



11261

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

2/
2es.

ESTUDIO DE LAS VARIANTES POLIMORFICAS DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA GLOBULINA TRANSPORTADORA DE HORMONAS SEXUALES HUMANA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS, AREA DE FISILOGIA PRESENTA LA BIOLOGA: CECILIA CARINO MORALES

MEXICO, D. F.

257845

1998.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biología de la Reproducción, del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán; bajo la tutoría del Dr. Fernando Larrea Gallo.

Agradecimientos

Al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, por las facilidades proporcionadas para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Fernando Larrea Gallo por su apoyo y confianza que hicieron posible la realización de esta tesis.

Al Arq. Jorge Campuzano Reyes-Retana por la ayuda prestada en el manejo del material gráfico.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
Secuencia del cDNA y características estructurales	2
Glicosilación y polimorfismos en SHBG	4
Dominios funcionales	5
Estructura y regulación del gen	8
Estructura y transcripción	8
Regulación hormonal	9
Expresión en otros tejidos y durante el desarrollo	11
Papel fisiológico	12
Acarreador de esteroides	12
Funciones nuevas	13
Participación clínica	14
II. ANTECEDENTES	16
III. OBJETIVOS	19
IV. MATERIAL Y MÉTODO	20
Reactivos	20
Extracción de DNA	20
Amplificación de secuencias codificantes por PCR	21
Análisis por electroforesis en geles con gradiente desnaturizante (DGGE)	22
Análisis de secuencia	23
Cromatografía en concanavalina A	23
Ensayos de unión de SHBG a DHT	23
Análisis de proteínas por Western blot	23
V. RESULTADOS	25
Amplificación de fragmentos por PCR	25
Análisis del gen de SHBG en heterocigotos por DGGE	26
Identificación de la mutación puntual en el exon 8	27
Caracterización del peso molecular de la proteína por Western blot	30
Cromatografía en concanavalina A	32
VI. DISCUSIÓN	34
VII. CONCLUSIONES	43
VIII. BIBLIOGRAFÍA	44

INTRODUCCIÓN

Durante muchos años se especuló acerca de la existencia de proteínas transportadoras de esteroides sexuales, hasta que Mercier-Bodard en 1966 descubrió una proteína en la fracción de las β -globulinas que unía a andrógenos y estrógenos con alta afinidad. Esta proteína fue llamada β -globulina acarreadora de esteroides (SBBG), proteína acarreadora de esteroides sexuales (SBP) o globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG). Posteriormente se observó que esta proteína era producida y secretada por hepatocitos en cultivo (Khan *et al*, 1981), y con el descubrimiento de su RNAm en hígado se corroboró que la proteína era sintetizada en ese órgano (Gershagen *et al*, 1987b; Que y Petra, 1987; Hammond *et al*, 1987). Por otra parte, estudiando el receptor de andrógenos, se encontró una proteína con esta actividad en testículo y epidídimo de rata (Ritzén *et al*, 1971, 1973; Blaquier, 1971), sin embargo, se demostró que esta nueva proteína no tenía las propiedades fisicoquímicas del receptor, que era sintetizada en el testículo y transportada al epidídimo (French y Ritzén, 1971; Danzo *et al*, 1974, 1977) y se le llamó proteína acarreadora de andrógenos (ABP). Posteriormente se demostró que las células de Sertoli del epitelio del túbulo seminífero eran el sitio de síntesis y secreción de ABP (Tindall *et al*, 1974).

Pronto fue obvio que SHBG y ABP se encontraban fuertemente relacionadas. A partir de la utilización de columnas de afinidad (Renoir y Mercier-Bodard, 1974; Rosner y Smith, 1975) se pudo purificar SHBG a partir de plasma, al igual que ABP de rata por medio de cromatografía de afinidad (Musto *et al*, 1980). A partir de este momento, se demostró que las dos proteínas compartían diversas características fisicoquímicas. La prueba de que eran en realidad la misma proteína, vino de la determinación de la secuencia de aminoácidos de SHBG humana y del cDNA de ABP de rata. La comparación entre estas dos proteínas de especies diferentes descubrió que tenían secuencias de

aminoácidos similares, y compartían el 68% de los 373 residuos que las forman (Petra *et al* 1986a; Joseph *et al*, 1986).

Respecto a su afinidad por esteroides sexuales, hay varios hechos interesantes, como la variación en la especificidad a esteroides entre diversas especies estudiadas (dihidrotestosterona o DHT>testosterona o T>estradiol o E2). La constante de asociación (Ka) para DHT se encuentra entre 1×10^9 y 1×10^{10} M. Testosterona y estradiol generalmente unen con afinidades menores, pero dentro del orden de DHT. La vida media del complejo DHT-SHBG en el ser humano es de aproximadamente 30-60 minutos, a diferencia de ABP de rata, que es de 5-6 minutos. (Hsu y Troen, 1978; Namkung *et al*, 1989).

SECUENCIA DEL cDNA Y CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

Se ha avanzado mucho en el estudio de la estructura del gen de ABP/SHBG gracias a varios estudios de clonación del cDNA, en los cuales se han encontrado pruebas de que al igual que rABP, la SHBG humana se produce en el hígado fetal (Hammond *et al*, 1987; Gershagen *et al*, 1987b; Que y Petra, 1978). En estos trabajos se comprobó que hABP y hSHBG provienen del mismo gen, el cual codifica para una secuencia de 373 aminoácidos que representan 40,509 Da, y presenta un péptido señal de 29 aminoácidos (Hammond *et al*, 1989; Gershagen *et al*, 1989).

La secuencia del gen de ABP/SHBG codifica para cuatro residuos de cisteína (Cys) en las posiciones 164, 188, 333 y 361 que forman dos puentes disulfuro en la proteína madura. Las características estructurales filogenéticamente conservadas de la molécula de SHBG incluyen las cuatro cisteínas que componen los puentes disulfuro intramoleculares y el dominio probable de unión al receptor en los residuos 48-57 (Avvakumov *et al*, 1988; Khan *et al*, 1990). Otros residuos conservados son los que forman un sitio potencial de glicosilación en el residuo de asparagina (Asn) 367. En SHBG/ABP del ser humano se presenta además un sitio de glicosilación de treonina (Thr) en el aminoácido 7. Por medio de experimentos de mutagénesis dirigida, se ha

demostrado la importancia de estas estructuras en la función (Joseph y Lawrence, 1993), ya que se ha visto que la eliminación de las dos cadenas de oligosacáridos en Asn 351 y 367 provoca una disminución de la capacidad de las células para secretar SHBG. Esto es independiente del carbohidrato ligado a O en posición 7, y al menos es necesaria una de las dos cadenas en N para la producción de la proteína, y la secreción por células COS (Bocchinfuso *et al*, 1992). Estos residuos de Cys se encuentran conservados en proteínas homólogas a ABP/SHBG como laminina y proteína S. Esta conservación de residuos en proteínas lejanas apoya la importancia del mantenimiento de la conformación adecuada para la actividad biológica de la proteína. La zona con menor similitud entre las dos proteínas es entre los residuos 132-138, cercanos al sitio de unión al esteroide. Otro aspecto importante en la estructura de la proteína es su composición de aminoácidos. A este respecto, se ha visto que ABP de rata presenta una estructura muy hidrofóbica, con 20% de residuos de leucina en el extremo carboxilo terminal, al igual que SHBG/ABP humana (Feldman *et al*, 1981). Esto sugiere su relación con la formación del sitio de unión del ligando hidrofóbico.

Una vez lograda la purificación de ABP y SHBG, se demostró que bajo condiciones desnaturalizantes que esta proteína consiste de dos componentes, uno pesado y otro ligero (Larrea *et al*, 1981a,b; Khan *et al*, 1985) que se encuentran en proporción de 3:1 (ABP) y 10:1 (SHBG). Al realizar el mapeo de péptidos de cada componente de la proteína se vio que éstos eran casi idénticos, lo que indica diferencias muy pequeñas en la estructura primaria o en el contenido de los carbohidratos (Susuki y Sinohara, 1984). Posteriormente se demostró que las diferencias en los componentes de ABP de rata y SHBG del ser humano se deben a la glicosilación diferencial de las subunidades de acuerdo con el órgano en que son producidas. Ya que la deglicosilación enzimática o química elimina los oligosacáridos ligados a N y a O, dá lugar a un solo componente con un peso molecular que concuerda con la eliminación de dos o tres cadenas de oligosacáridos, es decir, que los protómeros de SHBG humana, de 52 y 48 kDa,

se convierten en una sola especie electroforética de 42 kDa. (Danzo *et al*, 1988, 1989a, b).

GLICOSILACION Y POLIMORFISMOS EN SHBG

Desde 1991 (Danzo *et al*, 1991b) se observó que la ABP de rata y SHBG del ser humano son proteínas glicosiladas y que la molécula de SHBG contiene dos cadenas de oligosacáridos biantenarias ligadas a N en residuos de asparagina, además de una cadena ligada a O, unida a treonina (Avvakumov *et al*, 1983; Danzo y Black, 1990a). Por medio de cromatografía seriada en lectinas se demostró que la ABP de rata tiene mayor porcentaje de cadenas triantenarias y menos biantenarias que SHBG humana (Danzo y Black, 1990b). Además la ABP en suero de rata originada en testículo parece diferir en peso molecular y contenido de carbohidratos de ABP del epidídimo (Danzo *et al*, 1987), pero su deglicosilación origina un producto del mismo tamaño (Danzo y Bell, 1988). Esta heterogeneidad en ABP/SHBG se debe a la glicosilación diferencial de ambos sitios potenciales en la cadena polipeptídica, lo cual se observa en sistemas de SDS-PAGE donde se demuestran dos bandas que representan los dos monómeros de ABP/SHBG, que contiene una o dos cadenas de oligosacáridos ligados a N. Por medio de mutagénesis dirigida, se ha comprobado que la heterogeneidad de ABP/SHBG se debe a la glicosilación diferencial de asparagina en ambos sitios potenciales, y la sustitución de uno de estos dos residuos provoca cambios en el peso molecular de la proteína (Joseph *et al*. 1992a; Bocchinfuso *et al*, 1992).

Por medio de isoelectroenfoque o por SDS-PAGE se han identificado variantes electroforéticas de SHBG humana en varios laboratorios (Luckcock y Cavalli-Sforza, 1983; Gershagen, 1987a; Larrea, 1990; Van Baelen, 1992). Al parecer en cada estudio se ha identificado la misma variante, y a pesar de que existen variaciones en la distribución entre las poblaciones (Van Baelen, 1992) en todas las familias la herencia es por transmisión de tipo mendeliano. En geles de SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes los componentes de la proteína

variante migran a 56, 52 y 48 kDa en lugar de los de 52 y 48 kDa normales, y dado que estas dos subunidades tienen secuencia de aminoácidos idéntica, se ha sugerido que una cadena de carbohidratos adicional podría provocar el incremento de masa en la variante, originando subunidades con una, dos o tres cadenas de oligosacáridos ligados a N.

DOMINIOS FUNCIONALES

La ABP/SHBG tiene tres dominios funcionales: una región de unión al esteroide, una secuencia que interactúa con el receptor de membrana, y la secuencia involucrada en la interacción entre las subunidades o dimerización.

Se ha intentado identificar la región exacta de unión al esteroide, implicando varias regiones entre el residuo 134 y el extremo carboxilo. Esta secuencia involucra una región que formaría una bolsa hidrofóbica cercana al extremo carboxilo terminal (Hammond *et al*, 1987; Petra *et al*, 1988; Grenot *et al*, 1988, 1992; Khan y Rosner, 1990; Danzo *et al*, 1991a). Probablemente los residuos 134-139 hacen contacto con el anillo AB del ligando, ya que los cambios en estos aminoácidos provocan alteraciones en la afinidad por estradiol, y la sustitución de la metionina 139 resulta en un decremento en la afinidad a DHT y otros ligandos. Esto no ocurre en el sitio carboxilo terminal inmediato a la Met 139, donde no hay efecto en la unión al esteroide. En otros estudios, al analizar la unión de una proteína recombinante que comprende únicamente los primeros 205 aminoácidos, se demostró que la actividad de unión al esteroide se encuentra en el extremo aminoterminal de la molécula, lo que permite afirmar que todos los elementos estructurales necesarios para la alta afinidad y unión del esteroide están localizados dentro de la mitad N-terminal de la molécula de SHBG.

Respecto al dominio de unión al receptor, se ha identificado un fragmento de 10 residuos que compete por el receptor de próstata con SHBG marcada. Estos residuos van del aminoácido 48 al 57. Mientras que ABP/SHBG de rata y humano comparten el 68% de identidad en los aminoácidos, la secuencia de este decámero es idéntica en ambas especies, y las secuencias cercanas son mucho

más conservadas que en toda la secuencia. Esta homología está también parcialmente conservada en proteínas como laminina y proteína S, lo que sugiere que pudieran tener receptores comunes (Baker *et al*, 1987; Joseph y Baker, 1987).

Durante el decenio pasado aparecieron numerosos informes sobre la interacción de la SHBG con las membranas plasmáticas celulares de tejidos dependientes de esteroides, tales como próstata humana, placenta, endometrio y líneas celulares de cáncer mamario (Hryb *et al*, 1985; Krupenko *et al*, 1990; Strel'chyonok *et al*, 1984; Porto *et al*, 1991, 1992): A pesar de que los receptores de membrana de alta afinidad para SHBG han sido identificados, los efectos biológicos y la afinidad de estas interacciones parecen variar dependiendo del tipo celular y el tejido estudiado, además del estado de ocupación del sitio de unión al esteroide de SHBG (Hryb *et al*, 1990). Los sucesos bioquímicos iniciados por la unión de SHBG a membrana aparentemente tienen un papel activo en la modulación de la activación de los esteroides en los tejidos blanco. Existe una gran cantidad de estudios que muestran que ABP y SHBG se unen a proteínas de membrana en tejidos blanco, tales como próstata de ser humano (Hryb *et al*, 1985, 1989; Rosner, 1990), decidua de endometrio humano (Avvakumov *et al*, 1990) y membranas de placenta (Krupenko *et al*, 1990).

En años recientes, se ha caracterizado el receptor de SHBG en otros tejidos sensibles a estrógenos, como células MCF-7 (línea de cáncer mamario), endometrio premenopáusico, tejido mamario o hígado humanos (Fortunati *et al*, 1991, 1992 a,b, 1993; Frairia *et al*, 1991, 1992). En general los esteroides inhiben la unión de SHBG a las membranas a pesar de que los efectos de las hormonas esteroides en la unión son dependientes de sus concentraciones. Si éstas son fisiológicas, el receptor soluble no reconoce el complejo estradiol-SHBG, pero unido a membrana puede interactuar con este complejo y con SHBG libre, pero no con complejos andrógeno-SHBG. Estas proteínas receptoras presentan propiedades de unión típicas de los receptores de membrana y se ha visto que la interacción de SHBG con las membranas parece estar mediada por transducción

de señales. Se ha calculado un peso de 174 kDa para receptor de testículo y de próstata (Hryb *et al*, 1989; Porto *et al*, 1992) el cual presenta dos sitios de unión dependientes de pH, uno de alta y otro de baja afinidad.

La presencia de esteroides (DHT, testosterona y estradiol) aumenta la afinidad en el sitio de alta afinidad, y el estradiol lo incrementa en el sitio de baja afinidad. Por otra parte, en 1989, Avvakumov demostró que las cadenas de carbohidratos son importantes en la unión a membranas, ya que a pesar de que la desialización de la proteína no influye en la unión al esteroide, causa la pérdida completa de la capacidad de unir específicamente a membranas de endometrio. Sin embargo, no se conoce mucho acerca de la función de estas proteínas membranales de unión en procesos fisiológicos, ni el proceso de transducción que se realiza.

Se conoce muy poco respecto al mecanismo de asociación de las subunidades, cada uno de los monómeros presenta un dominio de dimerización que participa en las interacciones entre ellos. Se sabe que existen dos puentes disulfuro intramoleculares entre cada monómero, y que las dos subunidades se encuentran no covalentemente unidas. Es probable que los monómeros se asocien durante la síntesis de forma cotraduccional, o se pliegan de manera independiente y entonces dimerizan. La unión de las cadenas de oligosacáridos en cada uno de estos casos, puede ser necesaria para la finalización del estado plegado final, y no se ha determinado la orientación de los monómeros respecto uno del otro (Walsh *et al*, 1986).

Se ha demostrado que la SHBG nativa puede ser parcialmente renaturalizada en presencia de DHT, y esto permite inferir que los ligandos esteroides contribuyen al plegamiento y dimerización de la proteína (Casali *et al*, 1990). Se sabe que la SHBG purificada sufre una pérdida rápida e irreversible de su capacidad de unión a esteroides y que el Ca^{+2} y DHT previenen parcialmente esta pérdida (Rosner *et al*, 1974) ayudando a conservar la integridad del dominio de unión al esteroide y potenciando la estabilidad del dímero. El esteroide podría funcionar como un molde conformacional que ayudara a los dos monómeros a

dimerizar durante la síntesis. Debido a que no se ha podido demostrar que los monómeros en forma independiente pueden unir al esteroide se asume que la unión al esteroide y la dimerización son procesos que se encuentran ligados. Se ha propuesto un modelo en el cual la molécula de esteroide se encuentra entre las dos subunidades (Petra *et al*, 1986a, 1991), es decir, un sitio de unión por dímero, pero también existe otro modelo en el que cada monómero une una molécula de DHT (Strel'chyonok *et al*, 1983). A pesar de que el dominio de dimerización no ha sido identificado, se ha postulado una región que contiene una serie de leucinas entre los residuos 267-281 en SHBG para esta función (Petra *et al*, 1991). Probablemente los dominios de dimerización y unión al esteroide se encuentren íntimamente asociados y sobrelapados, lo que explicaría el porqué los esteroides aumentan la asociación de dímeros, además de que supondría que el esteroide residiera entre las dos subunidades (Hammond *et al*, 1995).

ESTRUCTURA Y REGULACION DEL GEN

Estructura y transcripción

A la fecha se han mapeado los genes ABP/SHBG del ser humano, rata y ratón; cada especie contiene un solo gen (Joseph *et al*, 1991; Sullivan *et al*, 1991), y se sabe que el gen de ABP/SHBG humano se localiza en el cromosoma 17 (región p12-p13). Esta región es un sitio de recombinación genética, amplificación génica e integración de genomas externos (Berubé *et al*, 1990). Las regiones codificantes de los genes del ser humano y de rata consisten en ocho exones separados por intrones inusualmente pequeños. Cada sitio de corte que flanquea los exones 1-8, posee secuencias donadoras yceptoras de corte y empalme muy conservadas en ambas especies. Estos sitios de corte se encuentran también conservados en el gen de la proteína S, lo que apoya la teoría del origen a partir del mismo gen ancestral (Joseph *et al*, 1988; Hammond *et al*, 1989; Gershagen *et al*, 1989, 1991).

Hasta ahora no se ha logrado identificar el sitio de iniciación de la transcripción, ya que no existe ningún elemento de secuencia TATA, y las

secuencias anteriores al codón de iniciación de traducción (Met) no permiten identificarlo. Algunos lo localizan a 36 pb antes del codón de iniciación (Joseph *et al*, 1988; Sullivan *et al*, 1993), sin embargo no puede decirse que no exista algún exon no codificante anterior. Lo único claro es que el sitio de iniciación de la transcripción se encuentra dentro de los 1.5 kb anteriores al codón de iniciación (Reventos *et al*, 1993): Al comparar las regiones 5' de los genes de ABP/SHBG de la rata (Joseph *et al*, 1988) y del ser humano (Hammond *et al*, 1989) se observó una región aproximadamente de 600 pb antes del codón de iniciación Met (residuos en rata 897-1504, y en ser humano 2097-2642) de secuencia homóloga. Se ha supuesto que esta región contiene los más importantes elementos reguladores y secuencias relacionadas, como en la rata que existe una secuencia TATA modificada (TACCTA) la cual inicia la transcripción en SV40 (Brady *et al*, 1982) por medio de TFIID (proteína de unión a TATA).

Las secuencias más interesantes son probablemente las que regulan la expresión específica en cada tejido. El gen humano de la SHBG contiene una secuencia potenciadora específico de hígado en la región del promotor (Hammond *et al*, 1989) la cual no está presente en la rata, lo que explicaría la falta de expresión de este gen en el hígado de rata adulta. También se ha encontrado una secuencia potenciadora en células de Sertoli en ser humano y rata, a la cual se unen proteínas nucleares, haciendo posible que sea el potenciador en estas células.

Otro aspecto interesante en relación con la estructura de este gen, es que toda la región es extremadamente pequeña, de solamente 3 kb de DNA incluyendo los siete intrones, los cuales en su mayoría son sólo de 200-400 pb. Existen además elementos repetitivos en los intrones y en la región 5' de sitio de inicio de la transcripción, lo que podría regular el corte y empalme del RNA, facilitando la formación del RNAm.

Regulación hormonal

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que FSH y testosterona están involucradas en la regulación de la producción de ABP por células de Sertoli

(Hansson *et al*, 1973, 1976; Vernon *et al*, 1972; Elkington *et al*, 1977). La hipofisectomía para eliminar la fuente de FSH y los requerimientos hormonales (LH) de testosterona por células de Leydig, origina una declinación de la secreción de ABP testicular y del epidídimo, mientras que el tratamiento con FSH o testosterona la reinicia. Por medio de estudios con antagonistas de GnRH para suprimir la función testicular (Danzo *et al*, 1990), se concluyó que los andrógenos son los reguladores primarios de la producción de ABP y el transporte al epidídimo. Los efectos de FSH parecen ser realizados por un mecanismo diferente, probablemente facilitando el desarrollo estructural del túbulo seminífero. Estos hallazgos fueron confirmados posteriormente (Hall *et al*, 1986; Reventos *et al*, 1988), al demostrar que el nivel de RNAm de ABP testicular en ratas hipofisectomizadas permanece alto con la administración de FSH o testosterona, y decrece sin esta administración. En células de Sertoli en cultivo, la FSH y AMPc incrementaron la producción y secreción de ABP (Dorrington *et al*, 1975; Wright *et al*, 1981). Los mecanismos de regulación podrían ser a nivel génico, o por otra parte, no mediado por elementos de respuesta a AMPc (CRE), sino por factores paracrin regulados por andrógenos (Skinner y Fritz, 1985).

Existen varios trabajos sobre los efectos hormonales en el nivel sérico de SHBG (Anderson, 1974; Lobl, 1981; Vermeulen, 1988; Rosner, 1990) en los que se implican andrógenos, estrógenos y hormonas tiroideas. Muchos estudios han encontrado que la SHBG aumenta con estrógenos y hormonas tiroideas mientras que disminuye con andrógenos. En el recién nacido se encuentran cifras bajas de esta proteína (aproximadamente la mitad que en el adulto), seguidas por un incremento hasta concentraciones más o menos altas en uno y otro sexo durante la infancia. En la pubertad disminuyen, sobre todo en varones, seguramente debido a la influencia que los andrógenos testiculares tienen sobre la síntesis de la SHBG (Anderson, 1974). En las mujeres adultas, las concentraciones de SHBG son de casi el doble que en hombres, varían poco durante el ciclo menstrual y aumentan mucho durante el embarazo. En la menopausia disminuyen hasta los niveles encontrados en varones de la misma edad (Wagner, 1978); también se ha

encontrado en suero fetal masculino y femenino además de en líquido amniótico, lo que lleva a suponer que juega un papel fundamental durante el desarrollo fetal (Hammond *et al*, 1983).

En cultivo celular de hepatocitos, los estrógenos y andrógenos generalmente incrementan la SHBG, al igual que las hormonas tiroideas, mientras que insulina y prolactina inhiben su producción (Rosner *et al*, 1984; Mercier-Bodard *et al*, 1989, 1991; Ragatt, 1992).

Expresión en otros tejidos y durante el desarrollo

Se ha demostrado la expresión del gen ABP/SHBG en el cerebro de rata incluida la eminencia media hipotalámica (Wang *et al*, 1990). Se encontró un RNAm de ABP/SHBG de 1.7 kb en todas las regiones estudiadas, mientras que sólo una especie de 2.3 kb se encontró en algunas de ellas. El cerebro expresa el mismo mRNA que el testículo, sin embargo, el grado de actividad de unión a esteroides es poco detectable, y además expresa otra forma con una secuencia N-terminal diferente, identificada en el hígado fetal, la cual parece no unir esteroides (Sullivan *et al*, 1993). También se ha encontrado SHBG inmunorreactiva en otros tejidos blanco como próstata, endometrio y mama (Bordin y Petra, 1980; Mercier-Bodard *et al*, 1987; Sinnecker *et al*, 1988; Larriva-Sahd *et al*, 1991), aunque no se probó que fuera sintetizada por el tejido. En 1993, Larrea encontró pruebas de que la placenta humana es un sitio de expresión del gen de ABP/SHBG. También las hay de la expresión del gen en ovario, debido a las altas cantidades de actividad de SHBG en líquido folicular humano (Ben-Rafael *et al*, 1986), y la expresión del gen en células de la granulosa de ovario de rata.

La edición alternativa del RNA es un proceso asociado con genes importantes en diferenciación (Joseph y Baker, 1992). Los productos de RNAs editados alternativamente tienen acciones antagonistas a la proteína (Yen *et al*, 1991). Estos RNAs han sido descritos en hígado y testículo fetal de rata, y cerebro de rata. Una característica común es la presencia de la región de unión al receptor y la falta de regiones de unión al esteroide. Esto indica propiedades de

unión al receptor de una proteína, sin las propiedades de unión al esteroide, lo que concuerda con la estructura esperada de un antagonista.

La conservación de secuencias en el gen de la proteína ABP/SHBG y sus homólogas podría indicar alguna acción de esta proteína en la diferenciación y el desarrollo al igual que las proteínas análogas. La más estudiada es la laminina, la cual ejerce diversos efectos mediados por receptores de superficie. De igual forma ABP/SHBG, que también se une a receptores de membrana, podría tener actividades en la diferenciación y en el desarrollo. Otro dato que apoya esto es la prueba de la regulación temporal de ABP/SHBG y la edición alternativa del RNAm durante el desarrollo de la rata. El RNAm (1.7 kb) está presente en el hígado fetal de los 15 a 17 días de gestación (Sullivan *et al*, 1991), y la proteína aparece en la circulación (Gunsalus *et al*, 1984). Después de 17 días, las concentraciones séricas comienzan a descender y casi no se encuentran al nacimiento. Esta expresión transitoria coincide con el crecimiento tisular y la diferenciación de los órganos sexuales. Baker e Iles (1985) especularon que SHBG podría funcionar en el embrión como protección para concentraciones excesivas de andrógenos libres.

PAPEL FISIOLÓGICO

Acarreador de esteroides

Hasta hace unos años, se consideraba que sólo los esteroides libres no unidos a SHBG eran los que se encontraban disponibles para ser tomados por las células blanco de los capilares, es decir, que sólo las hormonas libres eran biológicamente activas. En esta teoría, la SHBG tenía el papel de un reservorio de los esteroides, los cuales podían estar a disposición de las células por disociación de la proteína (Mendel, 1989; Rosner, 1990). Sin embargo, surgió otro modelo de acción, que propone una liberación selectiva de los esteroides sexuales a tejidos blanco específicos. En 1982, Lobl sugirió que ABP y SHBG utilizan receptores de superficie para regular la captación del ligando hacia esos tejidos blanco, y en 1984 Strel'chyonok demostró un sistema de reconocimiento de SHBG en

membranas plasmáticas de decidua de endometrio humano. Posteriormente Hryb (1985) propuso algo similar en próstata humana, identificando un receptor de membrana específico para SHBG. Su modelo propone que la entrega del esteroide se realiza por medio de la unión de SHBG con la membrana plasmática. Sólo la SHBG sin ligando puede unirse a la membrana, pero una vez unida al receptor, puede unirse al esteroide. Pardridge (1988a, b) propuso que la reserva de esteroides unidos a SHBG son los disponibles para las células. Parece que una vez unido el complejo esteroide-proteína se internaliza en las células blanco, ya que por inmunohistoquímica se ha demostrado la concentración de SHBG en el borde de las células de endometrio y epitelio del oviducto humano, tejido mamario y próstata de mono (Noé *et al*, 1992).

Funciones nuevas

Antes que la secuencia de aminoácidos de ABP/SHBG fuera descifrada, se esperaba que el dominio de unión a esteroides tendría secuencias similares con otras proteínas de unión a hormonas esteroides, como receptores nucleares y enzimas esteroideogénicas. Por el contrario, se encontró que las similitudes encontradas no eran significativas (Dayhoff *et al*, 1983). Sin embargo, sí se encontraron semejanzas en varias proteínas plasmáticas, de la matriz extracelular y del desarrollo, como la proteína S (factor coagulante) y laminina (de matriz extracelular) (Baker *et al*, 1987; Joseph y Baker, 1992). La secuencia más conservada es la región de unión al receptor de SHBG. Notablemente, los cuatro residuos de cisteína de la molécula de SHBG se encuentran altamente conservados en todas las proteínas. ABP/SHBG está relacionada también con el dominio carboxilo terminal globular de la cadena A de laminina y merosina, las cuales tienen importantes papeles en la proliferación celular, la migración y la diferenciación (Beck *et al*, 1990; Engel, 1989, 1992; Kleinman *et al*, 1993). La mayoría de los dominios de ABP/SHBG homólogos con otras proteínas comparten secuencia con los dominios proteasa-antiproteasa que están asociados con proteínas reguladoras. Parece que los dominios relacionados han evolucionado

de la misma proteína ancestral y podría esperarse que compartieran las mismas propiedades funcionales.

Por otra parte, en ratones transgénicos se ha encontrado que las células germinales y del sistema reproductivo femenino internalizan ABP, probablemente proveniente de células de Sertoli (Gerard *et al*, 1994), y la sobreexpresión en ambos sistemas reproductivos parecen causar problemas de fertilidad (Reventos *et al*, 1993). Los ratones transgénicos homocigotos presentan altos niveles de ABP inmunoreactiva en las células piramidales de la corteza cerebral con función de control motora, lo que sugiere que la sobreexpresión del gen pueda ser causante de algunos desórdenes neurológicos.

Participación clínica

A pesar de que se sabe que los esteroides sexuales tienen influencia en las concentraciones en suero de SHBG, en la actualidad se reconoce que los factores nutricionales pueden ser importantes también en las mujeres, es decir, que las concentraciones de SHBG son inversamente proporcionales con el índice de masa corporal (IMC). Existen pruebas de que la insulina puede ser el mediador hormonal de los cambios de SHBG dependientes del peso ya que las concentraciones de SHBG están en relación inversa con las cantidades de insulina estimuladas por glucosa, y se ha demostrado que la hormona tiene un efecto inhibitorio directo en la síntesis y secreción de SHBG en hepatocitos en cultivo. La importancia clínica de la supresión de SHBG relacionada con el peso se apoya en el descubrimiento de una gran prevalencia de hirsutismo en mujeres obesas con síndrome de ovario poliquístico. Estas mujeres tienen cifras de testosterona normales, pero de SHBG menores, y por tanto, altos niveles de testosterona libre (Botwood *et al*, 1995).

Sin embargo, el problema que existe para aumentar el conocimiento de la función de SHBG, es que no se han localizado mutantes naturales en animales o seres humanos que afecten su función. Esto sugiere que la proteína es extremadamente importante para el desarrollo en mamíferos, lo cual se apoya en la conservación de la secuencia y actividad durante la evolución. Por esto, es de gran importancia

el estudiar las alteraciones de la secuencia de esta proteína, los cuales puedan dar alguna clave para entender mejor el papel fisiológico de la SHBG en el organismo. Este trabajo de tesis estuvo enfocado a estudiar una variante polimórfica de la SHBG, con el fin de obtener mayor conocimiento sobre su función.

ANTECEDENTES

La proteína transportadora de esteroides sexuales (SHBG) se encuentra en el suero del ser humano y algunas especies animales, y se considera como un transportador de hormonas sexuales desde su sitio de síntesis hasta su órgano blanco, sin embargo, todavía no se conocen con certeza sus funciones e importancia real. El mayor problema para el estudio de la función de SHBG es que no existen modelos naturales que tengan afectados algún sistema o actividad metabólica relacionados con la ausencia de esta proteína. Por ello, en nuestro laboratorio se inició una línea de investigación para descubrir la presencia de alguna variación en la estructura de la proteína que ayude a determinar su función. Con este objetivo, se inició un análisis de muestras de suero de individuos adultos, las cuales se trataron con neuraminidasa para eliminar el ácido siálico de las cadenas de oligosacáridos, y de esta forma simplificar los datos obtenidos en isoelectroenfoque (IEF). Posterior al IEF se localizó la presencia de SHBG por medio de un anticuerpo específico.

Con el método anteriormente descrito se investigaron 110 muestras de individuos correspondientes a 55 parejas. Se observaron dos patrones principales que se llamaron 1-1 y 1-2. El primero (con una frecuencia de 0.9773) consistió en dos bandas bien definidas de intensidades iguales, que migraron a puntos de pH de 6.5 y 6.63 respectivamente. El segundo patrón (con frecuencia de 0.0227) consistió en las mismas bandas del primero, además de dos bandas catódicas adicionales con puntos isoeléctricos (pI) de 6.7 y 6.76. Estos datos se observan en la figura 1, que muestra el patrón de bandas obtenidas en isoelectroenfoque de muestras de suero desializadas. En los carriles 1 y 2 se muestra el patrón de bandas 1-1, denominado fenotipo silvestre, y en el carril 3 se muestra el fenotipo variante o patrón 1-2. En la población estudiada por medio de IEF, no fue posible identificar un patrón de una sola banda, ni predilección de sexo. Tampoco se

encontró el patrón 2-2 esperado, consistente en las dos bandas catódicas extra (Larrea *et al*, 1990).

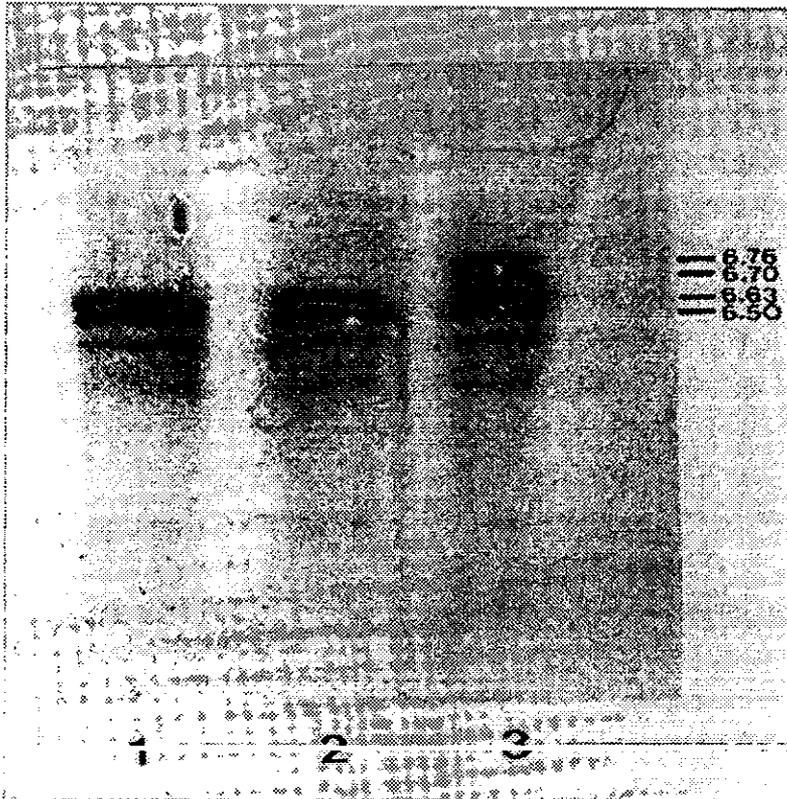


Figura 1

Para obtener mayor información acerca de la forma de transmisión de los dos patrones, se estudiaron a los miembros de la familia de los individuos que presentaban los dos fenotipos. Los resultados de los análisis de segregación

demonstraron que el patrón 1-2 se hereda como un gen autosómico, y parecía concordar con un sistema bialélico codominante con dos alelos (hSHBG-1 y hSHBG-2). Estos resultados se analizaron matemáticamente por medio de la ley de Hardy-Weinberg; no se demostraron diferencias significativas entre los fenotipos esperados y los observados. Nuestro estudio no demostró el patrón 2-2, estimándose la frecuencia génica para el fenotipo SHBG-2 ($q^2=0.0005$) de 1/2000 individuos. Estas observaciones concuerdan con las informadas por Van Baelen (1992), en donde la distribución fenotípica y las frecuencias alélicas de una variante similar a SHBG en varias muestras de poblaciones racialmente diferentes, corresponderían a las encontradas en nuestro laboratorio (Larrea *et al*, 1990).

Para determinar las propiedades y características de unión de los fenotipos de SHBG, se estudiaron las muestras de suero de individuos con los patrones de IEF 1-1 y 1-2 por análisis de saturación. Las constantes de afinidad y concentraciones en suero de SHBG 1-1 y 1-2 evaluadas a dos distintas temperaturas fueron similares y no revelaron ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ellas, al igual que la velocidad y la vida media de disociación para ambas. Estos datos sugirieron que la posible mutación responsable de la generación del patrón 1-2, no involucra el sitio de unión de esteroides. A pesar de que este estudio no permitió identificar la variante homocigota y sus propiedades de unión, Van Baelen demostró, para una variante similar, los mismos resultados en la unión a [³H]DHT entre los diferentes fenotipos encontrados, incluyendo al estado homocigoto.

La presencia de microheterogeneidad residual en muestras de suero de individuos con el patrón SHBG 1,2, sugiere la posibilidad de modificaciones en la estructura primaria de la proteína. En este trabajo se presenta la caracterización molecular de las variantes de la SHBG, y las repercusiones que la presencia de esta variante pudiera tener sobre la estructura y otras características de la proteína.

OBJETIVOS

Identificar la naturaleza del polimorfismo genético de la molécula de SHBG por medio de la amplificación del gen y del análisis del sitio y tipo de mutación en la secuencia codificante de la proteína.

Establecer las posibles repercusiones a nivel clínico y experimental derivadas de la presencia de variantes genéticas de la SHBG, y utilizarlas como modelo natural en estudios que contribuyan al conocimiento de sus funciones biológicas.

MATERIAL Y MÉTODO

REACTIVOS

Los esteroides no radiactivos se obtuvieron de Steraloids Inc. (Wilton, NH). La 1,2-³H-dihidrotestosterona (³ H-DHT) con actividad específica de 40-60 Ci/mmol y el I¹²⁵ se obtuvieron de Amersham Canada Ltd (Oakville, Ontario). La acrilamida, N,N'-metilbisacrilamida (Bis), N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED), N,N'diatiltartadiamida (DAD), azul de Coomasie R-250, persulfato de amonio, sulfato dodecílico de sodio (SDS), Nonidet P40, papel de nitrocelulosa, azul de bromofenol y estándares de peso molecular, se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA).

El Tris-HCl, glicina, Tween-20, glicerol, EDTA, fenol, acetato de sodio, cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, carbón activado, Concanavalina A-Sepharosa 4B (Con A), metil- α -D-manopiranosas, dimetilformamida, β -mercaptoetanol, proteína A, albúmina sérica bovina (ASB), cloramina T y metabisulfito de sodio se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El metanol, glicerol, fosfato monobásico y dibásico de sodio y cloruro de sodio se obtuvieron de JTBaker (México). El anticuerpo específico policlonal para hSHBG fue donado por el Dr. Geoffrey Hammond (Ontario, Canadá).

Extracción de DNA

El DNA genómico se aisló según la técnica de John (1991) a partir de 5 ml de sangre obtenida con anticoagulante. La muestra se llevó a 10 ml con solución 1 (tris 10 mM pH 7.6; KCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM). Se agregaron 120 μ l de Nonidet P40. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000 xg. El botón nuclear se resuspendió en 800 μ l de solución 2 (Tris 10 mM pH 7.6; KCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM; NaCl 0.5 M; SDS 0.5%; EDTA 2 mM).

Las proteínas se extrajeron con 400 μ l de fenol destilado (saturado con tris 1M pH 8.0) y se purificó con 700 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico. El DNA obtenido de la fase superior se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto helado, almacenando el tubo a -20°C toda la noche, y posteriormente se resuspendió en agua estéril.

Amplificación de secuencias codificantes por PCR

Esta reacción se realizó según la técnica descrita por Saiki (1981). Se eligieron los oligonucleótidos con temperaturas de hibridización aproximadas de 60°C por medio del software PRIMER (Whitehead Institute of Biomedical Research, Cambridge, MA) utilizando las secuencias intrónicas del gen de SHBG (Hammond *et al*, 1989), y se sintetizaron en el sintetizador Gene Assembler Special (Pharmacia, Piscataway, NJ).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados y las condiciones específicas de hibridización para cada par se muestran en el cuadro 1. El extremo de cada primer 5' consistió en una secuencia de 40 pb de G+C, que creó una pinza de GC en el DNA amplificado (Sheffield *et al*, 1989).

Las reacciones de amplificación se realizaron en tris-HCl pH 9.0 10 mM; KCl 50 mM, MgCl_2 1.5 mM, deoxirribonucleótidos 50 mM, oligonucleótidos 1 mM, 100 ng de DNA genómico y 1.25 U de *Taq* polimerasa (Perkin Elmer) en un volumen total de 50 μ l. Las reacciones se incubaron a 95°C por cinco minutos antes de la adición de la enzima y el inicio de los ciclos de reacción, el primer paso de cada ciclo fue la desnaturalización a 95°C por un minuto, y el paso de síntesis se realizó a 72°C por un minuto.

Se tomaron alícuotas (10 μ l) de cada reacción de PCR para analizar el producto en geles de poliacrilamida al 5%, utilizando una solución amortiguadora de tris-borato-EDTA en la electroforesis.

purificado y concentrado utilizando unidades de ultrafiltración Microcon-30 (Amicon, Beverly, MA) para utilizarse directamente en análisis de secuencia.

Análisis de secuencia

Los oligonucleótidos utilizados fueron idénticos a los ya descritos para PCR excepto por las pinzas de GC. Los oligonucleótidos se marcaron en sus extremos 5' utilizando T₄ polinucleótido kinasa (Promega, Madison, WI) y [γ ³²P]-ATP (Amersham, Arlington Heights, IL). Se utilizaron los reactivos del *fmol* Sequencing System (Promega) para la incorporación de dideoxirribonucleósidos por la *Taq* polimerasa. Los productos de la reacción de secuencia se separaron en geles de acrilamida 8% y urea 7M, utilizando un gradiente en la solución amortiguadora del gel (Biggin *et al*, 1983).

Cromatografía de afinidad en concanavalina A

Se aplicó 0.5 ml de suero que contiene SHBG normal o variante a las columnas de Con A preequilibrada con solución amortiguadora (Tris 50 mM; NaCl 0.5 M; CaCl₂, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, pH 7.4). Las columnas se lavaron con solución amortiguadora con manosa (metil- α -D-manopiranososa 257 mM y dimetilformamida 5%) para eluir las proteínas unidas en fracciones de 1 ml (Power *et al*, 1992).

Ensayos de unión de SHBG a DHT

La presencia de SHBG en las fracciones fue determinada con ensayos de unión a 5- α -DHT y carbón dextrán para separar el esteroide libre del unido a 4°C (Hammond, 1983).

Análisis de proteínas por Western blot

Se purificó la SHBG a partir de suero y fracciones de la columna de Con A por medio de su inmunoprecipitación con un anticuerpo policlonal (dil 1:25) incubándolo por 20 hrs a 4°C en un volumen de 500 μ l (Sinha *et al*, 1984).

Posteriormente se agregaron 100 μ l de segundo anticuerpo (dil 1:100), sedimentando este complejo por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se aspiró el sobrenadante y el botón de proteínas se lavó con agua bidestilada fría y se resuspendió en 20 μ l de solución de depósito (glicerol 10%, tris 0.01 M pH 6.8, SDS 3%, β -mercaptoetanol 0.5%, azul de bromofenol 0.03%), y se calentaron a 90°C por cinco minutos (Laemmli, 1970). Se depositaron en geles de acrilamida (gel concentrador: acrilamida 4.25% y DAD 0.75%; gel de resolución: acrilamida 10% y bisacrilamida 0.32%) en presencia de SDS. Las proteínas se electrotransfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa a 90 volts durante 1 hora (Towbin *et al*, 1979) en solución de electroforesis con metanol 20% sin SDS. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con leche descremada al 10% en solución de lavado (Tris 20 mM, NaCl 500 mM y Tween 2%) durante cinco horas y al finalizar se lavó varias veces en solución de lavado, se incubó en presencia del anticuerpo específico anti-SHBG (dilución final 1:100) durante 18 horas a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpos no unidos a la SHBG se eliminó por medio de lavados repetidos, y los complejos antígeno-anticuerpo se identificaron con proteína A marcada radiactivamente con I^{125} (20 000cpm/100 μ l) por el método de Cloramina T (Hunter y Greenwood, 1962).

RESULTADOS

Amplificación de fragmentos por PCR

Para investigar la base molecular del cambio en el punto isoeléctrico de la variante de SHBG, se comenzó con la amplificación de cada exon del gen por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como molde el DNA genómico que se aisló a partir de linfocitos de individuos con el fenotipo 1-1 y 1-2. El gen se amplificó en ocho fragmentos, cada uno conteniendo un exon entero con tamaños de 93 a 210 pb, además de aproximadamente 30 pb de la secuencia de los intrones adyacentes. Los oligonucleótidos del extremo 5' de cada segmento contenían una secuencia de 40 pb de guanina (G) y citosina (C). Al analizar los fragmentos amplificados en de geles nativos, se encontró que eran bandas específicas del tamaño esperado. No se observaron cambios en la migración electroforética de los fragmentos de la proteína normal y la variante, lo cual eliminó la posibilidad de una delección o inserción en la secuencia génica como fuente de variación. Estos datos se observan en la figura 2, la cual muestra el análisis electroforético en agarosa al 1% de cada uno de los exones estudiados.

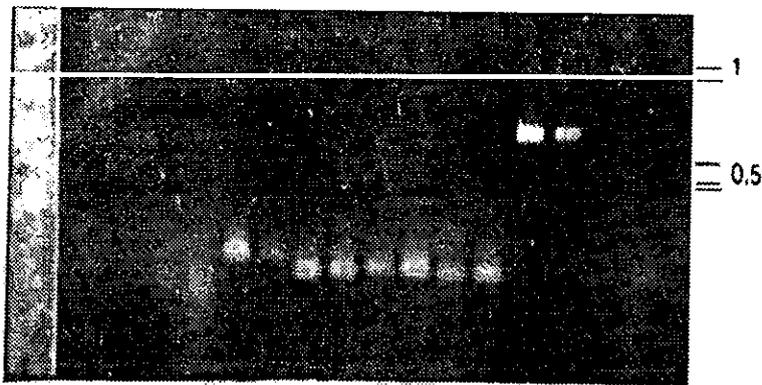


Figura 2

Análisis del gen de SHBG de los sujetos heterocigotos por DGGE

El análisis de los exones 1 al 7 por DGGE mostró que no existían diferencias entre los individuos normales y los heterocigotos. Todos los productos aparecieron como bandas únicas, y los productos de un mismo exon de individuos normales y variantes presentaron la misma migración electroforética.

Sin embargo, cuando los fragmentos con la pinza GC del exon 8 de los individuos heterocigotos fueron amplificados con los oligonucleótidos intron específicos y se analizaron por electroforesis en geles con gradiente desnaturizante, se observaron cuatro bandas a diferencia de los fragmentos de individuos homocigotos normales, que presentaron una sola banda.

En la figura 3 se observa el análisis electroforético en gradiente desnaturizante en geles de acrilamida y urea, de los fragmentos obtenidos por PCR del exon 8, y se encuentran señaladas las diferentes bandas obtenidas.

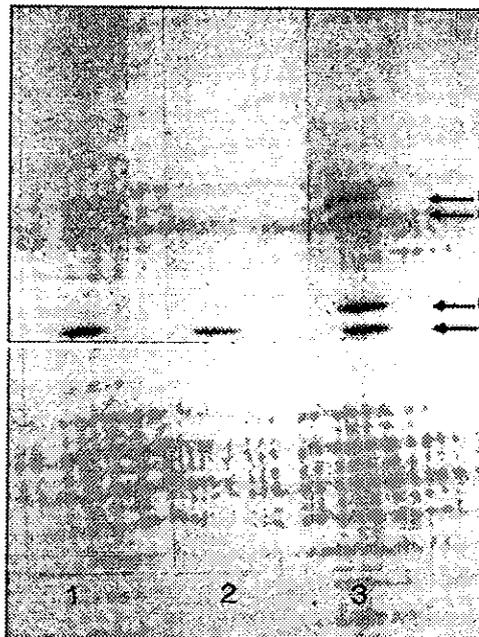


Figura 3

Estas cuatro bandas representan cada una los productos de PCR generados a partir del DNA del individuo heterocigoto, donde existe un alelo normal y el otro mutado. La banda inferior (banda A) de individuos heterocigotos migró con la única banda de los individuos normales. Esta banda corresponde a los homodímeros constituidos por el alelo normal. La siguiente banda (banda B) estuvo presente en todos los individuos heterocigotos y se tiñó con igual intensidad que la banda A. La banda B representa la secuencia homoduplex de la variante.

Las combinaciones heteroduplex de DNA normal y del variante se pueden formar durante los ciclos posteriores de amplificación cuando la concentración del producto es suficiente para competir con los oligonucleótidos durante el paso de hibridación de los oligonucleótidos. Los heteroduplex aparecen como dos bandas menores (C y D) de movilidad electroforética retardada respecto a los homoduplex, lo cual se debe al decremento de la termoestabilidad. Las bandas heteroduplex se observaron en las reacciones de PCR donde se utilizó como templado DNA genómico de individuos con la variante. Las diferentes migraciones de los productos de PCR en DGGE, concuerdan con la presencia de una diferencia en una sola base en un alelo de heterocigotos.

Identificación de la mutación puntual en el exon 8

Para confirmar la identidad de cada banda de DGGE de heterocigotos, las bandas A y B se cortaron en el trozo de acrilamida del gel desnaturalizante, se eluyó el DNA y se reamplificó por PCR. Esto dió por resultado el enriquecimiento de las especies de DNA homoduplex para analizarlos posteriormente por secuencia de DNA. El análisis de la secuencia de los productos de PCR del exon 8 de individuos normales y variantes, demostró la presencia de una mutación puntual en el codón 327 causada por el cambio de una guanina por una adenina (GAC→AAC). Esto provocó la sustitución de ácido aspártico por asparagina en la secuencia polipeptídica, lo que creó un sitio de consenso nuevo para la glicosilación de residuos de asparagina. Este sitio se encuentra determinado por

la secuencia de aminoácidos Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina.

En la figura 4 se puede observar la secuencia de aminoácidos que muestra la sustitución de ácido aspártico por asparagina provocado por la sustitución de una guanina por adenina.

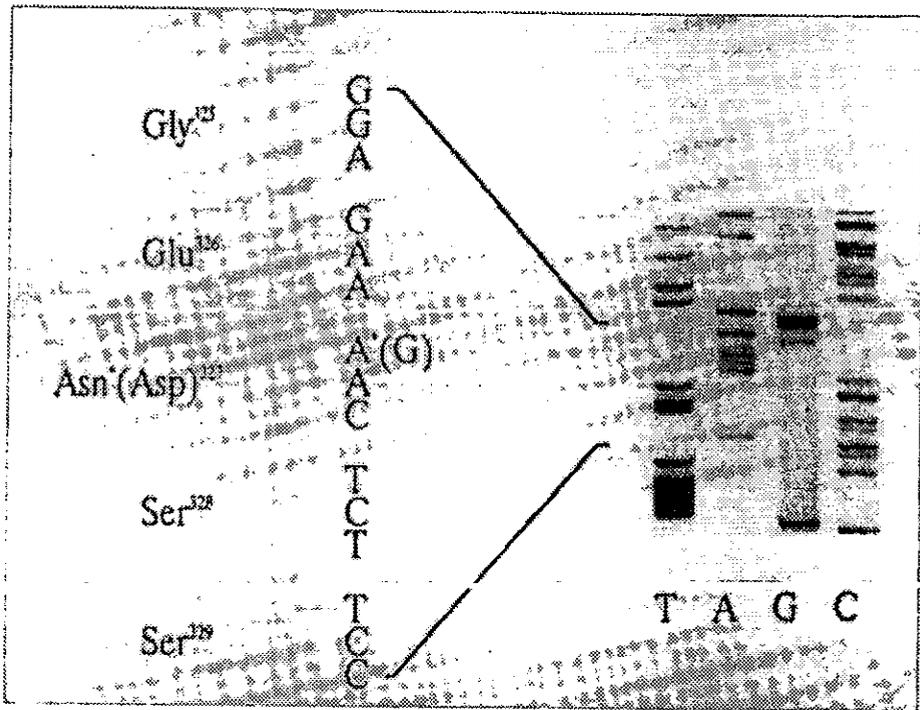


Figura 4

La identificación de esta mutación se confirmó por análisis de secuencia de la cadena opuesta de DNA del exon 8, donde se observó el cambio de una citosina por una timina. Esta mutación resultó idéntica a la presentada en los individuos heterocigotos belgas en el estudio de Van Baelen (1992). Estos resultados se observan en la figura 5, que muestra el análisis del exon 8 de un individuo normal y de uno que presenta la proteína variante.

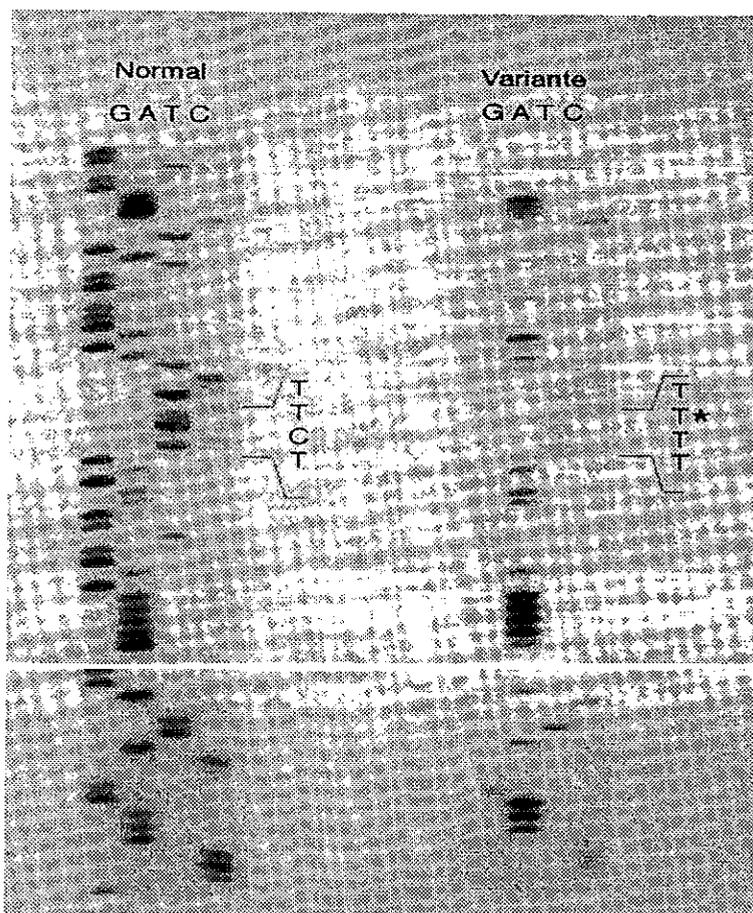


Figura 5

El cambio de un aminoácido con carga negativa por otro en la molécula, resulta además en la pérdida de esta carga, lo cual explicaría la diferencia en la migración de la proteína en un sistema de isoelectroenfoque. Debido a la potencial importancia que este cambio en la estructura de SHBG pudiera tener sobre las características físicas y biológicas de la proteína, en nuestro grupo se decidió investigar algunas de estas características, entre las cuales se encuentra el peso de la molécula.

Caracterización del peso molecular de la proteína por Western blot

A este respecto se estudió la estructura de las proteínas obtenidas de suero de los sujetos afectados y normales por medio de geles de SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes para separar los protómeros que componen a la SHBG.

Posteriormente se transfirieron a nitrocelulosa y se localizó la proteína utilizando anticuerpos policlonales específicos. Al analizar la SHBG obtenida de suero de pacientes afectados se observó una subunidad adicional cuyo peso molecular fue mayor a las dos que normalmente aparecen (49 y 52 kDa). Esta banda adicional no se encontró en individuos de la misma familia no afectados. Estos resultados sugieren fuertemente la posibilidad de que el nuevo sitio de consenso para glicosilación en residuos de Asp (Asp-X-Ser, donde X es cualquier aminoácido excepto Thr) sea utilizado, haciendo que la subunidad más pesada de SHBG contenga mayor número de cadenas de oligosacáridos en su estructura.

En la figura 6 se muestran los resultados del Western blot donde se observan en las líneas 1 a 4, la presencia de una subunidad adicional (SH) con un peso molecular de aproximadamente 56 kDa, además de las dos subunidades usuales de 48 y 52 kDa (H y L). Estos carriles contienen muestras correspondientes a sujetos heterocigotos. En los carriles 5 a 8 se observa el patrón obtenido para sujetos homocigotos para la proteína normal, donde se muestran únicamente las dos bandas correspondientes a las subunidades de peso menor H y L (H:heavy; L:light, SH:superheavy).

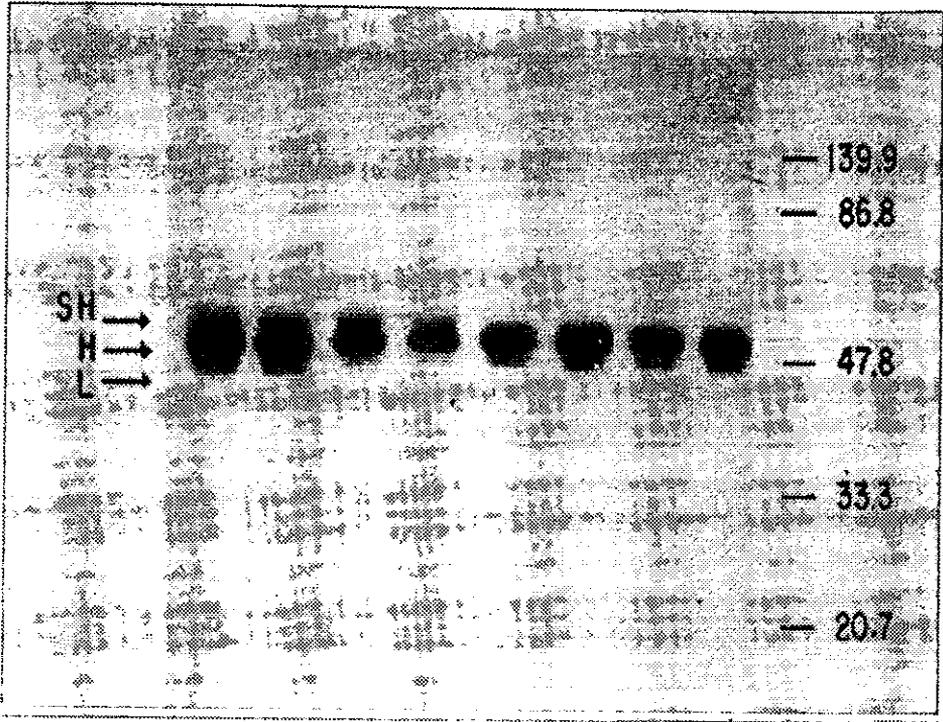
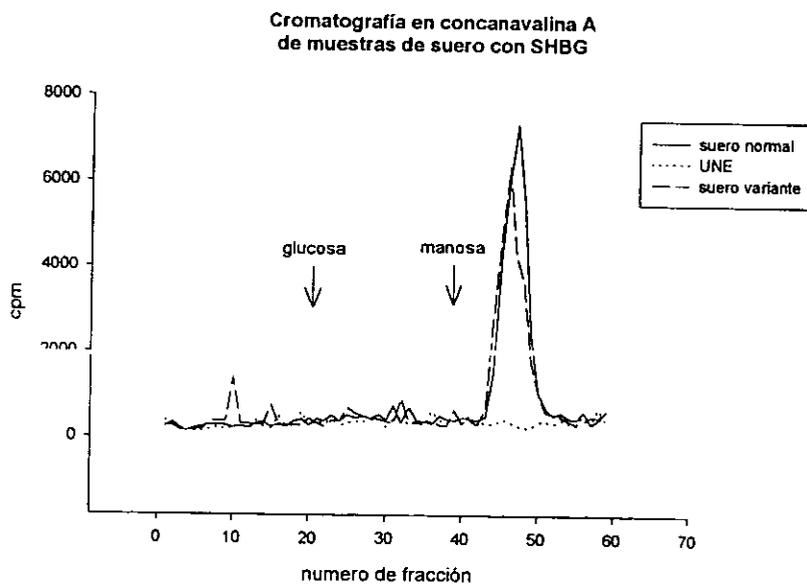


Figura 6

Cromatografía en concanavalina A

Para confirmar la diferencia de migración provocada probablemente por la adición de una cadena de oligosacáridos, analizamos esta proteína por cromatografía en lectinas, utilizando concanavalina A. La presencia de las diferentes formas de SHBG se determinó en cada una de las fracciones por medio de ensayos de unión a DHT marcada radiactivamente con tritio. Los resultados representados en gráficas se muestran en el cuadro 2, donde se demuestran los perfiles de elución de SHBG semejantes en las muestras de suero de sujetos normales y de sujetos con la proteína variante. La fracción glicosilada fue eluida con manosa y la presencia de SHBG fue determinada por ensayos de unión a DHT-H³.



Cuadro 2

Al analizar los resultados por Western blot, se observó que las fracciones unidas a Concanavalina A de muestras de sujetos con la variante presentan la subunidad adicional de mayor peso molecular observada en los geles con suero total que indica probablemente, la presencia de cadenas adicionales de carbohidratos que serían responsables tanto de la estructura y peso molecular como de la afinidad por la lectina. La banda adicional fue llamada SH (superheavy) a diferencia de las más ligeras, H (heavy) y L (light).

En la figura 7 se muestra el análisis de Western blot en donde se observa la presencia de la subunidad adicional (banda SH) además de la subunidad H en la fracción glicosilada o unida a concanavalina A de la SHBG variante (carril 1:V). También se muestra la única banda que corresponde a la subunidad H en la fracción glicosilada de la SHBG de individuos normales (carril 2:nL).

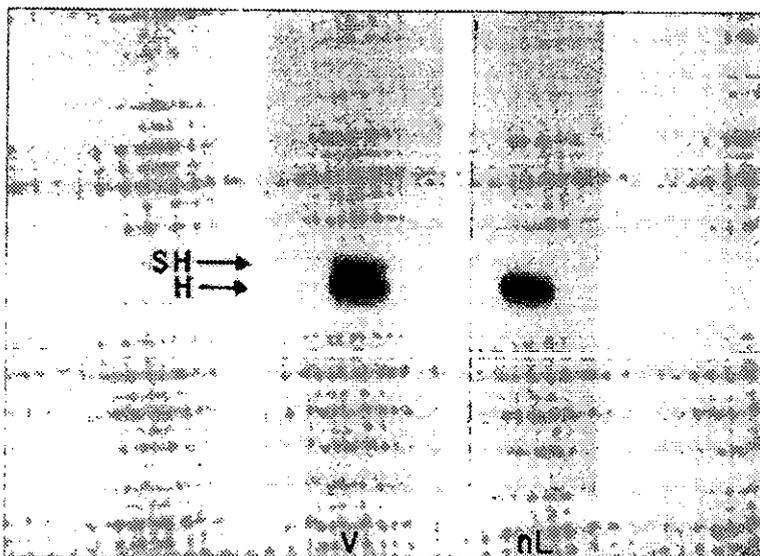


Figura 7

DISCUSIÓN

En el decenio de los años 60 se describió por primera vez la presencia en el suero de moléculas diferentes a la albúmina, con la capacidad de unir con alta afinidad a las hormonas esteroides (Mercier *et al* 1966). En el caso de las hormonas sexuales esteroides, como la testosterona y el estradiol, éstas circulan unidas a una proteína conocida como SHBG, la cual ha sido motivo de varios estudios de función, estructura y síntesis (Gershagen *et al*, 1978, Que y Petra, 1978, Hammond *et al*, 1978). En la actualidad se conoce la estructura proteínica de la SHBG, así como algunas características obtenidas del análisis del gen estructural. Sin embargo, la caracterización parcial de la región 5' reguladora de la expresión del gen de la SHBG aún no ha permitido establecer los mecanismos involucrados en la regulación de la síntesis de esta proteína. La ausencia de un promotor clásico ha dificultado conocer los factores y mecanismos involucrados en la expresión de este gen.

La mayoría de los estudios sobre la función de SHBG se han enfocado al análisis de las propiedades de unión a testosterona y estradiol, o bien a la descripción de sus concentraciones circulantes bajo diferentes situaciones clínicas (Anderson, 1974). Estos estudios han identificado estados caracterizados por el aumento o disminución de las concentraciones circulantes de la SHBG, así como de algunos factores que influyen sobre la síntesis y disponibilidad de esta proteína. La función más reconocida de la SHBG es la de ser el transportador sanguíneo de hormonas esteroides sexuales; sin embargo, esta función parece no ser importante en otras especies carentes de esta proteína como en el caso de la rata. En esta especie la presencia de albúmina es suficiente para satisfacer las demandas de transporte hormonal en el caso de ausencia o deficiencia de la SHBG en el suero. Se desconocen las implicaciones de la ausencia de SHBG en el ser humano, ya que no se han descrito variantes genéticas caracterizadas por

la pérdida funcional de la proteína, ni existe información sobre enfermedades derivadas o responsables de su deficiencia.

La falta de información respecto a las características de la SHBG y sus variantes genéticas motivó la realización de estudios por nuestro laboratorio con la finalidad de identificar y caracterizar variantes de esta proteína en la población mexicana. En este estudio se reveló la presencia de cambios en las propiedades de migración de la proteína en sistemas de isoelectroenfoque, indicando alteraciones de las propiedades de carga. Estos resultados sugirieron la transmisión de estos caracteres por medio de un solo gen del cual se identificaron alelos codominantes (Larrea *et al*, 1990).

Las características fisicoquímicas de la SHBG en relación con las propiedades de unión de los andrógenos de las formas variantes fueron idénticas a las observadas en las formas nativas, lo que sugiere que las alteraciones estructurales responsables de la generación de variantes genéticas tomaron lugar en sitios diferentes a los dominios estructurales de unión a esteroides, o bien que los cambios no modificaron de manera importante el sitio activo y por lo tanto las propiedades de unión a los andrógenos de la SHBG.

El objetivo del presente trabajo fue conocer las diferencias a nivel molecular entre las variantes genéticas de la SHBG, lo cual podría determinar el papel funcional de esta proteína en el ser humano. En este estudio fue necesaria la utilización de metodología para la identificación de mutaciones puntuales en genes estructurales. Esto consistió en la amplificación de las regiones codificantes del gen por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como molde el DNA obtenido de sangre periférica. Se diseñaron oligonucleótidos iniciadores de la reacción para cada uno de los exones que constituyen el gen estructural. Estos iniciadores poseían además 40 pb extras de los nucleótidos de guanina y citosina en la región 5'. Esta extensión permitió el uso del método conocido como la pinza de GC, la cual incrementa de manera significativa la sensibilidad de la localización de cambios en la cadena de DNA, debido a que aumenta la temperatura de desnaturalización de los fragmentos

obtenidos por PCR en presencia de agentes desnaturalizantes y calor. Este aumento del punto de fusión de los fragmentos permitió la detección de mutaciones puntuales en las cadenas del DNA (Myers *et al*, 1985).

El análisis de los productos de PCR bajo condiciones no desnaturalizantes no mostró diferencias en la migración electroforética del DNA obtenido de sujetos afectados y sujetos normales, mostrando fragmentos de DNA de la talla esperada y descartando de esta manera la posibilidad de que deleciones o inserciones sean responsables del polimorfismo estructural.

Por otra parte, el análisis de los productos de PCR de cada uno de los exones del gen de SHBG en geles desnaturalizantes de poliacrilamida permitió la identificación de cambios en la composición del DNA únicamente para el caso del exon 8. Los cambios encontrados consistieron en la presencia de cuatro bandas con movilidades electroforéticas distintas y constituidas por combinaciones de cadenas afectadas y cadenas normales. La presencia de cuatro bandas sugiere fuertemente la alteración en un solo alelo del gen, lo que está de acuerdo con resultados previos de nuestro grupo sobre la naturaleza heterocigota de la variante encontrada en sujetos mexicanos. A diferencia de los afectados, los individuos normales presentaron una sola banda bajo las condiciones descritas para el caso de la variante.

Con la finalidad de caracterizar cada una de las bandas correspondientes al DNA normal y afectado, éstas fueron purificadas del gel de poliacrilamida, reamplificadas y analizadas nuevamente en relación con su movilidad electroforética en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Los resultados permitieron confirmar la presencia de cambios en la composición del DNA en el exon 8, de sujetos portadores de la variante, así como identificar los DNAs adecuados para posteriormente ser sometidos al análisis de la secuencia de nucleótidos. Este método demostró elevada sensibilidad para la identificación de cambios estructurales que ocurren a nivel molecular y ofrece una alternativa relativamente simple para la descripción de variantes genéticas de la SHBG o de otras proteínas.

Para determinar la naturaleza de las alteraciones a nivel de DNA encargadas de los cambios en las características de carga de la SHBG, se procedió al análisis de secuencia de las cadenas amplificadas del DNA correspondientes a individuos afectados y normales. El análisis de secuencia de nucleótidos de las cadenas de DNA del exon 8 indicó que había una mutación a nivel del codón que codifica para el aminoácido 327.

En estudios realizados por Van Baelen y Power (1992) en donde se encontraron individuos homocigotos para el fenotipo variante, la secuencia del gen de SHBG reveló una mutación puntual en el exon 8 de la misma naturaleza que la informada en este trabajo de tesis. La mutación detectada en nuestro laboratorio consistió en la sustitución de guanina por adenina lo cual ocasiona el cambio de ácido aspártico por asparagina en la estructura primaria de la proteína. El cambio de un aminoácido con carga negativa por otro sin carga o de carga neutra, provoca la pérdida de carga negativa en la proteína, lo que da como resultado la síntesis de una proteína con carga neta más básica que la proteína nativa. Esto explica el cambio en el punto isoeléctrico de la SHBG detectado en los geles de isoelectroenfoque, en los que la proteína obtenida de los sujetos heterocigotos, al tener en su secuencia un aminoácido sin carga negativa migra hacia el cátodo, por tener un punto isoeléctrico más básico.

Por otra parte, la aparición de la asparagina en el aminoácido 327 originó la formación de un sitio de consenso para la adición de cadenas de oligosacáridos durante la síntesis de la proteína. Este sitio está dado por la secuencia Asp-X-Ser o Asn-X-Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto prolina) y en el caso de la SHBG proveniente de los individuos heterocigotos, la secuencia creada fue de Asp-Ser-Ser.

La presencia de cadenas de carbohidratos en la molécula variante de SHBG fué parcialmente comprobada en geles de SDS-PAGE, en los cuales se observó la presencia de una banda adicional de mayor peso molecular en la estructura de la proteína. De acuerdo con su migración electroforética, esta banda correspondería a un protómero adicional con un peso aproximado de 56 KDa, el

cual difiere de las dos que se encuentran normalmente en la proteína nativa de 49 y 52 KDa. Este aumento en el peso molecular del protómero puede explicarse con la presencia de una cadena de oligosacáridos adicional en el sitio nuevo de glicosilación.

Para comprobar la naturaleza glicosilada de la subunidad más pesada de SHBG, la proteína del suero se analizó por medio de cromatografía de afinidad en concanavalina A (Con A). Esta lectina se caracteriza por su afinidad a oligosacáridos del tipo de alta concentración de manosa, haciéndola específica para el tipo de azúcares presente en la SHBG. De esta forma, separó las fracciones glicosiladas de las no glicosiladas. Posteriormente al analizar la forma glicosilada en geles de SDS-PAGE, se observaron dos bandas con pesos moleculares mayores (52 y 56 KDa). Este método permitió establecer que la banda de mayor peso molecular observada en los análisis de Western blot de las fracciones glicosiladas pertenecía a un protómero con una cadena de oligosacáridos adicional, y afín a la lectina utilizada.

En otros estudios (Bocchinfuso *et al* , 1992) por medio de ensayos de mutagénesis dirigida y expresión de cDNA en células de ovario de hamster chino (células CHO) se demostró la síntesis de la proteína mutada con la cadena de oligosacáridos adicional en asparagina. Sin embargo, los datos presentados en este trabajo de tesis resultan de gran importancia, dado que por primera vez se sugiere la utilización *in vivo* del nuevo sitio de glicosilación en la proteína variante.

En el estudio mencionado (Bocchinfuso *et al* 1992) se demostró que la actividad de unión a esteroides de SHBG no se afecta por la presencia de una cadena adicional de oligosacáridos en el aminoácido 327, y de acuerdo con los datos de nuestro laboratorio, la SHBG variante de la población mexicana presenta características de unión al ligando iguales a los de la proteína normal, lo que indica que la mutación no afecta el sitio de unión al esteroide. Sin embargo no se puede descartar una influencia sobre otras actividades metabólicas, ya que los oligosacáridos de una proteína están fuertemente involucrados con otras

funciones biológicas, tales como unión a receptores, internalización en tejidos blanco, y regulación de la síntesis y secreción celular.

A pesar de que la remoción de carbohidratos de algunas glicoproteínas no afecta su actividad bioquímica, en general se reconoce que la función de una glicoproteína dentro de un organismo está a menudo relacionada con la estructura y la composición de carbohidratos. Las variaciones en los carbohidratos están asociadas a alteraciones en estados fisiológicos y puede dar por resultado la aparición de glicofomas con actividad modificada. En el caso de la SHBG, la importancia de su glicosilación se puede deducir del hecho de que la proteína transportadora de andrógenos (ABP) y la SHBG son codificadas por el mismo gen, tienen la misma secuencia de aminoácidos y únicamente difieren en el tipo de oligosacáridos unidos a ellas, siendo sintetizadas en órganos diferentes y ejerciendo su acción en sitios del organismo distintos. Estas diferencias se deben probablemente a mecanismos de glicosilación específicos, que originan actividades diferentes, ya que la glicosilación es un importante regulador del mecanismo de acción.

Las glicoproteínas que interactúan con Con A contienen cadenas de oligosacáridos unidos a N del tipo de alta concentración de manosa o biantenarios, mientras que los que contienen oligosacáridos unidos a N del tipo triantenario no se unen a Con A (Krusius *et al*, 1976). La SHBG normal contiene dos cadenas de oligosacáridos unidos a N del tipo biantenarios (Avvakumov *et al*, 1983) a diferencia de ABP que posee cadenas más grandes que las de SHBG. La diferencia de tamaño en las subunidades H y L de la SHBG permanece independiente de la capacidad de unión a Con A de la molécula. De acuerdo con los datos de este trabajo de tesis, al pasar la SHBG normal y variante por cromatografía en Con A, casi la totalidad de la SHBG se unió a la columna, sin embargo en el caso de ABP de homogenado testicular humano, solamente el 50% se unió (Hsu y Troen, 1978; Cheng *et al*, 1985). Esto sugiere diferencias tejido-específicas en la glicosilación de SHBG, que ocurrirían *in vivo*, apoyando

fuertemente a la glicosilación como un proceso de gran importancia en varias de las funciones de la proteína.

Uno de los procesos estudiados recientemente en proteínas multiglicosiladas, es el de la formación y estabilización de la conformación molecular activa (Montrevil, 1984). Se conoce que la SHBG humana existe en la circulación como un homodímero de un peso aproximado de 90 a 100 KDa, de acuerdo con el método usado (Hammond *et al*, 1986). En geles de SDS-PAGE, esta proteína migra como un doblete de subunidad pesada y ligera (Cheng *et al*, 1983). La subunidad pesada es más abundante y se asume que el dímero está formado por una mezcla de subunidades, donde predomina la isoforma formada por la combinación de dos subunidades pesadas. Las subunidades pueden ser marcadas con un ligando afín, obteniéndose la misma proporción de señal en ambas subunidades, lo que indica que ambas participan en la unión al esteroide (Cheng *et al*, 1983). Lo que no se conoce todavía es si los cambios en la composición del dímero son fisiológicamente importantes; sin embargo, esta proporción y el proceso de dimerización mismo podrían verse alterados con la presencia de una cadena adicional de carbohidratos en el caso de la variante de SHBG informada en este trabajo.

Recientemente se han descrito algunas funciones biológicas de la SHBG, además de su capacidad de transportar hormonas esteroides en la circulación general. Estas funciones se encuentran relacionadas con las propiedades de la SHBG de interactuar con receptores localizados en la membrana extracelular de órganos esteroide dependientes. La formación del complejo SHBG-receptor induce la activación de proteínas G y la consecuente acumulación de AMP cíclico intracelular. Esta propiedad se manifiesta únicamente en presencia del ligando natural (hormonas esteroides) posterior a la unión de la SHBG con el receptor de membrana, e indica la existencia de un sistema alostérico de regulación entre los sitios activos para las hormonas esteroides y el receptor de membrana. Esto sugiere la participación de la SHBG como primer mensajero dentro de los mecanismos de transducción de señal, así como de transporte de las hormonas

esteroides a sitios específicos del organismo. De acuerdo con esto, la presencia de una cadena adicional de carbohidratos en la estructura de la proteína podría afectar la unión alostérica a receptores de membrana, inhibiendo o potenciando la acción de las hormonas esteroides en sus órganos blanco.

Anteriormente en nuestro laboratorio se demostró la síntesis de SHBG en células de trofoblasto en cultivo (Larrea *et al*, 1993). En estos experimentos se demostró la presencia de transcritos para esta proteína localizados por medio de una sonda específica, y también la presencia de la proteína en medio de cultivo por medio de análisis de Western blot. En estos resultados, se observó una banda de tamaño aproximado de 56 KDa que correspondería a la tercera subunidad informada en este trabajo. Esto sugiere la síntesis y secreción de una forma variante de la SHBG en trofoblasto humano, lo cual tendría similitud con la presencia de una forma del RNAm de SHBG que se encuentra presente en el hígado fetal de rata durante los días 15 a 17 de la gestación (Sullivan *et al*, 1991). Esto coincide con el periodo en el cual se realiza la diferenciación sexual del feto, además del crecimiento de tejidos. Durante este periodo se ha detectado una pequeña cantidad de SHBG en el suero, aunque posteriormente desaparece. Esta observación podría explicarse por la presencia de una copia del gen diferente en el exon 8 que se expresaría únicamente en células de placenta, como ocurre en cerebro de rata, en donde se expresa una copia diferente del exon 1 de ABP.

Esta forma variante de ABP es secretada por el testículo fetal y el cerebro de rata (Sullivan *et al*, 1991, 1993; Wang *et al*, 1990). En la secuencia de DNA de esta forma en particular, existe un promotor alternativo que se encuentra 15 Kb antes del sitio de inicio del exon 1. Este promotor codifica para una proteína con la secuencia N-terminal alterada, la cual no es secretada por células COS probablemente debido a la pérdida de hidrofobicidad de la molécula. También se ha demostrado en el hígado un cDNA de SHBG que presenta la secuencia alterada. En este caso, el cDNA se encuentra formado por la fusión de los exones 1 al 5 del gen de ABP/SHBG con el gen de la histidina decarboxilasa (HDC). Este transcrito codifica para una proteína-precursora de 98 KDa (Sullivan *et al*, 1991).

Estos dos dominios se unen en regiones de secuencia de corte de los dos genes localizados en los cromosomas 10 (ABP) y 3 (HDC) de rata. Esto es importante porque es el primer ejemplo de trans-splicing (mecanismo de edición de donador-aceptor de dos genes) en eucariotes superiores que afecta la síntesis de una proteína. A pesar de que no se conoce la función de este producto de fusión, se ha sugerido que el péptido señal codificado por ABP dirige el dominio catalítico activo de HDC hacia un compartimento celular no accesible normalmente para la HDC.

En testículo humano se han descrito otras formas de transcritos alternativos de ABP (Hammond *et al*, 1989; Gershagen *et al*, 1989), los cuales representan expresiones diferenciales del gen durante el desarrollo de este órgano. Estos casos de reordenamiento de secuencias podrían representar un proceso común en este gen para obtener una proteína de acuerdo con la etapa de desarrollo o la función requerida en cierto momento. Se presume que esta función podría ser el servir como barrera para los esteroides durante el desarrollo, conservando los niveles de testosterona libre bajos, o servir como almacén de esteroides o de sistema regulador del metabolismo de andrógenos durante la formación de la placenta. De igual forma, la presencia de un producto con mayor cantidad de cadenas glicosiladas sintetizado por el trofoblasto, representaría una función importante y necesaria en el desarrollo del feto actuando a nivel de receptor de membrana en órganos blanco o en la placenta misma.

Es por esto que se hace necesario el estudio de la regulación del gen de SHBG, así como las variantes polimórficas que de él se puedan presentar en los diferentes tejidos, y a lo largo de varias etapas del desarrollo de los individuos. De esta forma se podrán encontrar modelos de acción de la SHBG y dilucidar sus funciones biológicas e importancia en el desarrollo.

CONCLUSIONES

En este trabajo se encontró que el polimorfismo estructural de la SHBG se debe a la aparición de un sitio adicional de glicosilación en la secuencia primaria de la subunidad SH de la proteína variante. Este cambio se debe a la sustitución de una guanina por una adenina ocasionando el cambio de ácido aspártico por asparagina.

Además se demostró medio de electroforesis en SDS-PAGE y cromatografía en concanavalina A la presencia de cadenas glicosiladas en las subunidades de la proteína y por tanto se sugiere la utilización del nuevo sitio de glicosilación *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrams E.S., Murdaugh S.E., Lerman L.S.: Comprehensive detection of single base changes in human genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis and GC clamp. *Genomics* 7 (1990) 463-475.
- Anderson D.C.: Sex hormone-binding globulin. *Clin. Endocrinol. (Oxford)* 3 (1974), 69-96.
- Avvakumov G.V., Matveentseva I.V., Akhrem L.V., Strel'chyonok O.A., Akhrem A.A.: Study of the carbohydrate moiety of human serum sex hormone-binding globulin. *Biochim. Biophys. Acta* 760 (1983) 104-110.
- Avvakumov G.V., Zhuk N.I., Strel'chyonok O.A.: Biological function of the carbohydrate component of the human sex steroid-binding globulin. *Biochem. U.S.S.R.* 53 (1988) 726-729.
- Baker M.E., French F.S., Joseph D.R.: Vitamin K-dependent protein S is similar to rat androgen-binding protein. *Biochem. J.* 243 (1987) 293-296.
- Beck K., Hunter I., Engel J.: Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* 4 (1990) 148-160.
- Becker R.R., Iles D.J.: Developmental pattern of androgen-binding protein secretion during the critical period of sexual differentiation. *Arch. Androl.* 14 (1985) 107-114.
- Ben-Rafael Z., Mastroiani L. Jr., Meloni F., Lee M.S., Flickinger G.L.: Total estradiol, free estradiol, sex hormone-binding globulin, and the fraction of estradiol bound to sex hormone-binding globulin in human follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63 (1986) 1106-1111.
- Berubé D., Séralini G.E., Gagné R., Hammond G.L.: Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12-p13). *Cytogenet. Cell Genet.* 54 (1990) 65-67.
- Biggin M.D., Gibson T.J., Hong G.F.: Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80 (1983) 3963-3965.
- Blaquier J.A.: Selective uptake and metabolisms of androgens by rat epididymis. The presence of a cytoplasmic receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45 (1971) 1076-1081.
- Bocchinfuso W.P., Ma K-L., Warmels-Rodenhiser S., Lee W.M., Hammond G.L.: Selective removal of glycosylation sites from sex hormone-binding globulin by site-directed mutagenesis. *Endocrinology* 131 (1992) 2331-2336.
- Bordin S., Petra P.H.: Immunocytochemical localization of the sex steroid-binding protein of plasma in tissues of the adult monkey *Macaca nemestrina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77 (1980) 5676-5682.
- Botwood N., Hamilton-Fairley D., Kiddy D., Robinson S., Franks S.: Sex-hormone-binding globulin and female reproductive function. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* (1995) 53, 1-6, 529-531.
- Brady J., Radonovich M., Vodkin M., Natarajan V., Thoren M., Das G., Janik J., Salzman N.P.: Site-specific base substitution and deletion mutations that enhance or suppress transcription of the SV40 major late RNA. *Cell (Cambridge, Mass.)* 31 (1982) 625-632.
- Casali E., Petra P.H., Ross J.B.A.: Fluorescence investigation of the sex steroid binding protein of rabbit serum: steroid binding and subunit dissociation. *Biochemistry* 29 (1990) 9334-9343.
- Cheng C.Y., Musto N.A., Gunsalus G.L., Frick J., Bardin C.W.: There are two forms of androgen binding proteins in the testis. Comparison of their protomeric variants with serum testosterone-estradiol binding globulin. *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 5631-5640.
- Danzo B.J., Eller B.C., Orgebin-Crist M.C.: Studies of the site of origin of the androgen binding protein present in epididymal cytosol from mature intact rabbits. *Steroids* 24 (1974) 107-122.
- Danzo B.J., Cooper T.G., Orgebin-Crist M.C.: Androgen binding protein (ABP) in fluids collected from the rete testis and cauda epididymis of sexually mature and immature rabbits and observations on morphological changes in the epididymis following ligation of the ductuli efferentes. *Biol. Reprod.* 17 (1977) 64-77.
- Danzo B.J., Bell B.W.: The microheterogeneity of androgen-binding protein in rat serum and epididymis is due to differences in glycosylation of their subunits. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 2402-2408.

- Danzo B.J., Black J.H., Bell B.W.: The microheterogeneity of rabbit testosterone-binding globulin is due to differential glycosylation of its single protomer. *Biol. Reprod.* 41 (1989a) 957-965.
- Danzo B.J., Bell B.W., Black J.H.: Human testosterone-binding globulin is a dimer composed of two identical protomers that are differentially glycosylated. *Endocrinology* 124 (1989b) 2809-2817.
- Danzo B.J., Pavlou S.N., Anthony H.L. Hormonal regulation of androgen-binding protein in the rat. *Endocrinology (Baltimore)* 127 (1990) 2829-2838.
- Danzo B.J., Black J.H.: Structure of asparagine-linked oligosaccharides on human and rabbit testosterone-binding globulin. *Biol. Reprod.* 42 (1990a) 472-482.
- Danzo B.J., Black J.H.: Analysis of the oligosaccharides on rat androgen-binding protein using serial lectin chromatography. *Biol. Reprod.* 43 (1990b) 219-228.
- Danzo B.J., Parrott J.A., Skinner M.K.: Analysis of the steroid binding domain of rat androgen-binding protein. *Endocrinology (Baltimore)* 127 (1991a) 690-696.
- Danzo B.J., Black J.H., Bell B.W.: Analysis of the oligosaccharides on androgen-binding proteins: implications concerning their role in structure/function relationships. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40 (1991b) 821-831.
- Dayhoff M.O. Barker W.C., Hunt L.T.: Establishing homologies in protein sequences. In "Methods in Enzymology" (C.Hirs, S.Timasheff, eds.) (1983) Vol. 91, pp. 524-545. Academic Press, New York.
- Dorrington J.H., Roller N.F., Fritz I.B.: Effects of follicle stimulating hormone on cultures of Sertoli cell preparations. *Mol. Cell. Endocrinol.* 3 (1975) 57-60.
- Elkington J.S.H., Sanborn B.M., Martin M.W., Chowdhury A.K., Steinberger E.: Effect of testosterone propionate on ABP levels in rats hypophysectomized at different ages using individual sampling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 6 (1977) 203-209.
- Engel J.: EGF-like domains in extracellular matrix proteins: Localized signal for growth and differentiation?. *FEBS Lett.* 251 (1989) 1-7.
- Engel J.: Laminins and other strange proteins. *Biochemistry* 31 (1992) 10604-10651.
- Feldman M., Lea O.A., Petrusz P., Tres L.L., Kierszenbaum A.L., French F.S.: Androgen-binding protein. Purification from rat epididymis, characterization and immunocytochemical localization. *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 5170-5175.
- Fortunati N., Fissore F., Fazzari A., Berta L., Giudici M., Frairia R.: Sex steroid-binding protein interacts with a specific receptor on human premenopausal endometrium membrane, modulating effect of estradiol. *Steroids* 56 (1991) 341-346.
- Fortunati N., Fissore F., Fazzari A., Berta L., Varvello L., Frairia R.: Receptor for sex steroid-binding protein of endometrium membranes: Solubilization, partial characterization and role of estradiol in steroid-binding protein-soluble receptor interaction. *Steroids* 57 (1992a) 464-470.
- Fortunati N., Frairia R., Fissore F., Berta L., Fazzari A., Gaidano G.: The receptor for human sex steroid binding protein (SBP) is expressed on membranes of neoplastic endometrium. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42 (1992b) 185-191.
- Fortunati N., Fissore F., Fazzari A., Berta L., Benedusi-Pagliano E., Frairia R.: Biological relevance of the interaction between sex steroid binding protein and its specific receptor of MCF-7 cells: Effect on the estradiol-induced cell proliferation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 45 (1993) 435-444.
- Frairia R., Fortunati N., Berta L., Fazzari A., Fissore F., Gaidano G.: Sex steroid binding protein (SBP) receptors in estrogen sensitive tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40 (1991) 805-812.
- Frairia R., Fortunati N., Fissore F., Fazzari A., Zeppego P., Varvello L., Orsello M., Berta L.: The membrane receptor for sex steroid binding protein is not ubiquitous. *J. Endocrinol. Invest.* 15 (1992) 617-620.
- French M., Ritzén E.M.: A high-affinity androgen binding-protein (ABP) in rat testis: Evidence for secretion into efferent duct fluid and absorption by epididymis. *Endocrinology (Baltimore)* 93 (1973) 88-95.
- Gerard H., Gerard A., Nya A.E., Felden F., Gueant J.L.: Spermatogenic cells do internalize Sertoli androgen-binding protein: A transmission electron microscopy autoradiographic study in rat. *Endocrinology* 134 (1994) 1515-1527.

- Gershagen S., Henningsson K., Fernlund P.: Subunits of human sex hormone binding globulin. Interindividual variants in size. *J. Biol. Chem.* 262 (1987a) 8430-8437.
- Gershagen S., Fernlund P., Lundwall A.: A cDNA coding for human sex hormone binding globulin. Homology to vitamin K-dependent protein S. *FEBS Lett.* 220 (1987b) 129-135.
- Gershagen S., Lundwall A., Fernlund P.: Characterization of the human sex hormone-binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis. *Nucleic Acid Res.* (1989) 9245-9258.
- Gershagen S., Fernlund P., Edenbrandt C.-M.: The genes for SHBG/ABP and the SHBG-like region of vitamin K-dependent protein S have evolved from a common ancestral gene. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40 (1991) 763-769.
- Grenot C., de Montard A., Blachere T., Mappus E., Cuilleron C.-Y.: Identification d'un site de photomarquage de la protéine plasmatique de liaison de la testostérone et de l'oestradiol (SBP) par l'hydroxy-17 β oxo-3 androstadiène-4,6 tritié. *C.R. Seances Acad. Sci* 307 (1988) 391-396.
- Grenot C., de Montard A., Blachere T., de Ravel M.R., Mappus E., Cuilleron C.-Y.: Characterization of Met-139 as the photolabeled aminoacid residue in the steroid binding site of sex hormone binding globulin using delta 6 derivatives of either testosterone or estradiol as unsubstituted photoaffinity labeling reagents. *Biochemistry* 31 (1992) 7609-7621.
- Gunsalus G.L., Carreau S., Vogel D.L., Musto N.A., Bardin C.W.: Use of androgen-binding protein to monitor development of the seminiferous epithelium. In "Sexual Differentiation: Basic and Clinical Aspects" (M.Serio, ed.) (1984) pp.53-64. Rave Press, New York.
- Hall S.H., Joseph D.R., Conti M., French F.S.: Regulation of androgen binding protein messenger RNA. In "Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis" (1986) (M. Stefanini, M. Conti, R. Geremia, E. Ziparo, eds.) pp. 139-149. Excerpta Medica, Amsterdam and New York.
- Hammond G.L., Lahteenmaki P.L.A.: A versatile method for the determination of serum cortisol binding globulin and sex hormone binding globulin binding capacities. *Clin. Chim. Acta* 132 (1983) 101-110.
- Hammond G.L., Underhill D.A., Smith C.L., Goping I.S., Harley M.J., Musto N.A., Cheng C.Y., Bardin C.W.: The cDNA-deduced primary structure of human sex hormone-binding globulin and location of its steroid-binding domain. *FEBS Lett.* 215 (1987) 100-104.
- Hammond G.L., Underhill D.A., Rykse H.M., Smith C.L.: The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs. *Mol. Endocrinol.* 3 (1989) 1869-1876.
- Hammond G.L., Bocchinfuso W.P.: Sex hormone-binding globulin/androgen binding protein: steroid-binding and dimerization domains. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 53 (1995) 1-6, 543-552.
- Hansson V., Reusch E., Trygstad O., Torgersen O., Ritzén E.M., French F.S.: FSH stimulation of testicular androgen binding protein. *Nature (London) New Biol.* 246 (1973) 56-58.
- Hansson V., Calandra R., Purvis K., Ritzén E.M., French F.S.: Hormonal regulation of spermatogenesis. *Vitam. Horm. (N.Y.)* 34 (1976) 187-214.
- Hryb D.J., Khan M.S., Rosner W.: Testosterone-estradiol-binding globulin binds to human prostatic cell membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128 (1985) 432-440.
- Hryb D.J., Khan M.S., Romas N.A., Rosner W.: The solubilization and partial characterization of the sex hormone-binding globulin receptor from human prostate. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 5378-5383.
- Hryb D.J., Khan M.S., Romas N.A., Rosner W.: The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 6048-6054.
- Hsu A.F., Troen P.: An androgen binding protein in the testicular cytosol of human testis. *J. Clin. Invest.* 61 (1978) 1611-1619.
- Hunter W.M., Greenwood F.C.: Preparation of iodine 131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194 (1962) 495.
- John S.W.M., Weitzner G., Rozen R., Scriver C.R.: A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acid Res.* 19 (1991) 408.
- Joseph D.R., Hall S.H., French F.S.: Rat androgen binding protein: structure of the gene, mRNA and protein. *Colloq.-Inst. Natl. Sante Rech. Med.* 149 (1986) 123-135.

- Joseph D.R., Hall S.H., Conti M., French F.S.: The gene structure of rat androgen-binding protein: Identification of potential regulatory deoxyribonucleic acid elements of a follicle-stimulating hormone-regulated protein. *Mol. Endocrinol.* 2 (1988) 3-13.
- Joseph D.R., Adamson M.C., Kozak C.A.: Genetic mapping of the gene for androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin to mouse chromosome 11. *Cytogenet. Cell Genet.* 56 (1991) 122-124.
- Joseph D.R., Lawrence W., Danzo B.J.: The role of asparagine-linked oligosaccharides in the subunit structure, steroid binding, and secretion of androgen-binding protein. *Mol. Endocrinol.* 6 (1992a) 1127-1134.
- Joseph D.R., Baker M.: Sex hormone-binding globulin, androgen-binding protein, and vitamin K-dependent protein S are homologous to laminin A, emrosin, and *Drosophila* crumbs protein. *FASEB J.* 6 (1992b) 2477-2481.
- Joseph D.R., Lawrence W.: Mutagenesis of essential functional residues of rat androgen-binding protein sex/hormone-binding globulin. *Mol. Endocrinol.* 7 (1993) 488-496.
- Khan M.S., Knowles B.B., Aden D.P., Rosner W.: Secretion of testosterone-estradiol-binding globulin by a human hepatoma-derived cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52 (1981) 448-449.
- Khan M.S., Ehrlich P., Birken S., Rosner W.: Size isomers of testosterone-estradiol-binding globulin exist in the plasma of individual men and women. *Steroids* 45 (1985) 463-472.
- Khan M.S., Hryb D.J., Hashim G.A., Romas N.A., Rosner W.: Delineation and synthesis of the membrane receptor-binding domain of sex hormone-binding globulin. *J. Biol. Chem.* (1990) 18,362-18,365.
- Khan M.S., Rosner W.: Histidine 235 of human sex hormone-binding globulin is the covalent site of attachment of the nucleophilic steroid derivative, 17 β -bromoacetoxydihydrotestosterone. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 8431-8435.
- Kleinman H.K., Weeks B.S., Schnaper H.W., Kibbey M.C., Yamamura K., Grant D.S.: The laminins: A family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases. *Vitam. Horm. (N.Y.)* 47 (1993) 161-186.
- Krupenko N.I., Avvakumov G.V., Strel'chyonok O.A.: Binding of human sex hormone-binding globulin-androgen complexes to the placental syncytiotrophoblast membrane. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 171 (1990) 1279-1283.
- Krusius T., Finne J., Rauvala H.: The structural basis of the different affinities of two types of acidic N-glycosidic Glycopeptides for Concanavalin A-Sepharose. *FEBS Lett* 1 (1976) 117-120.
- Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.
- Larrea F., Musto N.A., Gonsalus G.L., Mather J.P., Bardin C.W.: Origin of heavy and light protomers of androgen-binding protein from rat testis. *J. Biol. Chem.* 256 (1981a) 12566-12573.
- Larrea F., Musto N.A., Gonsalus G.L., Bardin C.W.: The microheterogeneity of rat androgen-binding protein from the testis, rete testis fluid, and epididymis, as demonstrated by immunoelectrophoresis and photoaffinity labeling. *Endocrinology* 109 (1981b) 1212-1220.
- Larrea F., Oliart R.M., Granados J., Mutchinik O., Díaz-Sánchez V., Musto N.A.: Genetic polymorphism of the human sex hormone-binding globulin: evidence of an isoelectric focusing variant with normal androgen-binding affinities. *J. Steroid Biochem.* 36 (1990) 541-548.
- Larrea F., Díaz L., Carriño C., Larriva-Sahd J., Carrillo L., Orozco H., Ulloa-Aguirre A.: Evidence that human placenta is a site of sex hormone-binding globulin gene expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46 (1993) 497-505.
- Larriva-Sahd J., Orozco H., Hernandez-Pando R., Oliart R.M., Musto N.A., Larrea F.: Immunohistochemical demonstration of androgen-binding protein in the rat prostatic gland. *Biol. Reprod.* 45 (1991) 417-423.
- Lobl T.J.: Androgen transport proteins: Physical properties, hormonal regulation, and possible mechanism of TeBG and ABP action. *Arch. Androl.* 7 (1981) 133-151.
- Luckock A., Cavalli-Sforza L.L.: Detection of genetic variation with radioactive ligands. V. Genetic variants of testosterone-binding globulin in human serum. *Am. J. Hum. Genet.* 35 (1983) 49-57.
- Mendel C.M.: The free hormone hypothesis: A physiologically based mathematical model. *Endocr. Rev.* 10 (1989) 232-274.

- Mercier C., Aïssel A, Balieu E.E.: Testosterone binding globulin in human plasma. *Int. Congr. Ser.-Excerpta Med.* 101 (1966) 212 (abstr.).
- Mercier-Bodard C., Radanyi C., Roux C., Groyer M.T., Robel P., Dadoune J.P., Petra P.H., Jolly D.J., Baulieu E.E.: Cellular distribution and hormonal regulation of hSBP in human hepatoma cells. *J. Steroid Biochem.* 27 (1987) 297-307.
- Mercier-Bodard C., Baville F., Bideux G., Binart N., Chambraud B., Baulieu E.-E.: Regulation of SBP synthesis in human cancer cell lines by steroid and thyroid hormones. *J. Steroid Biochem.* 34 (1989) 199-204.
- Mercier-Bodard C., Nivet V., Baulieu E.-E.: Effects of hormones on SBP mRNA levels in human cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40 (1991) 777-785.
- Montrevil J.: Spatial structures of glycon chairs of glycoproteins in relation to metabolism and function, survey of a decade of research. *Pure Appl. Chem.* 56 (1984) 859-877.
- Musto N.A., Gonsalus G.L., Bardin G.W.: Purification and characterization of a rat androgen binding protein from the rat epididymis. *Biochemistry* 19 (1980) 2853-2860.
- Myers R.M., Lerman L.S., Fischer S.G., Maniatis T.: Modification of the melting properties of duplex DNA by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acid Res.* 13 (1985) 3111-3129.
- Namkung P.C., Stanczyk F.Z., Cook M.J., Novy M.J., Petra P.H.: Half-life of plasma sex steroid-binding protein (SBP) in the primate. *J. Steroid Biochem.* 32 (1989) 675-680.
- Noé G., Cheng Y.C., Dabiké M., Croxatto H.B.: Tissue uptake of human sex hormone-binding globulin and its influence on ligand kinetics in the adult female rat. *Biol. Reprod.* 47 (1992) 970-976.
- Partridge W.M.: Selective delivery of sex steroid hormones to tissues in vivo by albumin and by sex hormone-binding globulin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 538 (1988a) 173-192.
- Partridge W.M.: Selective delivery of sex steroid hormones to tissues by albumin and by sex hormone-binding globulin. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 10 (1988b) 237-292.
- Petra P.H., Titani K., Walsh K.A., Joseph D.R., Hall S.H., French F.S.: Comparison of the aminoacid sequence of the sex steroid-binding protein of human plasma (SBP) with that of the androgen-binding protein (ABP) of rat testis. *Colloq.-Inst.Natl.Sante.Med.* 149 (1986a) 137-142.
- Petra P.H., Namkung P.C., Seneor D.F., McCrae D.A., Rousslang K.W., Teller D.C., Ross J.B.A.: Molecular characterization of the sex steroid binding protein (SBP) of plasma. Re-examination of rabbit SBP and comparison with the human, macaque and baboon proteins. *J. Steroid Biochem.* 25 (1986b) 191-200.
- Petra P.H., Que B.G., Namkung P.C., Ross J.B.A., Charbonneau H., Walsh K.A., Griffin P.R., Shabanowitz J., Hunt D.F.: Affinity labeling, molecular cloning, and comparative aminoacido sequence analyses of sex steroid-binding protein of plasma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 583 (1988) 10-24.
- Petra P.H.: The plasma sex steroid binding protein (SBP or SHBG). A critical review of recent developments on the structure, molecular biology and function. *J. Steroid Biochem.* 40 (1991) 135-153.
- Porto C.S., Gonsalus G.L., Bardin C.W., Phillips D.M., Musto N.A.: Receptor-mediated endocytosis of an extracellular steroid-binding protein (TeBG) in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology* 129 (1991) 436-445.
- Porto C.S., Musto N.A., Bardin C.W., Gonsalus G.L.: Binding of an extracellular steroid-binding globulin to membranes and soluble receptors from human breast cancer cells (MCF-7 cells). *Endocrinology* 130 (1992) 2931-2936.
- Power S.G.A., Bocchinfuso W.P., Pallesen M., Warmels-Rodenhiser S., van Baelen H., Hammond G.L.: Molecular analyses of a human sex hormone-binding globulin variant: evidence for an additional carbohydrate chain. *J. Clin. Endocrin. Metab.* 75 (1992) 4,1066-1070.
- Pugeat M., Moulin P., Cousin P., Fimbel S., Nicolas M.H., Crave J.C., Lejeune H.: Interrelations between sex hormone-binding globulin (SHBG), plasma lipoproteins and cardiovascular risk. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 53 (1995) 1-6, 567-572.
- Que B.G., Petra P.H.: Characterization of a cDNA coding for sex steroid-binding protein of human plasma. *FEBS Lett.* 219 (1987) 405-409.

- Raggatt L.E., Blok R.B., Hamblin P.S., Barlow J.W.: Effects of thyroid hormone on sex hormone-binding globulin gene expression in human cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75 (1992) 116-120.
- Renoir J.-M., Mercier-Bodard C.: Purification of SBP ("sex steroid binding plasma protein") from human pregnancy plasma by affinity chromatography. *J. Steroid. Biochem.* 5 (1974) 328 (abstr.).
- Reventos J., Hammond G.L., Crozat A., Brooks D.E., Gunsalus G.L., Bardin C.W., Musto N.A.: Hormonal regulation of rat androgen-binding protein (ABP) messenger ribonucleic acid and homology of human testosterone-estradiol-binding globulin and ABP complementary deoxyribonucleic acids. *Mol. Endocrinol.* 2 (1988) 125-132.
- Reventos J., Sullivan P.M., Joseph D.R., Gordon J.W.: Tissue-specific expression of the rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin gene in transgenic mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 96 (1993) 69-73.
- Rosner W., Toppel S., Smith R.N.: Testosterone-estradiol-binding globulin of human plasma: denaturation and protection. *Biochem. Biophys. Acta* 351 (1974) 92-98.
- Rosner W., Smith R.N.: Isolation and characterization of the testosterone-estradiol-binding globulin from human plasma. Use of a novel affinity column. *Biochemistry* (1975) 4813-4820.
- Rosner W., Aden D.P., Kahn M.S.: Hormonal influences on the secretion of steroid-binding proteins by a human hepatoma-derived cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59 (1984) 806-808.
- Rosner W.: The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: Recent advances. *Endocr. Rev* 11 (1990) 80-91.
- Ritzén E.M., Nayfeh S.N., French F.S., Dobbins M.C.: Demonstration of androgen-binding components in rat epididymis cytosol and comparison with binding components in prostate and other tissues. *Endocrinology (Baltimore)* 89 (1971) 143-151.
- Ritzén E.M., Dobbins M.C., Tindall D.J., French F.S., Nayfeh S.N.: Characterization of an androgen binding protein (ABP) in rat testis and epididymis. *Steroids* (1973) 593-607.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (1985) 1350-1354.
- Sheffield V.C., Cox D.R., Lerman L.R., Myers R.M.: Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1989) 232-236.
- Sinha Y.N., Gilligan T.A., Lee D.W.: Detection of high molecular weight of prolactin in human plasma by a combination of electrophoretic and immunologic techniques. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58 (1984) 752-754.
- Sinnecker G., Mitze M., Donn F., Neumann S.: Immunohistochemical detection of a sex hormone-binding globulin like antigen in tissue sections of normal human prostate, benign prostatic hypertrophy and normal human endometrium. *Steroids* 52 (1988) 335-336.
- Skinner M.K., Ritz E.B.: Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (1985) 114-118.
- Sullivan P.M., Petrusz P., Szpirer C., Joseph D.R.: Alternative processing of androgen-binding protein RNA transcripts in fetal rat liver. Identification of a transcript formed by trans splicing. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 143-154.
- Sullivan P.M., Wang Y.-M., Joseph D.R.: Identification of an alternate promoter in the rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin gene that regulates synthesis of a mRNA encoding a protein with altered function. *Mol. Endocrinol.* 7 (1993) 702-715.
- Suzuki Y., Sinohara.: Subunit structure of sex-steroid-binding plasma proteins from man, cattle, dog and rabbit. *J. Biochem. (Tokyo)* 96 (1984) 751-759.
- Strel'chyonok O.A., Survilo L.I., Tsapelik G.Z., Sviridov O.V.: Purification and physicochemical properties of the sex steroid-binding globulin of human blood plasma. *Biokhimiya (Moscow)* 48 (1983) 756-762.
- Strel'chyonok O.A., Avvakumov G.V., Survilo L.I.: A recognition system for sex-hormone-binding protein-estradiol complex in human decidua endometrium plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 802 (1984) 459-466.

- Tindall D.J., Schrader W.T., Means A.R.: The production of androgen binding protein by Sertoli cells. In "Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis" (M.L. Dufau, A.R. Means, eds.) (1974) pp. 167-175. Plenum, New York.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (1979) 4350-4354.
- Van Baelen H., Convents R., Cailleau J., Heyns W.: Genetic variations of human sex hormone-binding globulin: Evidence for a worldwide bi-allelic gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75 (1992) 135-139.
- Vermeulen A.: Physiology of the testosterone-binding globulin in man. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 538 (1988) 103-111.
- Vernon R.G., Dorrington J.H., Fritz I.B.: Testosterone binding by rat testicular seminiferous tubules. *Int. Congr. Ser. Excerpta Med.* 256 (1972) 200 (abstr.)
- Wagner R.K.: Extracellular and Intracellular Steroid Binding Proteins, properties, discrimination, assay and clinical application. *Acta Endocrinologica* (1978) 88 (Suppl 218), 1-73
- Walsh K.A., Titani K., Takio K., Kumar S., Hayes R., Petra P.H.: Aminoacid sequence of the sex steroid binding protein of human blood plasma. *Biochemistry* 25 (1986) 7584-7590.
- Waltz M.R., Pullman T.N., Takeda K., Sobieszczyk P., Refetoff S.: Molecular basis for the properties of the thyroxine-binding globulin-slow variant in American Blacks. *J. Endocr. Invest.* 13 (1990) 343-349.
- Wang Y.-M., Bayliss D.A., Millhom D.E., Petrusz P., Joseph D.R.: The androgen-binding protein gene is expressed in male and female rat brain. *Endocrinology (Baltimore)* 127 (1990) 3124-3130.
- Wright W.W., Musto N.A., Mather J.P., Bardin C.W.: Sertoli cells secrete both testis-specific and serum proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (1981) 7565-7569.
- Yen J., Wisdom R.M., Tratner I., Verma I.M.: An alternative spliced form of FosB is a negative regulator of transcriptional activation and transformation by Fos proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 5077-5081.