenida por PCR y que corresponde a una porción de 731 pares de bases (pb) del gen de la FQ de hámster. Para el marcaje de las sondas, se usó el estuche RadPrime DNA labeling system (Invitrogen life technologies Carlsbad, CA) y desoxicitidina trifosfato [α^{32} P] dCTP, actividad específica 3000 Ci/mmol (Perkin Elmer® Life and Analytical Sciences Boston, MA). Se desnaturalizaron 25 ng de DNA (sonda) en 20 μ l de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7.4), por 5 min a 95°C, se agregaron 3 μ l de una mezcla de dATP, dGTP, dTTP (500 μ M), 20 μ l de una solución random primer 2.5X, 5 μ l (~50 μ Ci) de [α^{32} P] dCTP, se llevó a 49 μ l con H₂O dd y se agregó 1 μ l del fragmento Klenow (5 U). Se incubó a 37°C durante 10 min. Se agregaron 5 μ l de solución de terminación (EDTA 0.5 M pH 8), se desnaturalizó a 95°C por 5 min, se transfirió rápidamente a hielo y se usó toda la mezcla para hibridar las membranas. Las membranas se prehibridaron por 60 min a 65°C en solución de hibridar (150 μ l/cm²) [Na₂HPO₄ 0.25M/SDS 7%]. Se cambió la solución de prehibridar por una fresca y se agregó la sonda marcada y desnaturalizada. Se hibridó por 24 h a 65°C. Al finalizar se hicieron varios lavados a la membrana: Un lavado con SSC 2X/SDS 0.1% durante 20 min a TA, un lavado con SSC 1X/SDS 0.1% a 65°C por 15 min y un lavado con SSC 0.1X/SDS 0.1% a 65°C por 15 min. La membrana se expuso a placa de rayos X (X-OMAT, Kodak) por diferentes períodos de tiempo a TA.

Preparación de cDNA

Se utilizó el estuche Superscript First-Strand System para RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA). Para efectuar la reacción se preparó una mezcla de RNA (1-3 μg), 1 μl de dNTPs (10 mM) y 1 μl de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se llevó a 10 μl con H₂O dd tratada con DEPC. Las reacciones se incubaron a 65°C durante 5 min, se colocaron en hielo y se agregaron 9.0 μl de la siguiente mezcla: 2 μl de solución RT 10X, 4 μl de MgCl₂ 25 mM, 1 μl de inhibidor de RNasas y 2 μl de ditiotritol (DTT) 0.1 M. Las reacciones se incubaron a 42°C durante 2 min y se agregó 1.0 μl de SuperScript II RT, se mezcló y se incubó a 42°C durante 50 min. Se terminó la reacción incubando a 70°C durante 15 min y se colocaron en hielo. Se colectó la reacción por centrifugación, se agregó 1.0 μl de RNasa H y se incubó a 37°C durante 20 min. Al terminar la incubación las reacciones se colocaron en hielo.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones se efectuaron mezclando solución de reacción de Perkin Elmer (MgCl₂ 1.5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8.3 10 mM), mezcla de dNTPs 25 μM , oligonucleótido cebador 5' 1.5 μM , oligonucleótido cebador 3' 1.5 μM , dimetil sulfóxido (4% v/v), 2.5 U de Taq (DNA) polimerasa (Ampli-Taq) y 1.5 μl de cDNA, llevadas a un volumen total de 25 μl con H₂O dd. Las muestras fueron colocadas en un termociclador Perkin Elmer modelo 480 con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 30 seg a 80°C, 90 seg a 94°C; 25 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a la temperatura específica del oligonucleótido, 45 seg a 72°C y 1 ciclo de 45 seg a 94°C, 45 seg a la temperatura específica del oligonucleótido y 3 min a 72°C. Alícuotas de 5 μl de los productos de PCR mezclados con 3 μl de solución de carga [azul de bromofenol 0.25% (p/v), cianol xileno 0.25% (p/v), ficoll 400 15% (p/v) en H₂O dd] se depositaron en geles de agarosa al 1% (1 g de agarosa disuelta en 100 ml de TBE 1X [Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.1 M pH 8]) con bromuro de etidio (3.5 μg) y se corrieron a 100 volts usando como solución de corrida TBE 1X. Los geles se observaron en un transiluminador y se tomaron fotos.

Oligonucleótidos utilizados:

1) Para la amplificación de fragmentos específicos de la FQ se llevó a cabo el análisis comparativo de secuencias de la FQ de rata, humano, bovino, rana, pollo y un pez (Nakahashi & cols., 1990; Taketani & cols., 1990; Shibuya & cols., 1995; Day & cols., 1998; Childs & cols., 2000) con la finalidad de establecer los porcentajes de homología de las secuencias de amino ácidos y nucleótidos, utilizando los bancos de información de secuencias genómicas (<http://clustalw.genome.ad.jp/>) (Thompson & cols., 1994). Los resultados obtenidos a partir de esta comparación demostraron un porcentaje de homología entre un 75 y un 95%. A partir de esta comparación de secuencias se diseñaron y se sintetizaron 4 oligonucleótidos degenerados.

Temperatura de asociación 60°C:

FQH1 5'-CA/CC CTA/C CTC ATC CAG TGC TTT GC

FQH2 CAG CTG C/TTG GC/TT GGT GAA GAA GG-3'

Temperatura de asociación 60°C:

FQ2 5'-CTG TGG ATA CTG TGT GAA AG

FQ78 ATA/C TTA/G ATG C/TTA/G AAC ATG GGA/G GGC-3'

2) Para la amplificación del cDNA total de la FQ del hámster se diseñaron dos oligonucleótidos específicos generados a partir de los fragmentos del RACE 5' y 3'.

Temperatura de asociación 65°C:

FPLUS 5'-GAT CCC TGG CGT CCC GGA AAT GCT T

FMINUS TCT GTG AAT CCC ACG GGT CCT CAG-3'

3) Para analizar la expresión del gen de la FQ del hámster mediante RT-PCR se diseñaron dos oligonucleótidos específicos utilizando la secuencia de nucleótidos descrita en este trabajo. Para sintetizar una sonda específica de FQ se utilizaron estos mismos oligonucleótidos.

Temperatura de asociación 65°C:

MA7 5'-CGT CCA TCC TTT GAC AGA AGA AGC

MA22 GAT TTA CAC AGA GCG GGC AGC-3'

Para analizar la orientación del inserto en el plásmido se utilizaron dos oligonucleótidos, uno ubicado en el inserto (RX5FQ) y otro ubicado en el plásmido (T7).

RX5FQ 5'-AAG TCT TGA ACT TCT CCA AGG GTT TCG-3'

T7 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

Purificación de los productos de PCR

Cuando fue necesario purificar los productos de PCR, se hicieron 3 reacciones de 25 µl cada una, las cuales se reunieron y aplicaron en un gel preparativo de agarosa al 1%. Se corrió la electroforesis, se visualizaron las bandas en un transiluminador y se cortaron con bisturí. Las bandas se electroeluyeron en TBE 1X usando bolsas de diálisis (Spectra). El eluido se depositó directamente en columnas Centricon® 30 (Amicom Bioseparations, Millipore) y se llevó a un volumen de 2 ml con H₂O dd. Las columnas se centrifugaron a 6600 xg durante 30 min a 4°C, al terminar se agregaron otros 2 ml de H₂O dd y se centrifugó en las mismas condiciones. La columna se invirtió sobre un tubo cónico y se centrifugó a 2000 xg durante 5 min a 4°C. El producto obtenido se cuantificó espectrofotométricamente y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

Análisis por transferencia Southern (Southern blot)

A partir del RNA de diferentes tejidos, se obtuvo el cDNA y se amplificó el gen de la FQ mediante RT-PCR. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X a 100 volts. Al terminar la corrida, el gel se colocó en una solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 N) por 45 min. Se lavó el gel dos veces con H₂O dd y se neutralizó con Tris-HCl 1 M pH 7.4, NaCl 1.5 M, durante 30 min a TA. Se cambió la solución neutralizante por otra fresca y se lavó por 15 min más. El DNA se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon Hybond N+ durante toda la noche, usando una solución SSC 10X. Al acabar la transferencia se lavó la membrana con SSC 6X por 5 min, se dejó secar y el DNA se fijó con radiación UV. Posteriormente, se hibridó con la sonda marcada radiactivamente.

Amplificación de los extremos 5' y 3' mediante RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el estuche GeneRacer de Invitrogen [For full-length, RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RLM-RACE), Carlsbad CA], metodología descrita inicialmente por Frohman & cols., (1988). El RNA usado se verificó que no estuviera degradado en un gel de agarosa y se efectuaron los siguientes pasos:

1) Desfosforilación del RNA

Se preparó la siguiente reacción en un tubo de 0.5 ml: 4 µg de RNA total, 1 µl de solución CIP 10X, 1 µl de RNase OUT™ (40 U/µl) y 1 µl de CIP (10 U/µl). Se llevó a un volumen final de 10 µl con H₂O tratada con DEPC y se mezcló suavemente por pipeteo, se incubó a 50°C por 1 h. Al término de la incubación las reacciones se centrifugaron y se colocaron sobre hielo.

2) Precipitación del RNA

Se adicionaron 90 µl de H₂O tratada con DEPC, 100 µl de fenol:cloroformo (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico [25:24:1] y 0.1% de 8-hidroxiquinoleína), se agitó vigorosamente por 30 seg y se centrifugó a máxima velocidad (micro centrifuga) por 5 min a TA. La fase acuosa (sobrenadante) fue transferida a otro tubo y se le adicionaron 2 µl de mussel glycogen (10 mg/ml en H₂O tratada con DEPC), 10 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y se mezcló. Se adicionaron 220 µl de etanol al 95% y se agitó. Las muestras fueron colocadas sobre hielo por 10 min. Las reacciones se centrifugaron (microcentrifuga) a máxima velocidad por 20 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se adicionaron 500 µl de etanol al

75% y se mezcló por inversión. Se centrifugó (microcentrifuga) a máxima velocidad por 2 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante por pipeteo y se retuvo el precipitado. Se centrifugó en condiciones similares a las anteriores, se eliminó el sobrenadante por pipeteo y se retuvo el precipitado. El exceso de etanol del precipitado fue eliminado usando aire seco o vacío por 2 min a TA, el precipitado fue resuspendido en 7 µl de H₂O tratada con DEPC.

3) Eliminación del Cap del RNAm

Se preparó la siguiente reacción: 6 ó 7 µl de RNA desfosforilado, 1 µl de Solución TAP 10X, 1 µl de RNaseOUT™ (40 U/µl) y 1 ó 2 µl de TAP (0.5 U/µl) para un volumen final de 10 µl. La reacción se mezcló brevemente y se incubó a 37°C por 1 h. Al término de la incubación la reacción se colocó sobre hielo. El RNA se precipitó como anteriormente se describió.

4) Ligación del RNA oligo al RNAm sin el Cap

Se adicionaron 7 µl de RNA desfosforilado y sin el Cap, al tubo que contiene el prealiquotado liofilizado GeneRacer™ RNA oligo (0.25 µg). Se pipeteo varias veces para mezclar y resuspender el oligonucleótido. La reacción se incubó a 65°C por 5 min para relajar la estructura secundaria del RNA. Al término de la incubación se colocó sobre hielo por 2 min. A la reacción anterior se le adicionó lo siguiente: 1 µl de solución ligase 10X, 1 µl de ATP 10 mM, 1 µl de RNaseOut™ (40 U/µl) y 1 µl de T4 RNA ligase (5 U/µl) para un volumen final de 10 µl. La reacción se mezcló brevemente y se incubó a 37°C por 1 h. Al término de la incubación se colocó sobre hielo. El RNA se precipitó como se describió anteriormente.

5) Transcripción reversa del RNAm

Se adicionó 1 µl del oligonucleótido deseado (Gene Racer Oligo dT Primer) al RNA ligado (10 µl) y 1 µl de dNTPs 25 mM de cada uno, se incubó a 65°C por 5 min y se colocó sobre hielo por 2 min. Se adicionaron los siguientes reactivos al RNA ligado y al Gene Racer Oligo dT Primer para iniciar la reacción de transcripción reversa: 4 µl de solución RT 5X, 1 µl AMV-RT (15 U/µl), 1 µl de RNase OUT™ (40 U/µl) y se llevó a un volumen final de 20 µl con H₂O dd. La reacción se incubó a 45°C por 1 h y a 85°C por 15 min para inactivar la AMV-RT, se centrifugó brevemente y se usó inmediatamente para la amplificación por PCR. La amplificación de los extremos del cDNA se llevó a cabo por PCR de la siguiente manera:

Para la amplificación del extremo 5' del cDNA se adicionaron 5 µl de solución de reacción (MgCl₂ 1.5 mM, KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM pH 8.3), 1 µl de mezcla de dNTPs 25 mM, 3 µl oligonucleótido GeneRacer 5' 10 µM, 1 µl oligonucleótido específico del gen 5' 1.5 µM, 2 µl de dimetil sulfoxido (4 % v/v), 2.5 U de Taq (DNA) polimerasa (Ampli-Taq) y 2 µl de template de RT llevadas a un volumen total de 50 µl con H₂O dd. Para la amplificación del extremo 3' del cDNA se utilizaron las mismas condiciones anteriores con la excepción de que se utilizó el oligonucleótido GeneRacer 3' 10 µM. Las reacciones anteriores fueron colocadas en un termociclador Perkin-Elmer modelo 480 con las siguientes condiciones: un ciclo de 2 min a 94°C; 5 ciclos de 30 seg a 94°C y 1 min a 72°C; 5 ciclos de 30 seg a 94°C y 1 min a 70°C; 25 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 65°C y 1 min a 72°C y por último un ciclo de 10 min a 72°C. Al finalizar la reacción de PCR se analizaron las muestras en un gel de agarosa con bromuro de etidio.

Oligonucleótidos utilizados:

1) Oligonucleótidos específicos del gen de la FQ del hámster utilizados para generar mediante la metodología del RACE la amplificación de los extremos 5' y 3' del cDNA de la FQ.

Temperatura de asociación 65°C:

RACE 5': RX5FQ 5'-AAG TCT TGA ACT TCT CCA AGG GTT TCG-3'

RACE 3': FQAYH 5'-GGA AAT CCA TTG TTC TCT AAG GC-3'

2) Para la amplificación completa del extremo 3' se necesitó del diseño adicional de 3 oligonucleótidos específicos:

Temperatura de asociación 65°C:

R3P7 5'-GAA GCC ACA TAG CCT GGA CAC AGC-3'

R32FQ 5'-GTG AAT ACT CAC AAC CAT TTC TGG G-3'

FQR4 5'-AAG AAT TGG GCT GAG GGC ATA GC-3'

Secuenciación

Las reacciones se realizaron con el estuche de secuenciación de USB Corporation (OH, USA). Estas reacciones contenían desoxinucleótidos (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) en una concentración de 0.75 μM cada uno; didesoxinucleótidos marcados radiactivamente [α - ^{33}P] (ddGTP, ddATP, ddTTP ó ddCTP) 0.225 μCi de cada uno; cDNA purificado (100 ng); oligonucleótido cebador (16 pmol); termosecuensasa DNA polimerasa (8 U); todo lo anterior en una solución Tris-HCl 26 mM pH 9.5 y MgCl_2 6.5 mM. El volumen final fue de 20 μl el cual se alcanzó con H_2O dd. Las reacciones fueron sometidas a ciclos de 80°C durante 30 seg, 94°C/90 seg; 30 ciclos de 94°C/45 seg, 58°C/45 seg; 72°C/45 seg y un último ciclo con las mismas condiciones anteriores pero con la última temperatura de 72°C por 3 min. Al terminar las reacciones, se adicionaron a cada tubo 4 μl de solución para detener la reacción (formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0.05% y cianol xileno FF al 0.005%). Las muestras se calentaron a 70°C por 5 min y posteriormente se llevaron a hielo por 5 min. Se prepararon geles de acrilamida-urea al 6% (Acrilamida 5.7 g, Bis-Acril 0.3 g, Urea 42 g, TTE 10X 10 ml en 100 ml de H_2O dd, 1 ml de persulfato de amonio al 10% y 25 μl de TEMED), se dejaron polimerizar al menos 1 h. Los geles acrilamida-urea se montaron en cámaras de electroforesis, se usó como solución de corrida TTE 1X (TTE 10X; Tris base 108 g, Taurina 36 g, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g, llevadas a 1 L con H_2O dd) y se precalentaron a 1800 V hasta alcanzar 50°C. Se depositaron 3 μl de cada muestra. Se corrió la electroforesis a 1800 V. Los geles se transfirieron a papel 3 MM, y se secaron durante 60 min a 75°C con vacío (Savant). Los geles adheridos al papel 3 MM se expusieron a placas de rayos X, [Bio Max-MR, (Kodak)] en cartuchos con pantallas intensificadoras. Se dejaron a TA de 12 a 16 h y se revelaron las placas. Se analizó la secuencia.

Clonación del DNA complementario (cDNA) de Ferroquelatasa

Para la clonación de la FQ total, se preparó inicialmente un PCR utilizando dos oligonucleótidos específicos (FPLUS y FMINUS). Las reacciones de clonación se llevaron a cabo utilizando el estuche TOPO Cloning pc DNA 3.1/V5-His TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad CA) (Fig 5).

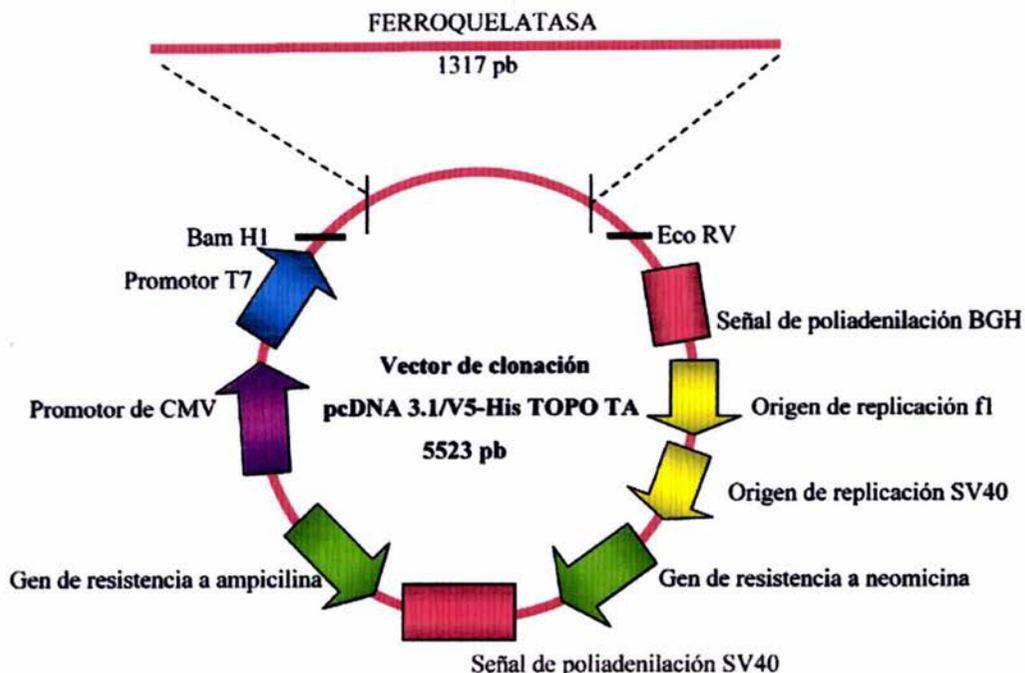


Fig 5. Diagrama estructural del vector de clonación pcDNA 3.1/His-TOPO TA utilizado para la inserción de productos de PCR.

La transformación celular TOPO cloning se llevó de la siguiente manera: se mezclaron 4 μ l del cDNA de la FQ, 1 μ l de solución salina (NaCl 1.2 M; MgCl₂ 0.06 M), 1 μ l del vector TOPO (10 ng/ μ l de plásmido en: glicerol al 50%, Tris-HCl 50 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, Tritón X-100 0.1%, BSA 100 μ g/ml y rojo de fenol). La mezcla se incubó 5 min a TA y se colocó sobre hielo. Se adicionaron 2 μ l de la reacción TOPO cloning a una estirpe de células competentes [One shot chemically competent *E. coli*], se mezcló suavemente y se mantuvo 20 min sobre hielo. Las células se calentaron a 42°C por 30 seg sin agitación e inmediatamente se transfirieron a hielo. Se adicionaron 250 μ l de medio SOC (Triptona al 2%, Extracto de levaduras al 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM) a TA. Los tubos se agitaron a 200 rpm (Brinkmann incubator 1000 orbimix 1010, Germany) por 1 h a 37°C. Se sembraron de 25-250 μ l de células transformadas en cajas petri con medio Luria-Bertani-Agar (5 g de Bacto-yeast extract, 10 g de peptona, 10 g de NaCl, 15 g de bacto agar, llevar a pH 7 y llevar a 1 L con H₂O dd) y se incubaron

toda la noche a 37°C. Como control se usaron placas con o sin antibiótico (100 µg/ml de ampicilina) con o sin bacterias. Se eligieron 10 colonias para cultivar en medio líquido y obtener el plásmido.

Purificación del Plásmido

Se inocularon 5 ml de medio LB con una sola colonia bacteriológica por tubo. Se incubaron toda la noche a 37°C con agitación. Al terminar la incubación se tomaron 1.5 ml de medio y se centrifugaron 20 seg a TA a velocidad máxima (micro centrifuga), se eliminó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 100 µl de solución GTE (Glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM, esterilizar por autoclave y almacenar a 4°C) y se dejó reposar 5 min a TA. Se adicionaron 200 µl de solución NaOH/SDS [NaOH 0.2 N, dodecil sulfato de sodio (SDS) 1% p/v], se mezcló con agitación suave y se colocó sobre hielo durante 5 min. Se adicionaron 150 µl de solución de acetato de potasio 5 M pH 4.8, se agitó por 2 seg y se colocó en hielo por 5 min. Se centrifugó a velocidad máxima (micro centrifuga) por 3 min, se transfirió el sobrenadante a un tubo y se mezcló con 0.8 ml de etanol al 95%, se mantuvo en reposo 5-10 min a TA para precipitar los ácidos nucleicos, se centrifugó a velocidad máxima (micro centrifuga) por 1 min a TA, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70%. El precipitado fue resuspendido en TE (30-50 µl) y se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Los plásmidos se digirieron a 37°C durante 2 h [2.5 µl de solución 1X (Tris HCl 10 mM pH 7.5, KCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, tritón X-100 al 0.002 %, BSA 200 µg/ml y glicerol al 50%), 3µl de DNA plasmídico, 15 U de Eco RV (10U/µl), 15 U de Bam HI (10 U/µl) y se llevó a 25 µl con H₂O dd]. Para verificar la orientación del inserto se preparó un PCR utilizando dos oligonucleótidos específicos, uno del plásmido T7 y otro del fragmento clonado (RX5FQ). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Se seleccionaron las colonias que tuvieran el inserto orientado.

Una alícuota de 1 ml de cada clona probada, se inoculó en 500 ml de medio LB/ampicilina y se incubó toda la noche en agitación (200 rpm) a 37°C. El medio con el cultivo bacteriano se centrifugó a 2000 xg durante 10 min a TA, el precipitado se resuspendió en 3 ml de TES (Tris-base 10 mM pH 7.8, EDTA 1 mM, glucosa 50 mM), se adicionó 1 ml de lisozima (8 mg/ml en TES pH 8) y se dejó en reposo a 4°C durante 10 min. Se agregaron 6 ml de solución (SDS 1%/NaOH 0.2 N) y se dejó en reposo en hielo 10 min, posteriormente se agregaron 4.5 ml de acetato de potasio 5 M pH 4.8 y se dejó en hielo 10 min más. La mezcla se centrifugó a 19000 xg por 30 min a 4°C. El sobrenadante se

transfirió a tubos corex, se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 12000 xg 20 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol al 70%, se centrifugó a 12000 xg durante 10 min, se tiró el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a TA por 10 min. Se agregaron 4.5 ml de TE y se resuspendió el precipitado, se agregaron y disolvieron 4.5 g de CsCl y 0.45 ml de bromuro de etidio (1 mg/ml). La solución se centrifugó a 3000 xg por 10 min a TA. El sobrenadante se depositó en tubos de ultra centrifuga y se centrifugaron a 322000 xg durante 18 h a 20°C. Al terminar la centrifugación, se visualizaron dos bandas mediante luz UV, se colectaron punzando el tubo con agujas del #18 y se depositaron en tubos corex. Se extrajo el bromuro de etidio de las muestras con 4 volúmenes de N-butanol (saturado con TE) y se repitió la extracción hasta quedar una solución incolora (4 o 5 veces). Se adicionaron 3 volúmenes de TE, se mezcló, se agregaron 2.5 volúmenes de isopropanol y se dejó en reposo a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó a 12000 xg por 20 min a 4°C, se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 12000 xg por 30 min a 4°C. El precipitado se dejó secar por 25 min y se resuspendió en 0.5 ml de TE. Las muestras fueron cuantificadas espectrofotométricamente y analizadas en un gel de agarosa con bromuro de etidio. Se realizó una restricción con 1.5 µl de Bam HI, 1.5 µl de Eco RV, 3 µl del plásmido, 2 µl de solución 1X (Tris HCl 10 mM pH 7.5, KCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, tritón X-100 al 0.002 %, BSA 200 µg/ml y glicerol al 50%), se llevó a un volumen total de 20 µl con H₂O dd. Se incubó por 1 h a 37°C y se analizaron en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

RESULTADOS

Con la finalidad de clonar el gen de la FQ del hámster, inicialmente se obtuvo el RNA a partir de hígado de hámster. El RNA fue copiado a cDNA por la transcriptasa reversa y fue amplificado mediante PCR utilizando dos pares de oligonucleótidos degenerados, los cuales se obtuvieron a partir del análisis múltiple de secuencias para las FQs de diferentes especies descritas hasta el momento; el análisis de estos fragmentos en geles de agarosa mostró la presencia de dos productos con la talla esperada de 370 y 579 pb (Fig 6).

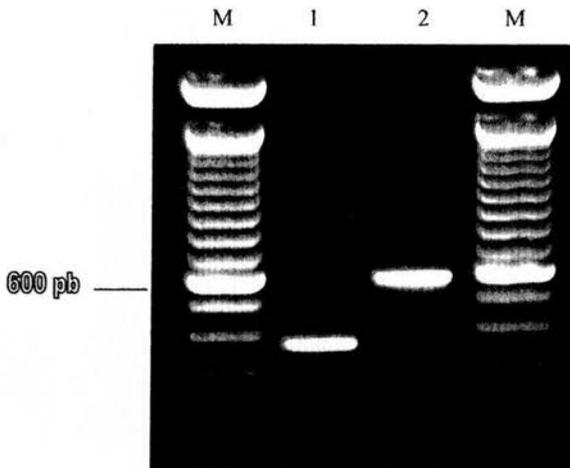
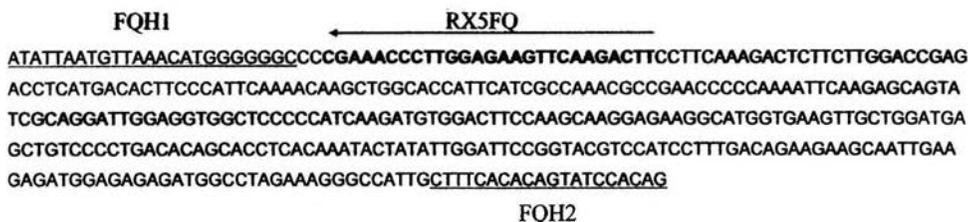


Fig 6. Electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos de FQ de hámster amplificados por PCR. 1) producto de 370 pb, se usaron los oligonucleótidos FQH1 y FQH2. 2) producto de 579 pb, se usaron los oligonucleótidos FQ78 y FQ2. M: escalera de DNA de 100 pb.

La figura 7 a y b, muestra la secuencia de nucleótidos de los dos fragmentos amplificados usando los oligonucleótidos degenerados. Esta secuencia específica para el hámster, sirvió para el diseño de los oligonucleótidos usados en la amplificación de los extremos 5' y 3' (RX5FQ y FQAYH).

a)



b)

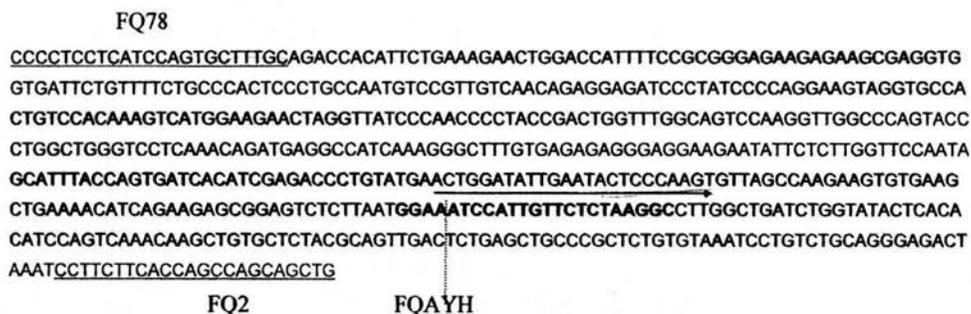
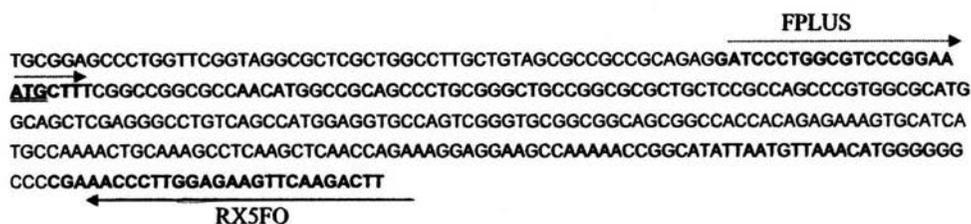


Fig 7. Secuencias nucleotídicas parciales del gen de la FQ de hámster. a) Fragmentos amplificados en la región 5' usando los oligonucleótidos FQH1 y FQH2. La flecha indica las bases usadas para diseñar un oligonucleótido específico (RX5FQ), b) fragmento amplificado en la región 3' usando los oligonucleótidos FQ78 y FQ2. La flecha indica las bases usadas para diseñar un oligonucleótido específico (FQAYH) el cual se usó en la amplificación del extremo 3'.

Los productos de PCR obtenidos mediante RACE 5' y 3' fueron secuenciados (Fig 8 a y b). Para la amplificación completa del extremo 3' se necesitó del diseño adicional de tres oligonucleótidos específicos (R3P7, R32FQ, FQR4).

a)



b)

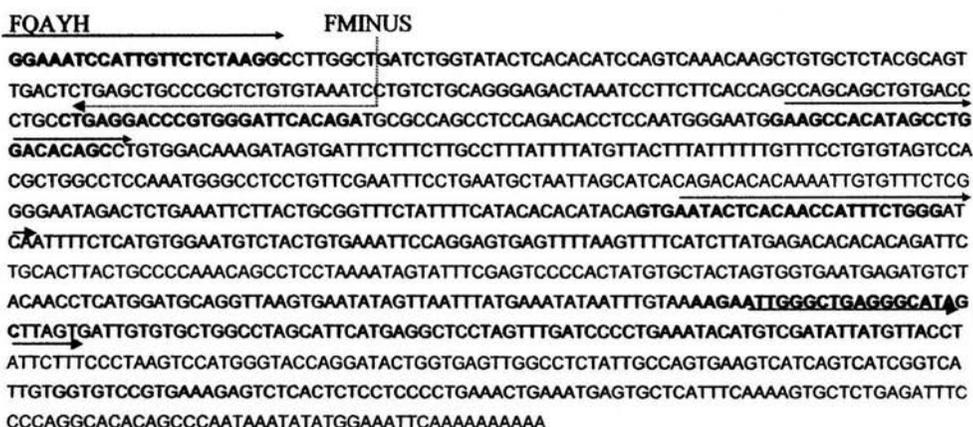


Fig 8. Secuencia nucleotídica parcial de los extremos 5' y 3' de la FQ del hámster. a) Región 5' del gen de la FQ, con doble subrayado se señala el codón de iniciación (ATG). b) Región 3' del gen de la FQ, el doble subrayado indica la señal de poliadenilación. Con flechas y en negritas se indican los oligonucleótidos utilizados para la amplificación parcial de los extremos 5' y 3' de la FQ. Las flechas punteadas indican los oligonucleótidos utilizados en la PCR para generar el inserto (FPLUS; FMINUS).

Para amplificar por PCR el cDNA total de la FQ se diseñaron dos oligonucleótidos específicos (FPLUS y FMINUS) generados a partir de los extremos 5' y 3'. Al terminar la amplificación el producto de PCR (1317 pb) fue insertado en un vector de clonación (5523 pb) y analizado en geles de agarosa (Fig 9). Los resultados indicaron la presencia de un producto de clonación de 6800 pb.

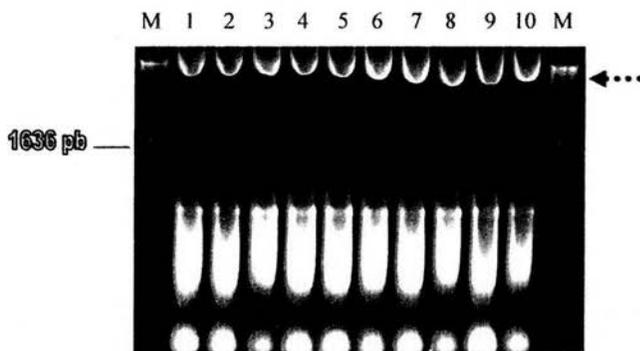


Fig 9. Electroforesis en geles de agarosa del fragmento total de FQ (1317 pb) insertado en el vector de clonación (5523 pb). La flecha punteada indica la presencia del plásmido aislado de cada colonia bacteriológica (muestra 1 a 10). M: escalera de 1000 pb.

El plásmido se analizó por restricción con la finalidad de verificar la presencia del inserto en el vector de clonación. Los productos de restricción se depositaron en geles de agarosa y se compararon con una escalera de DNA de 1000 pb. Se observó un inserto de aproximadamente 1300 pb separado del vector de clonación de 5523 pb. Los resultados indicaron que el inserto estaba presente en todos los plásmidos, con excepción de la muestra 8 y en las colonias 7 y 9 presentaron una migración electroforética ligeramente mayor (Fig 10).

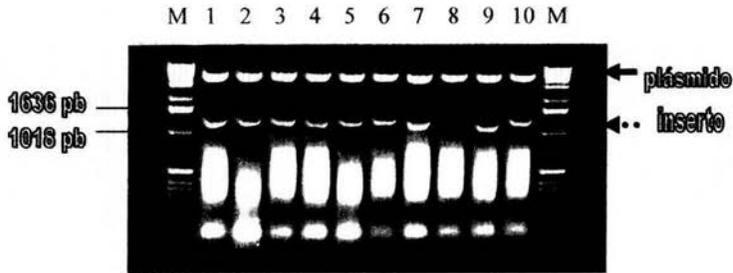


Fig 10. Electroforesis en geles de agarosa del vector de clonación digerido con BamHI y EcoRV. El inserto (flecha punteada) estuvo presente en todas las muestras, excepto la muestra número 8. M: escalera de DNA de 1000 pb.

Con la finalidad de verificar la orientación del inserto presente en el vector de clonación, se efectuó un PCR utilizando dos oligonucleótidos, uno ubicado en el inserto y otro en el plásmido. Los productos amplificados fueron depositados en geles de agarosa y comparados con una escalera de DNA de 100 y 1000 pb. Los resultados confirmaron que el inserto estaba presente en el vector de clonación y que solo algunos de ellos estaban orientados. Los insertos orientados fueron los que si habían amplificado (Fig 11). Los insertos orientados fueron analizados mediante la secuenciación directa como se muestra en la Fig 12.

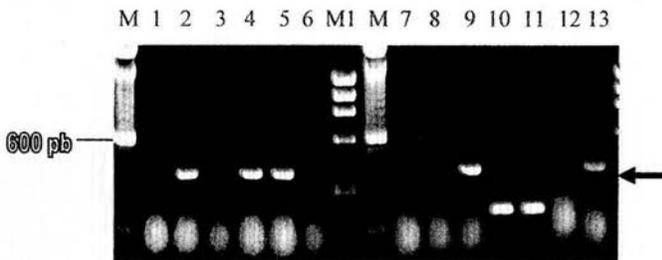


Fig 11. Electroforesis en geles de agarosa para verificar la orientación y el tamaño del inserto. Las muestras 2, 4, 5, 9 y 13 indican la presencia del inserto orientado en el plásmido y con el tamaño esperado de aproximadamente 400 pb (flecha). M: escalera de DNA de 100 pb, M1: escalera de 1000 pb.

-70 gccctggttcggtagggcgtcgctggccttgcgtgagcgcgcccagaggatccctggcgtcccggaa

ATG CTT TCG GCC GGC GCC AAC ATG GCC GCA GCC CTG CGG GCT GCC GGC GCG CTG CTC CGC CAG CCG CTG GCG	72
Met Leu Ser Ala Gly Ala Asn Met Ala Ala Ala Leu Arg Ala Ala Gly Ala Leu Leu Arg Gln Pro Leu Ala	24
CAT GGC AGC TCG AGG GCC TGT CAG CCA TGG AGG TGC CAG TCG GGT GCG GCG GCA GCG GCC ACC ACA GAG AAA	144
His Gly Ser Ser Arg Ala Cys Gln Pro Trp Arg Cys Gln Ser Gly Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Glu Lys	48
GTG CAT CAT GCC AAA ACT GCA AAG CCT CAA GCT CAA CCA GAA AGG AGG AAG CCA AAA ACC GGC ATA TTA ATG	216
Val His His Ala Lys Thr Ala Lys Pro Gln Ala Gln Pro Glu Arg Arg Lys Pro Lys Thr Gly Ile Leu Met	72
TTA AAC ATG GGG GGC CCC GAA ACC CTT GGA GAA GTT CAA GAC TTC CTT CAA AGA CTC TTC TTG GAC CGA GAC	288
Leu Asn Met Gly Gly Pro Glu Thr Leu Gly Glu Val Gln Asp Phe Leu Gln Arg Leu Phe Leu Asp Arg Asp	96
CTC ATG ACA CTT CCC ATT CAA AAC AAG CTG GCA CCA TTC ATC GCC AAA GCG CGA ACC CCC AAA ATT CAA GAG	360
Leu Met Thr Leu Pro Ile Gln Asn Lys Leu Ala Pro Phe Ile Ala Lys Arg Arg Thr Pro Lys Ile Gln Glu	120
CAG TAT CGC AGG ATT GGA GGT GGC TCC CCC ATC AAG ATG TGG ACT TCC AAG CAA GGA GAA GGC ATG GTG AAG	432
Val His His Ala Lys Thr Ala Lys Pro Gln Ala Gln Pro Glu Arg Arg Lys Met Trp Thr Ser Lys Lys Met Val Lys	144
TTG CTG GAT GAG CTG TCC CCT GAC ACA GCA CCT CAC AAA TAC TAT ATT GGA TTC CGG TAC GTC CAT CCT TTG	504
Leu Leu Asp Glu Leu Ser Pro Asp Thr Ala Pro His Lys Tyr Tyr Ile Gly Phe Arg Tyr Val His Pro Leu	168
ACA GAA GAA GCA ATT GAA GAG ATG GAG AGA GAT GGC CTA GAA AGG GCC ATT GCT TTC ACA CAG TAT CCA CAG	576
Thr Glu Glu Ala Ile Glu Glu Met Glu Arg Asp Gly Leu Glu Arg Ala Ile Ala Phe Thr Gln Tyr Pro Gln	192
TAT AGC TGC TTC ACC ACC GGC AGC AGT TTA AAT GCC ATT TAC AGA TAC TAT AAC GAG ATG GGA CGG AAG CCC	648
Gln Tyr Arg <u>Cys</u> Phe Thr Thr Gly Ser Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Arg Tyr Tyr Asn Glu Met Gly Arg Lys Pro	216
ACC ATG AAG TGG AGC ACA ATT GAC AGG TGG CCC ACG CAT CCC CTC CTC ATC CAG TGC TTT GCA GAC CAC ATT	720
Thr Met Lys Trp Ser Thr Ile Asp Arg Trp Pro Thr His Pro Leu Leu Ile Gln Cys Phe Ala Asp His Ile	240
CTG AAA GAA CTG GAC CAT TTT CCG CGG GAG AAG AGA AGC GAG GTG GTG ATT CTG TTT TCT GCC CAC TCC CTG	792
Leu Lys Glu Leu Asp His Phe Pro Arg Glu Lys Arg Ser Glu Val Val Ile Leu Phe Ser Ala His Ser Leu	264
CCA ATG TCC GTT GTC AAC AGA GGA GAT CCC TAT CCC CAG GAA GTA GGT GCC ACT GTC CAC AAA GTC ATG GAA	864
Pro Met Ser Val Val Asn Arg Gly Asp Pro Gln Glu Val Gly Ala Thr Val His Lys Val Met Glu	288
GAA CTA GGT TAT CCC AAC CCC TAC CGA CTG GTT TGG CAG TCC AAG GTT GGC CCA GTA CCC TGG CTG GGT CCT	936
Glu Leu Gly Tyr Pro Asn Pro Tyr Arg Leu Val Trp Gln Ser Lys Val Gly Pro Val Pro Trp Leu Gly Pro	312
CAA ACA GAT GAG GCC ATC AAA GGG CTT TGT GAG AGA GGG AGG AAG AAT ATT CTC TTG GTT CCA ATA GCA TTT	1008
Gln Thr Asp Glu Ala Ile Lys Gly Leu Cys Glu Arg Gly Arg Lys Asn Ile Leu Leu Val Pro Ile Ala Phe	336
ACC AGT GAT CAC ATC GAG ACC CTG TAT GAA CTG GAT ATT GAA TAC TCC CAA GTG TTA GCC AAG AAG TGT GAA	1080
Thr Ser Asp His Ile Glu Thr Leu Tyr Glu Leu Asp Ile Glu Tyr Ser Gln Val Leu Ala Lys Lys Cys Glu	360
GCT GAA AAC ATC AGA AGA GCG GAG TCT CTT AAT GGA AAT CCA TTG TTC TCT AAG GCC TTG GCT GAT CTG GTA	1152
Ala Glu Asn Ile Arg Arg Ala Glu Ser Leu Asn Gly Asn Pro Leu Phe Ser Lys Ala Leu Ala Asp Leu Val	384
TAC TCA CAC ATC CAG TCA AAC AAG CTG TGC TCT ACG CAG TTG ACT CTG AGC TGC CCG CTC TGT GTA AAT CCT	1224
Tyr Ser His Ile Gln Ser Asn Lys Leu Cys Ser Thr Gln Leu Thr Leu Ser <u>Cys</u> Pro Leu <u>Cys</u> Val Asn Pro	408
GTC TGC AGG GAG ACT AAA TCC TTC ACC AGC CAG CAG CTG TGA ccctgcctgaggaccctgggattccacagatgcgcc	1266
Val <u>Cys</u> Arg Glu Thr Lys Ser Phe Thr Ser Gln Gln Leu ***	422
<p>agcctccagacacctccaatgggaatggaagccacatagcctggacacagcctgtggacaaagatagtgattctttctgacctttatattatgttactttat tttttgttctctgttagtccacgctggcctccaatgggctcctgttcgaatttctgtaagtctaattagcatcacagacacacaaaattgtgttctcgg ggaatagactcgaattcttactcggtttctattttcaacacacatacagtgtaactcacaaccatttctggatcaatttctcatgtggaatgcta ctgtgaaattccaggagtgagtttaagtttcatcttatgagacacacacagattctgcaacttactgcccacaacagcctccaataatagatatttcagttcc ccactatgtgctactagtggtgaatgagatgctacaacctcatggatgcaggttaagtgaatatagttaatttatgaaatataatttgtaaaaaaattgggc tgagggcatagcttagtgattgtgtgctggcctagcttcatgaggtcctagtttgatccccgaaatacatgctgatattatgttacctattcttcccta agtccatgggtaccaggatactggtgagttggcctctatgcccagtgaaagtcacagtcacaggtcattgtggtgctccgtgaaagagtcctcactctcctccc tgaactgaaatgagtgctcatttcaaaagtctctgagatttcccaggccacacagcccataaataatagaaatttc</p>	

Fig 12. Secuencia de nucleótidos y amino ácidos de la FQ del hámster. La posición +1 es asignada como el codón de iniciación ATG y los asteriscos señalan el codón de terminación TGA. La señal de poliadenilación esta subrayada. La doble línea indica las cuatro cisteínas ligadas al conjunto [2Fe-2S].

La amplificación rápida de los extremos 5' y 3' del cDNA (RACE) de la FQ se llevó a cabo utilizando el cDNA del hígado de hámster sirio. La secuencia de nucleótidos obtenida a partir del cDNA es de 2105 pb de longitud con un marco de lectura abierto de 1266 pb, presenta un sitio de iniciación ATG y una señal de terminación TGA. Contiene una región 5' no traducida de 70 pb y una región 3' no traducida de 849 pb. La secuencia señal de poliadenilación AATAAA se localiza a 2087 pb del codón de iniciación y a 817 pb del codón de terminación (Fig 12). Esta secuencia codifica para una proteína de 422 amino ácidos con un peso molecular aproximado de 47569 Da. Los primeros residuos de amino ácidos después del sitio de iniciación ATG presentan predominantemente características hidrofóbicas. Los resultados del análisis de la secuencia de amino ácidos revelaron que la Lisina, Alanina, Prolina y el Ácido glutámico fueron los amino ácidos predominantes y se observó que un 48.57% de los residuos de amino ácidos en la región NH₂-terminal de la FQ son hidrofóbicos.

La secuencia de amino ácidos descrita en este trabajo presenta cuatro cisteínas conservadas en las posiciones 195, 402, 405 y 410; tres de las cuatro cisteínas están ligadas al grupo [2Fe-2S] y se localizan en el extremo COOH-terminal, la cuarta cisteína está localizada en el extremo NH₂-terminal (NH₂-Cys-X₂₀₆-Cys-X₂-Cys-X₄-Cys-COOH). La proteína madura presenta un tamaño tentativo de 369 amino ácidos con una pre-secuencia de 53 amino ácidos.

Al utilizar los bancos de información de secuencias genómicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) se comparó y se analizó la secuencia de nucleótidos y amino ácidos de la FQ del hámster Sirio con las FQs descritas para el grupo vertebrata, los resultados mostraron que la secuencia de amino ácidos de la FQ presenta un porcentaje de homología del 95% con la del ratón (*Mus musculus*), 89% con la del humano (*Homo sapiens*), 87% con la del bovino (*Bos taurus*), 79% con la de un ave (*Gallus gallus*), 78% con la de una rana (*Xenopus laevis*) y 74% con la de un pez (*Danio reiro*). Adicionalmente, se obtuvo el alineamiento múltiple en la secuencia de amino ácidos de las FQs descritas para algunos vertebrados mediante los bancos de información de secuencias (<http://clustalw.genome.ad.jp/>) (Fig 13).

Hámster	MLCAGANMAAALRAAGALLRQPLANGSSRACQFW---RCQS-GAAAAATTEKVVHAKTAKPQAQPERRKKPKTGILML
Ratón	MLSASANMAAALRAAGALLREPLVHJSSRACQFW---RCQS-GAAVAATTEKVVHAKTTKPPQAQPERRKKPKTGILML
Humano	MRSIGANMAAALRAAGVLLRDLPLASSRNVRCQFW---RWKGGAAAAVTTEQAHAQGAQPVQPPQRKKPKTGILML
Bovino	-----MAAALRSAGVLLRDRLLYGGSRACQFR---RCQSGAATAAAATEAQRARSPPQAQPGNRKKPKTGILML
Ave	-----MAAAGRAARPLVAGGRQLRVPLRWG-----QVAAAAPSTKQAEPETRKKPKTGILML
Xenopus	-----MAAFRAAHLRLGHILRNESASGLVTQ---RWSS-----SAAVASVPKSSDPKPHAQDPKRRKKPKTGILML
Pez	-----MAVLGGACRLVQLVRCGSPVGLCLSS-----SLRRQSTATAAAFNNTATPETKESRKKPKTGILML
Hámster	NMGGPETLGEVQDFLQRLFLDRDLMTLPIQNKLAFFIAKRRTPKIQEQYRRIGGGSPIMWTSKQEGEMVKLLDELS P
Ratón	NMGGPETLGEVQDFLQRLFLDRDLMTLPIQNKLAFFIAKRRTPKIQEQYRRIGGGSPIMWTSKQEGEMVKLLDELS P
Humano	NMGGPETLGEVQDFLLRFLDQDLMTLPIQNKLAFFIAKRRTPKIQEQYRRIGGGSPIMWTSKQEGEMVKLLDELS P
Bovino	NMGGPETVEEVQDFLQRLFLDQDLMTLPVQDKLGFPIAKRRTPKIQEQYRRIGGGSPIMWTSKQEGEMVKLLDELS P
Ave	NMGGPERLDDVDFLLRFLDRDLMTLPIQNKLAFFIAKRRTPKIQEQYRRIGGGSPIMWTSKQEGEMVKLLDELS P
Xenopus	NMGGPETLDDVHGFLLRFLDQDLMTLPIQNKLAFFIAKRRTPKIQEQYRRIGGGSPIMWTSKQEGEMVKLLDELS P
Pez	NMGGPEKLEDDVDFLLRFLDQDLMTLPIQNKLAFFIAKRRTPKIQEQYRRIGGGSPIMWTSKQEGEMVKLLDELS P
Hámster	DTAPHKYIIGFRYVHPLTEEAIEEMERDGLERAIAFTQYPQYSCSTTGSLSLNAIYRYNEMGRKPTMKWSTIDRWPTH
Ratón	ATAPHKYIIGFRYVHPLTEEAIEEMERDGLERAIAFTQYPQYSCSTTGSLSLNAIYRYNEVGQKPTMKWSTIDRWPTH
Humano	NTAPHKYIIGFRYVHPLTEEAIEEMERDGLERAIAFTQYPQYSCSTTGSLSLNAIYRYNQVGRKPTMKWSTIDRWPTH
Bovino	HTAPHKYIIGFRYVHPLTEEAIEEMERDGLERAIAFTQYPQYSCSTTGSLSLNAIYRYNEVGRKPTMKWSTIDRWPTH
Ave	QTAPHKYIIGFRYVHPLTEEAIEEMERDGLERAIAFTQYPQYSCSTTGSLSLNAIYRYNKKGKKPKMKWSIIDRWPTH
Xenopus	ATAPHKYIIGFRYVHPLTEEAIEEMERDGLERAIAFTQYPQYSCSTTGSLSLNAIYRYNAKGTQPKMKWSIIDRWPTH
Pez	DTAPHKYIIGFRYVHPLTEEAIEEMERDGLERAIAFTQYPQYSCSTTGSLSLNAIYRYNSRADRPKMKWSIIDRWPTH
Hámster	PLLIQCFADHILKELDHFPPEKRREVVILFSAHSLPMSVVNRGDPYPQEVGATVHKVMEELGYPNPNYRLVWQSKVGPV
Ratón	PLLIQCFADHILKELNHPPEKRREVVILFSAHSLPMSVVNRGDPYPQEVGATVHKVMEELGYPNPNYRLVWQSKVGPV
Humano	HLLIQCFADHILKELDHFPPEKRREVVILFSAHSLPMSVVNRGDPYPQEVGATVHKVMEELGYPNPNYRLVWQSKVGPV
Bovino	PLLIQCFADHILKELDHFPPEKRREVVILFSAHSLPMSVVNRGDPYPQEVGATVQVVMKLGYSNPNYRLVWQSKVGPV
Ave	PLLIQCFADHIQKELDFPPEKRREVVILFSAHSLPMSVVNRGDPYPQEVGATVQVVMKLGYSNPNYRLVWQSKVGPV
Xenopus	PLLIQCFADHIQKELDFPPEKRREVVILFSAHSLPMSVVNRGDPYPQEVGATVQVVMKLGYSNPNYRLVWQSKVGPV
Pez	PLLIQCFADHILKELDHFPPEKRREVVILFSAHSLPMSVVNRGDPYPQEVGATVQVVMKLGYSNPNYRLVWQSKVGPV
Hámster	PWLGQPTDEAIKGLCERGRKNI LLVPIAFTSDHIETLYELDIEYSQVLAQKCGAENIRRAESLNGNPLFSKALADLVY
Ratón	PWLGQPTDEAIKGLCERGRKNI LLVPIAFTSDHIETLYELDIEYSQVLAQKCGAENIRRAESLNGNPLFSKALADLVH
Humano	PWLGQPTDES IKGLQGRGKNI LLVPIAFTSDHIETLYELDIEYSQVLAQKCGAENIRRAESLNGNPLFSKALADLVH
Bovino	PWLGQPTDEAIKGLCERGRKNI LLVPIAFTSDHIETLYELDIEYSQVLAQKCGAENIRRAESLNGNPLFSKALADLVH
Ave	PWLVQPTDET IKGLQGRGKNI LLVPIAFTSDHIETLYELDIEYSQVLAQKCGAENIRRAESLNGNPLFSKALADLVH
Xenopus	AWLGQPTDES IKGLQGRGKNI LLVPIAFTSDHIETLYELDIEYSQVLAQKCGAENIRRAESLNGNPLFSKALADLVH
Pez	AWLGQPTDEV IKGLQGRGKNI LLVPIAFTSDHIETLYELDIEYSQVLAQKCGAENIRRAESLNGNPLFSKALADLVH
Hámster	SHIQSNKLCSTQLTLCPLCVNVPVCRETKSFFTSQQL-
Ratón	SHIQSNKLCSTQLS LNCPLCVNVPVCRKTKSFFTSQQL-
Humano	SHIQSNELCSKQLTLCPLCVNVPVCRETKSFFTSQQL-
Bovino	SHLQSKERCSTQLTLCPLCVNVPVCRETKSFFTSQQL-
Ave	SHIQSNEICSKQLTLCPLCVNVPVCRETKSFFTSQQL-
Xenopus	SHMKSEICSKQLS LRCPLCVNVPVCGEAKSFFTKQQQ
Pez	SHLQSNESCSRQLTLCPLCVNVPVCAQTKAFFSSQQL-

Fig 13. Análisis comparativo entre la secuencia deducida de amino ácidos para la FQ del hámster y las FQs descritas para el grupo vertebrata, las letras azules indican los sitios de homología (<http://clustalw.genome.ad.jp/>). Los asteriscos indican las cisteínas asociadas al grupo [2Fe-2S].

Mediante la secuencia deducida de amino ácidos de la FQ del hámster y el uso de programas para identificar y predecir las secuencias de señalización (Nielsen & cols., 1997; Nielsen & Krogh, 1998; Bendtsen & cols., 2004), se identificó a partir de la estructura primaria de amino ácidos de la FQ la secuencia denominada péptido señal, ubicada en la región NH₂-terminal (Fig 14 a). La secuencia topogénica de la FQ del hámster presentó características comunes a un péptido señal como: 1) la presencia de una región con amino ácidos cargados positivamente, 2) seguido por una región hidrofóbica y 3) una región polar COOH-terminal. Adicionalmente los resultados indicaron una probabilidad del 94% para la predicción del péptido señal de la FQ del hámster (Fig 14 b).

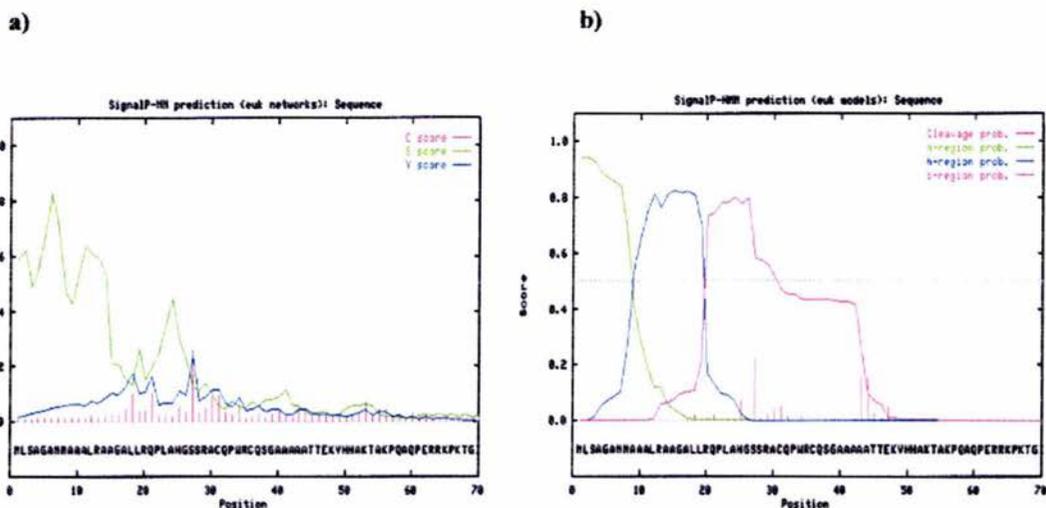


Fig 14. Análisis para identificar y predecir secuencias péptido señal en los primeros 70 amino ácidos de la FQ de hámster. a) El resultado en rojo (C score) indica la probabilidad del sitio de rompimiento del péptido señal, el resultado en verde (S score) indica si pertenece o no pertenece a un péptido señal y el resultado en azul (Y score) indica una combinación de resultados entre el score C y S. b) El resultado en verde (n-region prob) indica la región NH₂-terminal cargada positivamente, el resultado en azul (h-region prob) indica la región central hidrofóbica y el resultado en rojo (c-region prob) indica el sitio de rompimiento (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

Los resultados del análisis por Northern blot demostraron la presencia de un único transcrito con un tamaño esperado de 2.1 kb, la expresión del RNAm de la FQ se observó principalmente en el hígado, sin embargo la expresión no fue detectada en la glándula Harderiana (Fig 15).

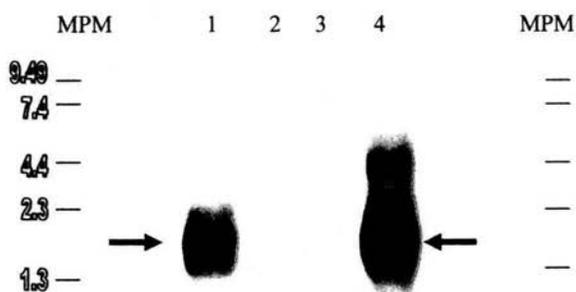


Fig 15. Análisis por Northern blot de la expresión de la FQ de hígado (muestra 1 y 4), glándula Harderiana de macho (muestra 2) y glándula Harderiana de hembra (muestra 3), las muestras fueron comparadas con un marcador de peso molecular para RNA de 0.24 a 9.5 kb (MPM). Se utilizaron 20 μ g de RNA total por muestra.

La expresión del gen de la FQ se pudo detectar en otros tejidos mediante Southern blot, de muestras obtenidas por RT-PCR. Este método fue más sensible, ya que además del hígado, se observó expresión del gen en tejidos como el pulmón, glándula suprarrenal y glándula Harderiana (Fig 16).

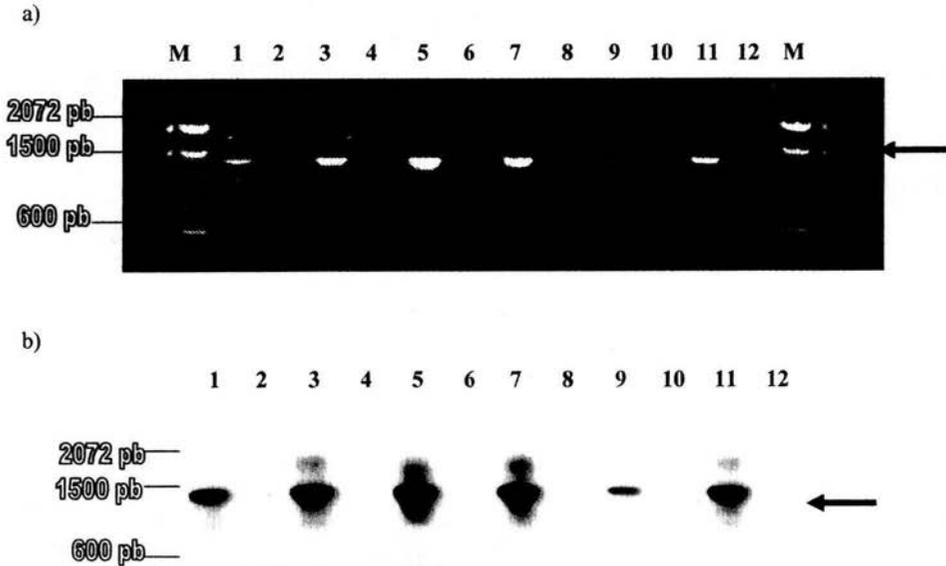


Fig 16. Análisis por RT-PCR y Southern blot de la FQ del hámster. a) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a partir de hígado de macho (muestra 1 y 2) y de hembra (muestra 3 y 4), glándula Harderiana de macho (muestra 5 y 6) y de hembra (muestra 7 y 8), glándula suprarrenal (muestra 9 y 10) y pulmón (muestra 11 y 12). b) Los productos de PCR fueron analizados por Southern blot utilizando una sonda marcada con ^{32}P para la FQ. Las muestras 2, 4, 6, 8, 10 y 12 indican los controles negativos utilizados. M: escalera de DNA de 100 pb.

Adicionalmente, la expresión génica fue analizada mediante RT-PCR en hígado y glándula Harderiana en función a las variaciones hormonales del ciclo estral. Los resultados demostraron la existencia de variaciones en la expresión de la FQ glandular en función al sexo, en donde los machos (intactos y castrados) presentaron mayores niveles de RNAm que la hembra. Asimismo, se observaron variaciones en la glándula Harderiana durante el ciclo estral; en el estro se presentaron los niveles más altos de expresión del RNAm de la FQ (Fig 17a). Estas diferencias no fueron observadas en el hígado (Fig 17b). Para estandarizar los resultados, se amplificó una porción del gen de ciclofilina (450 pb) de cada cDNA de los diferentes tejidos.

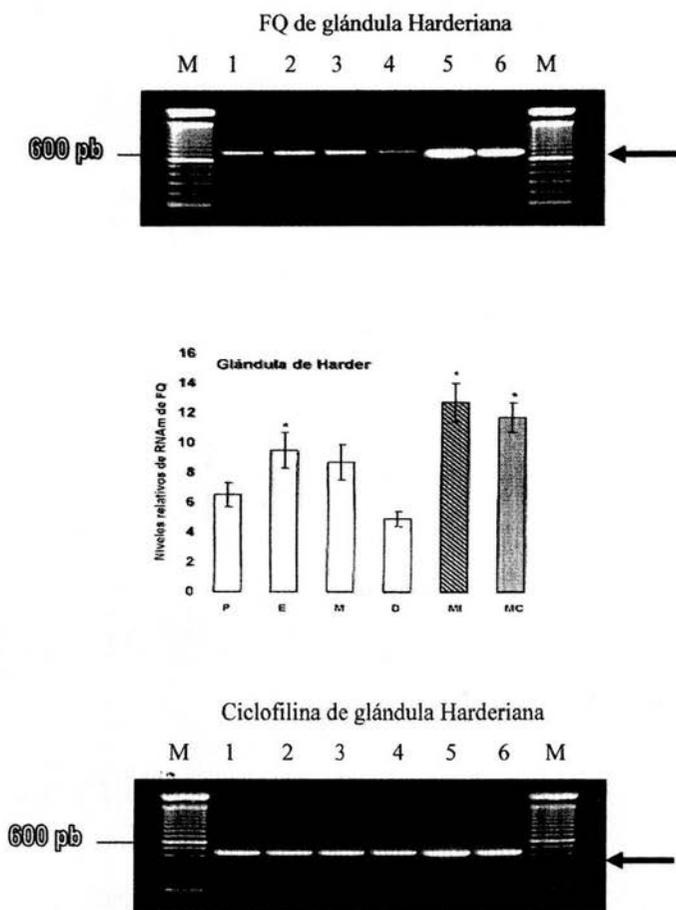


Fig 17a. Niveles de expresión de RNAm de ferroquelatasa (FQ) en glándula Harderiana de hámster. El cDNA glandular obtenido en las diferentes fases del ciclo estral: proestro (1), estro (2), metaestro (3) y diestro (4); de macho intacto (5) y macho castrado (6) fue usado para amplificar transcritos específicos de FQ y ciclofilina. La normalización de la densidad óptica relativa de los productos de RT-PCR de FQ (753 pb) y ciclofilina (450 pb) se muestran en el panel central. Los geles son representativos de un experimento y las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se determinaron usando el análisis de varianza de Kruskal-Wallis. La talla de los productos de RT-PCR fue calculada usando una escalera de DNA (M) de 100 pb (Flecha).

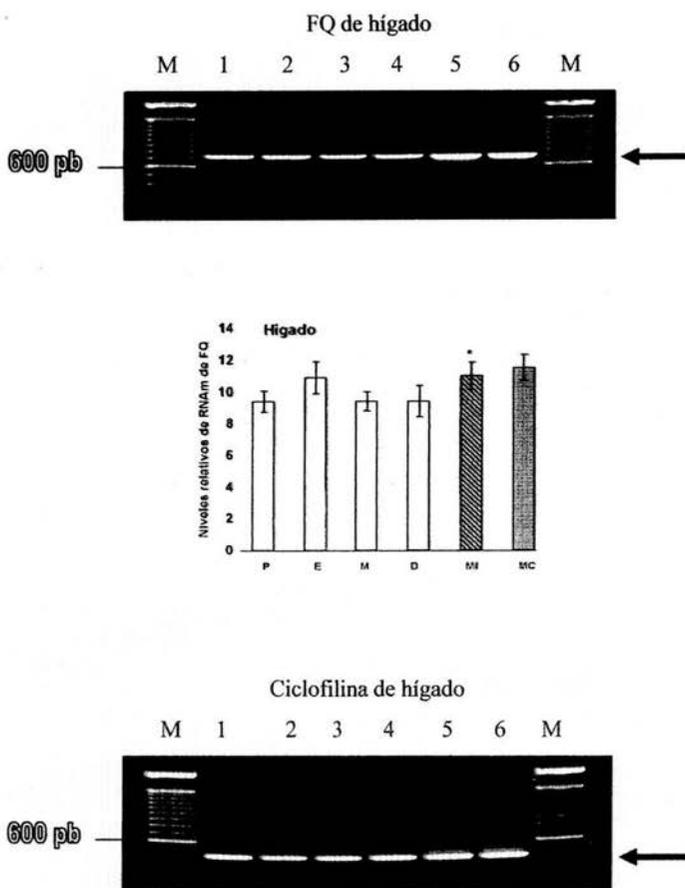


Fig 17b. Niveles de expresión de RNAm de ferroquelatasa (FQ) en hígado de hámster. El cDNA glandular obtenido en las diferentes fases del ciclo estral: proestro (1), estro (2), metaestro (3) y diestro (4); de macho intacto (5) y macho castrado (6) fue usado para amplificar transcritos específicos de FQ y ciclofilina. La normalización de la densidad óptica relativa de los productos de RT-PCR de FQ (753 pb) y ciclofilina (450 pb) se muestran en el panel central. Los geles son representativos de un experimento y las barras representan la media \pm desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se determinaron usando el análisis de varianza de Kruskal-Wallis. La talla de los productos de RT-PCR fue calculada usando una escalera de DNA (M) de 100 pb (Flecha).

DISCUSIÓN

La biosíntesis de porfirinas es una ruta muy importante debido a la formación del anillo tetrapirrólico hemo, un grupo prostético para varias hemoproteínas que cumple funciones vitales en la fisiología de los mamíferos como: el almacenaje y transporte del oxígeno (hemoglobina y mioglobina), generación de energía celular (citocromo a, b, y c), formación de ciertas hormonas esteroideas (citocromo P450) y algunas reacciones de reducción y desintoxicación (peroxidasa y catalasa). El anillo tetrapirrólico se encuentra presente no solo en varias hemoproteínas, sino también en la clorofila de plantas verdes. La biosíntesis de una molécula de hemo requiere 8 moléculas de glicina y 8 moléculas de succinil coenzima A e involucra la presencia de 4 enzimas localizadas en la mitocondria y 4 enzimas localizadas en el citoplasma. La enzima limitante para la bioformación de hemo es denominada ferroquelatasa, esta enzima cataliza la inserción del ión Fe^{2+} en la protoporfirina IX, con la liberación de dos protones (Dailey, 2001). Como la mayoría de las proteínas mitocondriales, la FQ es codificada por un gen nuclear, sintetizada en el citosol y subsecuentemente importada a la membrana mitocondrial interna. Esta enzima, ha sido caracterizada en su secuencia de nucleótidos y amino ácidos a partir de diversas especies eucariontes (*Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Bos taurus*, *Homo sapiens*) y procariontes (*Thermoplasma acidophilum*, *Caulobacter crescentus*, *Mycobacterium tuberculosis*).

Convencionalmente, se ha mencionado que el hígado es el biosintetizador primario de hemo y en un porcentaje muy alto esta molécula es utilizada para su incorporación en isoenzimas denominadas citocromos P450; sin embargo, existen informes de la presencia de actividad porfirinogénica en fibroblastos, linfocitos y en la glándula Harderiana de roedores.

En la actualidad existen evidencias para la formación de porfirinas *de novo* en la glándula Harderiana del hámster. Se ha observado que la concentración de porfirinas y la actividad porfirinogénica presenta un dimorfismo sexual, que varía en respuesta a cambios hormonales de tipo androgénico y conjuntamente con los estudios informados sobre la localización del receptor para andrógenos en ambos sexos, han sugerido que este dimorfismo sexual es regulado de manera andrógeno-dependiente. No obstante, la presencia de varias hemoproteínas y la gran cantidad de protoporfirina IX en la glándula Harderiana del hámster, hasta ahora no se ha podido demostrar la incorporación del ión Fe^{2+} en la protoporfirina IX en este tejido.

En el presente trabajo se describió la clonación, expresión y regulación de la FQ del hámster Sirio (*Mesocricetus auratus*). La secuencia de nucleótidos y amino ácidos para la FQ presenta un porcentaje de homología alto cuando se comparó con secuencias descritas para especies de vertebrados, lo cual sugiere que es una proteína altamente conservada. Este análisis comparativo, utilizando los bancos de información de secuencias genómicas (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), indicó un grado de homología del 95% con la enzima de *Ratus norvegicus*, 92% con *Mus musculus* (Taketani & cols., 1990), 87% con *Homo sapiens* (Nakahashi & cols., 1990), 85% con *Bos taurus* (Shibuya & cols., 1995), 79% con *Gallus gallus*, 77% con *Xenopus laevis* (Day & cols., 1998) y un 76% con *Danio reiro* (Childs & cols., 2000). El análisis indicó la existencia de variaciones características distintivas para cada enzima y un alto porcentaje de similitud estructural entre las FQs del grupo vertebrata; el alto grado de homología indica que estas enzimas descendieron de una molécula precursora común y de acuerdo al análisis comparativo anterior la similitud más conservada se observó entre las especies del orden rodentia (Fig 13).

No obstante, la presencia de la secuencia consenso (GCCXCCATGG) descrita por Kozak (1991) en la secuencia de nucleótidos de la FQ del hámster (ATG a 7 codones río abajo de la primera metionina de iniciación); y no obstante, la ubicación de un sitio de iniciación traduccional (ATG a 7 codones río abajo de la primera metionina de iniciación) mediante el análisis de identificación y predicción de sitios de iniciación (Pedersen & Nielsen, 1997; http://www.cbs.dtu.dk/services/Net_Start/); la primera metionina de iniciación (Fig 18) fue designada mediante el análisis comparativo con las secuencias de las FQs descritas para *Mus musculus* (Taketani & cols., 1990) y *Homo sapiens* (Nakahashi & cols., 1990). De cualquier manera, las secuencias Kozak para la FQ han sido identificadas en otras especies de vertebrados como *Bos taurus* (Shibuya & cols., 1995), *Gallus gallus* y *Xenopus laevis* (Day & cols., 1998).

<i>Bos taurus</i>	ACCCCGGTCCCGGGCC GGG CTTTCAGTCGGCGCAAAC ATGG GCTG	
<i>Gallus gallus</i>		CCGCCAAC ATGG GCTG
<i>Xenopus</i>	GGAGGACACTAAGGG AATG CTCAGACCTCCACCAAC ATGG GCTG	
<i>Homo sapiens</i>	CGAGGCTGCCAGGCA ATG CGTTCACTCGGCCAAAC ATGG GCTG	
<i>Mus musculus</i>	CCTGGCCGTCCCGGAA ATG CTTTCGGCCAGCGCCAAC ATGG GCTG	
<i>Mesocricetus</i>	CCCTGGCGTCCCGGAA ATG CTTTCGGCCGGCGCCAAC ATGG CCG	
Kozak	GCCXCC ATGG	GCCXCC ATGG

Fig 18. Análisis comparativo de la secuencia nucleotídica alrededor de los sitios de iniciación para la FQ de las diversas especies de vertebrados con la secuencia consenso deducida por Kozak (1991), en donde X representa una adenina (A) o una guanina (G).

Al seleccionar la primera metionina de iniciación para la secuencia de nucleotidos de la FQ del hámster se identificó a su vez la estructura topogénica para el traslado y destino de todas las proteínas (Fig 14), esta estructura ha sido designada por otros autores como el péptido señal (von Heijne, 1986). Diversos trabajos han demostrado, que las proteínas destinadas a la mitocondria típicamente presentan una secuencia topogénica de 10 a 70 residuos de amino ácidos en la parte NH₂-terminal denominada péptido señal, con amino ácidos cargados positivamente, hidrofóbicos y polares (Nielsen & cols., 1997; 1999). Esta pre-secuencia es proteolíticamente eliminada en la matriz mitocondrial por peptidasas (von Heijne, 1986; Brunner & Neupert, 1995; Isaya & Kalousek, 1995) y en diversos reportes la estructura amfilílica ha sido propuesta como señal de localización mitocondrial (Schatz, 1996; Tokatlidis & Schatz, 1999), la cual dirige a la proteína al organelo a través de la membrana mitocondrial interna y externa (Hartl & Neupert, 1990; Baumann & cols., 2002). Considerando la primera metionina de iniciación por análisis comparativo (Fig 18) y considerando las características de la región NH₂-terminal para la FQ del hámster, se observó que la pre-secuencia NH₂-terminal de la FQ es una estructura amfilílica que consta de aproximadamente 60 residuos de amino ácidos, constituida por 4 argininas, 3 histidinas, 2 lisinas y un 47% de amino ácidos hidrofóbicos. Estos amino ácidos localizados después del primer codón de iniciación ATG son definidos como la secuencia péptido señal para la FQ del hámster (Fig 14).

La FQ de animales y de algunos procariontes presentan un grupo [2Fe-2S] que funciona como un grupo prostético para esta enzima, el cual esta asociado a una secuencia consenso de cuatro cisteinas NH₂--Cys-X₂₀₆-Cys-X₂-Cys-X₄-Cys--COOH (en donde X representa cualquier amino ácido y el número pequeño la cantidad de amino ácidos entre cada cisteína) altamente conservadas, tres de ellas localizadas en la región COOH-terminal y la cuarta en la región NH₂-terminal (Ferreira, 1999); no

obstante en bacterias (*Caulobacter* y *Mycobacterium*) esta secuencia presenta una disposición diferente en la ubicación de las cisteínas (C-X₁₇₀-C-X₆-C-X-C) (Dailey & Dailey, 2002). En la secuencia de residuos de amino ácidos para la FQ del hámster se identificó y se caracterizó la disposición estructural consenso de las cuatro cisteínas ligadas al grupo [2Fe-2S] ubicadas en la posición 195, 402, 405 y 410 (Fig 12), esta estructura se ha reportado para una amplia diversidad de especies animales incluyendo eucariontes unicelulares (Dailey & Dailey, 2002). Los resultados demuestran, conjuntamente con los reportes anteriores, una importancia estructural del conjunto [2Fe-2S] que se originó durante la evolución de los animales, aunque hasta el momento la función vital del grupo [2Fe-2S] en la FQ aun no es definida.

La secuencia de la FQ descrita en este trabajo, presenta una señal de poliadenilación AATAAA la cual ha sido descrita en una gran cantidad de secuencias; estos resultados han sugerido que esta señal de poliadenilación es una región evolutivamente conservada (Proudfoot & Brownlee, 1976).

La determinación de la expresión génica mediante Northern blot para la FQ se ha descrito únicamente en dos trabajos y se ha localizado la presencia de dos transcritos a partir de células de eritroleucemia y hepatoma de humano (Nakahashi & cols., 1990), hígado (Brenner & Frasier, 1991) y células de eritroleucemia de ratón (Taketani & cols., 1990). En estos trabajos los autores justifican la presencia de dos transcritos debido a la posible utilización de dos sitios alternos de poliadenilación en la región 3' no traducida del RNAm. Los resultados en este trabajo mostraron que mediante la hibridación del RNA se mostró un único transcrito de 2.1 kb para la FQ del hámster a partir de tejido hepático, mientras que no se observó una señal en la glándula Harderiana (Fig 15); este resultado se generó debido a la utilización de una sola señal de poliadenilación ubicada a 817 pb del codón de terminación TGA para la secuencia nucleotídica de la FQ descrita en este trabajo. Adicionalmente, se demuestra que en el hámster, la expresión genica de FQ es más elevada en el hígado, esto debido a los altos requerimientos de hemo como grupo prostético.

Al determinar que la FQ se expresaba en hígado, se analizó con precisión y detalle la expresión génica utilizando RT-PCR y Southern blot en diversos tejidos y en ambos estudios se encontró que existía la expresión de un transcrito de aproximadamente 1300 pb en hígado, en la glándula suprarrenal, en el pulmón y en la glándula Harderiana de hembra y macho del hámster (Fig 16). De estos resultados se sugiere y concluye lo siguiente:

1) Las hormonas esteroideas sintetizadas en la glándula suprarrenal utilizan citocromos P450 para su formación (CYP11B1, CYP2, CYP17, CYP11A1, CYP11B2), esta variedad de enzimas utilizan hemo continuamente para catalizar reacciones que participan en la esteroidogénesis de mineralocorticoides, glucocorticoides y andrógenos de la corteza suprarrenal (Keegan & Hammer, 2002). Así mismo, una amplia variedad de citocromos P450 (CYP1A1, CYP3A5, CYP2B6/7) expresados en diferentes tipos celulares del pulmón participan en la hidroxilación y metabolismo de compuestos xenobióticos (Hukkanen & cols., 2002; Ding & Kaminsky, 2003) y se ha observado que la toxicidad de estos compuestos inducen la actividad localizada de varios citocromos P450 (Raunio & cols., 1998, 1999), además se ha detectado en el pulmón la expresión del RNAm de diversos genes, CYP11A1 (Vilchis & cols., 2002), CYP11B1 (Denner & cols., 1995) y CYP11B2 (Wu & cols., 1999), los cuales son utilizados para la producción de aldosterona en este tejido; por consiguiente se sugiere que en la glándula suprarrenal y en el pulmón la biosíntesis de hemo debe ser generada como una respuesta tisular inmediata y local. Otro aspecto importante en la biología de hemo y las hemoproteínas es su catabolismo hacia los pigmentos biliares biliverdina y bilirrubina. La etapa limitante en la formación de bilirubina requiere de la enzima hemo oxigenasa y se ha reportado que esta enzima es expresada con gran actividad específica en el pulmón como un antioxidante (Dennery & cols., 2003).

2) En la glándula Harderiana del hámster se ha localizado la expresión de varias hemoproteínas como el citocromo P450_{scc} y la proteína de 156-kDa específica de la glándula Harderiana del macho (Vilchis & cols., 1996, 2002) y no obstante, la gran cantidad de protoporfirina IX localizada en este tejido hasta este momento no se había detectado la incorporación del Fe^{2+} , a partir de estas observaciones y de nuestros resultados se concluye que la glándula Harderiana tiene la capacidad de sintetizar hemo a partir de protoporfirina IX aunque se observó que la expresión de FQ estaba muy abatida, por lo que se sugiere que bajo ciertas condiciones medio ambientales o fisiológicas se estimula la formación inmediata de hemo en la glándula Harderiana.

El análisis de los resultados obtenidos en estos tejidos (glándula suprarrenal, pulmón y glándula Harderiana) que demuestran expresión de FQ, indican que la formación del grupo prostético hemo debe estar continuamente disponible para las reacciones que catalizan las hemoproteínas, y que bajo ciertas condiciones se puede estimular la formación de hemo en respuesta inmediata y localizada tisularmente, en respuesta a estimulaciones medio ambientales y/o variaciones fisiológicas. El resultado en este trabajo de actividad porfirinogénica en la glándula suprarrenal es apoyado por la detección de actividad de ALA sintetasa en este tejido, la enzima que controla la etapa inicial en la

formación de hemo (Kappas & Sassa, 1995). A pesar de que en este estudio se detectó la expresión de FQ en el pulmón; hasta este momento, no se ha reportado la actividad de otras enzimas involucradas en la síntesis de hemo en este tejido.

No obstante, la expresión de FQ en la glándula Harderiana por RT-PCR, este resultado no fue el esperado ya que no se encontró un dimorfismo sexual en este tejido como se presenta para las demás enzimas porfirinogénicas y además existe la expresión de la FQ en ambos sexos (Fig 17), aunque se ignora la actividad en la que está actuando, por lo que se sugiere que existe un mecanismo regulador sobre la expresión de FQ que permita la sobreproducción de protoporfirinas y en especial la protoporfirina IX.

En conclusión, se describió la secuencia nucleotídica del cDNA total que codifica para la FQ del hámster Sirio y se describió la estructura primaria a través de la secuencia deducida de amino ácidos. Además de esto se detectó por primera vez la expresión de la FQ en el pulmón, glándula Harderiana, suprarrenal e hígado mediante RT-PCR/Southern blot y en este estudio se pudo detectar únicamente mediante Northern blot en el hígado y muy ligeramente en la Harderiana. Esta expresión tejido-específica demuestra la capacidad local y probablemente inmediata de sintetizar hemo y expresar actividad de FQ bajo ciertas condiciones fisiológicas. En base a los niveles de expresión del RNAm, se puede concluir que la ferroquelatasa Harderiana juega un papel activo para mantener la poza fisiológica de hemo requerido para el procesamiento de los citocromos y otras hemoproteínas glandulares.

REFERENCIAS

- Arakane F, Kallen CB, Watari H, Foster JA, Sepuri NBV, Pain D, Stayrook SE, Lewis M, Gerton GL & Strauss JF III (1998) The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* **273**: 16339-16345.
- Bardin CW & Catterall JF (1981) Testosterone: A major determinant of extragenital sexual dimorphism. *Science* **211**: 1285-1294.
- Baumann F, Neupert W & Herrmann JM (2002) Insertion of bitopic membrane proteins into the inner membrane of mitochondria involves an export step from the matrix. *J Biol Chem* **277**: 21405-21413.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G & Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783-795.
- Bloomer JR (1998) Liver metabolism of porphyrins and haem. *J Gastroenterol Hepatol* **13**: 324-329.
- Bottomley & Muller-Eberhard (1988) Pathophysiology of heme synthesis. *Semin Hematol* **25**: 282-302.
- Brenner DA & Frasier F (1991) Cloning of murine ferrochelatase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 849-853.
- Brunner M & Neupert W (1995) Purification and characterization of mitochondrial processing peptidase of *Neurospora crassa*. *Methods Enzimol* **248**: 717-728.
- Bucana CD & Nadakavucaren MJ (1972) Innervation of the hamster Harderian gland. *Science* **175**: 205-206.
- Burns RB & Maxwell MH (1979) The structure of the Harderian and lacrimal gland ducts of the turkey, fowl and duck. A light microscope study. *J Anat* **128**: 285-292.
- Burns RB (1992) The harderian gland in birds: histology and immunology In "Harderian glands: Porphyrin metabolism, behavioral and endocrine effects". (S.M. Webb, R.A. Hoffman, M.L. Puig-Domingo, and R.J. Reiter, eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp 155-163.
- Camadro J-M, Ibrahim NG & Levere RD (1984) Kinetic studies of human liver ferrochelatase. *J Biol Chem* **259**: 5678-5682.
- Camadro J-M & Labbe P (1988) Purification and properties of ferrochelatase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **263**: 11675-11682.
- Chieffi G, Baccari GC, Di Matteo L, D'Istria M, Marmorino C, Minucci S & Varriale B (1992) The harderian gland of amphibians and reptiles In "Harderian glands: Porphyrin metabolism, behavioral and endocrine effects". (S.M. Webb, R.A. Hoffman, M.L. Puig-Domingo, and R.J. Reiter, eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp 91-108.

Childs S, Weinstein BM, Mohideen MA, Donohue S, Bonkovsky H & Fishman MC (2000) Zebrafish *dracula* encodes ferrochelatase and its mutation provides a model for erythropoietic protoporphyria. **Curr Biol** 10: 1001-1004.

Christenson LK & Strauss JF 3rd (2001) Steroidogenic acute regulatory protein: An update on its regulation and mechanism of action. **Arch Med Res** 32: 576-586.

Chung B-C, Matteson KJ, Voutilainen R, Mohandas TK & Miller WL (1986) Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450_{scc}: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. **Proc Natl Acad Sci USA** 83: 8962-8966.

Chung B-C, Picado-Leonard J, Haniu M, Bienkowski M, Hall PF, Shively JE & Miller WL (1987) Cytochrome P450_{c17} (steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase): Cloning of human adrenal and testis cDNA indicates the same gene is expressed in both tissues. **Proc Natl Acad Sci USA** 84: 407-411.

Clabough JW & Norvell JE (1973) Effects of castration, blinding, and the pineal gland on the Harderian glands of the male golden hamster. **Neuroendocrinology** 12: 344-353.

Dailey HA (1982) Purification and characterization of membrane-bound ferrochelatase from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. **J Biol Chem** 257: 14714-14718.

Dailey HA (2001) Terminal steps of haem biosynthesis. **Biochem Soc Trans** 30: 590-595.

Dailey TA & Dailey HA (2002) Identification of [2Fe-2S] clusters in microbial ferrochelatases. **J Bacteriol** 184: 2460-2464.

Dailey HA & Fleming JE (1983) Bovine ferrochelatase. **J Biol Chem** 258: 11453-11459.

Dailey HA & Fleming JE (1986) The role of arginyl residues in porphyrin binding to ferrochelatase. **J Biol Chem** 261: 7902-7905.

Dailey HA, Jones CS & Karr SW (1989) Interaction of free porphyrins and metalloporphyrins with mouse ferrochelatase. A model for the active site of ferrochelatase. **Biochim Biophys Acta** 999: 7-11.

Dailey HA, Finnegan MG & Johnson MK (1994) Human ferrochelatase is an iron-sulfur protein. **Biochemistry** 33: 403-407.

Dailey HA, Dailey TA, Wu C-K, Medlock AE, Wang K-F, Rose JP & Wang B-C (2000) Ferrochelatase at the millennium: structures, mechanisms and [2Fe-2S] clusters. **Cell Mol Life Sci** 57: 1909-1926.

Day AL, Parsons BM & Dailey HA (1998) Cloning and characterization of *Gallus* and *Xenopus* ferrochelatases: Presence of the [2Fe-2S] cluster in nonmammalian ferrochelatase. **Arch Biochem Biophys** 359: 160-169.

Denner K, Vigel R, Schmalix W, Doehmer J & Bernhardt R (1995) Cloning and stable expression of the human mitochondrial cytochrome P450_{11B1} cDNA in V79 chinese hamster cells and their application for testing of potential inhibitors. **Pharmacogenetics** 5: 89-96.

Dennery PA, Lee CS, Ford BS, Weng YH, Yang g & Rodgers PA (2003) Developmental expression of heme oxygenase in the rat lung. **Pediatr Res** 53: 42-47.

Deybach J-C & Puy H (1995) Porphobilinogen deaminase gene structure and molecular defects. **J Bioenerg Biomembr** 27: 197-206.

Ding X & Kaminsky LS (2003) Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 43: 149-173.

Ebling FJ, Ebling E, Randall V & Sjinner J (1975) The effects of hypophysectomy and of bovine growth hormone on the responses to testosterone of prostate, preputial, harderian and lachrymal glands and of brown adipose tissue in the rat. **J Endocr** 66: 401-406.

Elder GH & Roberts AG (1995) Uroporphyrinogen decarboxylase. **J Bioenerg Biomembr** 27: 207-214.

Ferreira GC, Franco R, Lloyd SG, Pereira AS, Moura I, Moura JJ & Huynh BH (1994) Mammalian ferrochelatase, a new addition to the metalloenzyme family. **J Biol Chem** 269: 7062-7065.

Ferreira GC (1995) Heme biosynthesis: Biochemistry, molecular biology and relationship to disease. **J Bioenerg Biomembr** 27: 147-150.

Ferreira GC, Franco R, Lloyd SG, Moura I, Moura JGG & Huynh BH (1995) Structure and function of ferrochelatase. **J Bioenerg Biomembr** 27: 221-229.

Ferreira GC & Gong J (1995) 5-Aminolevulinate synthase and the first step of heme biosynthesis. **J Bioenerg Biomembr** 27: 151-160.

Ferreira GC (1999) Ferrochelatase. **Int J Biochem Cell Biol** 31: 995-1000.

Frairia R, Fortunati N, Revelli A, Guidetti D, Cavaglia S & Massobrio M (1994) Binding of sex steroid binding protein to plasma membranes of human testis. **J Steroid Biochem Molec Biol** 51: 319-322.

Franco R, Ma J-G, Lu Y, Ferreira GC & Shelnett JA (2000) Porphyrin interactions with wild-type and mutant mouse ferrochelatase. **Biochemistry** 39: 2517-2529.

Frohman MA, Dush MK & Martin GR (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. **Proc Natl Acad Sci USA** 85: 8998-9002.

Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW & Andersson S (1994) Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3. **Nature Genet** 7: 34-39.

- Gioeli D, Ficarro SB, Kwiek JJ, Aaronson D, Hancock M, Catling AD, White FM, Christian RE, Settlage RE, Shabanowitz J, Hunt DF & Weber MJ (2002) Androgen receptor phosphorylation. **J Biol Chem** 277: 29304-29314.
- Gouya L, Puy H, Lamoril J, Da Silva V, Grandchamp B, Nordmann Y & Deybach J-C (1999) Inheritance in erythropoietic protoporphyria: A common wild-type ferrochelatase allelic variant with low expression accounts for clinical manifestation. **Blood** 93: 2105-2110.
- Grandchamp B, Lamoril J & Puy H (1995) Molecular abnormalities of coproporphyrinogen oxidase in patients with hereditary coproporphyria. **J Bioenerg Biomembr** 27: 215-238.
- Grandchamp B & Nordmann Y (1988) Enzymes of the heme biosynthesis pathway: Recent advances in molecular genetics. **Semin Hematol** 25: 303-311.
- Haile DJ (1999) Regulation of genes of iron metabolism by the iron-response proteins. **Am J Med Sci** 318: 230-240.
- Hansson M & Hederstedt L (1994) Purification and characterisation of a water-soluble ferrochelatase from *Bacillus subtilis*. **Eur J Biochem** 220: 201-208.
- Hanukoglu I (1992) Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. **J Steroid Biochem Molec Biol** 43: 779-804.
- Harder JJ (1694) *Glandula nova lachrymalis una cum ductu excretorio in cervis et damis*. **Acta erudit Publ Lipsiae** 49-52.
- Hartl F-U & Neupert (1990) Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. **Science** 247: 930-938.
- Haseltine FP & Ohno S (1981) Mechanisms of gonadal differentiation. **Science** 211: 1272-1278.
- Hoffman RA (1971) Influence of some endocrine glands, hormones and blinding on the histology and porphyrins of the Harderian glands of golden hamsters. **Am J Anat** 132: 463-478.
- Hoffman RA & Jones JW (1981) Concentrations of metals in the Harderian glands of male and female hamsters. **Comp Biochem Physiol** 69: 153-156.
- Hughes IA (2001) Minireview: Sex differentiation. **Endocrinology** 142: 3281-3287.
- Huhtala A, Huikuri KT, Palkama A & Tervo T (1977) Innervation of the rat Harderian gland by adrenergic and cholinergic nerve fibre. **Anat Rec** 188: 263-272.
- Hukkanen J, Pelkonen O, Hakkola J & Raunio H (2002) Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. **Cri Rev Toxicol** 32: 391-411.
- Isaya G & Kalousek F (1995) Mitochondrial intermediate peptidase. **Methods Enzimol** 248: 556-567.
- Jaffe EK (1995) Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. **J Bioenerg Biomembr** 27: 169-180.

Johnston HS, McGadey J, Thompson GG, Moore MR & Payne AP (1983) The Harderian gland, its secretory duct and porphyrin content in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **J Anat** 137: 615-630.

Johnston HS, McGadey J, Thompson GG, Moore MR, Breed WG & Payne AP (1985) The Harderian gland, its secretory duct and porphyrin content in the plains mouse (*Pseudomys australis*). **J Anat** 140: 337-350.

Johnston HS, McGadey J, Payne AP, Thompson GG & Moore MR (1987) The harderian gland, its secretory duct and porphyrin content in the house (*Apodemus sylvaticus*). **J Anat** 153: 17-30.

Jones MS & Jones OTG (1968) Evidence for the location of ferrochelatase on the inner membrane of rat liver mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun** 31: 977-983.

Kappas A & Sassa S (1995) The porphyrins In: The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th edit Scriver CR and Beaudet AL eds McGraw-Hill 2103-2159.

Karr SR & Dailey HA (1988) The synthesis of murine ferrochelatase in vitro and in vivo. **Biochem J** 254: 799-803.

Keegan CE & Hammer GD (2002) Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. **Trends Endocrinol Metab** 13: 200-208.

Kemppainen JA, Lane MV, Sar M & Wilson EM (1992) Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. **J Biol Chem** 267: 968-974.

Kennedy GY (1970) Harderoporphyrin: A new porphyrin from the Harderian glands of the rat. **Comp Biochem Physiol** 36: 21-36.

Kozak M (1991) An analysis of vertebrate mRNA sequences: Intimations of translational control. **J Cell Biol** 115: 887-903.

Kvetnoy IM (1999) Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. **Histochem J** 31: 1-12.

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, Kemppainen JA & Wilson EM (1998) Intermolecular NH₂-/Carboxyl-terminal interactions in androgen receptor dimerization reveals by mutations that cause androgen insensitivity. **J Biol Chem** 273: 92-101.

Lin W-L & Nadakavukaren MJ (1981) Harderian gland lipids of male and female golden hamster. **Comp Biochem Physiol** 70B: 627-630.

Lin W-L & Nadakavukaren MJ (1982) δ -Aminolevulinate synthase activity in the Harderian glands of male and female golden hamster. **Comp Biochem Physiol** 71B: 539-540.

- Magness ST, Tugores A & Brenner DA (2000) Analysis of ferrochelatase expression during hematopoietic development of embryonic stem cell. **Blood** **95**: 3568-3577.
- Marr FA, Shah SW, McGadey J, Moore MR, Houston T & Payne AP (1995) The effects of bromocriptine and prolactin on porphyrin biosynthesis in the Harderian gland of the male hamster, *Mesocricetus auratus*. **J Comp Physiol B** **164**: 524-529.
- Mathews-Roth MM, Drouin GL & Duffy L (1987) Isolation of human ferrochelatase. **Arch Dermatol** **123**: 429-430.
- Medlock AE & Dailey HA (2000) Examination of the activity of carboxyl-terminal chimeric constructs of human and yeast ferrochelatases. **Biochemistry** **39**: 7461-7467.
- Menendez-Pelaez A & Buzzell GR (1992) Harderian gland indoles. In "Harderian glands: Porphyrin metabolism, behavioral and endocrine effects". (S.M. Webb, R.A. Hoffman, M.L. Puig-Domingo, and R.J. Reiter, eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp 219-234.
- Milgrom LR (1997) The colours of life. An introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds. Oxford, NY.
- Moore MR (1980) The biochemistry of the porphyrins. **Clin Haematol** **9**: 227-252.
- Moore MR (1993) Biochemistry of porphyria. **Int J Biochem** **25**: 1353-1368.
- Nakahashi Y, Taketani S, Okuda M, Inoue K & Tokunaga R (1990) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human ferrochelatase. **Biochem Biophys Res Commun** **173**: 748-755.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S & von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Engineer** **10**: 1-6.
- Nielsen H & Krogh (1998) Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6), AAAI Press, Menlo Park, California, pp 122-130.
- Nielsen H, Brunak S & von Heijne G (1999) Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. **Protein Engineer** **12**: 3-9.
- Norvell JE & Clabough JW (1972) Adrenergic and cholinergic innervation of the Hamster harderian gland. **Science** **178**: 1102-1103.
- Olcese J & Wesche A (1989) The Harderian gland. **Comp Biochem Physiol** **93**: 655-665.
- Omura T & Morohashi K-I (1995) Gene regulation of steroidogenesis. **J Steroid Biochem Molec Biol** **53**: 19-25.
- Payne AP, McGadey J, Moore MR & Thompson GG (1975) The effects of androgen manipulation on cell types and porphyrin content of the Harderian gland in the male golden hamster. **J Anat** **120**: 615-616.

- Payne AP (1977) Pheromonal effects of harderian gland homogenates on aggressive behaviour in the hamster. **J Endocr** 73: 191-192.
- Payne AP, McGadey J, Moore MR & Thompson (1977) Androgenic control of the Harderian gland in the male golden hamster. **J Endocr** 75: 73-82.
- Payne AP, McGadey J, Johnston HS, Moore MR & Thompson GG (1982) Mast cells in the hamster Harderian gland: sex differences, hormonal control and relationship to porphyrin. **J Anat** 135: 451-461.
- Payne AP, McGadey J & Johnston HS (1992) The structure of the harderian gland of the golden hamster In "Harderian glands: Porphyrin metabolism, Behavioral and endocrine effects" (ed. S.M. Webb, RA Hoffman, M.L. Puig-Domingo & R.J. Reiter) Berlin: Springer-Verlag, pp 53-67.
- Payne AP (1994) The Harderian gland: a tercentennial review. **J Anat** 185: 1-49.
- Pedersen AG & Nielsen H (1997) Neural Network prediction of translation initiation sites in eukaryotes: perspectives for EST and genome analysis. **ISMB** 5: 226-233.
- Piper WN (1988) Role of heme in endocrine function. **Semin Hematol** 25: 330-335.
- Ponka P (1997) Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanism in erythroid cells. **Blood** 89: 1-25.
- Ponka P (1999) Cell biology of heme. **Am J Med Sci** 318: 241-256.
- Ponka P, Sheftel AD & Zhang A-S (2001) Iron targeting to mitochondria in erythroid cells. **Biochem Soc Trans** 30: 735-738.
- Prasad ARK & Dailey HA (1995) Effect of cellular location on the function of ferrochelatase. **J Biol Chem** 270: 18198-18200.
- Pratt WB & Toft DO (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. **Endocr Rev** 18: 306-360.
- Proudfoot NJ & Brownlee GG (1976) 3' Non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. **Nature** 263: 211-214.
- Raunio H, Hakkola J, Hukkanen J, Pelkonen O, Edwards R, Boobis A & Anttila S (1998) Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human pulmonary tissues. **Arch Toxicol** 20: 465-469.
- Raunio H, Hakkola J, Hukkanen J, Lassila A, Paivarinta K, Pelkonen O & Anttila S (1999) Expression of xenobiotic-metabolizing CYPs in human pulmonary tissue. **Exp Toxicol Pathol** 51: 412-417.
- Reiter RJ & Klein DC (1971) Observations on the pineal gland, Harderian gland, the retina and the reproductive organs of adult female rats exposed to continuous light. **J Endocr** 51: 117-125.

- Rodriguez C, Menendez-Pelaez A, Vaughan MK & Reiter RJ (1993) Gender-associated differences in the development of 5-aminolevulinic synthase gene expression in the Harderian gland of syrian hamster. **Mol Cell Endocrinol** 93: 167-173.
- Ruepp A, Graml W, Santos-Martinez ML, Koretke KK, Vloker C, Mewes HW, Frishman D, Stocker S, Lupas AN & Baumeister W (2000) The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. **Nature** 407: 503-513.
- Rüfenacht UB, Gouya L, Schneider-Yin X, Puy H, Schäfer BW, Aquaron R, Nordmann Y, Minder E & Deybach J-C (1998) Systematic analysis of molecular defects in the ferrochelatase gene from patients with erythropoietic protoporphyria. **Am J Hum Genet** 62: 1341-1352.
- Sakai T & Yohro T (1981) A histological study of the Harderian gland of mongolian gerbils, *Meriones meridianus*. **Anat Rec** 200: 259-270.
- Sassa S (1988) Heme stimulation of cellular growth and differentiation. **Semin Hematol** 25: 312-320.
- Schacter BA (1988) Heme catabolism by heme oxygenase: Physiology, regulation and mechanism of action. **Semin Hematol** 25: 349-369.
- Schatz G (1996) The protein import system of mitochondria. **J Biol Chem** 271: 31763-31766.
- Sellers VM, Johnson MK & Dailey HA (1996) Function of the [2Fe-2S] cluster in mammalian ferrochelatase: A possible role as a nitric oxide sensor. **Biochemistry** 35: 2699-2704.
- Sellers VM, Wang K-F, Johnson MK & Dailey HA (1998) Evidence that the fourth ligand to the [2Fe-2S] cluster in animal ferrochelatase is a cysteine. **J Biol Chem** 273: 22311-22316.
- Shibahara K (1988) Regulation of heme oxygenase gene expression. **Semin Hematol** 25: 370-376.
- Shibuya H, Nonneman D, Tamassia M, Allphin OL & Johnson GS (1995) The coding sequence of the bovine ferrochelatase gene. **Biochim Biophys Acta** 1231: 117-120.
- Shirama K, Furuya T, Takeo Y, Shimizu K & Maekawa K (1981) Influences of some endocrine glands and of hormone replacement on the porphyrins of the Harderian glands of mice. **J Endocrinol** 91: 305-311.
- Shirama K, Harada T, Kohda M & Hokano M (1988) Fine structure of melanocytes and macrophages in the Harderian gland of the mouse. **Acta Anat** 131: 192-199.
- Shoolingin-Jordan PM (1995) Porphobilinogen deaminase and Uroporphyrinogen III synthase: Structure, Molecular, Biology and Mechanism. **J Bioenerg Biomembr** 27: 181-196.
- Simpson E, Lauber M, Demeter M, Stirling D, Rodgers R, Means G, Mahendroo M, Kilgore M, Mendelson C & Waterman M (1991) Regulation of expression of the genes encoding steroidogenic enzymes. **J Steroid Biochem Molec Biol** 40: 45-52.
- Smith DF & Toft DO (1993) Steroid receptors and their associated proteins. **Mol Endocrinol** 7: 4-11.

Smith AG, Santana MA, Wallace-Cook ADM, Roper JM & Labbe-Bois R (1994) Isolation of a cDNA encoding chloroplast ferrochelatase from *Arabidopsis thaliana* by functional complementation of a yeast mutant. **J Biol Chem** 269: 13405-13413.

Spike RC, Johnston HS, McGadey J, Moore MR, Thompson GG & Payne AP (1985) Quantitative studies on the effects of hormones on the structure and porphyrin biosynthesis in the Harderian gland of the female golden hamster. I. The effects of ovariectomy and androgen administration. **J Anat** 142: 59-72.

Spike RC, Johnston HS, McGadey J, Moore MR, Thompson GG & Payne AP (1986) Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the Harderian gland of the female golden hamster. II. The time course of changes after ovariectomy. **J Anat** 145: 67-77.

Spike RC, Payne AP, Thompson GG & Moore MR (1990) High-performance liquid chromatographic analysis of porphyrins in hamster Harderian glands. **Biochem Biophys Acta** 1034: 1-3.

Spike RC, Payne AP & Moore MR (1992) Porphyrins and their possible significance. In "Harderian glands: Porphyrin metabolism, Behavioral and endocrine effects" (ed. S.M. Webb, RA Hoffman, M.L. Puig-Domingo & R.J. Reiter) Berlin: Springer-Verlag, pp165-193.

Sun CY & Nadakavukaren (1980) Effect of testosterone on the female hamster Harderian gland pigmentation and ultrastructure. **Cell Tiss Res** 207: 511-517.

Taketani S & Tokunaga R (1981) Rat liver ferrochelatase. Purification, properties and stimulation by fatty acids. **J Biol Chem** 256: 12748-12753.

Taketani S, Nakahashi Y, Osumi T & Tokunaga R (1990) Molecular cloning, sequencing, and expression of mouse ferrochelatase. **J Biol Chem** 265: 19377-19380.

Taketani S & Fujita H (1995) The ferrochelatase gene structure and molecular defects associated with erythropoietic protoporphyria. **J Bioenerg Biomembr** 27: 231-238.

Taketani S, Adachi Y & Nakahashi Y (2000) Regulation of the expression of human ferrochelatase by intracellular iron levels. **Eur J Biochem** 267: 4685-4692.

Thompson GG, Hordovatz X, Moore MR, McGadey J & Payne AP (1984) Sex differences in haem biosynthesis and porphyrin content in the Harderian gland of the golden hamster. **Int J Biochem** 16: 849-852.

Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Res** 22: 4673-4680.

Tokatlidis K & Schatz G (1999) Biogenesis of mitochondrial inner membrane proteins. **J Biol Chem** 274: 35285-35288.

Tomio JM & Grinstein M (1968) Porphyrin biosynthesis. Biosynthesis of protoporphyrin IX in Harderian glands. **Eur J Biochem** 6: 80-83.

Tomio JM, Tuzman V & Grinstein M (1968) δ -Aminolevulinatase from rat Harderian gland. **Eur J Biochem** 6: 84-87.

Tugores A, Magness ST & Brenner DA (1994) A single promoter directs both housekeeping and erythroid preferential expression of the human ferrochelatase gene. **J Biol Chem** 269: 30789-30797.

Vilchis F, Hernández A, Pérez AE & Pérez-Palacios (1987) Hormone regulation of the rodent Harderian gland: binding properties of the androgen receptor in the male golden hamster. **J endocrinol** 112: 3-8.

Vilchis F & Pérez-Palacios G (1989) Steroid hormone receptors and the sexual phenotype of the Harderian gland in hamsters. **J Endocr** 121: 149-156.

Vilchis F, Chávez B & Pérez-Palacios G (1991) Steroid hormone binding in the Harderian gland of birds: Characteristics of the androgen, estrogen, and progesterone receptors of *Anas platyrhynchos* and *Gallus domesticus*. **Gen Comp Endocr** 82: 425-433.

Vilchis F, Chávez B, Cerbón MA & Pérez-Palacios G (1992) The Harderian gland as a target for steroid hormone action: Role and characteristics of intracellular receptor. In "Harderian glands: Porphyrin metabolism, behavioral and endocrine effects" (S.M. Webb, R.A. Hoffman, M.L. Puig-Domingo, and R.J. Reiter, eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp 297-316.

Vilchis F, Enriquez J, Queipo G, Pérez-Palacios G & Chávez B (1994) Steroid 5α -Reductase activity in the Harderian glands of male and female syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). **Gen Comp Endocr** 96: 298-308.

Vilchis F, Damsky R, Heuze Y, Enriquez J & Chávez B (1996) Identification and androgen regulation of a 156-kDa hemeprotein in the Harderian gland of the syrian hamster. **Gen Comp Endocrinol** 101: 297-303.

Vilchis F, Chávez B, Larrea F, Timossi C & Montiel F (2002) The cDNA cloning and tissue expression of the cytochrome P450scc from Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). **Gen Comp Endocrinol** 126: 279-286.

von Heijne G (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. **Embo J** 5: 1335-1342.

Webb SM, Puig-Domingo M, Viader M, Mato E & Peinado M-A (1992) Harderian gland peptides. In "Harderian glands: Porphyrin metabolism, behavioral and endocrine effects" (S.M. Webb, R.A. Hoffman, M.L. Puig-Domingo, and R.J. Reiter, eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp 235-243.

Wetterberg L, Geller E & Yuwiler A (1970) Harderian gland: an extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats?. **Science** 167: 884-885.

Wight PAL, Burns RB, Rothwell B & Mackenzie GM (1971) The Harderian gland of the domestic fowl. Histology, with reference to the genesis of plasma cells and russell bodies. **J Anat** 110: 307-315.

Wilson JD (1999) The role of androgens in male gender role behavior. **Endocr Rev** 20: 726-737.

Wilson JD, George FW & Griffin JE (1981) The hormonal control of sexual development. **Science** **211**: 1278-1284.

Wong CI, Zhou ZX, 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.

Wu C-K, Dailey HA, Rose JP, Burden A, Sellers VM & Wang B-C (2001) The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. **Nature Struct Biol** **8**: 156-160.

Wu P, Liang X, Dai Y, Liu H, Zang Y, Guo Z, Zhang R, Lai W, Zhang Y & Liu Y (1999) Aldosterone biosynthesis in extraadrenal tissues. **Chin Med J** **112**: 414-418.