

00381
49



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**Aislamiento, Clonación y Análisis de Secuencia del ADNc del
Citocromo P450_{sc} de Hámster Sirio (*Mesocricetus auratus*)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA

M en C FELIPE DE JESUS VILCHIS URIBE

DIRECTOR DE TESIS: DR. FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE, 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

El trabajo experimental para la elaboración de esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal, Departamento de Biología de la Reproducción, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Agradezco al Dr. Fernando Montiel Aguirre de la Facultad de Química de las Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo.

Mi agradecimiento a los profesores que revisaron esta tesis:

Dr. Enrique Pedernera Astegiano
Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta
Dr. José Pedraza Chaverri
Dra. María del Carmen Méndez Herrera
Dr. Alfredo Antonio Ulloa Aguirre
Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Mi reconocimiento también para la Universidad Nacional Autónoma de México y la Secretaría de Salud.

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

INDICE

<i>RESUMEN</i>	-----	<i>1</i>
<i>ABSTRACT</i>	-----	<i>2</i>
<i>ANTECEDENTES</i>	-----	<i>3</i>
Características Generales de los Citocromos		
Conversión de Colesterol a Pregnenolona		
Citocromo P450 _{scc}		
Dominios y Regiones Funcionales del P450 _{scc}		
Suministro de Colesterol		
Distribución del Citocromo P450 _{scc}		
Tejidos Esteroidogénicos Primarios		
Tejidos Potencialmente Esteroidogénicos		
<i>OBJETIVO</i>	-----	<i>24</i>
<i>HIPOTESIS</i>	-----	<i>25</i>
<i>MATERIAL Y METODOS</i>	-----	<i>26</i>
Aislamiento de RNAm		
Síntesis de DNA Complementario (DNAc)		
Secuenciación del DNA		
Amplificación de los Extremos del DNAc (RACE)		
Reacciones de Clonaje y Transformación		
Transferencia de Acidos Nucleícos		
Ensayos de Transfección		
<i>RESULTADOS Y DISCUSION</i>	-----	<i>38</i>
<i>CONCLUSIONES</i>	-----	<i>62</i>
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	-----	<i>63</i>
<i>PUBLICACION</i>	-----	<i>78</i>

RESUMEN

El colesterol es un componente esencial de la membrana celular y el esteroide más abundante en organismos superiores a partir del cual se sintetizan los ácidos biliares, las hormonas esteroideas, la vitamina D y la mielina. El citocromo P450_{scc} (el producto del gen CYP11A1) forma parte de un sistema de transporte de electrones intramitocondrial que cataliza el rompimiento de la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona. A su vez la conversión de colesterol a pregnenolona se considera como el paso limitante para la biosíntesis de todas las hormonas esteroideas en los órganos esteroideogénicos. Como paso inicial para determinar si la glándula Harderiana tiene la capacidad de expresar esta actividad enzimática, en el presente trabajo de tesis se reporta el aislamiento y clonación de un DNA complementario (DNAc) para el citocromo P450_{scc}, el cual fue obtenido a partir de tejido adrenal de hámster Sirio (*Mesocricetus auratus*). El aislamiento del RNAm se llevó a cabo mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos degenerados y el procedimiento de la amplificación rápida de los extremos 5'- y 3'- del DNAc (RACE 5'- y 3'-). El DNAc del p450_{scc} fue insertado en el vector de clonación pcDNA3.1, amplificado y purificado para la determinación de su secuencia nucleotídica.

El análisis de secuenciación indicó que el DNAc completo contiene un marco abierto de lectura de 1563 pares de bases que codifica para un polipéptido de 520 residuos. La secuencia deducida de aminoácidos mostró la existencia de dominios funcionales bien conservados, incluyendo un dominio de unión al hemo y un dominio de unión al esteroide y comparte una homología de secuencia mayor al 80% con la enzima de otros roedores. Estudios de transfección transitoria de células HEK-293 con el P450_{scc} clonado, muestran la transformación del sustrato 25-hidroxicolesterol en pregnenolona. Usando una sonda específica marcada y el método de transferencia Northern se demostró la presencia de un transcrito de aproximadamente 1.8 kb, cuya expresión se detectó en los principales tejidos endocrinos clásicos como el ovario, el testículo y la suprarrenal. Asimismo, mediante el análisis de transferencia Southern y la reacción en cadena de la polimerasa/transcriptasa reversa (RT-PCR) se encontró que el RNAm de esta enzima también se expresa en otros órganos considerados no-esteroideogénicos, entre los que se encuentran el pulmón el epidídimo y la glándula Harderiana. La abundancia relativa de transcritos específicos en estos tejidos sugiere que el P450_{scc} podría desempeñar un papel importante en la regulación de la síntesis de hormonas esteroideas a nivel local.

ABSTRACT

Cholesterol is an essential component of the cell membrane and the most abundant sterol in higher organisms from which bile acids, steroid hormones, vitamin D and myelin are synthesized. Cytochrome P450scc (the gene product of CYP11A1) is part of an intramitochondrial electron transport system that catalyzes the conversion of cholesterol to pregnenolone. This reaction represents the first, rate-limiting and hormonally regulated step in the biosynthesis of all steroid hormones in steroidogenic tissues. As an initial step to establish whether this enzymatic activity is accomplished by the Harderian gland, in the present study we carried out the cloning and sequencing of the cDNA for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450scc of the Syrian hamster. Isolation of P450scc mRNA was performed using degenerate primer PCR together with 5'- and 3'-RACE system. The entire P450scc cDNA was inserted within the pcDNA3.1 cloning vector, amplified and then purified to determine its nucleotide sequence.

Sequencing analysis disclosed an open reading frame of 1563 bp encoding a polypeptide of 520 residues. The molecular weight of the mature form of P450scc was calculated to be 60,270 Da. Cytochrome isolated from hamster adrenals shows about 77% amino acid sequence homology to those of mammalian and chicken P450scc. The deduced amino acid sequence predicts the existence of various well preserved functional motifs, including a heme-binding domain, a steroid-binding domain and a mitochondrial leader sequence located towards the NH₂-region. Transient transfection of HEK-293 cells with the cloned cDNA, resulted in the formation of pregnenolone from the precursor 25-hydroxycholesterol. By Northern blot analysis a major transcript of 1.8 kb was detected in RNA preparations from primary endocrine organs (gonads, adrenal glands). In addition, tissue distribution analysis using the coupled reaction of RT-PCR and Southern blotting, showed the expression of specific mRNAs in sites other than the classical steroidogenic organs, such as the epididymis, lung and Harderian gland. The relative abundance of transcripts for both P450scc and StAR protein, suggests that cytochrome enzymatic activity may be relevant for local production of steroid hormones at these non-endocrine sites.

ANTECEDENTES

Los esteroides constituyen un grupo muy importante de reguladores metabólicos, esenciales para el mantenimiento de la homeostasis y la capacidad reproductiva, y que incluye a los ácidos biliares, vitamina D, esteroides, saponinas y hormonas esteroides. La actividad de estas últimas es determinante durante la embriogénesis y etapas subsecuentes del desarrollo posnatal. Desde el punto de vista fisiológico, los esteroides son considerados como moduladores del crecimiento, metabolismo y diferenciación celular. En mamíferos, los órganos endocrinos especializados en la producción de esteroides son la corteza adrenal y las gónadas. Durante el embarazo la placenta se desempeña como una fuente adicional de producción de estas hormonas (Albrecht & Pepe, 1990).

Así, los glucocorticoides y mineralocorticoides producidos en la corteza adrenal son importantes en el metabolismo de carbohidratos, la producción de surfactantes pulmonares, el manejo del estrés, la reabsorción de sodio y la presión sanguínea. Los andrógenos sintetizados en el testículo son responsables de la diferenciación del fenotipo masculino y el mantenimiento de la función reproductiva. Por último, los esteroides sexuales femeninos, estrógenos y progestagenos, sintetizados en el ovario y la placenta, son esenciales para la reproducción y funcionan para inducir los caracteres sexuales secundarios (Stocco & Clark, 1996; Whitfield et al., 1999).

Ya que las células esteroideogénicas no almacenan cantidades significativas de esteroides, la secreción de estos depende directamente de su capacidad de síntesis y producción. Se considera que la biosíntesis de todas las hormonas esteroides comienza con el rompimiento de la cadena lateral del colesterol (Burstein & Gut, 1971).

Los tejidos esteroideogénicos pueden sintetizar colesterol *de novo* a partir de acetato, pero en humano las células esteroideogénicas obtienen la mayor parte de su colesterol de las lipoproteínas plasmáticas de baja densidad (LDL). A nivel celular, las concentraciones de LDL reducen la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMGCoA), una enzima paso limitante en la formación del colesterol. Las hormonas tróficas que estimulan la esteroideogénesis también regulan los niveles de la HMGCoA reductasa así como el receptor de LDL y la captación de colesterol-LDL (Hanukoglu, 1992; Miller, 1998)).

Los ésteres de colesterol que son captados por endocitosis pueden entonces ser almacenados directamente, o bien, pueden ser convertidos a colesterol libre y usados para la síntesis de hormonas esteroides. Se piensa que el principal mecanismo responsable para la salida de colesterol-LDL de los endosomas o los

lisosomas, involucra la participación de la proteína NPC1, la cual facilitaría su transporte hacia el aparato de Golgi (Simons & Ikonen, 2000).

El almacenamiento del colesterol como ésteres de colesterol en vesículas lipídicas es controlado por la acción de dos enzimas contrarias, la colesterol esterasa (C_{27} -ester hidrolasa) y la colesterol ester sintetasa. En términos generales, las hormonas tróficas (LH, ACTH) estimulan la esterasa e inhiben la ester sintetasa, incrementando de esta manera la disponibilidad de colesterol para la síntesis de esteroides. La colesterol esterasa puede ser también activada por la δ -MSH, un péptido derivado de la POMC, el precursor de la ACTH (Miller, 1988).

El colesterol libre, el cual es insoluble en el citoplasma es transportado hacia la mitocondria muy probablemente a través de la proteína acarreadora de esteroides 2 (SCP2), del receptor periférico de benzodiazepinas (PBR) y de la proteína StAR. Se ha observado que en fibroblastos normales, la SCP2 es capaz de transportar colesterol recién sintetizado, del retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática, lo cual ha sugerido que esta proteína podría ser un transportador de colesterol no tan específico. La SCP2 ha sido descrita en tejidos donde el recambio de colesterol es alto, tal como sucede en el hígado o los tejidos esteroideogénicos, y se ha encontrado asociada con las fracciones microsomal y citosólica (Chanderbhan et al., 1982; Stocco & Clark, 1996). También se ha sugerido que la PBR podría estar involucrada en la translocación del colesterol, de la membrana externa hacia la membrana interna de la mitocondria (Gravish, 1995).

Independiente del tejido de origen, todas las hormonas esteroides son sintetizadas a partir de un substrato común, la pregnenolona. El rompimiento de la cadena lateral del colesterol por el citocromo P450_{scc}, es la reacción inicial así como el paso limitante en la producción de pregnenolona (y por lo tanto de los demás esteroides), y su síntesis esta regulada en forma crónica y aguda. La regulación aguda inducida por hormonas hipofisarias, depende exclusivamente de la disponibilidad del colesterol para la reacción del rompimiento de la cadena lateral, y no del cambio en los niveles de P450_{scc}. Esta respuesta aguda es mediada por la proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda (StAR) y probablemente también por una proteína similar al receptor de benzodiazepinas tipo-periférico (PBR), las cuales facilitarían el movimiento del colesterol al interior de la mitocondria. Por otro lado, la regulación lenta o crónica, la cual toma de horas a semanas para llevarse a cabo, es mediada por un incremento en la transcripción de los diferentes genes que codifican las enzimas esteroideogénicas (Omura & Morohashi, 1995; Miller, 1998; Arakane et al., 1998; Culty et al., 1999).

Para la síntesis de las hormonas esteroides en tejidos endócrinos intervienen por lo menos seis formas distintas de citocromos P450. La expresión específica de estas enzimas, la cual esta bajo el control de la hipófisis y regulada principalmente

a nivel transcripcional, determina la formación de los productos finales de la vía biosintética en cada órgano. Tres de los seis citocromos P450, el P450_{scd}, P450_{11B} y el P450_{ald} están localizados en la membrana interna de la mitocondria mientras que los tres restantes se encuentran en el retículo endoplásmico (Simpson et al., 1991; Omura & Morohashi, 1995).

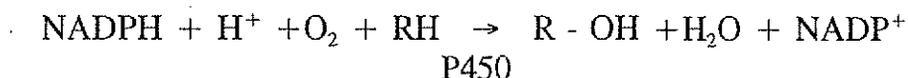
Características Generales de los Citocromos P450

El término "citocromo P450" se emplea en forma genérica para designar a un gran número de enzimas oxidativas con una talla aproximada de 500 aminoácidos y que contienen un grupo hemo único. Se les nombra P450 (pigmento 450) ya que todas ellas exhiben un desvío característico en el pico de absorbancia (de Soret) de 420 a 450 nm después de la reducción con monóxido de carbono (White & Coon, 1982; Miller, 1988).

Los citocromos P450 pertenecen a una superfamilia de proteínas que son importantes en el metabolismo oxidativo, peroxidativo y reductivo de múltiples compuestos endógenos tales como ácidos biliares, esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, leucotrienos y aminas biogénicas. Muchas de estas enzimas metabolizan también una gran variedad de compuestos exógenos incluyendo fármacos, contaminantes ambientales y productos vegetales naturales. El metabolismo de productos químicos externos puede llevar a producir metabolitos tóxicos, algunos de los cuales se les ha implicado como posibles agentes responsables para la iniciación, la promoción y la progresión tumoral (Nelson et al., 1993).

En el sentido estricto de la terminología, estas proteínas no son de hecho citocromos por lo cual la Unión Internacional de Bioquímica (NC-IUB) recomienda el término "proteína hemo-thiolato" en lugar de "citocromo" para los P450s (Palmer & Reedijk, 1989). No obstante el segundo término es el más ampliamente aceptado y su uso se ha generalizado en la literatura.

Los genes de la superfamilia de los P450s codifican para un grupo de enzimas que comparten ciertas características distintivas, ya que todas ellas: (i) contienen un grupo hemo unido en forma no covalente, (ii) son proteínas de membrana unidas firmemente a membranas intracelulares y (iii) utilizan equivalentes reductores de NADPH y un átomo de oxígeno para oxigenar los sustratos. Así, todos los citocromos P450 reducen O₂ atmosférico con electrones del NADPH de acuerdo a la siguiente reacción:

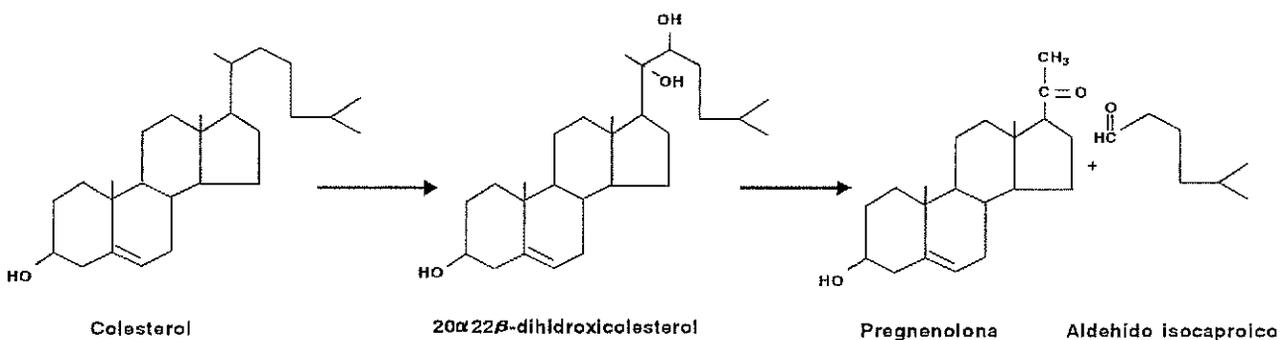


Los electrones del NADPH alcanzan el P450 vía uno o mas intermediarios del transporte de electrones, uno de los cuales es siempre una flavoproteína. En base a su localización intracelular y a la enzima a partir de la cual reciben electrones, los P450 pueden ser subdivididos en dos clases principales. La gran mayoría de los P450s se encuentran principalmente en el retículo endoplasmico en donde son sintetizados por polirribosomas unidos a membranas y se insertan directamente en la bicapa lipídica, vía señales de reconocimiento. A la segunda clase pertenecen el P450_{scc} (Miller, 1988), la 11 β -hidroxilasa (Chua et al., 1987) y la aldosterona sintetasa (Curnow et al., 1991), las cuales son sintetizadas en polirribosomas libres como grandes precursores, y solo después del rompimiento y remoción de un extrapeptido NH₂-terminal, son transportados hacia la mitocondria (Omura & Morohashi, 1995).

Los citocromos mitocondriales están involucrados en la formación de las principales clases de esteroides y reciben electrones de la ferredoxina a través de la NADPH-ferredoxina reductasa. Gran parte de estas proteínas provienen de genes ancestrales que han existido por mas de 3500 millones de años (Gonzalez, 1990; Nelson et al., 1993).

Conversión de Colesterol a Pregnenolona

La formación de pregnenolona a partir del colesterol representa el paso inicial y limitante en la biosíntesis de todas las hormonas esteroides. Esta reacción involucra tres pasos secuenciales distintos; 20 α -hidroxilación, 22 β -hidroxilación y el rompimiento de la cadena lateral del colesterol entre los carbonos 20 y 22 para formar pregnenolona (5-pregnen-3 β -ol-20-ona) y aldehído isocaproico (Fig. 1).



P450_{scc}

Figura 1. Conversión de Colesterol a Pregnenolona

Los resultados de estudios metabólicos indicaron que los derivados del colesterol, el 20 α -hidroxicolesterol, el 22 β -hidroxicolesterol y el 20,22-dihidroxicolesterol, podían ser aislados de tejido adrenal de bovino en cantidades significativas, lo cual sugería que esta conversión era llevada a cabo por tres enzimas diferentes; 20 α -hidroxilasa, 22 β -hidroxilasa y 20,22-liasa. (Burstein & Gut, 1971). Estudios posteriores de purificación de proteínas indicaron la existencia de una sola especie de citocromo inmunológicamente identificable (Lambeth et al., 1982; Miller, 1988; Stocco & Clark, 1996).

En la actualidad está bien establecido que la transformación enzimática de colesterol a pregnenolona es catalizada por el sitio activo único del citocromo P450_{scc} (side-chain cholesterol cleavage), el cual se encuentra unido a la membrana interna de la mitocondria como un multímero de 16 subunidades que llega a totalizar cerca de los 850,000 Daltones (Miller, 1998).

Citocromo P450_{scc}

El citocromo P450_{scc} es una hemoproteína de localización mitocondrial codificada por el gen CYP11A1 (John et al., 1984; Chung et al., 1997). La actividad de esta enzima [EC 1.14.15.67], conocida anteriormente como 20,22-Desmolasa se ha documentado en los principales órganos esteroideogénicos y su expresión es regulada a nivel transcripcional por hormonas tróficas, vía AMPc como segundo mensajero (Omura & Morohashi, 1995).

El CYP11A1 humano es un gen de copia simple, localizado en la región q23-q24 del cromosoma 15 y estructuralmente está constituido de 9 exones y 8 intrones que abarcan cerca de 20 kilobases del DNA genómico (Chung et al., 1986; Morohashi et al., 1987).

El DNAc del P450_{scc} humano, rata y bovino codifica para precursores de 521, 526 y 520 aminoácidos respectivamente (Morohashi et al., 1984; Chung et al., 1986; Oonk et al., 1990).

Se considera que el citocromo P450_{scc} funciona como la oxidasa terminal en un sistema de transporte de electrones intramitocondrial, constituido de tres componentes funcionales básicos, incluyendo una flavoproteína (NADPH-Ferredoxina Reductasa), una proteína hierro-sulfurada (Ferredoxina) y el citocromo P450_{scc} (Tabla I). Para las oxidasas mitocondriales de función mixta, los electrones necesarios para la reducción del oxígeno molecular son derivados del

NADPH, generado muy probablemente dentro de las mitocondrias a partir de intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (Henry, 1997; Miller, 1998).

Tabla 1. Características de los genes del complejo enzimático mitocondrial P450scc*.

Enzima	Gen(n)	Cromosoma	Gen(kb)	RNAm(kb)	# a.a.	Peso Mol.
F-Reductasa	1	17	12	2.0	459	52,000
Ferredoxina	1	11	>20	1.7	124	11,900
P450scc	1	15	>20	1.8	521	60,200

* Datos referidos del sistema mitocondrial humano.

En sistemas mitocondriales reconstituidos conteniendo ciertos detergentes y fosfolípidos, la actividad máxima del P450scc se desarrolla a un pH óptimo de 7.0-7.4. A 37°C, la enzima exhibe una K_m para colesterol de entre 30 y 70 $\mu\text{mol/L}$. Cuando se utiliza 25-hidroxicolesterol o bien 24-cetocolesterol, la K_m estimada para ambos sustratos es de 15.8 ± 2.6 y 4.8 ± 0.3 respectivamente (Tuckey, 1992; Tuckey & Cameron, 1993).

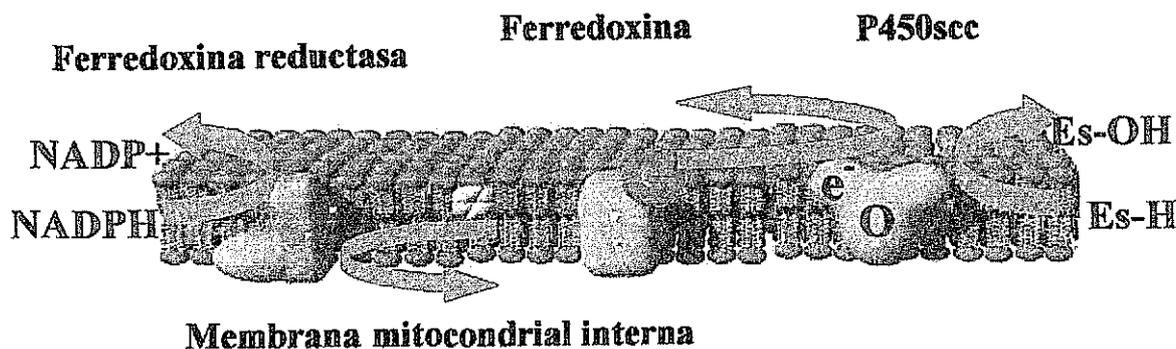
El modelo actual para las hidroxilasas mitocondriales (Fig. 2) involucra la transferencia secuencial de electrones del NADPH a la NADPH-ferredoxina que esta asociada debilmente a la membrana mitocondrial interna. La ferredoxina reductasa transfiere entonces los electrones a la ferredoxina la cual se encuentra en solución en la matriz mitocondrial. A su vez la ferredoxina transfiere los electrones al citocromo (Miller, 1988 ; Hanukoglu, 1992). El citocromo P450scc reduce el oxígeno molecular a H_2O y al grupo hidroxilo a ser incorporado al esteroide; esto le confiere la estereoespecificidad de la reacción de hidroxilación. En su forma reducida el citocromo P450scc une monóxido de carbono y en esta forma absorbe la luz de 450nm (Miller, 1988; Hanukoglu, 1992).

NADPH-Ferredoxina Reductasa

La adrenodoxina reductasa es una flavoproteína mitocondrial que acepta electrones del NADPH generado dentro de la mitocondria. De acuerdo a los patrones de hibridación del DNA genómico cortado con diferentes enzimas de restricción, el genoma humano contiene unicamente un solo gen de ferredoxina reductasa situado sobre el brazo largo del cromosoma 17 (cen \rightarrow q25). El gen de esta enzima codifica para una proteína de 497 aminoácidos, 32 de los cuales, localizados en la región NH_2 -terminal constituyen el péptido señal y los restantes 465 representan el péptido maduro (Solish et al., 1988). Estas presecuencias son requeridas para el transporte específico hacia el interior de la mitocondria y son desensambladas por proteasas una vez que el precursor ha entrado a la mitocondria (Matocha &

Waterman, 1985; Ness & Weiss, 1987, Komoya & Mihara, 1996).

La asociación específica de los precursores mitocondriales parece estar mediada por los extremos polares de la cardiolipina, un fosfolípido de la membrana mitocondrial interna (Miller, 1998). Se ha establecido que los péptidos señal del complejo presentan poca similitud de secuencia, no son hidrofóbicos e invariablemente contienen varios residuos básicos los cuales son esenciales para el transporte intramitocondrial (Hendrick et al., 1989, Hanukoglu, 1992).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig 2. Modelo del complejo P450 de la membrana mitocondrial interna

Estudios realizados en cultivos de células de la granulosa humana indican que el estímulo con gonadotropinas o con AMPc tienen poco efecto sobre los niveles de RNAm de la ferredoxina reductasa (Solish et al., 1988).

Ferredoxina

Las ferredoxinas mitocondriales son proteínas ferro-sulfuradas (sin grupos hemo) de entre 170 y 190 aminoácidos incluyendo una secuencia líder de transporte mitocondrial de 58 a 62 residuos dependiendo de la especie. La ferredoxina se encuentra más abundantemente en la corteza adrenal, placenta y gónadas y en menor cantidad en riñón e hígado (Yeh et al., 1995). El gen de la ferredoxina abarca más de 20 kilobases del DNA genómico y estructuralmente está constituido por cuatro exones y tres intrones. El primer exón codifica al péptido señal de 60 aminoácidos que dirige el transporte del precursor hacia la matriz mitocondrial interna. El péptido maduro de 124 aminoácidos está codificado por los tres exones restantes. Aparentemente el exón 3 del gen codifica dos dominios funcionales importantes para la unión de proteínas y la coordinación del hierro. El centro ferro-sulfurado de la adrenodoxina (ferredoxina adrenal) bovina parece radicar en las cisteínas 46, 55, 56 y 92 (Chang et al., 1988). En el humano, el gen de la

ferredoxina se encuentra en la región q13 del cromosoma 11 y existen además dos pseudogenes en los cromosomas 20 y 21 (Chung et al., 1997). Al igual que los citocromos esteroidogénicos la expresión de la ferredoxina es estimulada en forma retardada por AMPc. Esta se lleva por lo menos seis horas antes que el incremento del RNAm de ferredoxina sea aparente (Yeh et al., 1995; Chung et al., 1997). A nivel mitocondrial, la ferredoxina forma un complejo 1:1 con la ferredoxina reductasa y después se disocia para posteriormente re-asociarse en un complejo análogo 1:1 con el P450_{scc}, funcionando como un mecanismo de intercambio de electrones difuso e indiscriminado. Se piensa que la ferredoxina reductasa y la ferredoxina sirven como proteínas genéricas para el transporte de electrones para todos los P450s mitocondriales y no solo para aquellos involucrados en la esteroidogénesis (Hanukoglu, 1992).

DOMINIOS Y REGIONES FUNCIONALES DEL P450_{scc}

Como se mencionó con anterioridad el CYP11A1 es un gen de copia simple que se extiende mas de 20 kilobases del DNA genómico. En humano y rata su región codificante comprende 9 exones y 8 intrones de longitud variable (Oonk et al., 1990). Estudios moleculares en el promotor del gen de la rata, han determinado que el sitio principal de iniciación de transcripción es un residuo de adenosina, localizado aproximadamente 32 pb corriente arriba del primer codon de iniciación ATG, y 24 pb corriente abajo de la caja TATA (Oonk et al., 1990). En el promotor del bovino este sitio corresponde al nucleótido -52 (Ahlgren et al., 1990), en el humano corresponde al residuo -62 (Chung et al., 1989) y en ratón este se localiza 42 pb corriente arriba del codon de iniciación (Rice et al., 1990).

El análisis funcional de la región reguladora adyacente 5' del CYP11A1 ha mostrado la existencia de varios elementos de respuesta o secuencias consenso que le confieren sensibilidad al AMPc. Los resultados de numerosos estudios experimentales indican que los mecanismos que controlan la expresión del P450_{scc} y en general de los citocromos P450, son procesos complejos, tejido-específicos, especie-específicos y hormonalmente regulados (Waterman, 1994; Kenney et al., 1995; Omura & Morohashi, 1995; Chen & Guo, 2000; Hu et al., 2001; Manna et al., 2002).

En humano y en rata, el promotor basal contiene secuencias CATT y TATAAT, las cuales funcionan muy posiblemente como cajas CAT y TATA respectivamente y se encuentran 129 y 91 pb (humano) y 95 y 61 pb (rata) corriente arriba del codón de iniciación ATG (Morohashi et al., 1987; Oonk et al., 1990). Por el contrario, en la región promotora/regulatoria del CYP11A1 de bovino y ratón la caja TATA putativa se localiza en la posición -31 y -28 respectivamente (Ahlgren et al., 1990; Rice et al., 1990).

En 1987 Chung et al., realizaron los primeros experimentos tendientes a determinar las secuencias regulatorias involucradas en la activación del P450_{scc}. Mediante ensayos de transfección transitoria de constructos unidos a un gen reportero y utilizando diferentes líneas celulares, estos autores concluyen que al menos en las células Y-1 de origen adrenal, se requiere la presencia de un segmento de alrededor de 2,500 pb para inducir activación transcripcional completa (Chung et al., 1987).

Se ha estimado también que el o los elementos de respuesta (*cis*) activados por AMPc se encuentran distribuidos sobre un tracto de al menos 5.4 kb de la región 5' no traducida del CYP11A1 (Inoue et al., 1988).

Hasta ahora hay descritas al menos dos secuencias consenso GGGGCGGG, similares a los sitios de unión para el factor de transcripción Sp1 que se localizan entre las bases -118/-100 y más distalmente, entre las bases -1860/-1890. La delección de la región proximal -111/-100 del promotor, reduce o elimina la unión del Sp1 y también reduce marcadamente la transcripción inducida por AMPc; la región más distal parece ser un potenciador selectivo constituido por dos sitios de unión para Sp1, el cual tentativamente podría funcionar como un dominio de activación (Momi et al., 1992; Guo et al., 1994; Venapally & Waterman, 1995).

El factor de transcripción Sp1 (Selective promoter factor-1) es una proteína que se une a secuencias específicas del DNA e inicialmente fue aislada de células HeLa humanas. En cada célula parece haber de 5,000 a 10,000 moléculas de Sp1, las cuales potencian la actividad transcripcional de 10 a 50 veces de promotores que contienen por lo menos una caja GC dentro del motivo GGGCGG (Kadonaga et al., 1986; Kriwacki et al., 1992).

Se sabe que al igual que otros transactivadores, la proteína Sp1 modula la expresión del P450_{scc} inducida por AMPc a través de la proteína cinasa A (PKA) (Moore et al., 1992; Waterman et al., 1994; Venapally & Waterman, 1995).

Además existe evidencia de un mecanismo de cooperación entre la proteína Sp1 y el factor esteroideogénico-1 para regular la expresión del CYP11A1 bovino. Al parecer el coactivador CBP/p300 potencia la actividad transcripcional del complejo Sp1/SF-1 (Chou et al., 1996; Monté et al., 1998; Liu & Simpson, 1999).

Hay descritos otros elementos con una secuencia consenso TCAAGGTCA, localizados hacia los nucleótidos -45 y -1610 del promotor y que corresponden a sitios de unión del factor esteroideogénico-1 ó SF-1. El SF-1/AdBP4 fue identificado originalmente como un factor de transcripción tejido específico involucrado en la regulación de hidroxilasas P450 esteroideogénicas en células adrenocorticales (Morohashi et al., 1992; Honda et al., 1993; Ikeda et al., 1994).

El SF-1 de mamíferos es un homólogo del factor 1 fuzi-tarazu (Ftz-F1), un receptor nuclear que regula el gen fuzi-tarazu de la *Drosophila*, y estructuralmente pertenece a la superfamilia de receptores nucleares que incluye a los receptores para hormonas esteroides, hormonas tiroideas y ácido retinoico (Lala et al., 1992; Morohashi & Omura, 1996; Nawata et al., 1997).

En ratón el gen para el SF-1 está constituido por 6 exones y 5 intrones y su secuencia codificante predice una proteína con un peso molecular aproximado de 52,000 daltones (Ikeda et al., 1993). Su DNA complementario presenta un marco abierto de lectura de 1383 pb codificando 462 aminoácidos (Honda et al., 1993). En humano el gen SF-1 se localiza sobre el brazo largo (región q33) del cromosoma 9 (Taketo et al., 1995).

Al igual que otros factores de transcripción ligando-dependientes, el SF-1 contiene en su región amino-terminal un dominio de unión al DNA (DUD) con dos dedos de zinc Cis-Cis clásicos que le permiten unirse en forma monomérica a elementos de respuesta de alta afinidad, y que son esenciales para su unión al DNA y la subsecuente activación transcripcional. Cuando se muta esta porción, el SF-1 no se transporta eficientemente al interior del núcleo. Los aminoácidos carboxilo-terminales en el DUD del SF-1 (caja A), reconocen las secuencias PiCAAGGPiC o PuPuAGGTCA de la región 5' de genes blanco. En su porción C-terminal, además de un dominio de unión al ligando, este contiene una secuencia AF-2 (función de activación-2) bien conservada. Se ha reportado que para la máxima actividad del SF-1/AdBP4 es necesaria la integridad de dos regiones independientes; la función de activación AF-1 de la porción distal del dominio bisagra y la secuencia AF-2 (Hammer & Ingraham, 1999).

A la fecha el SF-1/AdBP4 es considerado como un receptor huérfano del que aún se desconoce su ligando específico. No obstante, se ha especulado que este podría ser un oxisterol del tipo del 25-hidroxicolesterol (Lala et al., 1997).

La expresión del SF-1 se ha detectado básicamente en los diferentes tipos celulares de los órganos esteroideogénicos primarios incluyendo a las células de Leydig y Sertoli del testículo, células de la granulosa y cuerpo lúteo en ovario, células de las tres zonas de la corteza adrenal y la placenta. Adicionalmente se han detectado transcritos del SF-1 en los núcleos dorsomedial y ventromedial del hipotálamo, en gonadotropos de la hipófisis y más recientemente en las células endoteliales del bazo (Morohashi, 1999).

Existe evidencia experimental que sugiere la participación del SF-1/AdBP4 en la regulación transcripcional PKA-dependiente de varios genes de la esteroideogénesis y de la diferenciación (Hammer & Ingraham, 1999). Además de su papel regulador en la vía biosintética de esteroides en la glándula adrenal y gónadas,

actuando sobre el P450_{scc} y otros genes CYP como la aldosterona sintetasa (CYP11B2), 21-hidroxilasa (CYP21), aromatasas P450 (CYP19), 17 α -hidroxilasa/C17-20 liasa (CYP17) y la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD). el SF-1 parece también modular la transcripción del promotor del receptor de ACTH y de la proteína StAR, de los genes de la subunidad B de la inhibina α y β , del receptor "scavenger" tipo I, el cual media el transporte selectivo de lípidos de las lipoproteínas de alta densidad al interior de la célula, así como los genes de la oxitocina, INSL3, sustancia inhibidora de Mullerianos (MIS), y de las subunidades β de la LH y la FSH (Wehrenberg et al., 1994; Shen et al., 1994; Halvorson et al., 1998; Hammer & Ingraham, 1999).

Estudios de interrupción génica dirigida (knockout), realizados en ratones han establecido que el gen SF-1 es esencial para la formación de los tejidos esteroideogénicos primarios y para la diferenciación sexual (Nomura et al., 1996; Morohashi, 1999).

Así, los animales homocigotos Ftz-f1 $-/-$ carecen de gónadas y glándulas adrenales y presentan un arreglo neuronal anormal en el hipotálamo ventromedial, además de severas alteraciones en el bazo. La ausencia del SF-1 resulta en la formación de genitales internos y externos femeninos, independientemente del sexo cromosómico del producto. Los animales con el alelo nulo $-/-$, mueren a los pocos días de su nacimiento debido a insuficiencia de mineralocorticoides y glucocorticoides (Luo et al., 1994; Majdic et al., 2002).

En el humano la mutación heterocigota del SF-1 resulta en una forma poco común de insuficiencia suprarrenal primaria con presencia de derivados Mullerianos y estrias gonadales en sujetos 46,XY fenotípicamente femeninos (Achermann et al., 1999).

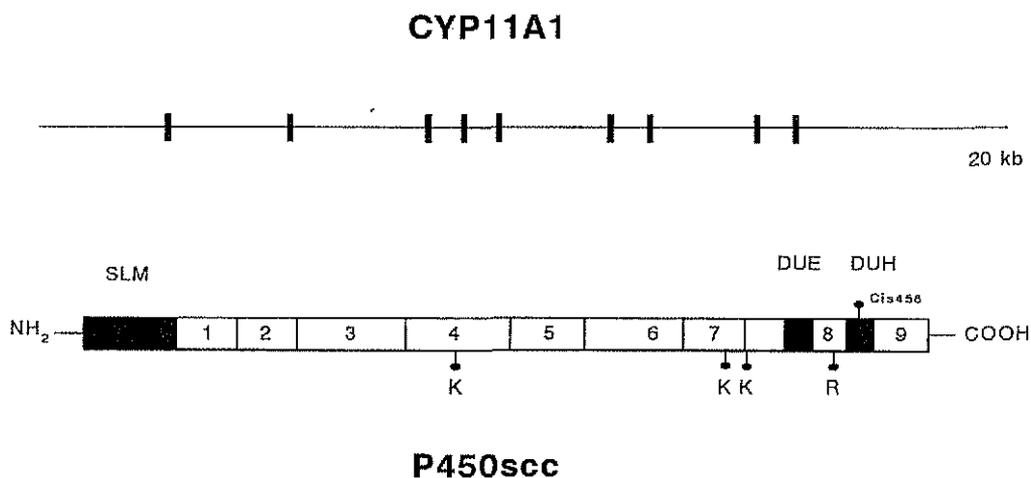
Hasta ahora, los mecanismos mediante los cuales este receptor huérfano activa la transcripción del P450_{scc} son poco conocidos, sin embargo se piensa que tejidos endocrinos, el SF-1 puede ser fosforilado en un residuo simple de serina (Ser₂₀₃) de la región AF-1. Otros factores de transcripción, incluyendo al Sp1, Dax-1, CREB y el receptor de estrógenos en combinación con el SF-1, podrían contribuir también a la regulación del P450_{scc} (Clemens et al., 1994; Hammer & Ingraham, 1999).

Además, se ha demostrado que el gen mFtz-F1 es controlado a través de una vía regulatoria única en donde el producto del gen (Ftz-F1) juega un papel esencial en la transcripción génica. Esto es, el gen SF-1 contiene sitios de unión SF-1/AdBP4, localizados hacia la región 5' del primer intron (Nomura et al., 1996). Asas autorregulatorias similares a las descritas para el mFtz-F1, han sido reportadas para otros genes, incluyendo el Hox-4 y Pit-1, los cuales al parecer están

involucrados en la diferenciación de ciertos tejidos o tipos celulares (Morohashi & Omura, 1996). En los tejidos esteroideogénicos primarios, este mecanismo autorregulatorio es imprescindible para mantener activado el gen y de esta manera mantener diferenciado el tejido (Nomura et al., 1996).

El alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos, ha indicado que como ocurre con otros citocromos, el P450_{scc} consta de regiones funcionales relativamente discretas, incluyendo una pre-secuencia amino-terminal de transporte mitocondrial (SLM), un dominio de unión al esteroide (DUE) y un dominio de unión al hemo (DUH).

La mayoría de las enzimas mitocondriales codificadas por genes nucleares son sintetizadas como grandes precursores y subsecuentemente convertidas a su forma madura en el proceso de translocación a la mitocondria. Adicionalmente, las pre-secuencias de las proteínas mitocondriales son muy variables en cuanto a su extensión y secuencia de aminoácidos (Matocha & Waterman, 1986; von Heijne, 1992; Lill & Neupert, 1996). Se ha especulado que para el P450_{scc} de humano pollo y vaca, esta señal de localización mitocondrial comprende los primeros 40 residuos de la región NH₂-terminal (Morohashi et al., 1984,1987; Nomura et al., 1997).



Si bien la estructura tridimensional definitiva del P450_{scc} no ha podido ser esclarecida totalmente, es probable que sea muy similar a la de otros citocromos cuya estructura cristalográfica ya se conoce (Vijayakumar & Salerno, 1992; Lewis & Lee-Robichaud, 1998). Además del dominio de unión al ligando, el cual se ha situado tentativamente en un tracto carboxilo-terminal de 17 residuos, también se han identificado los posibles aminoácidos que hacen contacto con el substrato (Picado-Leonard & Miller, 1988; Lewis & Lee-Robichaud, 1998).

Mediante mutagénesis dirigida y análisis de alineamiento de la porción carboxilo-terminal del P450_{scc}, ha sido posible detectar una secuencia rica en residuos básicos que esta involucrada con la unión del grupo hemo, y la cual parece ser determinante no solo para una actividad enzimática adecuada, sino también para la interacción electrostática del citocromo con la adrenodoxina. El DUH exhibe una alta homología de secuencia entre los diferentes citocromos mitocondriales estudiados, y conserva en su parte central un residuo de cisteína, considerado como el quinto ligando del hemo (Gotoh et al., 1983; Morohashi et al., 1984; Adamovich et al., 1989; Lepesheva et al., 2000; Usanov et al., 2002).

SUMINISTRO DE COLESTEROL

Sin importar el tipo de tejido, la producción de pregnenolona es controlada mediante factores que regulan la movilización del colesterol hacia la membrana mitocondrial externa y su subsecuente translocación a través del espacio intermembranal acuoso a la membrana interna. Ambos procesos son necesarios para asegurar la síntesis óptima de esteroides en respuesta al estímulo hormonal. A la fecha han sido identificados varios posibles candidatos relacionados con el suministro mitocondrial de colesterol. Una proteína bien caracterizada que se ha sugerido desempeña dicho papel es la proteína acarreadora de esteroides-2 (SCP-2), que se encuentra en forma abundante en hígado y tejidos esteroideogénicos. El gen que codifica la SCP-2 da origen a dos transcritos; uno que codifica para un polipéptido de 58-kDa (SCP_x) y el otro para uno de 15.3 kDa (SCP-2), el cual es procesado para producir una proteína madura de 13 kDa. La SCP_x y la SCP-2 poseen secuencias consenso de localización a peroxisomas y ambas han sido encontradas en estas vesículas, conocidas como sitios de síntesis de colesterol. A su vez, se ha demostrado que la síntesis de SCP-2 esta bajo el control de la ACTH aunque esta regulación solo ocurre varias horas después del estímulo hormonal. Los datos disponibles sugieren que la SCP-2 está asociada con el tráfico intracelular del colesterol como un transportador inespecífico (Pfeiffer et al., 1993; Ohba et al., 1994; Stocco & Clark, 1996).

Otra proteína que ha recibido una considerable atención por su papel en la translocación mitocondrial del colesterol es el receptor de benzodiazepinas tipo periférico o **PBR** (peripheral-type benzodiazepine receptor). El receptor PBR se ha localizado principalmente en la membrana mitocondrial externa de tejidos periféricos incluyendo la glándula adrenal y el testículo (Papadopulos et al., 1993).

Observaciones experimentales mostraron que ciertas benzodiazepinas como el diazepam (valium), incrementaban la secreción de corticosterona y testosterona en la rata, aparentemente a través de su unión al PBR (Gavish, 1995).

Los receptores PBR están compuestos de tres subunidades funcionales que comprenden un sitio de unión al ligando, un canal aniónico voltaje-dependiente y un acarreador de adenina, con pesos moleculares de 18, 32 y 30 kDa respectivamente (McEnery et al., 1992).

Hay evidencia que varios ligandos específicos del PBR estimulan la conversión de colesterol a pregnenolona. En preparaciones membranales de corteza cerebral y tejidos periféricos, los compuestos que mostraron una mayor efectividad fueron clorodiazepam, PK11195 y Ro 5-4864. Los dos últimos, estimularon la actividad esteroidogénica de células adrenales en cultivo a concentraciones fisiológicas; Kds de ~1.0 nmol/L. Estos hallazgos apoyaron la idea que la esteroidogénesis estaba mediada al menos en parte por la interacción del ligando y el PBR (Mukhin et al., 1989; Gavish, 1995).

En una comunicación previa (Verma et al., 1987), se había reportado que ciertas porfirinas podían funcionar como ligandos endógenos del PBR. En preparaciones mitocondriales de riñón de rata, la protoporfirina IX, la mesoporfirina IX y la deuteroporfirina IX, mostraron ser los competidores más potentes para inhibir la unión del [³H]PK11195 al PBR, exhibiendo constantes de inhibición (K_i) de 14.0, 23.0 y 31 X10⁻⁹ M, respectivamente (Snyder et al., 1989).

Ya que no hay todavía datos concluyentes, se ha especulado que la unión del ligando induce cambios conformacionales en el PBR y que dicha modificación estructural permitiría la formación de sitios de contacto entre las membranas mitocondriales externa e interna, lo cual elevaría el flujo de colesterol al interior de la mitocondria (Stocco & Clark, 1996; Culty et al., 2002).

Una serie de reportes han indicado que la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda o proteína StAR (**steroidogenic acute regulatory protein**) juega un papel esencial en la esteroidogénesis, facilitando el suministro de colesterol al P450_{scc} en la membrana mitocondrial interna (Clark et al., 1994, 1995; Stocco & Clark, 1996; Arakane et al., 1998; Stocco, 1997, 2001; Artemenko et al., 2001).

La proteína StAR es sintetizada como un precursor de 37 kDa que es fosforilada por la proteína cinasa A y procesada dentro de la mitocondria para generar una forma de 30 kDa. Esta fosfoproteína es indispensable para la esteroidogénesis adrenal y gonadal. La evidencia que la StAR es crítica para la producción de esteroides, derivó en parte de la demostración que las mutaciones en el gen StAR causaban hiperplasia suprarrenal congénita lipoidea (CAH), una enfermedad en la cual la síntesis de esteroides está dañada severamente a nivel del rompimiento de la cadena lateral del colesterol (Nakane et al., 1997; Korsch et al., 1999; Bose et al., 2000).

Asímismo, la interrupción del gen StAR murino resulta en un fenotipo en los animales mutantes homocigotos, similar al de la CAH lipoidea humana (Caron et al., 1997; Hasegawa et al., 2000). Como en otras proteínas importantes de la esteroidogénesis, el AMPc influencia la expresión y la actividad de la StAR (Stocco, 2001).

El análisis mutacional ha permitido determinar que la StAR contiene dos dominios funcionales principales; una secuencia líder NH₂-terminal de transporte mitocondrial y un dominio carboxilo-terminal relacionado con la transferencia de lípidos, el cual promueve la translocación del colesterol entre las dos membranas mitocondriales. El tracto NH₂-terminal de la StAR es característico de las proteínas destinadas a ser importadas a la mitocondria. Así, la delección progresiva del amino terminal (N-19, N-28 y N-48), afecta en forma proporcional el transporte mitocondrial del prepéptido. Por otro lado la remoción de los 4 últimos residuos carboxilo-terminal de la StAR (C-4), no afecta la actividad esteroidogénica pero la remoción de 10 residuos en esta región (C-10), reduce hasta un 50% la producción de pregnenolona, mientras que la delección de los últimos 28 residuos terminales (C-28), abate completamente la actividad de la StAR e impide su translocación y procesamiento. En base a estos hallazgos, se concluyó que esta fosfoproteína actúa en la parte externa de la mitocondria, en forma independiente a la translocación mitocondrial, y que su porción carboxilo-terminal es esencial para potenciar la actividad esteroidogénica (Arakane et al., 1996, 1998).

Estudios experimentales del mismo grupo mostraron que la proteína StAR contiene secuencias consenso de fosforilación por PKA. Ahí se demostró que en células transfectadas, estimuladas con 8-bromo-AMPc, se incrementaba la incorporación de ³²P en la pre-proteína. También, se observó que al mutarse los sitios de fosforilación conservados Ser₅₇ y Ser₁₉₅ de la StAR, dichas mutaciones no afectaban la síntesis de pregnenolona, aunque el cambio de la serina 195 por una alanina (S195A), si resultaba en una disminución del 50% en su actividad. Estos hallazgos sugirieron que la fosforilación de la serina 195 incrementa la actividad biológica de la StAR y que este proceso puede impactar sobre la producción esteroides regulada por AMPc (Arakane et al., 1997).

DISTRIBUCION DEL CITOCROMO P450_{scc}

Debido a que las gónadas y las adrenales son los órganos que expresan los niveles mas altos del P450_{scc}, estos han sido considerados como los principales sitios de producción de esteroides. En los últimos años sin embargo un número cada vez mas creciente de evidencia, señala que los órganos periféricos estan involucrados no solo en la transformación y el catabolismo de esteroides sino también en actividades biosintéticas mas amplias (Burstein & Gut, 1971; Dalla et al., 1992; Morales et al., 1999; Young et al., 2001).

La presencia del citocromo P450_{scc} en los diferentes tejidos esteroideogénicos, ha sido demostrada utilizando diversos enfoques experimentales, incluyendo métodos bioquímicos, moleculares e inmunohistoquímicos.

El P450_{scc} se expresa predominantemente en la corteza de las glándulas adrenales, en el testículo y en ovario. Además de los órganos endócrinos clásicos, esta enzima funciona en la placenta para proveer las hormonas necesarias para mantener el embarazo y el desarrollo fetal (Chung et al., 1986). En otro grupo de órganos tales como la glándula submaxilar (Rosner et al., 1969), cerebro (Legoascogne et al., 1987), piel (Slominski et al., 1996) y páncreas (Morales et al., 1999), por citar algunos, la expresión de transcritos de CYP11A1 ha sido relacionada con actividad esteroideogénica. Asimismo, se ha visto que la regulación transcripcional del P450_{scc}, exhibe marcadas diferencias, entre líneas celulares establecidas a partir de tejidos periféricos (células adrenocorticales Y-1 de ratón), y aquellas derivadas de tejido neural (Zhang et al., 1995).

TEJIDOS ESTEROIDOGENICOS PRIMARIOS

Glándula adrenal. Las células de las tres zonas corticales (glomerulosa, fasciculata y reticularis) son las que expresan la mayor actividad de P450_{scc} (Hanukoglu, 1992, Pelletier et al., 2001). Las células adrenocorticales de bovino mantenidas en cultivo, a las que se les adiciona ACTH por diferentes períodos de tiempo, muestran un incremento gradual de hasta 9 veces en la formación de pregnenolona, y cuya respuesta máxima se alcanza a las 36 horas del tratamiento. La administración continua de la hormona después de este período, no modifica sustancialmente los niveles máximos. Con estas observaciones se estableció que el efecto crónico de la ACTH era mediado, al menos en parte, por la inducción de la síntesis del citocromo P450_{scc}, y por lo tanto, por un incremento de la actividad catalítica (DuBois et al., 1981).

En las células de la zona glomerulosa, el P450_{scc} tiene una localización intramitocondrial hacia la membrana interna. La distribución intramitocondrial en la zona fascicular de la rata, muestra a la enzima en las crestas que dan a la matriz mitocondrial (Cherradi et al., 1997). La inmunodetección del citocromo P450_{scc} mediante microscopia electrónica usando oro coloidal, indica que la enzima se localiza exclusivamente en las mitocondrias grandes de las tres zonas adrenocorticales (Pelletier et al., 2001).

Ovario. La expresión del P450_{scc} en el ovario se ha detectado en las células de la teca interna y el cuerpo lúteo. En células de la granulosa su expresión depende de la etapa de crecimiento del folículo (Hanukoglu, 1992; Omura & Morohashi, 1995). Los niveles del RNAm para la enzima de la rata pueden ser inducidos en

folículos preovulatorios 12 horas después de la administración de LH. De igual forma, los niveles de la proteína se incrementan gradualmente a partir de las 24 horas del tratamiento con hCG o LH (Oonk et al., 1989). En ratas inmaduras tratadas con dosis fisiológicas de estradiol, la administración de PMSG causa un incremento de hasta 36 veces en los niveles de RNAm del P450scc ovárico. En células de la granulosa en cultivo, aisladas de ovarios de ratas prepúberes, el tratamiento con estradiol solo, no incrementa los niveles del mensajero, pero en combinación con FSH o 8-Br-AMPC, eleva de 3 a 4 veces el RNAm del CYP11A1 (McMasters et al., 1987).

Usando anticuerpos monoclonales contra el citocromo de bovino, Keyes y cols. (1990) demostraron que los estrógenos son determinantes para la síntesis del P450scc en el cuerpo lúteo de la coneja. Estos autores observaron que la supresión del estímulo estrogénico por 72 horas, resulta en un abatimiento importante en la cantidad de proteína inmunodetectable (Keyes et al., 1990).

Debido a que la esteroidogénesis ovárica embrionaria parece no ser necesaria para la diferenciación del fenotipo femenino, el RNAm del P450scc es apenas detectable en el ovario en desarrollo. A las 20 semanas de gestación, la cantidad de RNAm del ovario fetal representa aproximadamente el 6% del P450scc total expresado en suprarrenales fetales de la misma edad (Voutilainen & Miller, 1986). Durante el desarrollo posnatal del hámster, la expresión de la enzima es ya evidente en los ovarios de animales de 10 días. Hacia las 2½ semanas, el P450scc inmunorreactivo se localiza en el intersticio que rodea a los folículos secundarios. Por otro lado, los niveles basales de RNA del CYP11A1 permanecen bajos hasta las 2 semanas pero estos se incrementan gradualmente en ovarios de 3 semanas en adelante. Así, la expresión del RNAm del P450scc sigue un patrón que coincide con la expresión de la proteína (Schwartz & Roy, 2000). A nivel ultraestructural el P450scc se localiza básicamente en las mitocondrias de la granulosa, teca interna y cuerpo lúteo (Pelletier et al., 2001).

Testículo. La formación de pregnenolona en el testículo se lleva a cabo exclusivamente en las células de Leydig. En el testículo fetal humano, la abundancia del RNA para el P450scc es mayor entre las semanas 14 y 15 de la gestación y después disminuye lentamente a niveles casi indetectables hacia la semana 26. El patrón de aparición y desaparición del RNAm de la enzima sugiere que el CYP11A1 del testículo fetal está regulado por hCG ya que esta hormona alcanza su máxima concentración entre las semanas 14 a 16 del embarazo y posteriormente va disminuyendo en forma gradual (Voutilainen & Miller, 1986).

En las células de Leydig de ratón tanto normales como tumorales (MA-10) el P450scc se expresa constitutivamente. La estimulación crónica con AMPC incrementa los niveles basales del RNAm y la síntesis de la hemoproteína. En las

células de Leydig normales, los glucocorticoides reprimen la síntesis de la enzima así como los niveles de RNAm; en las células MA-10 tumorales, los glucocorticoides producen un efecto opuesto, incrementan los niveles del mensajero y la cantidad del citocromo P450_{scc} (Payne, 1990). A nivel ultraestructural la distribución del P450_{scc} testicular se restringe a las mitocondrias de la célula de Leydig (Pelletier et al., 2001).

Placenta. Experimentos de hibridación realizados con RNA proveniente de placentas humanas de 10 a 25 semanas, sugirieron que la abundancia relativa del RNAm para el P450_{scc} era mayor en las etapas tempranas de la gestación (Chung et al., 1986). En estudios *in vitro*, en los que se utilizaron cultivos de sincitiotrofoblastos y 25-hidoxicolesterol como sustrato, indicaron que la adición de concentraciones crecientes de estradiol al medio, incrementaba la producción de progesterona. Aunque la adición de estradiol solo no tuvo efecto, la incubación con 1.0 μ M de estradiol en presencia del sustrato, produjo una elevación del 100% en la producción de progesterona. No obstante que la actividad del citocromo se vió incrementada significativamente en los cultivos tratados, los niveles del RNAm fueron muy similares en todos los grupos. En base a esta observación se llegó a concluir que en el humano, los estrógenos aceleran el recambio del RNAm para el P450 de placenta (Babischkin et al., 1997a). A diferencia de lo que ocurre en la placenta humana, los hallazgos de un estudio llevado a cabo en placentas de mandriles fetectomizados, mostraron que en esta especie, las concentraciones circulantes de estrógenos, regulan de manera importante los niveles del RNAm y la actividad específica del P450_{scc} placentario (Babischkin et al., 1997b).

TEJIDOS POTENCIALMENTE ESTEROIDOGENICOS

Cerebro. La síntesis extragonadal de pregnenolona fue reportada originalmente por Baulieu y su grupo (1987), quienes demostraron la presencia y actividad del P450_{scc} en el cerebro de la rata. Usando anticuerpos específicos para el citocromo de bovino, fueron capaces de detectar la enzima en distintas áreas cerebrales. El P450_{scc} fue localizado básicamente en corteza entorrinal, bulbo olfatorio y sustancia blanca del encéfalo (LeGoascogne et al., 1987).

Casi al mismo tiempo se reportó la conversión de colesterol a pregnenolona y otros metabolitos como la alopregnanolona (3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-ona) en mitocondrias de oligodendrocitos de esta especie (Hu et al., 1987).

A los esteroides que son sintetizados en sistema nervioso a partir de colesterol y que se acumulan en el tejido neural en forma independiente a la secreción hormonal de las gándulas endócrinas se les conoce actualmente como

"neuroesteroides" (Robel & Baulieu, 1994).

En un estudio posterior en el que se usó un anticuerpo policlonal diferente, el citocromo se localizó básicamente en las regiones mielinizadas del encéfalo, incluyendo el cuerpo caloso, fornix, tálamo, comisura anterior y sustancia blanca del cerebelo. El patrón de tinción inmunohistoquímico fue esencialmente el mismo en ratas machos y hembras y no se encontraron variaciones significativas entre animales prepúberes y adultos (Iwahashi et al., 1990). Estas observaciones confirman de cierta forma los hallazgos de actividad enzimática en mitocondrias de oligodendrocitos ya que estas células son las responsables de sintetizar mielina. Reportes más recientes han demostrado la expresión del P450_{scc} en prácticamente todas las regiones cerebrales de la rata. La detección mediante RT-PCR del CYP11A1 y otros citocromos esteroidogénicos, así como de ferredoxina y ferredoxina reductasa, indican que al menos ciertas áreas tienen la capacidad de sintetizar esteroides *de novo* (Stromstedt & Waterman, 1995; Zhang et al., 1995).

A nivel central sin embargo, los elementos que regulan la neurosteroidogénesis parecen no requerir de la participación del SF-1 (Zhang et al., 1995). Contrario a lo que ocurre en roedores, en el humano se han descrito diferencias sexuales en la expresión del CYP11A1. En el lóbulo temporal y corteza frontal, la expresión del RNAm del P450_{scc} es significativamente mayor en las mujeres que en los hombres (Watzka et al., 1999).

Glándula submaxilar. Una serie de estudios metabólicos realizados con rebanadas de tejido submaxilar, indicaron que esta glándula posee el complejo enzimático necesario para la biosíntesis *de novo* de colesterol. Adicionalmente, demostraron que la glándula submaxilar de la rata, es capaz de transformar el colesterol-[¹⁴C] a pregnenolona y dehidroepiandrosterona (DHEA). El porcentaje de conversión del precursor marcado fue de entre el 3 y el 7% hacia pregnenolona y de entre el 0.2 y el 0.6% hacia DHEA (Rosner et al., 1969).

Útero. Mediante técnicas de hibridación *in situ* y transferencia Northern, Schiff y cols. (1993), demostraron la expresión del Cyp11a1 en útero de ratón gestante. Observaron que al tiempo de la implantación las células maternas tanto de la decidua basal como capsular expresaban cantidades significativas del P450_{scc}. Inicialmente el RNA de la enzima se detectó a los 4.5 días poscoito (dpc) y posteriormente alcanza sus niveles máximos a los 9.5 días. Después de este tiempo se pudo observar una disminución sustancial y progresiva hacia los 13.5 días de la gestación. Tales hallazgos fueron interpretados como evidencia de que el útero tiene la capacidad para sintetizar pregnenolona y que los esteroides secretados localmente podrían desempeñar un papel autocrino o paracrino durante la primera mitad del embarazo (Schiff et al., 1993).

Páncreas. La actividad esteroidogénica del tejido pancreático fue demostrada por

dos métodos diferentes; el primero fue mediante RT-PCR seguido de transferencia Southern para identificar transcritos del gen, el segundo fue un ensayo enzimático para ver la inhibición de la síntesis de pregnenolona inducida por aminoglutetimida (AMG), un potente inhibidor del citocromo P450_{scc}. Los resultados obtenidos sugirieron, que: a) el tejido pancreático posee actividad transcripcional del gen CYP11A1, b) que las mitocondrias aisladas del páncreas tienen la capacidad de sintetizar pregnenolona y c) que su síntesis es bloqueada por AMG (Morales et al., 1999).

Piel. La expresión del CYP11A1 y otros citocromos esteroidogénicos fue estudiada en preparaciones de piel humana normal y patológica y en células dérmicas mantenidas en cultivo. Mediante ensayos de RT-PCR seguidos de hibridaciones por Southern blot, fue posible demostrar la presencia de transcritos específicos para el CYP11A1, receptor de ACTH, CYP17 y CYP21A2. El RNAm del P450_{scc} fue detectado en biopsias de piel facial y piel corporal normal así como en carcinoma de células escamosas. Señales de hibridación positivas para el P450_{scc} fueron también observadas en muestras de cultivos primarios de melanocitos, carcinoma celular basal y melanoma. Estos datos representan la primera evidencia de que la piel humana y las células epidérmicas cultivadas expresan varios genes esteroidogénicos incluyendo el CYP11A1 (Slominsky et al., 1996). Estudios de hibridación *in situ* con una sonda específica de RNAc antisentido, mostraron expresión del P450_{scc} en un subgrupo de células no identificadas en el mesénquima dérmico de piel embrionaria de ratón. Las células que expresaron el P450_{scc} se encuentran distribuidas entre los tejidos que formarán las capas musculares superficiales y los elementos del tejido conectivo de la pared abdominal. La amplificación de transcritos específicos mediante RT-PCR, confirmaron la expresión no solo del Cyp11a1 sino también de ferredoxina y 3β-HSD en la piel embrionaria del ratón (Keeney et al., 1995).

Intestino. Durante el desarrollo embrionario del ratón, el análisis de hibridación *in situ* mostró marcaje positivo en el intestino primitivo de fetos de 14 días. La hibridación específica pudo observarse en las regiones más distantes del colon transversal. En estas zonas, los transcritos del P450_{scc} fueron localizados en las células epiteliales del lumen. De forma similar, mediante ensayos de hibridación *in situ* e inmunohistoquímicos, tanto el RNAm como la proteína se detectaron en el intestino fetal de ratones con el alelo nulo para el Ftz-F1 (Keeney et al., 1995). Con fundamento en sus resultados, estos autores concluyeron que en los tejidos fetales no-esteroidogénicos el Cyp11a1 se expresa en forma independiente al SF-1.

Corazón. En base a reportes previos que sugerían la existencia de un sistema esteroidogénico para la síntesis de aldosterona en tejido cardíaco, Young y cols.(2001), exploraron posibilidad de detectar expresión del citocromo P450_{scc} en este órgano. Encontraron que a partir de DNAc sintetizado de RNAm de

corazones humanos y de ratón, era posible obtener transcritos auténticos para el gen CYP11A1, 3 β -HSD y StAR. En ambos casos, sin embargo, los niveles de P450scc fueron de 100 a 1000 mas bajos a los detectados en tejido adrenal, por lo que el significado fisiológico de estos hallazgos es aún incierto (Young et al., 2001; Gomez et al., 2001).

Glándula de Harder o Harderiana. La glándula Harderiana (GH) es una estructura tubuloalveolar compuesta, situada dentro de la órbita ocular de la mayoría de los vertebrados terrestres que poseen membrana nictitante. Las funciones atribuidas a este órgano son múltiples y variadas. Se piensa que sirve primordialmente para lubricar la córnea y la nasofaringe. Se le considera además como un órgano productor de feromonas, melatonina e inmunoglobulinas y como un fototransductor en un sistema que incluye a la retina, la pineal y la gónada (Payne, 1994). No obstante su amplia distribución filogenética y el número de funciones en la que estar involucrada, se conoce relativamente poco de los factores que regulan su actividad. En términos generales, las porfirinas, lípidos e indolaminas son los principales productos de la GH cuya síntesis se encuentra bajo influencia endócrina (Vilchis, 1997).

En el hámser Sirio, el patrón de ácidos grasos glandulares, las concentraciones de melatonina así como la cantidad de porfirinas intraglandulares, en particular de protoporfirina IX, presentan un marcado dimorfismo sexual. Aún mas, se han descrito marcadas diferencias sexuales a nivel estructural y ultraestructural (Olcese & Wesche, 1989). En ambos sexos, tanto la actividad como las características de la GH pueden ser alteradas por la gonadectomía o reemplazo hormonal. También hay datos que indican que la GH tiene la capacidad de captar feromonas como la Δ^{16} -androstenona (Brooksbank et al, 1973; Payne, 1977) y metabolizar varios esteroides (Butler et al., 1978). Si bien la formación de pregnenolona en la GH no ha sido estudiada hasta ahora, la presencia de grandes cantidades de colesterol (Seyama et al., 1996), porfirinas (Payne, 1994) y enzimas esteroidogénicas (Vilchis et al., 1994), así como su alta sensibilidad a hormonas tróficas y hormonas esteroides incluyendo pregnanos C₂₁, glucocorticoides y andrógenos (Vilchis et al., 1992), han sugerido la posibilidad de que esta glándula sintetize hormonas esteroides a partir del colesterol como sucede en otros tejidos periféricos.

Deficiencia de P450scc

Hasta ahora no se conoce la deficiencia completa del citocromo P450scc en el humano aunque aparentemente en el conejo si ocurre (Miller, 1998). En esta especie Yang y cols. (1993) reportaron que la delección del CYP11A1 produce una forma letal de hiperplasia adrenal congénita (lipoid CAH), caracterizada por una

gran acumulación de colesterol e hipertrofia de la corteza adrenal, además de una feminización de los genitales en los fetos masculinos. Los animales homocigotos que presentan esta mutación, exhiben una ausencia total de la proteína y niveles indetectables del RNAm para la enzima. La delección del gen fue comprobada mediante estudios de transferencia Northern del DNA obtenido de diferentes líneas celulares (Pang et al., 1992; Yang et al., 1993). Estos hallazgos sin embargo no han sido reconfirmados a la fecha. En contraste, en el humano se sabe de un solo caso de hiperplasia suprarrenal congénita lipoidea, que deriva de una mutación heterocigota del CYP11A1, detectada en un paciente cariotípicamente masculino con insuficiencia suprarrenal y reversión sexual. Se trata de una inserción de 6-pb la cual de acuerdo al análisis mutacional, resulta en la inhibición absoluta de la actividad catalítica del citocromo (Tajima et al., 2001).

El hecho de que la ausencia de P450scc y por consiguiente de progesterona durante la gestación sea incompatible con un embarazo a término, explica en parte el porque, nunca se han detectado mutaciones homocigotas en el CYP11A1 humano (Miller, 1998). La lesión génica identificada en este paciente fue una mutación *de novo* heterocigota que no ejerce un efecto dominante negativo sobre el alelo normal, y que por lo tanto permite una actividad enzimática subnormal (Tajima et al., 2001).

Durante la escritura del presente trabajo se reportó la obtención de ratones knockout para P450scc, generados mediante la interrupción del *Cyp11a1*. Los productos homocigotos para la mutación, no sintetizan esteroides y mueren pocas horas después de nacer, aunque algunos logran sobrevivir si se les administran hormonas adrenales y gonadales. Contrario a lo esperado, los machos con el alelo nulo presentan genitales externos femeninos y órganos sexuales accesorios subdesarrollados. El epidídimo, testículo y vas deferens se encuentran presentes pero son de tamaño menor al normal. En estos animales se demuestra que la deficiencia fetal de esteroides conlleva a problemas en el desarrollo sexual, al desajuste de la homeostasis hormonal y a perturbaciones en la regulación génica (Meng-Chun et al., 2002).

OBJETIVO DEL ESTUDIO

En los últimos años, una serie de reportes experimentales han indicado que la producción de esteroides a partir de colesterol no es exclusiva de los órganos endócrinos primarios, sino que también puede ocurrir en tejidos no-

gran acumulación de colesterol e hipertrofia de la corteza adrenal, además de una feminización de los genitales en los fetos masculinos. Los animales homocigotos que presentan esta mutación, exhiben una ausencia total de la proteína y niveles indetectables del RNAm para la enzima. La delección del gen fue comprobada mediante estudios de transferencia Northern del DNA obtenido de diferentes líneas celulares (Pang et al., 1992; Yang et al., 1993). Estos hallazgos sin embargo no han sido reconfirmados a la fecha. En contraste, en el humano se sabe de un solo caso de hiperplasia suprarrenal congénita lipoidea, que deriva de una mutación heterocigota del CYP11A1, detectada en un paciente cariotípicamente masculino con insuficiencia suprarrenal y reversión sexual. Se trata de una inserción de 6-pb la cual de acuerdo al análisis mutacional, resulta en la inhibición absoluta de la actividad catalítica del citocromo (Tajima et al., 2001).

El hecho de que la ausencia de P450scc y por consiguiente de progesterona durante la gestación sea incompatible con un embarazo a término, explica en parte el porque, nunca se han detectado mutaciones homocigotas en el CYP11A1 humano (Miller, 1998). La lesión génica identificada en este paciente fue una mutación *de novo* heterocigota que no ejerce un efecto dominante negativo sobre el alelo normal, y que por lo tanto permite una actividad enzimática subnormal (Tajima et al., 2001).

Durante la escritura del presente trabajo se reportó la obtención de ratones knockout para P450scc, generados mediante la interrupción del *Cyp11a1*. Los productos homocigotos para la mutación, no sintetizan esteroides y mueren pocas horas después de nacer, aunque algunos logran sobrevivir si se les administran hormonas adrenales y gonadales. Contrario a lo esperado, los machos con el alelo nulo presentan genitales externos femeninos y órganos sexuales accesorios subdesarrollados. El epidídimo, testículo y vas deferens se encuentran presentes pero son de tamaño menor al normal. En estos animales se demuestra que la deficiencia fetal de esteroides conlleva a problemas en el desarrollo sexual, al desajuste de la homeostasis hormonal y a perturbaciones en la regulación génica (Meng-Chun et al., 2002).

OBJETIVO DEL ESTUDIO

En los últimos años, una serie de reportes experimentales han indicado que la producción de esteroides a partir de colesterol no es exclusiva de los órganos endócrinos primarios, sino que también puede ocurrir en tejidos no-

esteroidogénicos como la piel y el encéfalo. En el humano por ejemplo, se han descrito marcadas diferencias sexuales en la expresión del P450scc en varias zonas de la corteza cerebral, y se piensa que los neuroesteroides ahí sintetizados ejercen gran influencia sobre el comportamiento y la memoria. En otro grupo de órganos tales como el páncreas, útero, intestino y glándula submandibular, la formación de esteroides C₂₁ ha sido asociada a procesos regulatorios autocrinos o paracrinos. Estos hallazgos en su conjunto, han llevado a hacer un replanteamiento sobre el significado funcional de los esteroides producidos a nivel local. Datos de reportes previos sugirieron la posibilidad de que debido a su gran contenido de colesterol, actividad porfirinogénica y alta dependencia a hormonas tróficas hipofisarias y esteroides, la glándula Harderiana pudiera estar involucrada no solo en la transformación y catabolismo de esteroides sino también en actividades metabólicas mas amplias como la síntesis de sus propias hormonas. Se tiene conocimiento que la glándula Harderiana al igual que la piel, produce varias feromonas de origen esteroideal y convierte cantidades significativas de 11-cetopregnenolona y otros pregnanos 5β- reducidos, reconocidos por su efecto mediador en la síntesis de porfirinas. A su vez datos experimentales han sugerido que las porfirinas pudieran estar influenciando el metabolismo de esteroides. Como un paso inicial en el estudio de la actividad esteroidogénica de la glándula Harderiana del hámster, en el presente trabajo se aisló el DNAC del citocromo P450scc a fin de determinar su posible expresión en esta glándula exócrina.

HIPOTESIS

Los tejidos periféricos con capacidad de convertir colesterol a pregnenolona exhiben actividad de CYP11A1. Si consideramos a la glándula Harderiana del hámster como un órgano potencialmente esteroidogénico en consecuencia va a expresar el RNAm del citocromo P450scc.

esteroidogénicos como la piel y el encéfalo. En el humano por ejemplo, se han descrito marcadas diferencias sexuales en la expresión del P450scc en varias zonas de la corteza cerebral, y se piensa que los neuroesteroides ahí sintetizados ejercen gran influencia sobre el comportamiento y la memoria. En otro grupo de órganos tales como el páncreas, útero, intestino y glándula submandibular, la formación de esteroides C₂₁ ha sido asociada a procesos regulatorios autocrinos o paracrinos. Estos hallazgos en su conjunto, han llevado a hacer un replanteamiento sobre el significado funcional de los esteroides producidos a nivel local. Datos de reportes previos sugirieron la posibilidad de que debido a su gran contenido de colesterol, actividad porfirinogénica y alta dependencia a hormonas tróficas hipofisarias y esteroides, la glándula Harderiana pudiera estar involucrada no solo en la transformación y catabolismo de esteroides sino también en actividades metabólicas mas amplias como la síntesis de sus propias hormonas. Se tiene conocimiento que la glándula Harderiana al igual que la piel, produce varias feromonas de origen esteroideal y convierte cantidades significativas de 11-cetopregnenolona y otros pregnanos 5β- reducidos, reconocidos por su efecto mediador en la síntesis de porfirinas. A su vez datos experimentales han sugerido que las porfirinas pudieran estar influenciando el metabolismo de esteroides. Como un paso inicial en el estudio de la actividad esteroidogénica de la glándula Harderiana del hámster, en el presente trabajo se aisló el DNAC del citocromo P450scc a fin de determinar su posible expresión en esta glándula exócrina.

HIPOTESIS

Los tejidos periféricos con capacidad de convertir colesterol a pregnenolona exhiben actividad de CYP11A1. Si consideramos a la glándula Harderiana del hámster como un órgano potencialmente esteroidogénico en consecuencia va a expresar el RNAm del citocromo P450scc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de RNA y DNAc. El tejido adrenal de diez hamsters adultos fue utilizado para la extracción del RNA y la síntesis de DNAc. Para la purificación del RNA celular total y el RNA poliadenilado (poli A)⁺ se usó el reactivo de TRIZOL (Life Technologies, Grand Island, NY) y el estuche mRNA separator (Clontech Labs. Inc., Palo Alto, CA), respectivamente. Para la síntesis de DNAc se utilizó 1 μ g de RNAm y la Transcriptasa Reversa RNasa H⁻ contenida en el estuche SuperScript™ First-Strand Synthesis (GibcoBRL, USA), siguiendo el protocolo del proveedor.

OBTENCION DE RNA CON TRIZOL

1. Homogeneizar de 100 a 200 mg de tejido con 1,0 ml de TRIZOL.
2. Incubar el homogenado por 5 minutos sobre hielo.
3. Adicionar 0.2 ml de cloroformo por cada ml de homogenado.
4. Agitar vigorosamente y centrifugar a 12 000xg por 15 min. a 4°C.
5. Obtener fase acuosa y adicionar 0.5 ml de isopropanol/ml de soln. inicial.
6. Incubar las muestras por 10 minutos a temperatura ambiente (TA).
7. Centrifugar a 12 000xg por 10 minutos a 4°C - descartar sobrenadante.
8. Lavar el precipitado con etanol al 75%.
9. Repetir el paso 7.
10. Disolver el precipitado en ddH₂O estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).
11. Cuantificar el RNA en espectrofotómetro a 260/280 nm.

AISLAMIENTO DE RNA MENSAJERO (RNAm)*

Equilibrio de columnas

1. Resuspender la celulosa-Oligo(dt) invirtiendo la columna varias veces.
2. Centrifugar a 350xg (1,500 rpm, BeckmanTJ-6) por 2 min a TA.
3. Sacar la columna del tubo y descartar el eluido del tubo de 50 ml.
4. Adicionar 2 ml de amortiguador alto en sales (high salt) a la columna.
5. Centrifugar a 1,500 rpm, 2 min a TA.
6. Sacar la columna y descartar el amortiguador colectado en el fondo.
7. Reinsertar la columna para su uso en la extracción de RNAm.

Extracción de RNAm

1. Usar 1-3 mg de RNA total para una recuperación óptima.

2. Centrifugar el RNA total a 12,000 xg por 15 min. a 4°C.
3. Descartar el sobrenadante y secar al aire el RNA por 5 a 10 minutos.
4. Resuspender el RNA a una concentración de 1mg/ml de amortiguador de elución.
5. Calentar a 70°C por 6 min., asegurarse que todo el RNA este disuelto.
6. Dejar el RNA a TA por 5-10 min. Adicionar 1/5 parte de soln. de carga.
7. Precalentar 2 ml de amortiguador de elución a 65°C para uso en etapa #14.
8. Transferir el RNA en una columna recién preparada y guardar en tubo de 50 ml fresco.
9. Centrifugar a 1,500 rpm 2 min a 4°C. Guardar el eluido para repurificar.
10. Transferir el eluido del fondo del tubo de 50 ml a tubo fresco.
11. Lavado: a) Aplicar 0.3 ml de amortiguador alto en sales a la columna, b) centrifugar a 1,500 rpm 3 min a 4°C, c) Descartar el fluido. Repetir pasos a-c, dos veces mas.
12. Lavar la columna 3X con 0.6 ml de amortiguador bajo en sales, centrifugar a 1,500 rpm por 3 min a 4°C. Si es necesario centrifugar una vez mas.
13. Sacar la columna, quitar todo el liquido del tubo.
14. Aplicar 0.4 ml de amortiguador de elución. Centrifugar a 1,500 rpm a TA.
15. Sacar la columna del tubo de centrifuga y colocar sobre hielo.
16. Leer en espectrofotómetro para checar la concentración de RNA.
17. Adicionar 1/10 de volumen de KOAc 2M (pH 5.0) y 2.5-3.0 vol. de etanol absoluto a la muestra de RNA poli(A)⁺. Guardar a -20°C para uso posterior.
18. Secar la muestra de RNAm a TA por 5-10 min. Resuspender en ddH₂O/ con DEPC.
19. Medir la concentración de RNA en espectrofotómetro 260/280 nm.

* mRNA separator kit (K1040-2), Clontech Labs. Inc., CA, USA.

SINTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (DNAc)

1. Preparar la mezcla de RNA/iniciadores en tubo de 0.5 ml estéril.
2. La reacción incluye: 1-5 µl de RNA, 1.0 µl de mezcla (10mM) de cada dNTP (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), 1.0 µl de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (0.5µg/µl), llevar a 10 µl agua estéril.
3. Incubar cada muestra a 65°C por 5 min, incubar sobre hielo por 5 min.
4. Agregar 9.0 µl de la siguiente mezcla: Amortiguador 10X RT 2.0 µl, MgCl₂ 25 mM 4µl, 0.1M DTT 2µl, 1µl de inhibidor de RNasa.
5. Incubar a 42°C por 2 min.
6. Agregar 1µl (50 unidades) de Superscript II a cada muestra e incubar por 50 min a 42°C.
7. Terminar la reacción incubando a 70°C por 15 min, colocar sobre hielo.

8. Colectar la reacción por centrifugación. Agregar 1 μ l de RNasa H a cada tubo e incubar por 20 min a 37°C.

AMPLIFICACION DE FRAGMENTOS DEL P450scc

Inicialmente se amplificaron mediante PCR dos fragmentos del P450scc, usando el DNAc sintetizado a partir de RNA de glándula adrenal. Con el fin de obtener segmentos específicos del P450scc de hamster, se diseñaron dos pares de oligonucleotidos sintéticos (GibcoBRL, Life Technologies, USA) derivados de las secuencias reportadas para el citocromo de bovino (Morohashi et al., 1984), humano (Chung et al., 1986) y rata (Oonk et al., 1990).

Los iniciadores: rSCC1/r345 con dirección 5'→3' (ATGCWGGCAAAAGGTCTWTGC y CTGGYGTGGAACATCTKGKAGA), y SCC7a / SCC9b con dirección 5'→3' (CACCCCATCTCYGTGACCYTGACAGAG/TCMGGCRTCAGRATGAGGTTGAA), localizados hacia los extremos amino y carboxilo terminal respectivamente, fueron utilizados en las reacciones de PCR. [Y = T/C, W = T/A, K = G/T, M = C/A, R = G/A].

En todos los casos de amplificación de DNA, excepto para la síntesis del DNAc completo, se prepararon reacciones estandar, conteniendo cada una: amortiguador 10X (Tris-HCl 10mM, pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5mM) a una concentración final de 1X, 200 μ M de cada dNTP, 0.5 μ M de cada oligonucleótido, DNA 0.1-1.0 μ g, y 2.5 unidades de AmpliTaq DNA polimerasa (Perkin Elmer, Branchburgh, New Jersey, USA), en un volumen final de 25 μ l. En general, las reacciones de amplificación fueron sometidas de 25 a 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 seg., alineamiento de 52-68°C por 45 seg., y extensión de 72°C por 45 segundos con un ciclo final de extensión de 7 minutos. Al final de cada reacción, los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1% (en solución 1X TBE; Tris-Base 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 1.5mM), teñidos con bromuro de etidio. Una vez amplificados, estos segmentos fueron separados en un gel preparativo de agarosa al 1.2%, electroeluidos y purificados en columnas de Centricon 30 (Millipore Co., Bedford MA, USA) para posteriormente ser sometidos a análisis de secuenciación.

METODO DE SECUENCIACION DEL DNA

Para determinar la secuencia nucleotídica de los ácidos nucleicos se utilizó un estuche comercial de secuenciación cíclica con terminador radiomarcado (Thermo

Sequenase de Amersham LifeSciences, Cleveland, OH), que incorpora el uso de los cuatro didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con [α - 33 P] y una DNA polimerasa recombinante que permite el empleo de cantidades muy pequeñas del isótopo en las reacciones de terminación. Este procedimiento se basa en el método enzimático de Sanger (Sanger et al., 1977).

Después de purificar y cuantificar la muestra de DNA se procede a preparar las mezclas de terminación:

1. Seleccionar la mezcla maestra de terminación (MMT), ya sea dGTP o dITP.
2. Preparar las cuatro mezclas de terminación usando 2.0 μ L de MMT y 0.5 μ L de cada ddNTP marcado ([α - 33 P]-ddGTP, -ddATP, -ddTTP, -ddCTP; A.E. 1500 Ci/mmol) por reacción.

MMT	G	A	T	C
(Vol. en μ L)	2.0	2.0	2.0	2.0
[α - 33 P]ddGTP	0.5			
[α - 33 P]ddATP		0.5		
[α - 33 P]ddTTP			0.5	
[α - 33 P]ddCTP				0.5
Total	2.5	2.5	2.5	2.5

3. Depositar 2.5 μ L de cada mezcla de terminación (G,A,T,C) en tubo Eppendorf de 0.5 mL.
4. Preparar la mezcla de reacción agregando los siguientes componentes:

Amortiguador de reacción 10X	2.0 μ L
DNA (50-500 μ g)	<u> </u> μ L
Iniciador (2.5pmol)	1.0 μ L
ddH ₂ O estéril	<u> </u> μ L
Thermoseq. DNA polimerasa	<u>2.0μL</u>
	20.0 μ L

5. Transferir 4.5 μ L de la mezcla de reacción (templado/polimerasa) a cada tubo de terminación (G,A,T,C); mezclar y agregar 2 gotas de aceite mineral.
6. Aplicar 25-35 ciclos de amplificación en termociclador, incluyendo un período de desnaturalización a 95°C por 1 min., alineamiento (entre 54 y 65°C) por 1 min, extensión a 72°C por 1 min, con una extensión final a 72°C por 7 min.
7. Al finalizar el período de amplificación, agregar 4.5 μ L de solución de terminación. Pasar a tubo fresco retirando el aceite mineral.
8. Desnaturalizar a 70°C por 5 min., antes de aplicar a los geles de acrilamida.

GELES DE DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA

Las muestras desnaturalizadas se corren en geles de poliacrilamida al 6.0% conteniendo 7M de urea.

Acrilamida	5.7 g
Bis-acrilamida	3.3 g
Urea	42.0 g
Soln. TTE*	5.0 mL
ddH ₂ O	45.0 mL

Disolver y ajustar el volumen a 100 mL con ddH₂O; después filtrar la solución. Antes de vertir el gel se agregan 100 μ L de persulfato de amonio (NH₂S₂O₈) al 10%, se desgasifica por 5 min aplicando vacío y se agregan 25 μ L de TEMED. Se deja polimerizar por lo menos durante una hora a TA.

Montar el gel en la cámara usando 500mL de amortiguador de corrida TTE 1X en cada fase (Amortiguador TTE 10X para 1000mL)

Tris HCl	216g	1.7M
Taurina	72g	0.5M
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	4.0g	1mM

Efectuar una precorrida por 1-2 hrs, aplicando una corriente de 70 Watts hasta que el gel alcance una temperatura de 50°C. Aplicar 3 μ L/carril. Las muestras se corren por 2-6 hrs a 2000 Volts/70 Watts/50 mAmps.

Al finalizar, secar el gel por 1 h a 80°C y exponer en placas BioMax de Kodak por 12-16 hrs a TA.

AMPLIFICACION DE LOS EXTREMOS DEL DNAc (RACE).

Una vez amplificados con los iniciadores SCC1/SCC2 (245-pb) y SCC7a/SCC9b (335-pb), los fragmentos de PCR correspondientes, fueron secuenciados a fin de poder diseñar oligonucleótidos específicos y analizar los extremos del DNAc mediante el sistema de amplificación rápida de los extremos 5' y 3' del DNAc (RACE-3'/5'). Con este propósito se utilizaron los iniciadores 5'-CYPH1 con el anidado 5'-IM450 y el 3'-HBCC8, con el anidado 3'-H95. Se diseñaron además otros iniciadores para conocer secuencias intermedias.

Para la determinación de los extremos 5' y 3' del DNAc se utilizaron los iniciadores: CYPH1 (5'-CTGGAAATTCTGCATGTGATGGTAATG-3') y HBCC8 (5'-GATTGCAGAGCTGGAGATGAC-3') y el estuche "Marathon cDNA Amplification Kit" (Clontech Labs. Inc., Palo Alto, CA), de acuerdo al siguiente protocolo:

Síntesis de la Primera Hebra de DNAc

- 1) Por cada reacción, agregar: 0.1-1.0 μg de RNA poli(A)⁺, 1.0 μl de iniciador cDNA-Synthesis (10 μM), y agua estéril hasta 5 μl .
- 2) Incubar a 70°C por 2 min, dejar sobre hielo por 5 min.
- 3) Agregar 10 μl de una mezcla que contiene: 2 μl de solución 5X First-strand, 1 μl dNTPs (10mM), 1 μCi de [α -³²P]dCTP y 20 U/ μl de transcriptasa inversa AMV.
- 4) Mezclar perfectamente e incubar a 42°C por 1 h en incubador-aire/ colocar sobre hielo.

Síntesis de la segunda hebra del DNAc

- 1) Por cada reacción, agregar: 10 μl de la mezcla primera hebra, 16 μl de la solución 5X second strand, 1.6 μl de dNTPs (10 μM), 4 μl de una mezcla 20X de enzimas de E. coli [DNA ligasa (1.2 U/ μl)+ DNA polimerasa I (6.0U/ μl)+ RNasa H (0.25 U/ μl)] y agua estéril hasta un volumen de 80 μl .
- 2) Incubar a 16°C por 90 min.
- 3) Agregar 2.0 μl de DNA polimerasa T4 (10U).
- 4) Incubar a 16°C por 45 min.
- 5) Agregar 4.0 μl de EDTA/Glicógeno para terminar la reacción.
- 6) Agregar 100 μl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) dar vortex y centrifugar a 14,000 rpm por 10 min.
- 7) Transferir la fase acuosa a tubo fresco y repetir el paso 6 y 7.
- 8) Agregar ½ vol de acetato de amonio 4M y 2.5 vols de etanol 95% a TA.
- 9) Centrifugar a 14,000 rpm por 20 min a TA, remover el sobrenadante y contar la radiactividad del botón (debe contener del 1 al 10% de radiactividad inicial).
- 10) Dejar evaporar el etanol por 10 min a TA y resuspender el precipitado en 10 μl de agua estéril/DEPC y guardar a -20°C o continuar el procedimiento.

Ligación del adaptador

1. Por cada reacción de 10 μl , agregar: 5.0 μl de DNAc doble hebra, 2.0 μl de adaptador Marathon-cDNA, 2.0 μl de amortiguador de ligación 5X y 1.0 μl de DNA Ligasa T4 (400U/ μl).
2. Mezclar varias veces con pipeta e incubar toda la noche a 16°C.
3. Finalizando la incubación, calentar por 5 min a 70°C para inactivar enzima.
4. Diluir cada muestra 1:50 y 1:250 con una solución Tricina-KOH (pH 8.5)/EDTA 0.1 mM. Guardar el DNAc-Adaptador sin diluir a -20°C.
5. Desnaturalizar el DNAc-Adaptador diluido a 94°C por 5 min, incubar sobre hielo para hacer reacción RACE 5' y 3' o bien guardarlo a -20°C hasta su uso.

Amplificación Rápida de los Extremos 5' y 3' del DNAc.

Preparar una mezcla maestra (MM) suficiente para todas las reacciones de PCR. Esta mezcla puede ser usada para amplificar los extremos 5' y 3'. La MM contiene por tubo:

5 μ l Amortiguador-PCR 10X, 1 μ l de dNTPs (10mM), 1 μ l de Mezcla 50X de polimerasa

Advantage 2 y 36 μ l de ddH₂O.

Reacción	RACE-5'	RACE3'
DNAc-Adaptador	5.0 μ l	5.0 μ l
Iniciador AP1 (10 μ M)	1.0 μ l	1.0 μ l
Iniciador CYPH1 (10 μ M)	1.0 μ l	HBCC8 (10 μ M) 1.0 μ l
Mezcla Maestra	43.0 μ l	43.0 μ l

Las reacciones fueron sometidas a 35 ciclos de amplificación en un Termociclador de DNA Perkin-Elmer 480 bajo las siguientes condiciones:

5 Ciclos de: 94°C por 30 seg/72°C por 4 min.

5 Ciclos de: 94°C por 30 seg/70°C por 4 min.

25 Ciclos de: 94°C por 30 seg/68°C por 4 min.

Al finalizar la corrida analizar 5 μ l de cada muestra en un gel de Agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio, o bien, reamplificar con los oligonucleótidos anidados.

Los fragmentos correspondientes a los extremos 5' y 3' del DNAc fueron purificados y sometidos a análisis de secuenciación. En base a esta información se sintetizaron una serie de oligonucleótidos específicos para obtener el P450sc. El DNAc completo fue aislado con los iniciadores YAM5+YAM3 y el sistema de DNA polimerasas, ELONGasa (GibcoBRL), usando 30 ciclos de amplificación a 94°C por 45 seg., 54°C por 45 seg., y 72°C por 90 seg., con un paso de extensión final de 7 minutos. El producto generado de PCR (1,700 pb) fue insertado en un vector de clonación (6,200 pb) para su posterior purificación.

Reacciones de clonaje y transformación

El DNAc fue insertado en el plásmido pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitogen, Carlsbad, CA), de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Por cada reacción de 6.0 μ l agregar de 1-4 μ l de producto de PCR fresco, 1.0 μ l de NaCl 1.2M/MgCl₂ 0.06M, 1.0 μ l de plásmido (10ng DNA/ μ l), mezclar e incubar a TA por 5 min.
2. Agregar 2.0 μ l del incubado a un vial de bacterias competentes TOP 10 (E. coli), mezclar e incubar sobre hielo por 30 min.
3. Dar un pulso térmico de 30 seg a 42°C, transferir inmediatamente a hielo

4. Agregar a cada tubo 250 μ l de medio SOC (Tryptona 2%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10mM, Glucosa 20mM) e incubar por 1 h a 37°C con agitación continua (200 rpm).
5. Sembrar de 50 a 200 μ l de cada transformación en placas de agar (Tryptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, Bacto-agar 1.5%) conteniendo 50 μ g de Ampicilina/ml. Como control se usan placas con/sin antibiótico, con/sin bacterias.
6. Incubar toda la noche a 37°C. Una transformación eficiente debe producir varias clonas positivas.

Identificación de clonas positivas

Seleccionar 10 colonias y sembrar cada una en 5-7 ml de Medio LB (Luria-Bertani) pH 7.0 (Tryptona 1.0%, Extracto de levadura 0.5% NaCl 1.0%) conteniendo Ampicilina (50 μ g/ml). Incubar toda la noche a 37°C con agitación continua. Al finalizar hacer una mini-preparación del plásmido para identificar el inserto. La purificación del DNA plasmídico se hizo siguiendo un protocolo ya descrito (Sambrook et al., 1989).

Purificación del plásmido por lisis alcalina (Mini-prep).

- a) Centrifugar 1.5 ml de cada inoculado por 20 seg a 13,000 xg; descartar el sobrenadante.
- b) Resuspender las bacterias en 100 μ l de solución GTE Glucosa 50mM, Tris-HCL 5mM pH 8.0, EDTA 10mM), incubar por 5 min a TA.
- c) Agregar 200 μ l de una solución 0.2N NaOH/SDS 1%, incubar por 5 min a TA.
- d) Agregar 150 μ l de Acetato de potasio 5M pH 4.8, mezclar e incubar por 5 min a TA.
- e) Centrifugar a 13,00 xg para sedimentar DNA cromosómico y restos celulares.
- f) Transferir el sobrenadante y agregar 800 μ l de etanol al 95% para precipitar el DNA.
- g) Centrifugar por 1 min a 13,000 xg, descartar el sobrenadante y lavar con etanol 70%.
- h) Dejar secar el DNA y resuspender en 20 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM), usar 2-5 μ l para análisis de restricción y PCR.

Orientación del inserto

Con el fin de determinar la orientación correcta del DNAC se realizaron una serie de digestiones enzimáticas utilizando los sitios de restricción únicos, presentes en el vector y el inserto, para las endonucleasas Eco RV, KpnI, XbaI y otras. En forma paralela se verificó su orientación mediante reacciones de PCR, utilizando oligonucleótidos específicos y complementarios a secuencias del vector (T7; 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', BGH; 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'). Tres de las clonas identificadas como positivas fueron utilizadas para hacer una

purificación a gran escala del plásmido y determinar la secuencia del DNAC del P450_{sc}. Para este procedimiento se usó el estuche Genelute Maxiprep Plasmid Purification (Sigma, St. Louis MO). Una alícuota de 5 ml de cada clona fue inoculada en 500 ml de Medio LB/ampicilina y se incubó toda la noche en agitación (200 rpm) a 37°C.

Purificación del plásmido (Maxiprep)

1. Centrifugar el incubado a 4000 rpm por 10 min a TA.
2. Resuspender el botón bacteriano en 4.8 ml de solución S1, pasar a tubos Corex de 30 ml.
3. Lisar las células agregando 4.8 ml de solución de lisis. Mezclar por inversión.
4. Agregar 3.2 ml de solución de neutralización y centrifugar a 10,000 rpm por 15 min a 4°C.
5. Transferir el sobrenadante a tubo fresco y agregar 1.2 ml de solución ERS para remover endotoxinas. a) Dejar reposar sobre hielo por 10 min. b) Calentar a 37°C por 5 min, centrifugar a 5500 rpm a TA. c) Transferir fase clara a tubo fresco y repetir pasos 5a-5b.
6. Agregar 3.2 ml de solución de unión de DNA (DBS). Depositar el lisado sobre columna Genelute y centrifugar a 3500 rpm por 2 minutos.
7. Agregar 15.0 ml de solución de lavado (WS) y centrifugar a 3,500 rpm por 5 minutos a TA.
8. Transferir la columna a tubo fresco, agregar 5 ml de agua estéril libre de endotoxinas. El plásmido se encuentra en el eluido. Cuantificar la concentración de DNA y guardar a -20°C.

DETERMINACION DE LA SECUENCIA DEL P450_{sc}

El DNAC del hámster (\pm 1.6 Kb) se encuentra insertado en el plásmido pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (\pm 6.2 Kb), que en conjunto tienen una talla aproximada de 7.9 Kb (pCYP11A1/M.a.).

Mediante PCR se amplificaron alrededor de seis fragmentos que abarcan todo el DNAC usando una serie de iniciadores cuya secuencia es la siguiente:

NOMBRE	SECUENCIA 5'→3'	#pb
YAM5	CGT GAG GTT AAG GGT AGA GAC AGG C	(25)
H233	CTG TGC TGC ATC TTC AGG GTC CAG	(24)
H15	ACA CAC AGA ATC CAT TAC CAT CAC	(24)
H3REV	GAC TTC TGC TGC TTG ATG CGT CT	(23)

H35	CTT GTC CTA AAC CAG GAA GTG ATG	(24)
H533	CAG CAT CTC CGT AAT GTT GGC CTG	(24)
H45	GAG TCC CAG CAG TTC ATC GAT GCC	(24)
H73	CTT GGC AGG AAT CCT GTA ATT TCG	(24)
H65	GCC AGC ATC AAG GAG ACA CTG AG	(23)
H93	CTT CTC AGG CAT CAG GAT GAG GTT	(24)
H95	ACC CTC ATC CTG ATG CCT GAG AAG	(24)
YAM3	TTC TGG AGA TAC AGA GAC ACC CAC C	(25)
H3	CCT GGC TAA CCT AAG CAG TTG G	(22)
HAAA3	CAT GTG ACT CCA GTC TGA AGT TCA	(24)
H5CC1	CGC TCA GTG CTG GCC AAA GGC TG	(23)
IM450	GAT ATT AGC TCC CCC TCC AGT AG	(23)

Cada producto de PCR fue purificado y secuenciado en ambas direcciones para obtener la secuencia nucleotídica del P45scc.

TECNICAS DE TRANSFERENCIA NORTHERN Y SOUTHERN

Northern blot. Para analizar la expresión del P450scc se usó RNA total o RNAm de diferentes tejidos de hamster y la técnica descrita por Sambrook et al.(1989), haciendo ligeras modificaciones.

- 1) En un tubo de 0.5 ml estéril, tomar de 20 a 30 μ g de RNA (1-7 μ l) en 23 μ l de solución desnaturalizante (Formamida/250 μ l, MOPS 12X/42 μ l, Formaldehído 37%/81 μ l). Calentar por 5 min a 70°C.
- 2) Agregar 3 μ l de solución de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol 0.25%, 15% ficol-400) y depositar en gel de agarosa al 1%, conteniendo 6% de formaldehído.
- 3) Correr el gel en solución MOPS 12X por 4-6 h a 30-35 volts.
- 4) Al finalizar la corrida lavar el gel con ddH₂O y equilibrarlo por 20 min con SSC 10X (NaCL 87.6 g/L, Citrato de sodio 44.1 g/L pH 7.0).
- 5) Transferir el RNA por capilaridad a membrana de nylon Hybond[+]

- (Amersham, UK) usando una solución SCC 10X.
- 6) Después de la transferencia, lavar la membrana con 6X SCC por 5 min y dejar secar. Fijar el RNA a la membrana mediante radiación UV (Stratalinker, Stratagene USA).

Southern blot. Para analizar la distribución del P450 se utilizó el DNAc sintetizado a partir de RNA de los diferentes tejidos y la amplificación de este mediante PCR (RT-PCR).

- 1) Los productos de RT-PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1% en TBE a 100 volts al frente.
- 2) Al finalizar la corrida el gel se coloca en una solución desnaturalizante (NaCl 0.5N, NaOH 0.5N) por 45 min.
- 3) Lavar el gel dos veces con agua estéril y neutralizar con un amortiguador (Tris-HCl 1M, pH 7.4, NaCl 1.5M) durante 30 min a TA. Cambiar la solución de desnaturalización y lavar por 15 min adicionales.
- 4) Transferir el DNA por capilaridad a membrana de nylon Hybond[+] durante toda la noche, usando una solución 20X SCC.
- 5) Después de la transferencia, lavar la membrana con 6X SCC por 5 min y dejarla secar. Fijar el DNA a la membrana mediante radiación UV por ambos lados.
- 6) Hibridar con la sonda adecuada.

A fin de verificar la integridad del DNAc; así como para monitorear la cantidad de RNAm transcrito, se usó un juego de nucleótidos sintéticos para la proteína ciclofilina que amplifica un producto de RT-PCR de aproximadamente 450-pb y cuya secuencia es la siguiente: CY5; 5'-CCCCACCGTGTTCTTCGACAT-3', CY3; 5'-GCTGGTCTTGCCATTCCTGGA-3' (Danielson et al., 1988). Como control adicional se amplificó parte del DNAc de la proteína StAR de hamster (Fleury et al., 2000. Acceso # U66490). STAR1; 5'-GAAGCTCCTACAGACATCTGCGG-3', STAR2; 5'-TTTGGGTTCCACTCTCCCATTGC-3'. Todos los oligonucleótidos del presente trabajo fueron diseñados en bases teóricas o bien con el programa OLIGO de la Universidad de Wisconsin, EU.

MARCAJE E HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

En los estudios de transferencia de acidos nucléicos se utilizó una sonda marcada con ³²P, obtenida por PCR y que corresponde a una porción de 500-pb del pCYP11A1/M.a. Para el marcaje de las sondas se utilizó el estuche RadPrime Labeling System (Life Technologies Inc., Gaithersburg MD) y desoxicitidina trifosfato [α -³²P]dCTP, a.e. 3,000 Ci/mmol (New England Nuclear, Boston MA).

1. Desnaturalizar 25 ng de DNA en 20 μ l de TE por 5 min a 95°C.

2. Agregar una mezcla que contiene: 3 μ l de dATP-dTTP-dGTP (500 μ M), 20 μ l de solución random primer 2.5X, 50 μ Ci de [α -³²P]dCTP, 1 μ l de fragmento Klenow (5 U) y ddH₂O hasta 49 μ l.
3. Incubar a 37°C por 10 min.
4. Agregar 5 μ l de solución de terminación; desnaturalizar por 5 min a 95°C; enfriar sobre hielo y usar toda la mezcla para hibridar las membranas.
5. En ambos casos (Northern/Southern blot), se usó indistintamente Rapid-hyb (Amersham, Life Sciences) o bien 0.25 M Na₂HPO₄/SDS 7% como solución de prehibridación/hibridación.
6. Prehibridar las membranas por 1-4 h a 65°C en la solución de prehibridar correspondiente (150 μ l/cm²).
7. Cambiar solución de hibridación fresca, agregar la sonda marcada desnaturalizada e hibridar por 6-24 h a 65°C.
8. Al finalizar hacer varios lavados a la membrana de la siguiente manera: 1 lavado con 2X SSC/SDS 0.1% a TA por 20 min, 1 lavado con 1X SSC/SDS 0.1% a 65°C por 15 min, 1 lavado con 0.1X SSC/SDS 0.1% a 65°C por 15 min.
9. Exponer la membrana a placa de Rayos X diferentes períodos de tiempo a TA.

ENSAYOS DE TRANSFECCION TRANSITORIA

Para los ensayos de transfección del pCYP11A1/M.a., se utilizaron células de riñón fetal humano (línea HEK 293) mantenidas en Medio Esencial Mínimo de Dulbecco (DMEM, GibcoBRL), suplementadas con 5% de suero fetal de bovino (FCS, Invitrogen Co.) y 5 μ g de Geneticina/ml. Las células fueron crecidas al 80% de confluencia en cajas de 75 cm² en un incubador con atmósfera de CO₂ al 5%. Subsecuentemente se separaron y sembraron en cajas de cultivo de 6 pozos a una densidad inicial de 200,000 células/pozo. Después de 24 h, la células HEK fueron lavadas con OptiMEM y transfectadas con 2-2.5 μ g de DNA plasmídico/pozo usando 5.6 μ l de Lipofectamina y 800 μ l de OptiMEM (Life Technologies, Gaithersburg, USA) por pozo (en triplicado). A las cinco horas de incubación se agregaron 800 μ l de DMEM/FCS 5% a cada pozo para parar la reacción. Las células transfectadas fueron cultivadas por 24-48 h con o sin 25.0 μ M de 25-hidroxicolesterol (5-colesten-3 β -25-diol). Al final de la incubación, las células fueron cosechadas para medición de esteroides en el medio de cultivo. Las concentraciones de Pregnenolona (5 β -pregnen-3 β -ol-20-0na) fueron cuantificadas por radioinmunoanálisis en fase líquida usando [7-³H(N)]Pregnenolona (NEN, a.e. 10-25Ci/mmol. Con el fin de monitorear la eficiencia de transfección, en cada análisis se incluyó como control un ensayo de tinción histoquímica de β -galactosidasa. Por este procedimiento se determinó una eficiencia de entre 80 y 90% con el DNAC del pCMV sport- β -gal (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

RESULTADOS Y DISCUSION

Para aislar el DNAc completo se diseñó una estrategia basada en la amplificación de fragmentos de PCR, generados a partir de RNAm de corteza adrenal transcrito a la inversa. En una primera etapa se amplificaron dos porciones localizadas hacia la parte 5' y 3', que permitieron obtener segmentos específicos, correspondientes al exón 1 y a los exones 7-9 del citocromo de rata, respectivamente. En la figura 3 se muestran los fragmentos amplificados, los cuales una vez purificados fueron analizados para determinar su secuencia nucleotídica (Fig. 4).

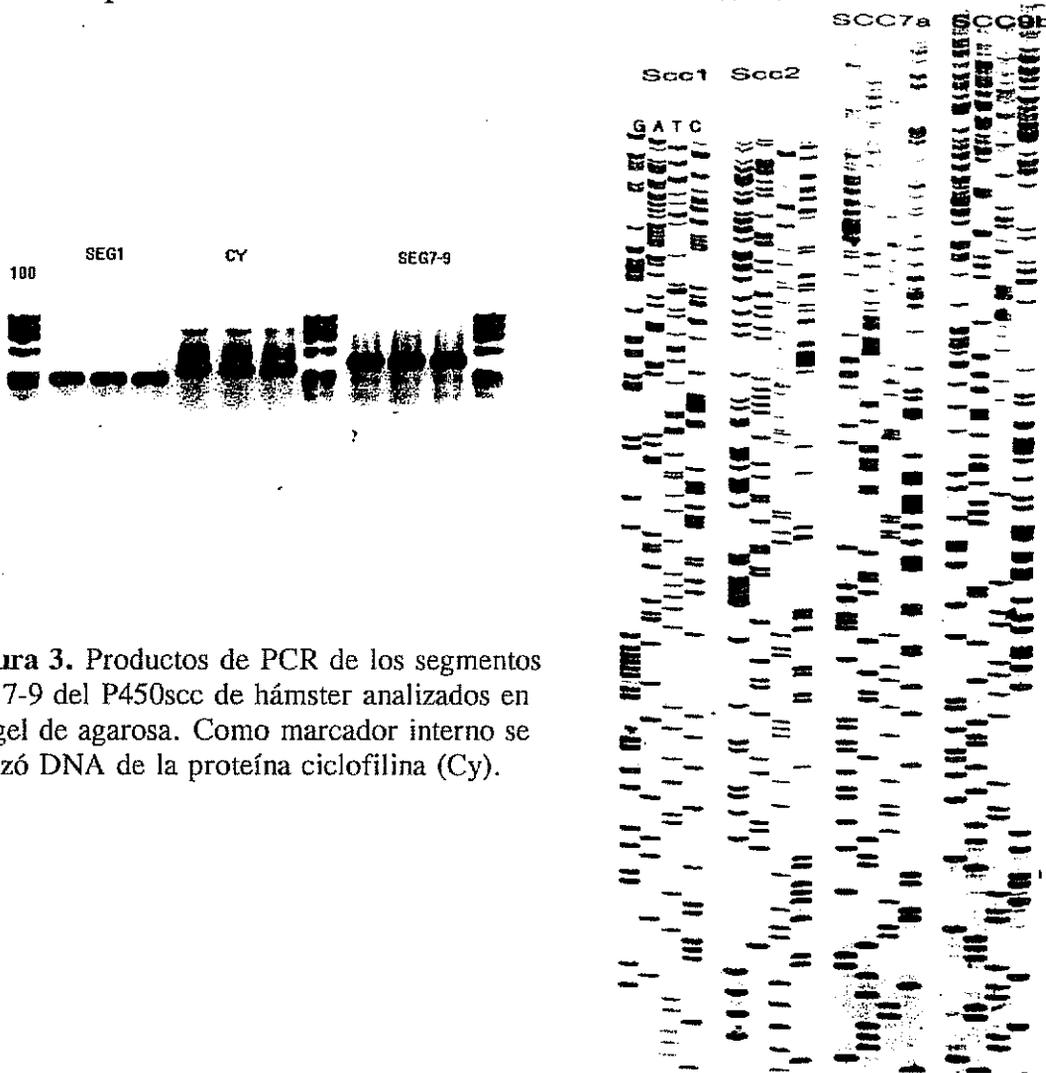


Figura 3. Productos de PCR de los segmentos 1 y 7-9 del P450scc de hámster analizados en un gel de agarosa. Como marcador interno se utilizó DNA de la proteína ciclofilina (Cy).

Figura 4. Secuenciación de los productos de PCR, 1 y 7-9. Los fragmentos purificados fueron secuenciados en ambos sentidos. Después de la electroforesis, los geles se expusieron a placas de rayos-X BioMax de Kodak por 12 a 16 h a TA.

Una vez que se determinó la secuencia de las regiones específicas del P450_{scc}, se procedió a diseñar los iniciadores para amplificar los extremos 5' y 3' y la porción interna del DNAc. En la figura 5 se muestra el esquema general de la estrategia seguida en la clonación del citocromo de hámster. Para analizar los extremos del P450_{scc} se utilizó la metodología de amplificación rápida de los extremos del DNAc o RACE (Rapid Amplification of the cDNA Ends). Este procedimiento también conocido como "PCR de un flanco" o "PCR anclado", está basado en la síntesis de DNAc a partir de RNAm, usando Transcriptasa Reversa del virus murino de la leucemia (MMLV-RT), e iniciadores gene-específicos o GSP (Frohman et al., 1988; Ohara et al., 1989).

Después de optimizar las condiciones de amplificación por PCR, se obtuvieron los fragmentos correspondientes a los extremos RACE-5' y RACE-3' (Fig. 6). Estos fueron secuenciados y su secuencia fue verificada en al menos tres reacciones distintas utilizando iniciadores anidados.

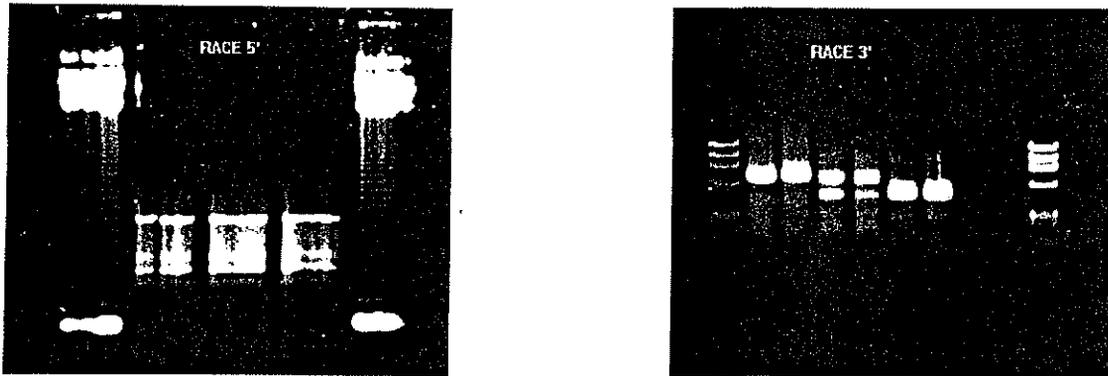


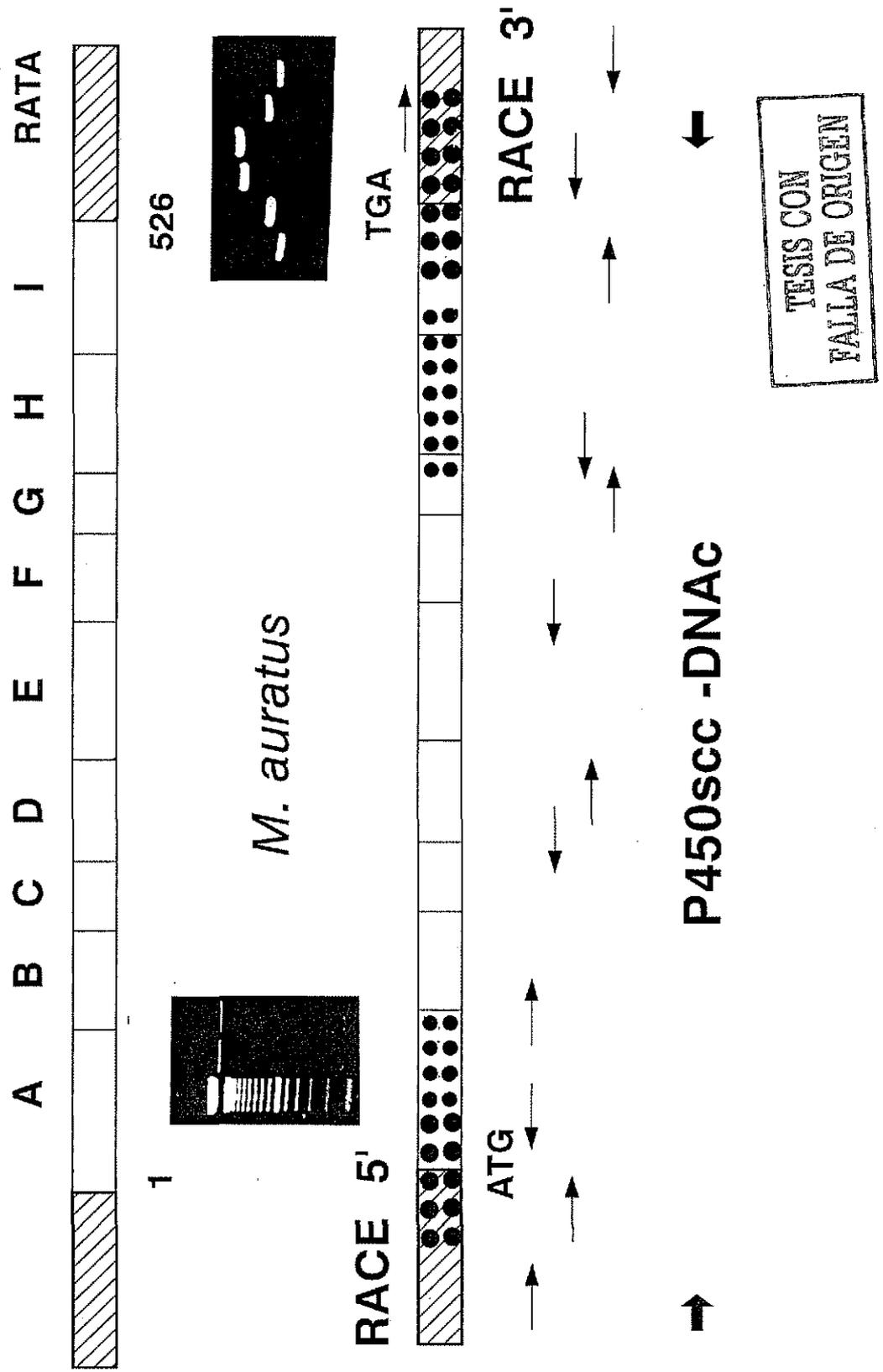
Figura 6. Electroforésis en geles de agarosa de los fragmentos de PCR RACE-5' y RACE-3' del P450_{scc} de hámster. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

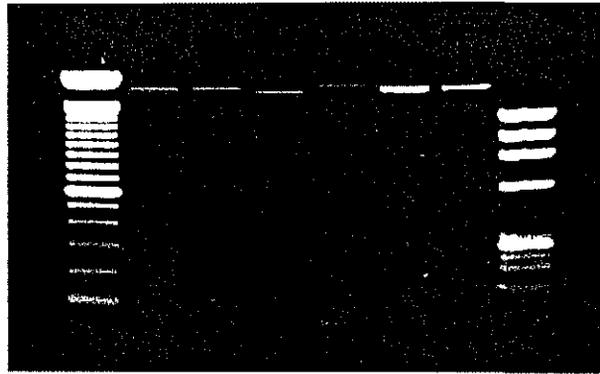
El DNAc completo del P450_{scc}, fue obtenido mediante PCR usando varios iniciadores derivados de los extremos 5' y 3' (Fig. 7). La amplificación de los fragmentos de PCR se realizó bajo condiciones óptimas a fin de generar preparaciones altamente puras, para ser insertadas en el plásmido. Como puede verse en la figura 7, los productos de estas reacciones mostraron tallas de entre 1700 y 1800 pb, que fueron similares a las tallas esperadas. Alícuotas de estos productos fueron utilizadas directamente en ensayos de ligación al vector de clonación. El DNAc fue insertado en el plásmido pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO de 6.2 kb. Una fracción de cada reacción fue usada para transformar bacterias *E. coli* competentes y seleccionarlas en un medio de cultivo conteniendo ampicilina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5

CITOCROMO P450scc





TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Amplificación del DNAc completo del P450scc de hámster. En las diferentes reacciones de PCR se emplearon los iniciadores YAM5 y YAM2, H3 o HAAA3. Para calcular la talla de los fragmentos se utilizó una escalera de DNA de 100 pb (izq.) y DNA de Φ X174 digerido con Hae III (der.) como estándares.

De las reacciones de transformación, se seleccionaron diez colonias positivas a fin de confirmar la presencia del inserto (Fig. 8). Posteriormente, las clonas que presentaron la talla adecuada fueron analizadas para verificar la orientación correcta del DNAc.

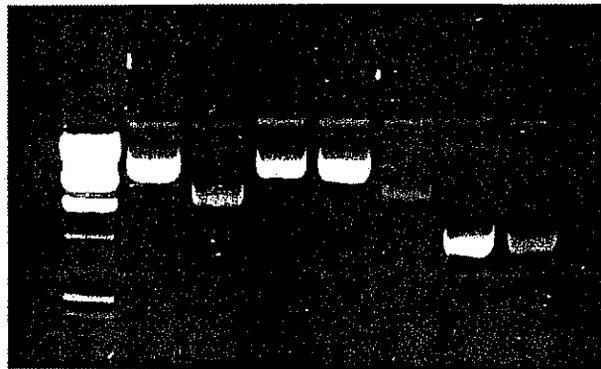


Figura 8. Análisis del DNA plasmídico aislado de colonias transformadas con el vector pcDNA 3.1/CT-GFP-TOPO/inserto YAM5-YAM3. Como marcador de talla se utilizó DNA de fago lambda digerido con Hind III (izq.).

Los plásmidos positivos fueron digeridos con las enzimas de restricción Kpn I o Eco RV. Por otro lado, la orientación del inserto fue confirmada mediante PCR, amplificando un fragmento que contiene una porción del plásmido y otra del inserto. Estos análisis confirmaron la orientación correcta del P450scc (Fig. 9).

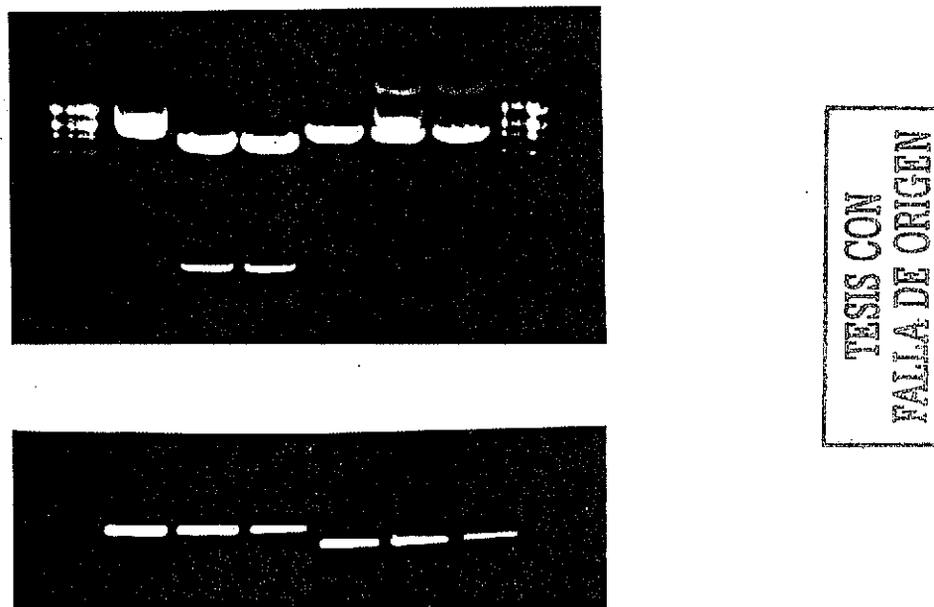


Figura 9. Análisis de restricción y amplificación por PCR del vector con el inserto del P450scc de hámster. En la parte superior se muestra la digestión del plásmido con Eco RV (carriles 3 y 4). En la parte inferior se muestran los fragmentos de PCR amplificados con los iniciadores T7 (plásmido) y CYP11 (carriles 1-3) o H233 (carriles 4-6), ambos del P450scc.

Después de corroborar que el plásmido contenía el inserto correcto, se escogieron varias clonas para hacer una maxipreparación de cada una y llevar a cabo el análisis de secuencia el P450scc. En la figura 10, se muestra un gel con las tres clonas positivas que fueron analizadas.

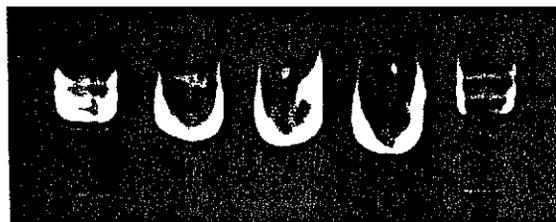


Figura 10. Análisis del DNA plasmídico después de su purificación en columnas GenElute. El plásmido puro de 7.9 kb fue etiquetado como pCYP11A1/M.a. (Fig. 11).

Mapa del vector pcDNA3.1/pCYP11A1-M.a.

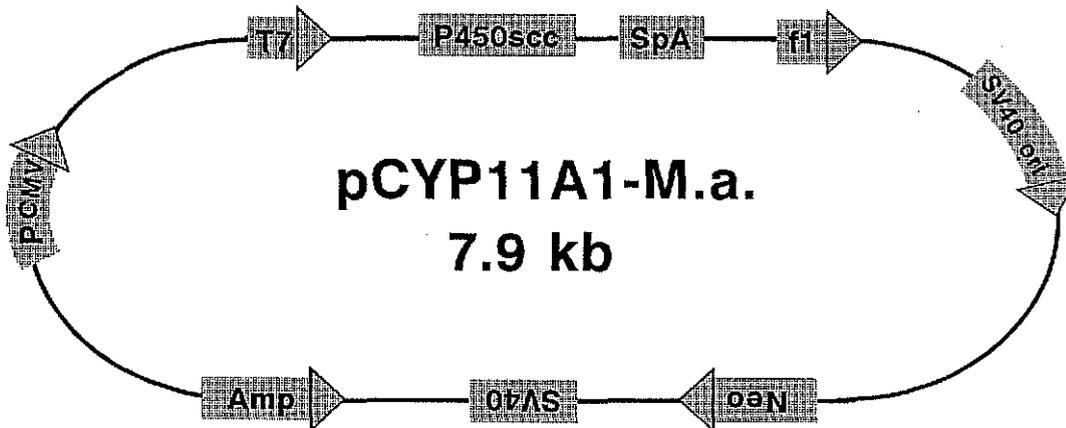


Figura 11. Diagrama esquemático del plásmido que contiene el DNAc del P450scc de hámster dorado. La secuencia completa de ~1.7 kilobases fue insertada en el vector pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO de Invitrogen (6.2 kilobases). El vector contiene los promotores de T7 y citomegalovirus (P_{CMV}), una secuencia de poliadenilación (SpA), el origen de replicación del SV40 (SV40ori), el origen de replicación F1 (f1), el gen de resistencia a neomicina (neo), una secuencia de poliadenilación del SV40 (SV40) y el gen de resistencia a la ampicilina (Amp). Este vector designado pCYP11A1-M.a., el cual tiene una talla aproximada de 7.9 kilobases (kb) fue usado para transformar bacterias *E. coli* competentes (cepa TOP-10) y determinar la secuencia nucleotídica del P450scc.

La secuencia nucleotídica del CYP11A1 fue determinada usando seis juegos de iniciadores que abarcan parte del vector y el DNAc completo (Fig. 12).

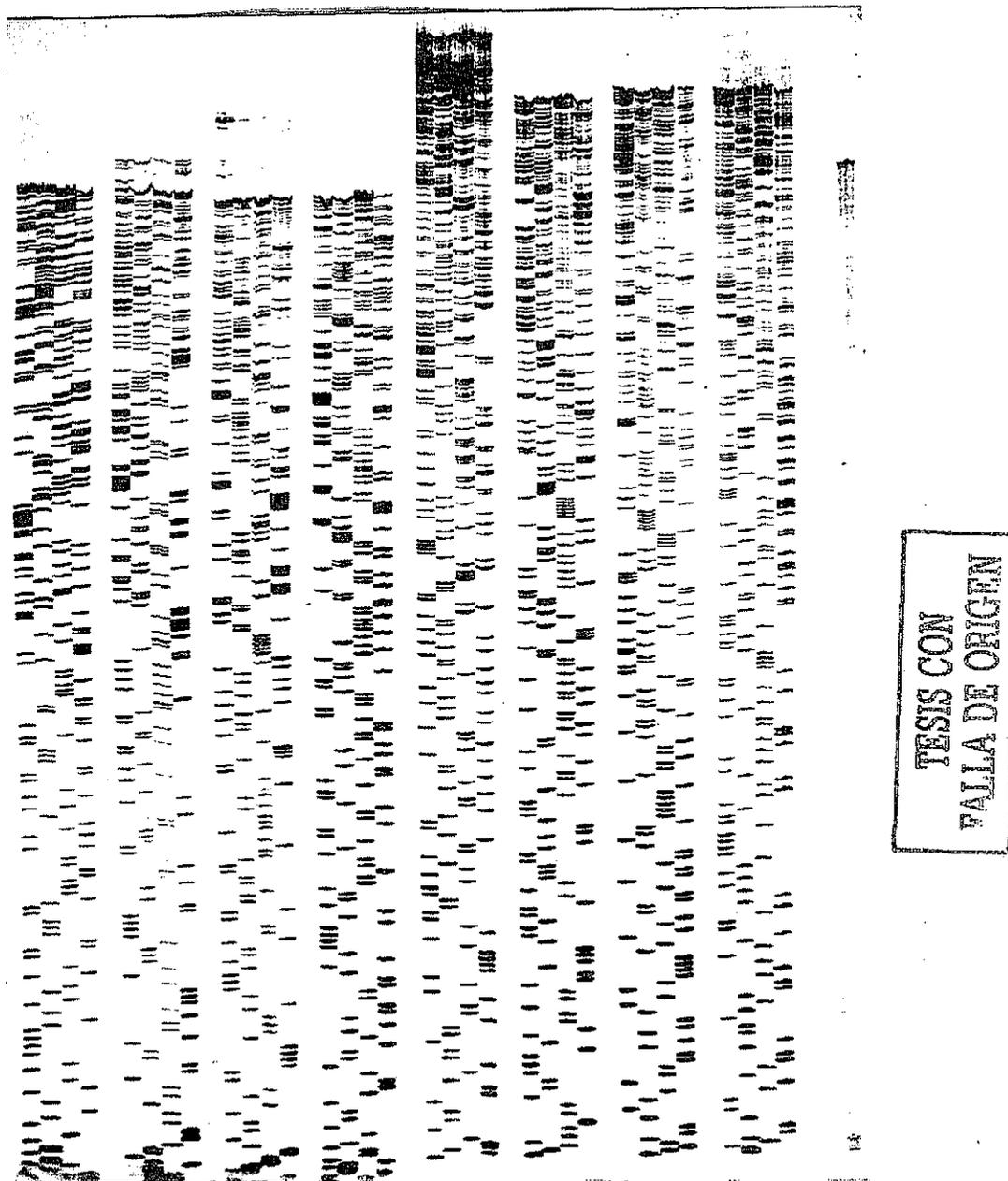


Figura 12. Análisis de secuencia del P450sc de hámster en gels de poliacrilamida TTE. En las reacciones (GATC) se utilizó el estuche de secuenciación Thermosequenase con terminador [³³P]ddNTP-radiomarcado. Tiempo de exposición 18 hrs a TA.

En la figura 13 se muestra la secuencia completa del DNAC del P450scc, derivada del análisis de secuencia del pCYP11A1/M.a.. El DNAC comprende ~1800 pb con una región 5' no-traducida de aproximadamente 80 pb, un marco abierto de lectura de 1560 pb y una región 3' no-traducida de más de 200 nucleótidos. La señal de poliadenilación se localiza hacia la base 1797, respecto al primer codón de iniciación ATG y 234 bases corriente abajo del codón de terminación TAG. Los nucleótidos circundantes al sitio putativo de iniciación cagtATGctgg del citocromo de hámster, se ajustan al arreglo de las secuencias Kozak ACCATGG propuestas para el sitio de inicio de la traducción (Kozak, 1986; Kozak 1991).

La secuencia deducida de aminoácidos del citocromo de hámster predice una proteína de 520 residuos con un peso molecular calculado de 60,270 Daltones. El P450scc de esta especie comparte un alto grado de similitud en su conformación de aminoácidos con las enzimas de otros vertebrados. Por comparación de secuencias, este parece contener regiones bien conservadas que son comunes a todos los miembros de la superfamilia de citocromos P450 (Gonzalez, 1990; Lewis & Lee-Robichaud, 1998).

Resultados de varios estudios han establecido que el P450scc es una hemoproteína de localización mitocondrial, y al igual que otras enzimas de importación codificadas por genes nucleares, este se sintetiza en citoplasma como un precursor provisto de una pre-secuencia NH₂-terminal removible (Matocha & Waterman, 1985; Hanukoglu, 1992). Como tales, los extrapéptidos se caracterizan por tener una extensión de entre 20 y 60 residuos y por contener una alta proporción de aminoácidos cargados positivamente, los cuales se distribuyen regularmente en un tracto lineal simple. Además de ser ricas en aminoácidos hidroxilados como serinas y treoninas, y de carecer de residuos acídicos, las pre-secuencias tienen el potencial de formar hélices alfa (Schatz, 1979; von Heijne, 1986; Hurt & van Loon, 1986; Komiya & Mihara, 1996). El análisis de la estructura primaria del citocromo de bovino, sugirió que el precursor del P450scc esta constituido por 520 aminoácidos, de los cuales, los primeros 39 de la porción NH₂-terminal corresponderían a una señal de transporte mitocondrial (Morohashi et al., 1984).

En el hámster, los 40 residuos iniciales del P450scc parecen concordar con la regla general de las pre-secuencias, esto es; ausencia de residuos acídicos y presencia de aminoácidos hidroxilados y básicos (Hurt & van Loon, 1986). En este tracto se encuentran tres residuos básicos (K---R---K), los cuales según se observa en el siguiente esquema se encuentran bien preservados en varias especies.

MLAKGLSLRSVLAKGCQPFLSPTWQSSV ---LATGGGANIS	hámster
MLAKGLPPRSVLVKGYYQTFLSAPREGLGRLRVPTGEGAGIS	humano
MLARGLPLRSALVKACPPILSTVGEWGHHHRVGTGEGAGIS	bovino
MLAKGLCLRSVLVKSCQPFLSPVWQGP --- LATGNGAGIS	rata

ATG	CTG	GCC	AAA	GGA	CTT	TCC	TTG	CGC	TCA	GTG	CTG	GCC	AAA	GGC	TGC	CAA	CCT	TTC	TTG	60
Met	Leu	Ala	Lys	Gly	Leu	Ser	Leu	Arg	Ser	Val	Leu	Ala	Lys	Gly	Cys	Gln	Pro	Phe	Leu	20
AGC	CCT	ACC	TGG	CAG	AGT	TCA	GTG	CTG	GCT	ACT	GGA	GGG	GGA	GCT	AAT	ATC	TCT	ACC	AAT	120
Ser	Pro	Thr	Trp	Gln	Ser	Ser	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala	Asn	Ile	Ser	Thr	Asn	40
AGC	CCT	CGT	CCC	TTC	AAT	GAG	ATT	CCT	TCC	CCC	GGT	GAC	AAT	GGT	TGG	CTA	AAC	CTG	TAC	180
Ser	Pro	Arg	Pro	Phe	Asn	Glu	Ile	Pro	Ser	Pro	Gly	Asp	Asn	Gly	Trp	Leu	Asn	Leu	Tyr	60
CAC	TTC	TGG	AGG	GAG	AAT	GGC	ACA	CAC	AGA	ATC	CAT	TAC	CAT	CAC	ATG	CAG	AAT	TTC	CAG	240
His	Phe	Trp	Arg	Glu	Asn	Gly	Thr	His	Arg	Ile	His	Tyr	His	His	Met	Gln	Asn	Phe	Gln	80
AAG	TAT	GGC	CCC	ATT	TAC	AGG	GAG	AAG	CTT	GGC	AAT	AAG	GAT	TCT	GTT	TAT	ATT	CTG	GAC	300
Lys	Tyr	Gly	Pro	Ile	Tyr	Arg	Glu	Lys	Leu	Lys	Leu	Lys	Asp	Ser	Val	Tyr	Ile	Leu	Asp	100
CCT	GAA	GAT	GCA	GCA	CAG	CTC	TTT	TTA	AGC	GAA	GGT	CCC	TAC	CCA	GAA	CGA	TAT	CTT	GTG	360
Pro	Glu	Asp	Ala	Ala	Gln	Leu	Phe	Leu	Ser	Glu	Gly	Pro	Tyr	Pro	Glu	Arg	Tyr	Leu	Val	120
CCC	CCC	TGG	GTC	GCC	TAT	CAC	CAG	TAT	TAC	AAG	AGA	CCC	ATA	GGG	GTC	CTG	TTT	AAG	AGT	420
Pro	Pro	Trp	Val	Ala	Tyr	His	Gln	Tyr	Tyr	Lys	Arg	Pro	Ile	Gly	Val	Leu	Phe	Lys	Ser	140
TCA	GAA	GCT	TGG	AAG	AAA	GAT	AGA	CTT	GTC	CTA	AAC	CAG	GAA	GTG	ATG	GCA	CCT	GAA	GCC	480
Ser	Glu	Ala	Trp	Lys	Lys	Asp	Arg	Leu	Val	Leu	Asn	Gln	Glu	Val	Met	Ala	Pro	Glu	Ala	160
ATC	AAG	AAC	TTC	GTG	CCC	CTG	CTG	GAA	GGT	GTA	GTT	CAG	GAC	TTC	ATC	AAC	GTC	TTG	CAC	540
Ile	Lys	Asn	Phe	Val	Pro	Leu	Leu	Glu	Gly	Val	Val	Gln	Asp	Phe	Ile	Asn	Val	Leu	His	180
AGA	CGC	ATC	AAG	CAG	CAG	AAG	TCT	GGA	AAT	TTC	TCA	GGG	GAC	ATC	AGC	GAT	GAC	CTG	TTC	600
Arg	Arg	Ile	Lys	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Asn	Phe	Ser	Gly	Asp	Ile	Ser	Asp	Asp	Leu	Phe	200
CGC	TTT	GCC	TTT	GAG	TCC	ATC	ACC	AGT	GTT	GTA	TTT	GGG	GAG	CGC	CTG	GGG	ATG	TTG	GAG	660
Arg	Phe	Ala	Phe	Glu	Ser	Ile	Thr	Ser	Val	Val	Phe	Gly	Glu	Arg	Leu	Gly	Met	Leu	Glu	220
GAG	ATT	GTG	GAC	CCT	GAG	TCC	CAG	CGG	TTC	ATC	GAT	GCC	ATC	TAC	CAG	ATG	TTC	CAC	ACC	720
Glu	Ile	Val	Asp	Pro	Glu	Ser	Gln	Arg	Phe	Ile	Asp	Ala	Ile	Tyr	Gln	Met	Phe	His	Thr	240
AGT	GTC	CCC	ATG	CTC	AAC	CTG	CCT	CCA	GAA	CTT	TTT	CGA	TTC	TTC	AGA	ACT	AAG	ACC	TGG	780
Ser	Val	Pro	Met	Leu	Asn	Leu	Pro	Pro	Glu	Leu	Phe	Arg	Phe	Phe	Arg	Thr	Lys	Thr	Trp	260
AAG	GAG	CAT	GCA	GCT	GCC	TGG	GAT	ATG	ATT	TTC	AAA	AAA	GCT	GAT	GAT	TAT	ACA	CAG	ACC	840
Lys	Glu	His	Ala	Ala	Ala	Trp	Asp	Met	Ile	Phe	Lys	Lys	Ala	Asp	Asp	Tyr	Thr	Gln	Thr	280
TTC	TAC	TGG	GAC	TTA	AGA	CAG	AAG	CAA	GAG	TTC	AGC	AAG	TAC	CCT	GGT	GTC	CTT	TAC	AGC	900
Phe	Tyr	Trp	Asp	Leu	Arg	Gln	Lys	Gln	Glu	Phe	Ser	Lys	Tyr	Pro	Gly	Val	Leu	Tyr	Ser	300
CTC	CTG	GGT	GGC	AAC	AAG	CTG	CCC	TTC	AAG	AAC	ATC	CAG	GCC	AAC	ATT	ACG	GAG	ATG	CTG	960
Leu	Leu	Gly	Gly	Asn	Lys	Leu	Pro	Phe	Lys	Asn	Ile	Gln	Ala	Asn	Ile	Thr	Glu	Met	Leu	320
GCA	GGA	GGC	GTA	GAC	ACG	ACC	TCC	ATG	ACC	CTG	CAG	TGG	AGC	CTT	TAT	GAG	ATG	GCA	CAC	1020
Ala	Gly	Gly	Val	Asp	Thr	Thr	Ser	Met	Thr	Leu	Gln	Trp	Ser	Leu	Tyr	Glu	Met	Ala	His	340
AAC	TTG	AAG	GTA	CAG	GAG	ATG	CTG	CGG	GCA	GAG	GTT	CTG	GCT	GCC	CGG	CGT	CAG	GCC	CAG	1080
Asn	Leu	Lys	Val	Gln	Glu	Met	Leu	Arg	Ala	Glu	Val	Leu	Ala	Ala	Arg	Arg	Gln	Ala	Gln	360
GGA	GAC	ATG	GTC	AAG	ATG	GTG	CAG	TTG	GTC	CCA	CTC	CTA	AAA	GCC	AGC	ATC	AAG	GAG	ACA	1140
Gly	Asp	Met	Val	Lys	Met	Val	Gln	Leu	Val	Pro	Leu	Leu	Lys	Ala	Ser	Ile	Lys	Glu	Thr	380
CTG	AGA	CTC	CAC	CCC	ATC	TCT	GTG	ACC	GTA	CAG	AGG	TAT	CTT	GTG	GAT	GAC	CTG	GTA	CTT	1200
Leu	Arg	Leu	His	Pro	Ile	Ser	Val	Thr	Val	Gln	Arg	Tyr	Leu	Val	Asp	Asp	Leu	Val	Leu	400
CGA	AAT	TAC	AGG	ATT	CCT	GCC	AAG	ATG	TTG	GTG	CAG	GTG	GCT	AAC	TAT	GCC	ATG	GGC	CGA	1260
Arg	Asn	Tyr	Arg	Ile	Pro	Ala	Lys	Met	Leu	Val	Gln	Val	Ala	Asn	Tyr	Ala	Met	Gly	Arg	420
GAA	CCC	AGC	TTC	TTC	CCC	AAC	CCA	AAC	AAG	TTT	GAC	CCA	ACT	CGT	TGG	CTG	GAA	AAA	AGC	1320
Glu	Pro	Ser	Phe	Phe	Pro	Asn	Pro	Asn	Lys	Phe	Asp	Pro	Thr	Arg	Trp	Leu	Glu	Lys	Ser	440
AAA	AAT	ACC	ACC	CAC	TTC	CGT	TAC	TTG	AGC	TTT	GGC	TGG	GGT	GTT	CGT	CAG	TGT	CTG	GGC	1380
Lys	Asn	Thr	Thr	His	Phe	Arg	Tyr	Leu	Ser	Phe	Gly	Trp	Gly	Val	Arg	Gln	Cys	Leu	Gly	460
CGG	CGG	ATT	GCA	GAG	CTG	GAG	ATG	ACC	ATC	TTC	CTC	ATC	AAT	GTG	CTG	GAG	AAC	TTT	AGA	1440
Arg	Arg	Ile	Ala	Glu	Leu	Glu	Met	Thr	Ile	Phe	Leu	Ile	Asn	Val	Leu	Glu	Asn	Phe	Arg	480
ATT	GAA	CTC	CAA	AGT	CTC	CAT	GAT	GTG	GGG	ACC	AAG	TTC	AAC	CTC	ATC	CTG	ATG	CCT	GAG	1500
Ile	Glu	Leu	Gln	Ser	Leu	His	Asp	Val	Gly	Thr	Lys	Phe	Asn	Leu	Ile	Leu	Met	Pro	Glu	500
AAG	CCC	ATC	CTC	TTC	AAC	CTC	CAG	CCT	CTC	AAG	AAG	GAC	CTT	GGG	ACA	ACC	ACG	AAC	AGA	1560
Lys	Pro	Ile	Leu	Phe	Asn	Leu	Gln	Pro	Leu	Lys	Lys	Asp	Leu	Gly	Thr	Thr	Thr	Asn	Arg	520
TAG	ggtggcaactgtotgaacttcagactggagtcacatggggagatggcccagtgggggcatttgggtgggtgtctct	1638																		
gtatctccagaaaaactgtctcttgggggtgtctcttagctctcagtgggccaactgcttaggttagccagggccctctc	1717																			
ctctctctctctctctctcttcttaacttaacctgaaggtaataaacacacatgaactctgaaaaa....	1780																			

Figura 13. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del P450sc de hámster. La posición +1 corresponde al primer nucleótido del codon de iniciación ATG. Esta secuencia aparece en el banco de datos NCBI con el número de acceso AF323965.

La porción NH₂-terminal del citocromo contiene además seis serinas y dos treoninas y a diferencia de las otras especies no presenta ningún residuo ácido. En cuanto al porcentaje de similitud, las pre-secuencias de la rata, vaca y humano exhiben una homología de 75, 56 y 48% con la del hámster.

Se ha argumentado que la importancia del péptido señal a ser reconocido por el complejo multimérico de la membrana mitocondrial externa, es independiente de su estructura primaria, aunque depende de su potencial para formar estructuras α -hélice anfifáticas cargadas positivamente (Lill & Neupert, 1996). Al respecto, se ha reportado que los aminoácidos iniciales de varias proteínas mitocondriales, incluyendo el P450_{scc} de humano y pollo, pueden potencialmente llegar a formar hélices alfa anfifáticas (Morohashi et al., 1987; Nomura et al., 1997). Estas observaciones junto con el análisis de comparación de secuencias, sugieren que la porción N-terminal del P450_{scc} de hámster podría también funcionar como señal de importación mitocondrial.

Existe evidencia que el citocromo P450_{scc} es sintetizado en el citoplasma como un precursor de peso molecular, mayor al que tiene la enzima madura y que su translocación esta fuertemente asociada al potencial de membrana intramitocondrial. Así los precursores importados, los cuales tienen una vida media de tan solo 3.5 minutos, son translocados al interior de la mitocondria en donde son procesados a una forma madura por endoproteasas que rompen el péptido señal (Matocha et al., 1985; Hurt et al. 1986). Las dos proteasas procesadoras que llevan a cabo esta actividad han sido identificadas en fracciones crudas de matriz mitocondrial. La proteasa I rompe al precursor a una forma intermediaria, mientras que la proteasa II lo convierte a subunidades maduras (Kalousek et al., 1988). En el bovino por ejemplo, el precursor y la forma madura del P450_{scc} tienen un peso molecular calculado de 60,322 y 56,387 daltones respectivamente (Morohashi et al., 1984). En hámster, la forma madura del P450_{scc} tendría un peso molecular estimado de 55,504.

Mediante el análisis de comparación de secuencias se determinó que un dodecapéptido situado hacia los aminoácidos 210-221 del P450_{scc} de bovino (residuos 207-218 en hámster; Fig. 14), tenía una alta similitud con el sitio de unión de la proteína unidora de esteroides de la prostata ventral de la rata. Este tracto, localizado en la porción central fue considerado como el sitio tentativo de reconocimiento del sustrato para el citocromo (Gotoh et al., 1985).

En estudios posteriores se ha establecido que el sitio mas probable de unión para el colesterol, se encuentra en una región intermedia que contiene una secuencia consenso bien preservada en enzimas esteroídogénicas y proteínas unidoras de esteroides, incluyendo varios receptores nucleares (Picado-Leonard & Miller, 1988; Tsujita & Ichikawa, 1993; Lewis & Lee-Robichaud, 1998).

Hámster MLAKGLSLRSLVLAAGCQPFLSPTWQSSVLATGGGANI-STNSPRPFNEIIPSPGDNGWLNLYHFWR 64
Ratón MLAKGLSLRSLVLKGCQPFLSPTWQGPVLSTGKGAG-TSTSSPRSENEIIPSPGDNGWLNLYHFWR
Rata MLAKGLCLRSLVLKSCQPFLSPVWQGPGLATGNGAGISSSTNSPRSENEIIPSPGDNGWINLYHFWR

Hámster ENGTHRIHYHHM~~QNFQKYGPIYREKLG~~NKDSVYIILDPEDAAQLFLSEGPYPERYLVPWPVAYHQY 129
Ratón ESGTQKIHYHQMSFQKYGPIYREKLG~~TLESVYIIVDPK~~DASILFSCGPNPERFLVPWPVAYHQY
Rata ENGTHRIHYHHM~~QNFQKYGPIYREKLG~~NMESVYIILDPKDAATLFSCEGPNPERYLVPWPVAYHQY

Hámster YKRPIGVLFKSS~~EA~~WKDRIVLNQEVMAPEAIKNFVPLLEGVVD~~EFINVLH~~RRIKQQKSGNFSGD 194
Ratón YQRP~~IGVLFKSS~~DAWKDRIVLNQEVMAPEAIKNFVPLLEGVAQDFIKVLHRRIKQQNSGNFSGV
Rata YQRP~~IGVLFKSS~~DAWRKDRIVLNQEVMAPDSIKNFVPLLEGVAQDFIKVLHRRIKQQNSGKFSGD

Hámster ISDDLFRF~~AFESIT~~SVVFG~~ERLGM~~LEEIVDPESQRFD~~AIYQMFHTS~~VPMNLNPP~~ELERFF~~RTKT 259
Ratón ISDDLFRF~~SFESISS~~VI~~FGERM~~GML~~EEIVD~~PEAQRFINAVYQMFHTS~~VPMNLNPP~~DF~~ERLLR~~TKT
Rata ISDDLFRF~~AFESIT~~SVVFG~~ERLGM~~LEEIVDPESQRFD~~AVYQMFHTS~~VPMNLNPP~~DLERL~~FRTKT

Hámster WKEHAAAWDMIFKKAD~~YTOTFYWDLRQKQ~~EFSKYPGVLYSLGGNKL~~PFKNIQANI~~TEMLAGGV 324
Ratón WKDHAAAWDVIFNKADEY~~TQNFYWDLRQK~~RDFSQYPGVLYSLGGNKL~~PFKNIQANI~~TEMLAGGV
Rata WKDHAAAWDVIFSKADEY~~TQNFYWDLRQK~~RDFSQYPGVLYSLGGNKL~~PFKNIQANI~~TEMLAGGV

Hámster DTTSM~~TLOWSLY~~EMAHNLKVQ~~EMLRAEVL~~AARRQAQGD~~MVKMVQIV~~PLLKASIKET~~LR~~LHPISVT 389
Ratón DTTSM~~TLOWNLY~~EMAHNLKVQ~~EMLRAEVL~~AARRQAQGD~~MAKMQIV~~PLLKASIKET~~LR~~LHPISVT
Rata DTTSM~~TLOWNLY~~EMAHNLKVQ~~EMLRAEVL~~AARRQAQGD~~MAKMQIV~~PLLKASIKET~~LR~~LHPISVT

Hámster VQRYLVDDLVLRNYRIPAKMLVQVANYAMGREP~~SFFPNPNKFD~~PTRWLEKS~~QNTTHERY~~LSFGWG 454
Ratón LQRYTVNDLVLRNYKIPAKTLVQVASYAMGRDP~~GFFPNPNKFD~~PTRWLEKS~~QNTTHERY~~LGF~~GWG~~
Rata LQRYIVNDLVLRNYKIPAKTLVQVASYAMGRES~~SFFPNPNKFD~~PTRWLEKS~~QNTTHERY~~LGF~~GWG~~

Hámster VRQCLGRRIAELEMTI~~FLIN~~VLENFRIE~~QSLHDVGT~~KFNLIILMPEKPI~~LENLQPLK~~DLGTTN 519
Ratón VRQCLGRRIAELEMTILLINLLENFRIE~~VQNL~~RDVGT~~KFSLI~~IMPENPI~~LENFQPLK~~QDLGPAVT
Rata VRQCLGRRIAELEMTI~~FLIN~~VLENFRIE~~VQSI~~RDVGT~~KFNLI~~ILMPEKPI~~FFNFQPLK~~QDLGSTMP

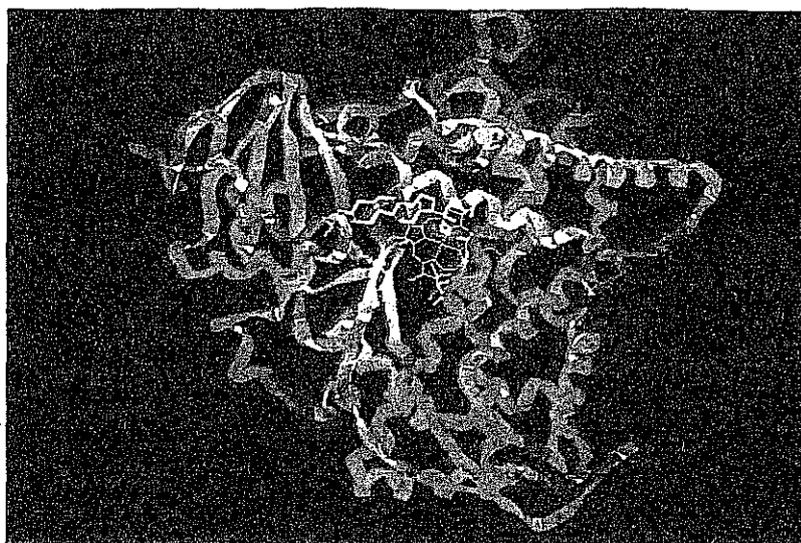
Hámster R 520
Ratón RKDNTVN 527
Rata RKGDTV 526

Figura 14. Comparación de las secuencias de aminoácidos del P450scc de roedores. Los residuos conservados en las tres especies están remarcados. Secuencias consenso propuestas para el dominio de unión al esteroide (recuadro) y el dominio de unión al hemo (subrayado).

La secuencia deducida de aminoácidos del citocromo sugiere la presencia de dos trectos localizados hacia la región carboxilo-terminal, los cuales se piensa representan los sitios de unión al esteroide y al grupo hemo (Fig.14).

El sitio consenso de unión al esteroide del hámster muestra una homología de secuencia del 100% con el sitio correspondiente del bovino (Morohashi et al., 1984), humano (Chung et al., 1986) y porcino (Mulheron et al., 1989).

La unión del colesterol parece poner en contacto los grupos hidroxilo del anillo A con por lo menos cinco residuos de aminoácidos hidrofóbicos; Leu87, Leu181, Val329, Ala236 y Leu437. Adicionalmente, es posible que otro sitio de contacto a nivel del residuo Ser328 pudiera mediar la orientación del metabolito intermediario 22(R)-hidroxicolesterol para su rompimiento en el enlace en 20-22 (Lewis & Lee-Robichaud, 1998). De acuerdo al modelo tridimensional del P450scc mas reciente, se especula que el dodecapéptido identificado entre los residuos 210 y 221 podría representar solo el canal de acceso al sitio de reconocimiento para la entrada del susbtrato (Fig. 15).



TESIS CON
LA DE ORIGEN

Figura 15. Modelo tridimensional del P450scc (Lewis & Lee-Robichaud, 1998).

El alineamiento del P450scc del hámster con secuencias de otras especies, señala la presencia de un dominio putativo de unión al hemo muy conservado, localizado entre los residuos 451 y 470 de la región carboxilo-terminal (Fig. 14). Hasta hace poco existía cierta controversia respecto al sitio de unión del hemo de los citocromos P450, esto, debido en parte a que las modificaciones químicas de los residuos de cisteína, situaban a este dominio en la porción NH₂-terminal de la enzima (Gotoh et al., 1983). No obstante, la comparación de las secuencias

primarias de varios citocromos microsomales y bacterianos, indicó que un segmento corto (HR2), el cual se encuentra en la región proximal carboxilo-terminal y contiene un residuo central de cisteína, era el sitio de unión al hemo (Gotoh et al., 1983; Morohashi et al., 1984, 1987). De hecho, hay un consenso general de que es una cisteína tiolada la que funciona como el quinto ligando del grupo hemo en los citocromos P450 (Schatz, 1979; White & Coon, 1982; Nomura et al., 1997).

Como ocurre en otros citocromos ya conocidos, la enzima del hámster contiene únicamente dos cisteínas, una, se ubica dentro del péptido señal NH₂-terminal (Cis₁₆) y la otra, la cual está dentro del sitio tentativo de unión al hemo (Cis₄₅₈), representa muy probablemente el quinto ligando del hemo como ha sido sugerido con anterioridad (Morohashi et al., 1987; Nomura et al., 1997).

El dominio de unión al hemo del P450_{scc} de hámster muestra una homología de entre el 90 y el 100 % con la secuencia correspondiente en otras especies (Fig.14). Evidencias experimentales recientes han indicado que ciertos aminoácidos básicos de la región COOH-terminal son esenciales para la actividad catalítica del citocromo. Los resultados de tales estudios demostraron que los residuos Lis₄₀₅, Arg₄₂₅ y Arg₄₂₆ están involucrados no solo en la formación de la cavidad central para el hemo sino también en la interacción electrostática del P450_{scc} con la ferredoxina (Azeva et al., 2001).

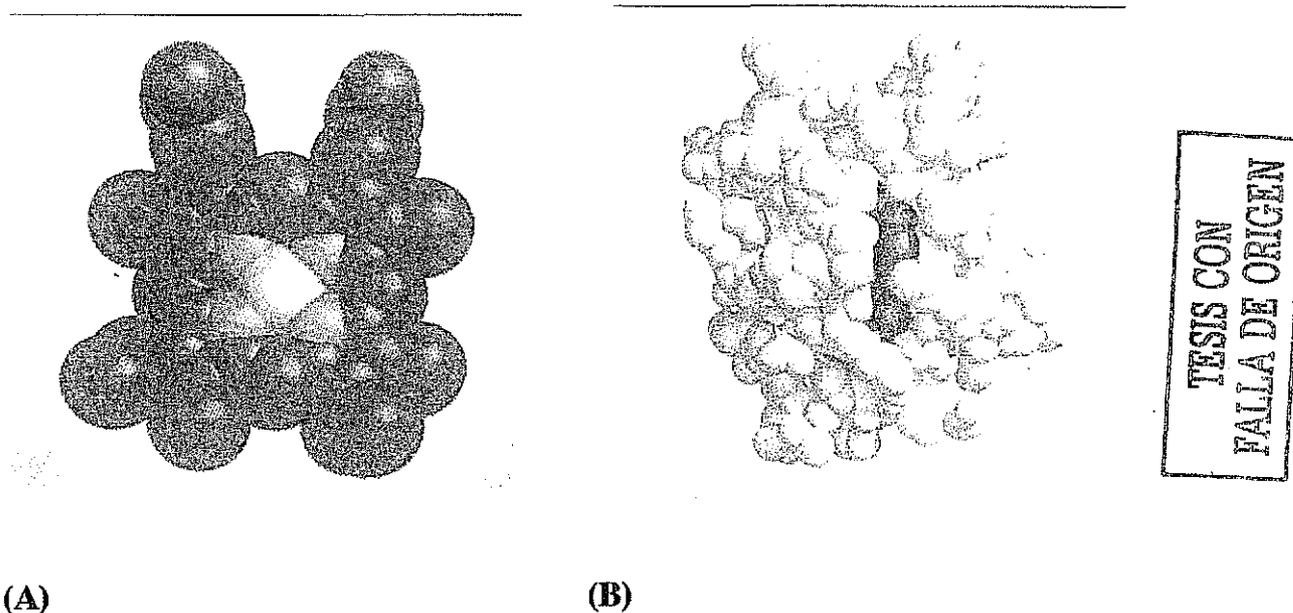


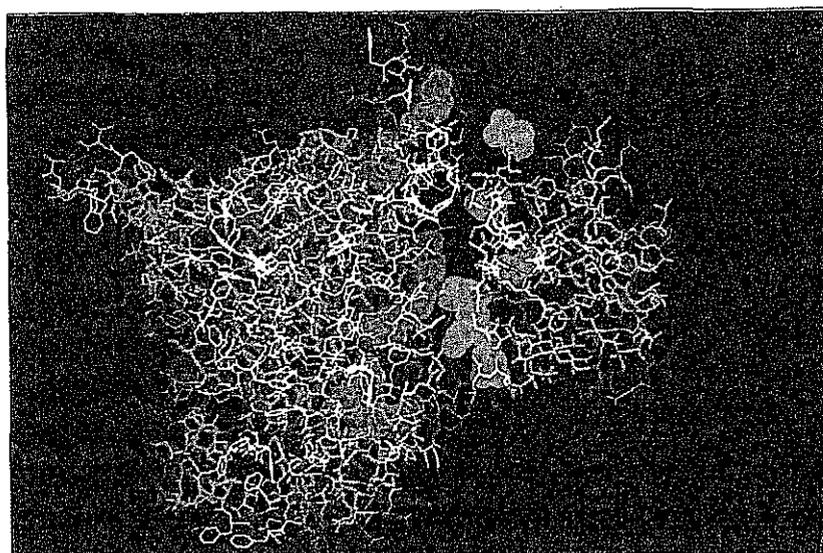
Figura 16. Representación tridimensional de un grupo hemo (A) y de un modelo general de citocromo P450 que muestra al hemo prácticamente enterrado en la molécula (B).

Estos residuos básicos se mantienen conservados en el citocromo del hámster, situándose en los sitios correspondientes a Lis₄₄₁, Arg₄₆₁ y Arg₄₆₂, los dos últimos están situados en la zona central del dominio putativo de unión al hemo (Fig. 14).

Además de los sitios probables de unión al sustrato, los estudios de mutagénesis dirigida y entrecruzamiento químico han permitido identificar algunos puntos clave de contacto del P450_{scc} con la ferredoxina (Viyajakumar & Salerno, 1992; Tsujita & Ichikawa, 1993; Lewis & Lee-Robichaud, 1998; Lepesheva et al., 2000; Azeva et al., 2001). A través de estos análisis, se ha podido identificar una serie de residuos básicos en el P450_{scc} que podrían formar pares iónicos con las cadenas acídicas de la adrenodoxina (ferredoxina***). Los sitios de interacción descritos involucran a los aminoácidos:

Lis315 + + +	---Asp36
Lis319 + + +	---Asp36
Lis114 + + +	---Asp12
Lis97 + + +	---Asp94
Lis63 + + +	---Glu42
Lis245 + + +	---Asp98

A excepción de la lisina 63, los residuos en cuestión se encuentran prácticamente conservados en la secuencia del P450_{scc} del hámster y corresponden a los sitios Lis_{146, 162, 288, 373, 377}. Se ha especulado la posibilidad que un punto de contacto entre el P450_{scc} y la adrenodoxina involucre a la región bisagra del citocromo, la cual yace insertada en una torción (loop), entre las hélices H e I, que varía en longitud en los diferentes P450s (Viyajakumar & Salerno, 1992; Chernogolov et al., 1992).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

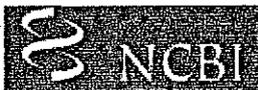
Figura 17. Modelo tridimensional de la interacción entre el P450_{scc} y la ferredoxina (Lewis & Robichaud, 1998).

Inicialmente, se propuso que la lisina 245 podría ser uno de los contactos electrostáticos con la adrenodoxina y además que la unión a la adrenodoxina afectaba la conformación completa del P450_{scc}, de tal forma que le facilitaría su actividad catalítica (Chernogolov et al., 1992). La observación de que los cambios conformacionales de la proteína, asociados a la modulación del estado de equilibrio del citocromo, dependía de la presencia de adrenodoxina, apoyó parcialmente dicha propuesta (Lange et al., 1992, Lewis & Robichaud, 1998).

Al respecto, los resultados de un reporte reciente indican que muy probablemente la arginina 426 sea el principal sitio de contacto del P450_{scc}, ya que su reemplazo por glutamina, resulta en la pérdida absoluta de unión con la adrenodoxina (Usanov et al., 2002). De igual forma, en estudios de mutagénesis dirigida, los mismos autores identificaron los sitios potenciales que participan en la interacción electrostática del P450_{scc}. Demostraron que el cambio de las lisinas 403 y 405 por glutaminas, reducía considerablemente tanto la actividad enzimática como su unión a adrenodoxina. En base a estos hallazgos, fue posible determinar que el P450_{scc} establece cuatro puntos de contacto con la adrenodoxina a nivel de los residuos K₄₀₃ +/-D₇₆, K₄₀₅ +/-D₇₂, R₄₂₆ +/-E₇₃ y K₂₆₇ +/-E₄₇ (Usanov et al 2002).

Comparativamente la arginina 461 del hámster, representaría la contraparte del residuo clave para la unión del grupo hemo y la interacción con la ferredoxina. Como ya se mencionó, la mayor parte de los residuos importantes identificados hasta ahora, se encuentran bien preservados en el P450_{scc} del hámster, mientras su secuencia completa conserva una homología considerable. Por ejemplo, el porcentaje de similitud en aminoácidos es superior al 75 % cuando se compara con el de otras especies (humano, rata, pollo, trucha, etc.). En cuanto a su similitud de nucleótidos, el DNAC del hámster exhibe una homología de secuencia que va del 45 % al 90 %. La secuencia nucleotídica del DNAC para el P450_{scc} de hámster fue registrada en el banco de datos NCBI con número de acceso AF323965 (Fig. 18).

Para confirmar que el pCYP11A1-M.a. fuera una clona funcional del P450_{scc}, su actividad catalítica fue examinada en células de riñón transfectadas, cuantificando la concentración de metabolitos C₂₁ en el sobrenadante. Veinticuatro horas después de la transfección, el 25-hidroxicolesterol fue adicionado al medio de cultivo a concentraciones de 25 μ mol/L y la acumulación de los productos de reacción a las 24 y 48 horas fue determinada por radioinmunoensayo (RIA). Células HEK-293 transfectadas e incubadas en ausencia del esteroide fueron incluidas como grupo control de actividad basal. Como puede verse en la tabla 2, los datos del valor promedio de dos experimentos hechos por triplicado, muestran que las células transfectadas con el DNA plasmídico, forman eficientemente pregnenolona y progesterona cuando se utiliza como sustrato el 25-hidroxicolesterol, lo cual refleja de cierta medida una actividad enzimática funcional.



CGCTCAGGATAGGACTTCGACCCCTAGAGATCGGATCCCGGGGCGGATFATTATATAGCTGGATCGATC
 TTCTCTTATATGCGCGGATATGCGGATATATACACACACAGCTCGCGGATAGCATGACTGATCTG
 TCCCACTTCTGAT
 CACAGACTTACCGTACCGTACCGTACCGTACCGTACCGTACCGTACCGTACCGTACCGTACCGTACCGT



PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PopSet Taxonomy OMIM Bio

Search for

Limits Preview/Index History Clipboard Details
 Display Save Text

1: AF323965. *Mesocricetus auratus* [gi:11991653] Protein, Taxonomy

LOCUS AF323965 1822 bp mRNA linear ROD 25-DEC-2000

DEFINITION *Mesocricetus auratus* cholesterol side-chain cleavage enzyme (CYP11A) mRNA, complete cds.

ACCESSION AF323965
 VERSION AF323965.1 GI:11991653

KEYWORDS .

SOURCE golden hamster.

ORGANISM *Mesocricetus auratus*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Cricetinae; *Mesocricetus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1822)
 AUTHORS Vilchis, F., Chavez, B., Timossi, C., Larrea, F. and Montiel, F.
 TITLE Sequence and characterization of the hamster side-chain cleavage enzyme (P450scc)

JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1822)
 AUTHORS Vilchis, F., Chavez, B., Timossi, C., Larrea, F. and Montiel, F.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (24-NOV-2000), Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion, Vasco de Quiroga #15, Colonia Tlalpan, Mexico, DF 14000, Mexico

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1822
 /organism="Mesocricetus auratus"
 /db_xref="taxon:10036"
 gene 1..1822
 /gene="CYP11A"
 CDS 43..1605
 /gene="CYP11A"
 /note="P450scc"
 /codon_start=1
 /product="cholesterol side-chain cleavage enzyme"
 /protein_id="AAG42320.1"
 /db_xref="GI:11991654"
 /translation="MLAKGLSLRSVLAKGCQPFLLSPTWQSSVLATGGGANISTNSPRP
 FNEIPLSPGDNGWLNLYHFWRENGTHRIHYHHMQNFQKYGP IYREKLGNKDSVYILDPE
 DAAQLFLSEGPYPERYLVPWPVAYHQYKRP IGVLFKSSSEAWKKDRLVLNQEVMAPEA
 IKNFVPLLEGVVQDFINVLHRRRIKQKSGNFSGDISDDLFRFAFESITSVVFGERLGM
 LEEIVDPESQRFIDAIYQMFHTSVPMNLNLPPELFRFFRTKTWKEHAAAWDMI FKKADD
 YTQTFYWDLRQKQEFISKYPGVLYSLGNGKLPFKNIQANITEMLAGGVDTTSMTLQWS
 LYEMAHNLKVQEMLRAEVLAARRQAQGMVKMVQLVPLLKAS IKETLRLHPISVTVQR
 YLVDDLVLRNRYRI PAKMLVQVANYAMGREPS FFPNPNKFDPTRWLEKSKNTTHERYLS
 FGWGVROCLGRRIAEMLEMTIFLINVLENFRIELQSLHDVGTGFNLILMPEKPILENLQ
 PLKKDLGTTTNR"

BASE COUNT 460 a 472 c 459 g 431 t

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

ORIGIN

```

1 agagacagggc gctcagtaag aagtgcagcg tgtggggaca gtatgctggc caaaggactt
61 tccttgcgct cagtgcctggc caaaggctgc caacctttct tgagccctac ctggcagagt
121 tcagtgcctgg ctactggagg gggagctaata atctctacca atagccctcg tcccttcaat
181 gagattcctt cccccgggta caatggttgg ctaaacctgt accacttctg gagggagaat
241 ggcacacaca gaatccatta ccatcacatg cagaatttcc agaagtatgg ccccatftac
301 agggagaagc ttggcaataa ggattctggt tatattctgg accctgaaga tgcagcacag
361 ctctttttta gegaaggctc ctaccagaa cgatatcttg tgccccctg ggctgcctat
421 caccagtatt acaagagacc cataggggtc ctgtttaaga gttcagaagc ttggaagaaa
481 gatagacttg tctaaacca ggaagtgat gcacctgaag ccatcaagaa cttcgtgccc
541 ctgctggaag gtgtagttca ggacttcatc aacgtcttg acagacgat caagcagcag
601 aagtctggaa atttctcagg ggacatcagc gatgacctgt tccgcttgc ctttgagtcc
661 atcaccagtg ttgtatttgg ggagcgcctg gggatggtg aggagattgt ggaccctgag
721 tcccagcggt tcatcgatgc catctaccag atgttcaca ccagtgtccc catgctcaac
781 ctgcctccag aactttttcg attcttcaga actaagacct ggaaggagca tgcagctgcc
841 tgggatatga ttttcaaaaa agctgatgat tatacacaga ctttctactg ggacttaaga
901 cagaagcaag agttcagcaa gtacctggt gtcctttaca gcctcctggg tggcaacaag
961 ctgcocttca agaacatcca ggccaacatt acggagatgc tggcaggagg cgtagacacg
1021 acctccatga cctgagctg gagcctttat gagatggcac acaacttga ggtacaggag
1081 atgctgcggg cagaggttct ggctgcccgg cgtcaggccc agggagacat ggtcaagatg
1141 gtgcagttgg tcccactcct aaaagccagc atcaaggaga cactgagact ccaccccatc
1201 tctgtgaccg tacagaggta tcttgggat gacctggtac ttcgaaatta caggattcct
1261 gccaagatgt tgggtcaggt ggctaactat gccatgggcc gagaaccag cttcttcccc
1321 aacccaaaca agtttgacc aactcgttg ctggaaaaaa gcaaaaatac caccacttc
1381 cgttacttga gctttggctg ggggttctgt cagtgtctgg gccggcggat tgcagagctg
1441 gagatgacca tcttctcat caatgtgctg gagaacttta gaattgaact ccaaagtctc
1501 catgatgtgg ggaccaagtt caacctcatc ctgatgcctg agaagcccat cctcttcaac
1561 ctccagcctc tcaagaagga ccttgggaca accacgaaca gataggggtg cactgtctga
1621 acttcagact ggagtcacat ggggagatgg cccagtgggg gcatttgggt ggggtgtctct
1681 gtatctccag aaaaacctgc tccttgggg tggttcttag ctctcagtg ccaactgctt
1741 aggttagcca ggccctctc tccttcatcc tctctcttt acttaccctg aaggttaata
1801 aacacatgaa ctctgaaaa aa

```

//

Revised: October 24, 2001.

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

Jun 12 2002 10:51:26

Figura 18. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos del P450sc, registradas en el banco de datos NCBI GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Vilchis et al., *General and Comparative Endocrinology* 126(3):279-286, 2002.

Los resultados obtenidos en las células HEK-293 son similares a datos de reportes previos en donde se utiliza 25-hidroxicolesterol y el vector recombinante es transfectado a células COS-1 o COS-7 también de origen renal (Takahashi et al., 1993; Nomura et al., 1997). Al respecto, se ha establecido que si bien el riñón esta desprovisto de actividad de P450_{scc}, la presencia de otros complejos enzimáticos mitocondriales incluyendo el CYP27B1 (1 α -hidroxi-VD₃), demuestran la expresión funcional de la ferredoxina y la ferredoxina reducta en el tejido renal (Henry, 1997; Díaz et al., 2000).

Tabla 2. Actividad de P450_{scc} en células HEK-293 transfectadas con pCYP11A1-M.a.

HEK-293	Pregnenolona ng/ml		Progesterona ng/ml	
	24h	48h	24h	48h
pCYP+25-OHC ₂₇	10.2±2.3	25.4±1.3	0.26±0.02	0.52±0.19
pCYP11A1-M.a.	-	<0.5	-	<0.2

Una vez establecida la identidad del p450_{scc}, se generó un fragmento específico de aproximadamente 550 pb para analizar la distribución del citocromo en los diferentes tejidos del hámster. El análisis por transferencia Northern del RNA obtenido de diferentes tejidos de machos y hembras, usando una sonda de DNA marcada con ³²P, mostró hibridación positiva exclusivamente en preparaciones de RNA poli(A)⁺ y RNA total de glándula adrenal y gónadas. En ambos casos se detectó un transcrito principal de alrededor de 1.8 kb, cuya longitud concuerda con la talla estimada según la secuencia de su DNAc (Fig. 19).

Con respecto a su talla, el RNAm del CYP11A1 de pollo y trucha es muy similar al de hámster, mientras que el de humano y rata es ligeramente mayor a 2.0 kb. Es posible que tal diferencia se deba a la extensión variable de sus respectivas regiones 3' no-traducidas (Morohashi et al., 1984; Chung et al., 1986; Oonk et al., 1990; Takahashi et al., 1993; Nomura et al., 1997).

Por transferencia Northern la señal de hibridación para el RNA de otros tejidos fue prácticamente indetectable incluso en el caso de cerebro y riñón. Un patrón de expresión similar fue descrito para el CYP11A1 de pollo (Nomura et al., 1997).

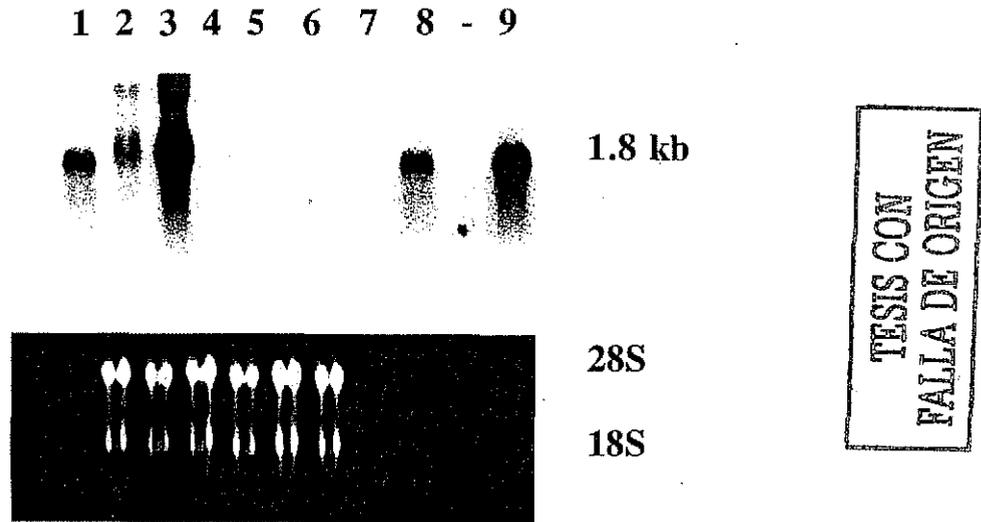


Figura 19. Análisis por transferencia Northern de la expresión del P450scc en varios tejidos de hámster adulto. Preparaciones de RNA poli(A)⁺ de glándula adrenal (carriles 1, 8 y 9) o de RNA celular total de testículo (2), ovario (3), pulmón (4), hígado (5), glándula Harderiana de macho (6) y glándula Harderiana de hembra (7), fueron transferidos a filtros de nylon e hibridados a 65°C con una sonda específica de DNA-CYP11A1 marcada con fósforo³² (panel superior). La tinción del gel con bromuro de etidio muestra las cantidades de RNA aplicadas en cada carril (panel inferior).

La combinación de evidencias derivadas de estudios inmunohistoquímicos y metabólicos han demostrado la presencia de P450scc en ciertas áreas cerebrales de roedores, la cual parece estar restringida a las regiones mielinizadas de la sustancia blanca. En la rata se ha detectado inmunotinción específica para el citocromo en varias zonas del cuerpo calloso, fornix, tálamo, núcleo caudado, bulbo olfatorio y sustancia blanca del cerebelo, pero no en corteza cerebral (LeGoascogne et al., 1987; Iwahashi et al., 1990).

Por otro lado, experimentos encaminados a demostrar actividad enzimática del P450scc en estos sitios han producido resultados contradictorios. Así, mientras que en homogenados totales de cerebro, incubados con colesterol-[³H] no se logró detectar la formación de pregnenolona marcada (LeGoascogna et al., 1987), la incubación de mevalonato-[³H] o colesterol-[³H] con preparaciones altamente enriquecidas de mitocondrias de oligodendrocitos, resulta en la formación de pregnenolona, 20 α -hidroxipregnenolona y otros pregnanos polares (Hu et al., 1987; Robel & Baulieu, 1994).

Aunque estas y otras observaciones (Strmstedt & Waterman, 1995) han mostrado la actividad funcional del CYP11A1 en el encéfalo, aún no hay reportes que demuestren la expresión de su RNAm por transferencia Northern. Está documentado que en cerebro de rata y estructuras neurales embrionarias de ratón, el RNAm del P450scc se expresa a niveles extremadamente bajos, aún cuando la cantidad de proteína inmunoreactiva sea abundante (Compagnone et al., 1995).

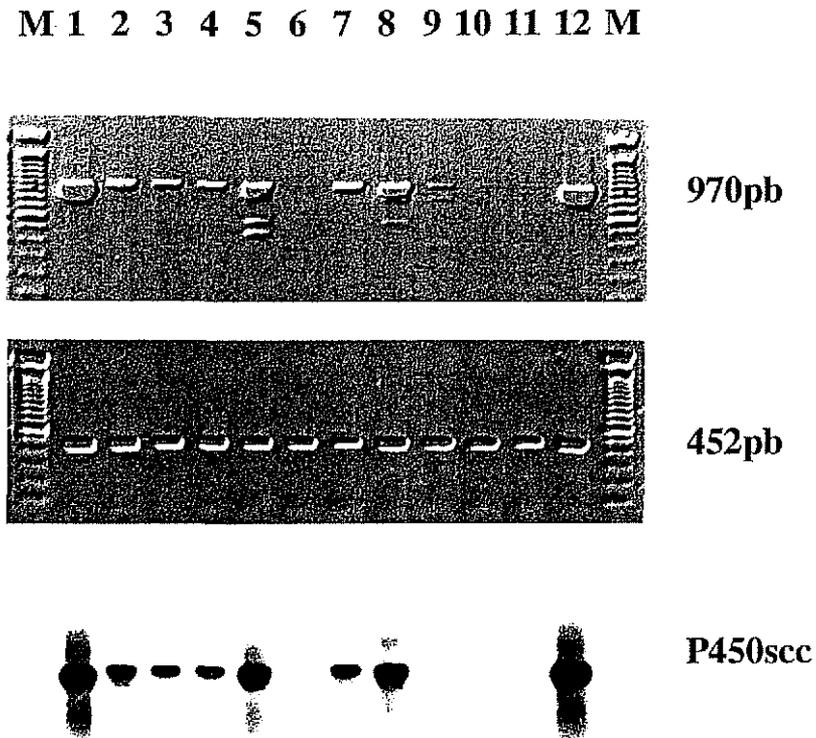
Asímismo, en ensayos de protección de RNAsa e hibridación *in situ*, el RNAm solo pudo ser detectado en tejido adrenal pero no en regiones de sistema nervioso central o periférico, lo cual confirma el bajo nivel de expresión en estos sitios. Se ha estimado que en tejido neural la expresión del gen CYP11A1 es 200 veces menor que en la suprarrenal (Compagnone et al., 1995; Zhang et al., 1995; Watzka et al., 1999).

No obstante la moderada expresión del gen a lo largo del desarrollo, la producción local de pregnenolona parece ser importante en el establecimiento de redes neuronales durante la vida fetal, así como en la modulación de los cambios de comportamiento y adquisición de memoria en etapas posnatales (Mellon & Deschepper, 1993; Mellon, 1994; Compagnone et al., 1995).

En el presente estudio el marcaje del RNAm de la enzima se detectó en glándula adrenal, testículo y ovario pero no en preparaciones de hipotálamo, cerebelo o corteza cerebral, y a diferencia de otros estudios en los que demuestran su expresión mediante RT-PCR, en el hámster tampoco fue posible identificar transcritos del citocromo en las regiones en cuestión (Fig. 20). Esto podría deberse en parte a las regiones utilizadas para aislar el RNA, o bien, a la densidad relativa de células (oligodendrocitos) que expresan el gen (Hu et al., 1987; Watzka et al., 1999), por lo que la aplicación de técnicas moleculares e inmunohistoquímicas más sensibles, se hace necesaria para determinar si el cerebro del hámster sintetiza o no neuroesteroides.

A diferencia de lo observado mediante transferencia Northern, la hibridación del DNAc generado por RT-PCR, mostró la presencia de señales positivas no solo en el tejido gonadal y adrenal sino además en preparaciones de pulmón, epidídimo y glándula Harderiana de machos y hembras (Fig. 20). La amplificación del DNAc con los iniciadores H45-YAM3 produjo fragmentos de la talla esperada que fue de aproximadamente 970 pb. A excepción de cerebro, cerebelo, hígado y riñón en los tejidos restantes fue posible detectar transcritos auténticos de P450scc. De igual forma, en todas las reacciones llevadas a cabo, la amplificación constante de ciclofilina confirmó la pureza e integridad del DNAc.

La distribución del CYP11A1 en pulmón, epidídimo y glándula Harderiana puede considerarse como evidencia inicial de la expresión del P450scc en estos sitios.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 20. Análisis de la expresión del P450scc en tejidos de hámster adulto. El DNAc fue sintetizado a partir de RNAm de glándula adrenal (carriles 1 y 12), glándula Harderiana de macho (2), glándula Harderiana de hembra (3), pulmón (4), testículo (5), cerebro (6), ovario (7), epidídimo (8), hígado (9), cerebelo (10) o riñón (11), y sometido a 25 ciclos de amplificación a 65°C. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa (panel superior), o transferidos a membranas de nylon e hibridizadas bajo condiciones de alta estringencia. Para la transferencia Southern se utilizó una sonda de P450scc (550pb) marcada con P³² (panel inferior). En ensayos paralelos, un fragmento de DNAc de ciclofilina (452pb) fue amplificado a fin de verificar la integridad de las reacciones de RT-PCR (panel intermedio). Como marcador de talla se usó una escalera de DNA de 100pb (M).

Aunque aún se desconoce la transformación enzimática del colesterol en dichos órganos, la abundancia relativa de transcritos de P450scc sugiere una actividad esteroideogénica local. En apoyo a lo antes mencionado, existen datos experimentales que demuestran la capacidad del epidídimo, el pulmón y la glándula Harderiana para sintetizar y transformar diversos esteroides incluyendo compuestos C₁₉ y C₂₁. Adicionalmente los tres tejidos se distinguen por su alto contenido en colesterol, pregnenolona y otros pregnanos 5 α -/5 β reducidos, así como por su gran dependencia hormonal y actividad de 5 α -reductasa (Vreeburg et al., 1976; Kumari et al., 1980; Milewich et al., 1980; Viger & Robaire, 1996; Vilchis et al., 1996; Vilchis, 1997; Kellendonk et al., 1999; Kolleck et al., 2002).

Al respecto, se ha considerado al pulmón como un órgano endocrino incompleto por carecer de algunas enzimas involucradas en la síntesis de esteroides C₁₉, sin embargo hay reportes que muestran no solo la formación *in situ* de andrógenos y glucocorticoides sino también la influencia de estos compuestos sobre el desarrollo y maduración pulmonar las en etapas finales de la gestación. En el conejo por ejemplo, el cortisol acelera la formación de surfactantes pulmonares y la diferenciación del tejido pulmonar (Cole et al., 1995; Mendelson & Boggaram, 1991; Kellendonk et al., 1999).

En el pulmón, además de encontrarse grandes concentraciones de colesterol, se han detectado cantidades importantes de conjugados sulfatados de pregnenolona, 5 α -pregnen-3 β ,20 α -diol, 16 α -hidroxipregnenolona, 17 α -hidroxipregnenolona y DHEA (Hutaniemi, 1974; Kolleck et al., 2002):

También existe evidencia de la conversión *in vitro* de pregnenolona a pregnandiol, 17 β -hidroxipregnenolona, 17 α -hidroxipregnenolona, 20 α -hidroxiprogesterona y progesterona; de progesterona a 20 α -OH-progesterona, 20 β -hidroxiprogesterona y 5 α -dihidroprogesterona, así como del metabolismo de la DHEA a 7 α -OH-DHEA y 16 α -OH-DHEA en homogenados totales de tejido pulmonar (Hutaniemi, 1974; Milewich et al., 1980).

La expresión de otros complejos enzimáticos mitocondriales (p.ej., 1 α -OHasa y CYP24), de ferredoxina, de ferredoxina reductasa y del receptor periférico de benzodiazepinas en el pulmón (Drugan, 1996; Jones et al., 1999; Segersten et al., 2002), junto con el presente hallazgo de transcritos para P450scc y proteína StAR sugieren fuertemente la posibilidad que este órgano tenga la capacidad de efectuar una actividad esteroidogénica mas amplia.

Como puede verse en la figura 21, la amplificación del DNAC de varios tejidos de hámster con iniciadores específicos para la proteína StAR (Fleury et al., 1996), produjo fragmentos de PCR de la talla esperada. En el pulmón al igual que en epidídimo y glándula de Harder, el análisis de RT-PCR utilizando dos pares de iniciadores que abarcan la totalidad del DNAC, mostró dos productos de 415 pb (Fig. 21) y 470 pb (no incluidos), derivados del RNAm del gen StAR.

Mediante análisis de RT-PCR, el epidídimo exhibió una expresión muy pronunciada del RNAm para el citocromo P450scc y la proteína StAR (Figs. 20 y 21), sugiriendo nuevamente la posibilidad de que este órgano pudiera sintetizar pregnenolona a partir de colesterol. Se tiene conocimiento de la gran dependencia a esteroides que tiene el epidídimo, en particular hacia pregnenolona y andrógenos, para el mantenimiento y maduración del espermatozoide. Así, mientras en animales hipofisectomizados la administración de pregnenolona mantiene la estructura del epidídimo y la viabilidad de los espermatozoide, la integridad

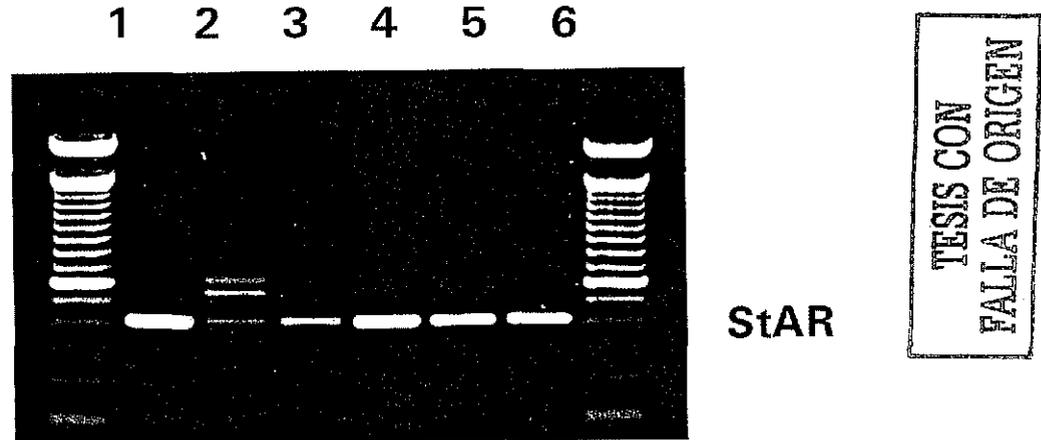


Figura 21. Expresión del RNAM de la proteína StAR en diferentes tejidos de hámster adulto. Se muestra el producto de RT-PCR de 415 pb derivado de preparaciones de DNAC de glándula adrenal (1), ovario (2), pulmón (3), epidídimo (4), glándula Harderiana de macho (5), glándula Harderiana de hembra (6). Alícuotas de 5 μ l de cada muestra fueron separadas en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Los carriles externos corresponden a un marcador de DNA de 100pb.

funcional del mismo, depende de los niveles circulantes de testosterona y otros compuestos con actividad androgénica (Vreeburg et al., 1976; Vigier & Robaire, 1996; Levine et al., 1996).

Datos de estudios metabólicos han indicado variaciones en el contenido de esteroides y actividad enzimática de los diferentes segmentos del epidídimo. Al parecer en la cauda y el cuerpo es donde se almacena la mayor cantidad de esteroides, pregnanos y DHEA, aunque su porción cefálica es la mas activa para transformar pregnenolona (Kumari et al., 1980; Roberts, 1987). Mas aún, se ha descrito que el epidídimo del hámster contiene grandes cantidades de desmosterol (el principal precursor del colesterol), que son similares a las encontradas en el cerebro en desarrollo. El desmosterol es también un importante constituyente del espermatozoide humano, de hámster, mono rhesus, conejo y ratón y también su concentración se incrementa gradualmente de la cabeza a la cauda, en algunas pero no en todas las especies (Legault et al., 1978; Awano et al., 1989).

Además del desmosterol, en el epidídimo del hámster se ha demostrado la acumulación de 7,24-colestandien-3 β -ol y 5 α -colesten-7,24-3 β -ol en cantidades

abundantes y más recientemente, se reportó la existencia de una gran concentración de 7-dehidrocolesterol y 8-dehidrocolesterol en la cabeza del epidídimo de la rata, los cuales pueden llegar a representar hasta el 30% de los esteroides totales. A diferencia del colesterol que se encuentra distribuido uniformemente a lo largo del epidídimo, los dehidrocolesteroles son prácticamente indetectables en la región caudal (Lindenthal et al., 2001). Las concentraciones inusualmente elevadas de precursores del colesterol, en asociación con el hallazgo de transcritos para el citocromo P450_{scc} y proteína StAR, parecen apoyar la idea que el epidídimo contiene los elementos necesarios para biosintetizar esteroides.

Por otro lado, resultados preliminares han sugerido que los esteroides sexuales podrían influenciar la transcripción del gen StAR en la glándula Harderiana del hámster; esto es, la cantidad de transcritos específicos tiende a aumentar después de la ovariectomía o la castración (datos no mostrados). Esta observación podría no ser de gran relevancia, sin embargo el simple hecho de encontrar co-expresión del citocromo P450_{scc} y la proteína StAR, da soporte a la propuesta inicial, en particular, por que la presencia de esta fosfoproteína ha sido considerada como una característica exclusiva de los órganos esteroideogénicos primarios. Aunque hasta ahora se conoce poco del metabolismo de esteroides en la glándula Harderiana y en general de la conversión enzimática del colesterol a nivel local, la abundancia de transcritos para el P450_{scc} (Fig. 20) y la proteína StAR (Fig. 21), sugieren la posibilidad que este órgano intraorbital realice actividad esteroideogénica.

En apoyo a esta propuesta, las evidencias existentes indican que la glándula Harderiana es un órgano altamente sensible a la acción de las hormonas tróficas como LH y FSH (Payne, 1994), contiene cantidades importantes de colesterol (Seyama et al. 1992, 1996), posee actividad de 11 β -hidroxilasa (CYP11B1) y otras enzimas (Butler et al., 1978; Vilchis et al., 1992, 1994) y que la pregnenolona y varios de sus metabolitos incluyendo la 11-cetopregnenolona, ejercen efectos estimuladores sobre la actividad de la σ -aminolevulinato sintetasa (ALA-S), la enzima paso limitante en la vía porfirinogénica (Gordon et al., 1970).

Como se sabe, la glándula Harderiana del hámster sintetiza y almacena gran cantidad de porfirinas, específicamente protoporfirina IX y la expresión de la ALA-S exhibe un marcado dimorfismo sexual (Spike et al., 1992; Payne, 1994; Vilchis et al., 1996). Al respecto se ha reportado que algunas protoporfirinas tales como la deutroporfirina IX y la protoporfirina IX pueden funcionar como ligandos endógenos del receptor de benzodiazepinas tipo periférico (Verma et al., 1987; Snyder et al., 1987). Hasta ahora, el PBR junto con la proteína StAR figuran entre los principales reguladores de la esteroideogénesis (Mukhin et al., 1989; Stocco, 2001).

Si bien la formación de esteroides a nivel local, podría explicar al menos parte de

los efectos hormonales que ejercen los derivados de la pregnenolona sobre la actividad biosintética glandular (Gupta & Maiti, 1983; Menendez-Pelaez et al., 1992), incluyendo la producción de feromonas (Brooksbank et al., 1973; Payne, 1977), se requieren estudios adicionales para confirmar la capacidad esteroidogénica de la glándula Harderiana.

CONCLUSIONES

- (1) En el presente trabajo se demuestra que la clona pCYP11A1-M.a., aislada de glándula adrenal contiene el DNAc para el P450scc de hámster; a) por el 75-85 % de homología en su marco abierto de lectura de 520 aminoácidos que comparte con la secuencia del citocromo de otros mamíferos y b) por la actividad enzimática de convertir 25-hidroxicolesterol a pregnenolona, demostrada en células HEK-293 transfectadas con el DNAc.
- (2) La secuencia deducida de aminoácidos del P450scc clonado indica la presencia de dominios funcionales bien conservados en su región carboxilo-terminal, incluyendo un sitio de unión al esteroide y un sitio de unión al grupo hemo con un residuo único de cisteína en la parte central, además de sitios de interacción con su contraparte fisiológica, la ferredoxina. Asimismo, la secuencia inicial de su región NH₂-terminal concuerda con la regla general de composición de aminoácidos requeridos para las señales de translocación mitocondrial.
- (3) La abundancia relativa de transcritos para el P450scc, detectada mediante RT-PCR en el pulmón, epididímo y glándula Harderiana, sugiere que la función del citocromo en estos sitios pudiera estar asociada a la producción local de esteroides para regular efectos autocrinos o paracrinos. La co-expresión del citocromo P450scc y la proteína StAR en la glándula Harderiana del hámster apoyan en forma consistente la hipótesis planteada.

los efectos hormonales que ejercen los derivados de la pregnenolona sobre la actividad biosintética glandular (Gupta & Maiti, 1983; Menendez-Pelaez et al., 1992), incluyendo la producción de feromonas (Brooksbank et al., 1973; Payne, 1977), se requieren estudios adicionales para confirmar la capacidad esteroidogénica de la glándula Harderiana.

CONCLUSIONES

- (1) En el presente trabajo se demuestra que la clona pCYP11A1-M.a., aislada de glándula adrenal contiene el DNAc para el P450scc de hámster; a) por el 75-85 % de homología en su marco abierto de lectura de 520 aminoácidos que comparte con la secuencia del citocromo de otros mamíferos y b) por la actividad enzimática de convertir 25-hidroxicolesterol a pregnenolona, demostrada en células HEK-293 transfectadas con el DNAc.
- (2) La secuencia deducida de aminoácidos del P450scc clonado indica la presencia de dominios funcionales bien conservados en su región carboxilo-terminal, incluyendo un sitio de unión al esteroide y un sitio de unión al grupo hemo con un residuo único de cisteína en la parte central, además de sitios de interacción con su contraparte fisiológica, la ferredoxina. Asimismo, la secuencia inicial de su región NH₂-terminal concuerda con la regla general de composición de aminoácidos requeridos para las señales de translocación mitocondrial.
- (3) La abundancia relativa de transcritos para el P450scc, detectada mediante RT-PCR en el pulmón, epididímo y glándula Harderiana, sugiere que la función del citocromo en estos sitios pudiera estar asociada a la producción local de esteroides para regular efectos autocrinos o paracrinos. La co-expresión del citocromo P450scc y la proteína StAR en la glándula Harderiana del hámster apoyan en forma consistente la hipótesis planteada.

BIBLIOGRAFIA

Adamovich T.B., Pikuleva I.A., Chashchin V.L. and Usanov S.A. (1989) Selective chemical modification of cytochrome P-450scc lysine residues. Identification of lysines involved in the interaction with adrenodoxin. **Biochim Biophys Acta** **996:247-253**.

Albrecht E.D. and Pepe G.J. (1990) Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. **Endocr Rev** **11:124-150**.

Ahlgren R., Simpson R.E., Waterman M.R. and Lund J. (1990) Characterization of the promoter/regulatory region of the bovine CYP11A (P-450scc) gene. **J Biol Chem** **265:3313-3319**.

Arakane F., Sugawara T., Nishino H. et al., (1996) Steroidogenic acute regulatory protein retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: implications for the mechanisms of StAR action. **Proc Natl Acad Sci USA** **93:13731-13763**.

Arakane F., King S.T., Du Y. et al., (1997) Phosphorilation of steroidogenic acute regulatory protein modulates its steroidogenic activity. **J Biol Chem** **272:32656-32662**.

Arakane F., Kallen C.B., Watari H. et al., (1998) The mechanisms of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). **J Biol Chem** **273:16339-16345**.

Artemenko I.P., Zhao D., Hales D.B. et al., (2001) Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. **J Biol Chem** **276:46583-46596**.

Awano M., Kawaguchi A., Morisaki M. and Mohri H. (1989). Identification of cholesta-7,24-dien-3beta-ol and desmosterol in hamster cauda epididymal spermatozoa. **Lipids** **24:662-664**.

Azeva T.N., Gilep A.A., Lepesheva G.I. et al., (2001) Site-directed mutagenesis of cytochrome P450scc. II. Effect of replacement of the Arg425 and Arg426 residues on the structural and functional properties of the cytochrome P450scc. **Biochemistry (Mosc)** **66:564-575**.

Babischkin J.S, Grimes R.W., Pepe G.P. and Albrecht E.D. (1997a) Estrogen stimulation of P450 cholesterol side-chain cleavage activity in cultures of human placental syncytiotrophoblasts **Biol Reprod** **56:272-278**.

Babischkin J.S., Pepe G.J. and Albrecht E.D. (1997b) Estrogen regulation of placental P-450 cholesterol side-chain cleavage enzyme messenger ribonucleic acid levels and activity during baboon pregnancy. **Endocrinology** **138:452-459**.

Boerboom D. and Sirlois J. (1997) Equus caballus cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage (P450scc) gene. **NCBI: #AF031664.**

Bose H.S., Sato S., Aisenberg J. et al., (2000) Mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in six patients with congenital lipoid adrenal hyperplasia. **J Clin Endocrinol Metab 85:3636-3639.**

Brooksbank B.W.L., Wilson D.A.A. and Clough G. (1973) The in-vivo uptake of [³H]androsta-4,16-dien-3-one in tissues of the adult male rat. **J Endocrinol 57ii.**

Burstein S. and Gut M. (1971) Biosynthesis of pregnenolone. **Rec Prog Horm Res 27:303-349.**

Butler D.G., Wilson J.X. and Youson J.H. (1978) Transformation of corticosterone to 11-dehydrocorticosterone by nasal, Harderian and lacrymal glands of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) in vivo. **Gen Comp Endocrinol 35:475-479.**

Caron K.M., Soo S.C., Wetsel W.C. et al., (1997) Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia. **Proc Natl Acad Sci USA 94:11540-11545.**

Clark B., Wells J., King S.R. and Stocco D.M. (1994) The purification, cloning and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. **J Biol Chem 269:28314-28322.**

Clemens J.W., Lala D.S., Parker K.L. and Richard J.S. (1994) Steroidogenic factor-1 binding and transcriptional activity of the cholesterol side-chain cleavage promoter in rat granulosa cells. **Endocrinology 134:1499-1508.**

Cole T.J., Blendy J.A., Monaghan A.P. et al., (1995) Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. **Genes Dev 9:1608-1621.**

Compagnone N.A., Bulfone A., Rubenstein J.L.R. and Mellon S.H. (1995) Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. **Endocrinology 136:2689-2696.**

Culty M., Li H., Boujrad N. et al., (1999) In vitro studies on the role of peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenesis. **J Steroid Biochem Molec Biol 69:123-130.**

Culty M., Luo L., Yao Z-X. et al., (2002) Cholesterol transport, peripheral benzodiazepine receptor, and steroidogenesis in Leydig cells. **J Androl 23:439-447.**

Curnow K.M., Tusie M.T., Pascoe L., et al., (1991). The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. **Mol Endocrinol 5:1513-1522.**

Chanderbhan R., Noland B.J., Scallen T.S. and Vahouny G.V. (1982) Sterol carrier protein 2. **J Biol Chem** **257:8928-8934**.

Chang C.Y., Wu D.A., Lai C.C. et al., (1988) Cloning and structure of the human adrenodoxin gene. **DNA** **7:609-615**.

Chen C. and Guo I.C. (2000) Effect of AMPc on protein binding activities of three elements in the upstream promoter of human CYP11A1 gene. **Life Sci** **67:2045-2049**.

Cherradi N., Rossier M.F., Vallotton M.B. et al., (1997) Submitochondrial distribution of three steroidogenic proteins (Steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome P450_{scc} and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. **J Biol Chem** **272:7899-7907**.

Chou S., Lai K. and Chung B. (1996) Characterization of the upstream sequence of the human CYP11A1 gene for cell type-specific expression. **J Biol Chem** **271:22125-22129**.

Chua S.C., Szabo P., Vitek A., et al., (1987) Cloning of cDNA encoding steroid 11 β -hydroxylase (P540c11). **Proc Natl Acad Sci USA** **84:7193-7197**.

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

Chung B., Hu M., Lai C.C. and Lin C.H. (1989) The 5'-region of the P450_{X1A1} (P450_{scc}) gene contains a basal promoter and an adrenal-specific activating domain. **Biochem Biophys Res Commun** **160:276-281**.

Chung B., Guo I-C and Chou S-J (1997) Transcriptional regulation of the CYP11A1 and ferredoxin genes. **Steroids** **62:37-42**.

Dalla V.L., Belvedere P., Simontacchi C. and Colombo L. (1992) Extraglandular hormonal steroidogenesis in aged rats. **J Steroid Biochem Molec Biol** **43:1095-1098**.

Díaz L., Sánchez I., Avila E., et al., (2000) Identification of a 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells. **J Clin Endocrinol Metab** **85:2543-2549**.

Drugan R.C. (1996) Peripheral benzodiazepine receptors: molecular pharmacology and possible physiological significance in stress-induced hypertension. **Clin Neuropharmacol** **19:475-496**.

Fleury A., Cloutier M., Ducharme L., et al., (1996) Adrenocorticotropin regulates the level of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein mRNA in hamster adrenals. **NCBI:U66490**

Frohman M.A., Dush M.K. and Martin G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. **Proc Natl Acad Sci USA** **85:8998-9002**.

Gavish M. (1995) Hormonal regulation of peripheral-type benzodiazepine receptors. **J Steroid Biochem Molec Biol** **53:1-6**.

Gomez S.C.E., and Gomez S.E.P. (2001) Cardiac steroidogenesis-New sites of synthesis, or much ado about nothing ?. **J Clin Endocrinol Metab** **86:5118-5120**.

Gonzalez F.J. (1990) Molecular genetics of the P-450 superfamily. **Pharm Ther** **45:1-38**.

Gordon A.S., Zanjani E.D., Levere R.D. ET AL., (1970) Stimulation of mammalian erythropoiesis by 5 β -H steroid metabolites. **Proc Natl Acad Sci USA** **65:919-924**.

Gotoh O., Tagashira Y., Iizuka T. and Fuji-Kuriyama Y. (1983) Structural characteristics of cytochrome P-450. Possible location of the heme-binding cysteine in determines amino-acid sequences. **J Biochem** **93:807-817**.

Guo I., Tsai H-M. and Chung B. (1994) Actions of two different cAMP-responsive sequences and an enhancer of the human CYP11A1 (P450scc) gene in adrenal Y1 and placental JEG-3 cells. **J Biol Chem** **269:6362-6369**.

Guo I. and Chung B. (1999) Cell-type specificity of human CYP11A1 TATA box. **J Steroid Biochem Molec Biol** **69:329-334**.

Gupta S.K. and Maiti B.R. (1983) Influence of sex-hormones on the Harderian gland activity in female domestic duckling. **Mikroskopie (Wien)** **40:132-137**.

Halvorson L.M., Ito M., Jameson J.L. and Chin W.W. (1998) Steroidogenic factor-1 and early growth response protein 1 act through two composite DNA binding sites to regulate LH β -subunit gene expression. **J Biol Chem** **273:14712-14720**.

Hammer G.D. and Ingraham H.A. (1999) Steroidogenic factor-1: its role in endocrine organ development and differentiation. **Front Neuroendocrinol** **20:199-223**.

Hanukoglu I. (1992) Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. **J Steroid Biochem Molec Biol** **43:779-804**.

Hasegawa t., Zhao L., Caron K.M. et al. (2000) Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. **Mol Endocrinol** **14:1462-1471**.

Hatano O., Takakusu A., Nomura M. et al., (1996) Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. **Gen Cell** **1:663-671**.

Hendrick J.P., Hodges P.E. and Rosenberg L.E. (1989) Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins. **Proc Natl Acad Sci USA** **86:4056-4060**.

Henry H.L. (1997) The 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase. In: **Vitamin D (Feldman D., Glorieux F.S. and Pike J.W. eds.) pp 57-68 Academic Press Inc., San Diego CA.**

Honda S., Morohashi K., Nomura M. et al., (1993) AdBP4 regulating steroidogenic P-450 is a member of steroid hormone receptor superfamily. **J Biol Chem** **268:7494-7502**.

Hu Z.Y, Bourreau E., Jung T.I. et al., (1987). Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. **Proc Natl Acad Sci USA** **84:8215-8219**.

Hu M.C., Hsu N.C., Pai C.I. et al (2001) Function of the upstream and proximal steroidogenic factor 1 (SF-1) binding sites in the CYP11A1 promoter in basal transcription and hormonal response. **Mol Endocrinol** **15:812-818**.

Huhtaniemi I, (1974) Endogenous neutral steroids in the lung tissue of early and mid-term human foetuses and in vitro studies on their formation. **Acta Endocrinol (Kbh)** **75:145-158**.

Hurt E.C. and van Loon A.P. (1986a) How proteins find mitochondrial compartments. **TIBS** **11:204-207**.

Hurt E.C., Soltanifar N., Goldschmidt M. et al., (1986b) The cleavable pre-sequence of an imported chloroplast protein directs attached polypeptides into yeast mitochondria. **EMBO J** **5:1343-1350**.

Ikeda Y, Lala D.S., Luo X. et al., (1993) Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. **Mol Endocrinol** **7:852-860**.

Ikeda Y., Shen W., Ingraham H.A, and Parker K.L. (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. **Mol Endocrinol** **8:654-662**.

Inoue H., Higashi Y, Morohashi K. and Fuji Y. (1988) The 5'-flanking region of the human P-450(scc) genes shows responsiveness to cAMP-dependent regulation in a transient gene-expression system of Y-1 adrenal tumor cells. **Eur J Biochem** **171:435-440**.

Iwahashi K., Ozaki H.S., Tsubaki M. et al., (1990) Studies of the immunohistochemical and biochemical localization of the cytochrome P-450scc-linked monooxygenase system in the adult brain. **Biochim Biophys Acta** **1035:182-189**.

John M.E., John M.C., Ashley P. et al., (1984) Identification and characterization of cDNA clones specific for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450. **Proc Natl Acad Sci USA 81:5628-5632.**

Jones G., Ramshaw H., Zhang A. et al., (1999) Expression and activity of vitamin D-metabolizing cytochrome P450s (CYP1alpha and CYP24) in human nonsmall cell lung carcinoma. **Endocrinology 140:3303-3310.**

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

Kallen C.B., Billheimer J.T., Summers S.A. et al., (1998) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein. **J Biol Chem 273:26285-26288.**

Kalousek F., Hendrick J.P. and Rosenberg L.E. (1988) Two mitochondrial matrix proteases act sequentially in the processing of mammalian matrix enzyme. **Proc Natl Acad Sci USA 85:7536-7540.**

Keeney D.S., Ikeda Y., Waterman M.R. and Parker K.L. (1995) Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 gene expression in the primitive gut of the mouse embryo does not require steroidogenic factor 1. **Mol Endocrinol 9:1091-1098.**

Kellendonk C., Tronche F., Reichardt H.M. and Schutz G. (1999) Mutagenesis of the glucocorticoid receptor in mice. **J Steroid Biochem Molec Biol 69:253-259.**

King R.J.B. and Mainwaring W.I.P (1974) Relationship of binding to biological activity. In: **Steroid-Cell Interactions**, pp. 288-378. **Butterworth & Co. Publishers Ltd, England.**

Kolleck I., Guthmann F., Ladhoff A.M. et al., (2002) Cellular cholesterol stimulates acute uptake of palmitate by redistribution of fatty acid translocase in type II pneumocytes. **Biochemistry 41:6369-6375.**

Komiya T. and Mihara K. (1996) Protein import into mammalian mitochondria. **J Biol Chem 271:22105-22110.**

Korsch E., Peter M., Hiort O. et al., (1999) Gonadal histology with testicular carcinoma in situ in a 46,XY female patient with a premature termination in the StAR protein causing congenital lipoid adrenal hyperplasia. **J Clin Endocrinol Metab 84:1628-1632.**

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

Kriwacki R.W., Schultz S.C., Steitz T.A. and Caradonna J.P. (1992) Sequence-specific recognition of DNA by zinc-finger peptides derived from the transcription factor Sp1. **Proc Natl Acad Sci USA 89:9759-9763.**

Kumari G.L., Allag I.S., Das R.P. and Datta J.K. (1980) Regional differences in steroidogenesis and hormone levels in the epididymis and vas deferens of adult rat. **Int J Androl** **3:267-281**.

Lambeth J.D., Kitchen S.E. and Farooqui A.A. (1982) Cytochrome P-450_{scc} substrate interaction. **J Biol Chem** **257:1876-1884**.

Lange R., Larroque C. and Anzenbacher P. (1992) The cholesterol-side-chain-cleaving cytochrome P450 spin-state equilibrium. **Eur J Biochem** **207:69-73**.

Lala D.S., Rice D.A. et al., (1992) steroidogenic factor-1, a key regulator of steroid enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor 1. **Mol Endocrinol** **6:1249-1258**.

Lala D.S., Syka P.M., Lazarchick S.B. et al., (1997) Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols. **Proc Natl Acad Sci USA** **94:4895-4900**.

Legault Y., VandenHeuvel W.J., Arison B.H., et al., (1978) 5 α -Cholesta-7,24-dien-3-beta-ol as a major sterol of the male hamster reproductive tract. **Steroids** **32:649-658**.

Le Goascogne C., Robel P., Gouézou M. et al., (1987) Neurosteroids: cytochrome P-450_{scc} in rat brain. **Science** **237:1212-1215**.

Lepesheva G.I., Azeva T.N., Strushkevich N.V. et al., (2000) Site-directed mutagenesis of cytochrome P450_{scc} (CYP11A1). I. Effects of lysine residue substitution on its structural and functional properties. **Biochemistry (Mosc)** **65:1409-1418**.

Levine A.C., Wang J., Ren M. et al., (1996) Immunohistochemical localization of steroid 5 α -reductase 2 in the human male fetal reproductive tract and adult prostate. **J Clin Endocrinol Metab** **81:384-389**.

Lewis D.F.V. and Lee-Robichaud P. (1998) Molecular modelling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP21 based on the CYP102 crystal structure. **J Steroid Biochem Molec Biol** **66:217-233**.

Lill R. and Neupert W. (1996) Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. **Trends Cell Biol** **6:56-61**.

Lin D., Shi Y.F. and Miller W.L. (1990) Cloning and sequence of the human adrenodoxin reductase gene. **Proc Natl Acad Sci USA** **87:8516-8520**.

Lindenthal B., Aldaghlis T.A. Kelleher J.K. et al., (2001) Neutral sterols of rat epididymis: high concentrations of dehydrocholesterols in rat caput epididymis. **J Lipid Res** **42:1089-1095**.

Majdic G., Young M., Gómez E. et al., (2002) Knockout mice lacking steroidogenic

factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. **Endocrinology** **143:607-614.**

Manna P.R., Dyson M.T., Eubank D.W. et al., (2002) Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family. **Mol Endocrinol** **16:184-199.**

Matocha M.F. and Waterman M.R. (1985) Synthesis and processing of mitochondrial steroid hydroxylases. **J Biol Chem** **260:12259-12265.**

McEnery M.W., Snowman A.M., Trifiletti R.R. and Snyder S.H. (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. **Science (Wash)** **89:3170-3174.**

McMasters K.M., Dickson L.A., Shamy R.V. et al., (1987) Rat cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450_{scc}): use of a cDNA probe to study the hormonal regulation of P450_{scc} mRNA levels in ovarian granulosa cells. **Gene** **57:1-9.**

Mellon S.H. and Deschepper C.F. (1993) Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. **Brain Res** **629:283-292.**

Mellon S.H. (1994) Neurosteroids: biochemistry, modes of action and clinical relevance. **J Clin Endocrinol Metab** **78:1003-1008.**

Meng-Chung H., Nai-Chi H., Noomen B. et al., (2002) Steroid deficiency syndromes in mice with targeted disruption of Cyp11a1. **Mol Endocrinol** **16:1943-1950.**

Mendelson C.R. and Boggaram V. (1991) Hormonal control of the surfactant system in fetal lung. **Annu Rev Physiol** **53:415-440.**

Méndez M.C., Chávez B., Echeverria O. et al., (1999) Evidence for estrogen receptor expression in germ cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. **Cell Tissue Res** **298:145-152.**

Menendez-Pelaez A., Rodriguez-Colunga M.J., Rodriguez C. et al., (1992). Effects of human chorionic gonadotropin and progesterone administration on porphyrin biosynthesis and histology of the Harderian glands in male and female syrian hamsters. **Biol Reprod** **47:307-315.**

Milewich L., Smith S.L. and MacDonald P.C. (1980) Nonrespiratory functions of the human lung: *in vitro* metabolism of tritium-labeled progesterone and pregnenolone. **J Clin Endocrinol Metab** **50:507-515.**

Miller W.L. (1988) Molecular biology of steroid synthesis. **Endocr Rev** **9:295-318.**

Miller W.L. (1998) Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. **Bailliere's Clin Endocr Metab** **12:67-81.**

Miller W.L. (1998) Why nobody has P450_{scc} (20,22 Desmolase) deficiency. **J Clin Endocrinol Metab** 83:1399-1400.

Momoi K., Waterman M.R., Simpson E.R. et al., (1992) 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent transcription of the CYP11A (cholesterol cleavage side-chain cytochrome P450) gene involves a DNA response element containing a putative binding site for transcription factor Sp1. **Mol Endocrinol** 6:1682-1690.

Monté D., DeWitte F. and Hum D.W. (1998) regulation of the human P450_{scc} gene by steroidogenic factor 1 is mediated by CBP/p300. **J Biol Chem** 273:4585-4591.

Moore C.D.C., Hum D.W. and Miller W.L. (1992) Identification of positive and negative placenta-specific basal elements and a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the human gene for P450_{scc}. **Mol Endocrinol** 6:2045-2058.

Morales A., Cuéllar A., Ramírez J. et al., (1999) Synthesis of steroids in pancreas: evidence of cytochrome P-450_{scc} activity. **Pancreas** 19:39-44.

Morohashi K., Fujii K. Y., Okada Y., et al., (1984) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for mRNA of mitochondrial cytochrome P-450 (scc) of bovine adrenal cortex. **Proc Natl Acad Sci USA** 81:4647-4651.

Morohashi K., Sogawa K., Omura T. and Fujii Y. (1987) Gene structure of human P-450(SCC), cholesterol desmolase. **J Biochem** 101:879-887.

Morohashi K. and Omura T. (1996) Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. **FASEB J** 10:1569-1577.

Morohashi K. (1999) Gonadal and extragonadal functions of Ad4BP/SF-1: developmental and aspects. **Trends Endocr Metab** 10:169-173.

Mukhin A. G., Papadopoulos V. Costa E. and Krueger K. E. (1989) Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 86:9813-9816.

Nakae J., Tajima T., Sugawara T. et al., (1997) Analysis of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene in Japanese patients with congenital lipid adrenal hyperplasia. **Hum Mol Genet** 6:571-576.

Nawata H., Yanase T., Oba K et al., (1999) Human Ad4BP/SF-1 and its related nuclear receptor. **J Steroid Biochem Molec Biol** 69:323-328.

Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J. et al. (1993) the P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. **DNA Cell Biol** 12: 1-51.

Ness S.A. and Weiss R.L. (1987) Carboxyl-terminal sequence influence the import of mitochondrial protein precursors in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA** **84:6692-6696**.

Nomura M., Nawata H. and Morohashi K. (1996) Autoregulatory loop in the regulation of mammalian ftz-f1 gene. **J Biol Chem** **271:8243-8249**.

Nomura O., Nakabayashi O. and Mizuno S. (1997) The cDNA cloning and transient expression of a chicken gene encoding cytochrome P-450. **Gene** **185:217-222**.

Ohara O., Dorit R.L. and Gilbert W.G. (1989). One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. **Proc Natl Acad Sci USA** **86:5673-5677**.

Ohba T., Rennert H., Pfeifer s.M. et al., (1993) The structure of the human sterol carrier proteinx/sterol carrier protein 2 gene. **Genomics** **24:370-374**.

Okuyama E., Okazaki T., Furukawa A., et al., (1996) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA clones of sheep and goat adrenocortical cytochromes p450scc (CYP11A1). **J Steroid Biochem Molec Biol** **57(3-4): 179-185**.

Olcese J. and Wesche A. (1989) The Harderian gland. **Comp Biochem Phys** **93:655-665**.

Omura T. and Morohashi K. (1995) Gene regulation of steroidogenesis. **J Steroid Biochem Molec Biol** **53:19-25**.

Oonk R.B., Krasnow J.S., Beattie W.G. and Richards J.S. (1989) Cyclic AMP-dependent and -independent regulation of cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 (P-450scc) in rat ovarian granulosa cells and corpora lutea. **J Biol Chem** **264:21934-21942**.

Oonk R.B., Parker K.L., Gibson J.L. and Richards J.S. (1990) Rat cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (P-450scc) gene. **J Biol Chem** **265:22392-22401**.

Palmer G. and Reedijk J. (1989) Nomenclature committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) nomenclature of the electron-transfer proteins. **Biochem Biophys Acta** **1060:599-611**.

Pang S., Yang X., Wang M. et al., (1992) Inherited congenital adrenal hyperplasia in the rabbit: absent cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 gene expression. **Endocrinology** **131:181-186**.

Papadopoulos V. (1993) Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. **Endocr Rev** **14:222-240**.

Payne A.H. (1990) Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase in Leydig cells. **Biol Reprod** **42:399-404**.

Payne A.P. (1977) Pheromonal effects of Harderian gland homogenates on aggressive behavior in the hamster. **J Endocrinol** 73:191-192.

Payne A.P. (1994) The Harderian gland: a tercentennial review. **J Anat** 185:1-49.

Pelletier G., Li S., Luu T.V. et al., (2001) Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450_{scc}, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450_{c17}) in rat adrenal cortex and gonads. **J Endocrinol** 171:373-383.

Pfeifer S.M., Furth E.E., Ohba T. et al., (1993) Sterol carrier protein 2: a role in steroid hormone synthesis?. **J Steroid Biochem Molec Biol** 47:167-172.

Picado-Leonard J. and Miller W.L. (1988) Homologous sequences in steroidogenic enzymes, steroid receptors and steroid binding protein suggest a consensus steroid-binding sequence. **Mol Endocrinol** 2:1145-1150.

Privalle C.T., Crivello J.F. and Jefcoate C.R. (1983). Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland. **Proc Natl Acad Sci USA** 80:702-706.

Rice D.A., Kirkman M.S., Aitken L.D. et al., (1990) Analysis of the promoter region of the gene encoding mouse cholesterol side-chain cleavage enzyme. **J Biol Chem** 265:11713-11720.

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

Robel P. and Baulieu E.E. (1994) Neurosteroids: biosynthesis and function. **Trends Endocrinol Metab** 5:1-8.

Roberts K.D. (1987) Sterol sulfates in the epididymis: synthesis and possible function in the reproductive process. **J Steroid Biochem** 27:337-341.

Rosner J.M., Macome J.C. and Cardinali D.P. (1969) In vitro biosynthesis of sterols and steroids by rat submaxillary glands. **Endocrinology** 85:1000-1003.

Schatz G. (1979) How mitochondria import proteins from the cytoplasm. **FEBS Lett** 103:203-211.

Schwartz J.R. and Roy S.K. (2000) Developmental expression of cytochrome P450 side-chain cleavage and cytochrome P450 17 α -hydroxylase messenger ribonucleic acid and protein in the neonatal hamster ovary. **Biol Reprod** 63:1586-1593.

Schiff R., Arensburg J., Itin A. et al., (1993) Expression and cellular localization of uterine side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid during early pregnancy in mice **Endocrinology** 133:529-537.

Segresten U., Correa P., Hewison M. et al., (2002) 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase expression in normal and pathological parathyroid glands. **J Clin Endocrinol Metab** 87:2967-2972.

Seyama Y., Kasama T., Yasugi E., et al. (1992) Lipids in Harderian glands and their significance. In: **Harderian Glands: porphyrin, metabolism, behavioral and endocrine effects** (Webb S.M., Hoffman R.A., Puig-Domingo M.L. and Reiter R.J. Eds.) Berlin: Springer-Verlag, pp 195-217.

Seyama Y., Otsuka H., Ohashi K. et al., (1996) Sexual diversity of the lipid metabolism in the Harderian gland of the golden hamster. **Microsc Res Tec** 34:71-76.

Shen W-H, Moore C.C.D., Ikeda I. et al., (1994) Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. **Cell** 77:651-661.

Simmons K. and Ikonen E. (2000) How cells handle cholesterol. **Science** 290:1721-1726.

Simpson E., Lauber M., Demeter M. et al., (1991) Regulation of expression of the genes encoding steroidogenic enzymes. **J Steroid Biochem Molec Biol** 40:45-52.

Slominski A., Ermak G. and Mihm M. (1996) ACTH receptor, CYP11a1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin. **J Clin Endocrinol Metab** 81:2746-2749.

Snyder S.H., Verma A. and Trifiletti R.R. (1987) The peripheral-type benzodiazepine receptor: a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands. **FASEB J** 1:282-288.

Solish S.B., Picado-Leonard J., Morel Y. et al., (1988) Human adrenodoxin reductase: two mRNAs encoded by a single gene on chromosome 17cen \rightarrow q25 are expressed in steroidogenic tissues. **Proc Natl Acad Sci USA** 85:7104-7108.

Spike R.C., Payne A.P. and Moore M.R. (1992) Porphyrins and their possible significance in Harderian glands. In: **Harderian Glands: porphyrin, metabolism, behavioral and endocrine effects**. (Webb S.M., Hoffman R.A., Puig-Domingo M.L. and Reiter R.J., Eds.). Berlin: Springer-Verlag, pp 165-192.

Stocco D.M. and Clark B.J. (1996) Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. **Endocr Rev** 17:221-244.

Stocco D.M. (1997a) A StAR search: Implications in controlling steroidogenesis. **Biol Reprod** 56:328-336.

Stocco D.M. (1997b) The steroidogenic acute regulatory (StAR) protein two years later. **Endocrine** **6:99-109**.

Stocco D.M. (2001) Tracking the role of a StAR in the sky of the new millennium. **Mol Endocrinol** **15:1245-1254**.

Stromstedt M. and Waterman M.R. (1995) Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. **Mol Brain Res** **34:75-88**.

Sugawara T., Holt J.A., Driscoll D. et al (1995) Human steroidogenic acute regulatory protein: Functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. **Proc Natl Acad Sci USA** **92:4778-4782**.

Tajima T., Fujieda K., Kouda N. et al. (2001) Heterozygous mutation in the cholesterol side chain cleavage enzyme (P450scc) gene in a patient with 46,XY sex reversal and adrenal insufficiency. **J Clin Endocrinol Metab** **86:3820-3825**.

Takahashi M., Tanaka M., Sakai N. et al., (1993) Rainbow trout cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (P450scc) cDNA cloning and mRNA expression during oogenesis. **FEBS Lett** **319:45-48**.

Taketo M., Parker K.L., Howard H. et al., (1995) Homologs of *Drosophila* fushi tarazu factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9. **Genomics** **25:565-567**.

Tanaka M., Hennebold J.H. and Adashi E.Y. (1999) Mouse full-length P450scc cDNA sequence. **NCBI: #AF195119**.

Trant J.M., Bernard C. and Byrne B.J. (1998) Isolation and heterologous expression of the cDNA encoding the cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **NCBI #AF063836**.

Tsujita M. and Ichikawa Y. (1993) Substrate-binding region of cytochrome P-450 (CYPX1A1). Identification of primary structure of the cholesterol binding region in cytochrome P-450scc. **Biochim Biophys Acta** **1161:124-130**.

Tuckey R. (1992) Cholesterol side-chain cleavage by mitochondria from the human placenta. **J Steroid Biochem Molec Biol** **42:883-890**.

Tuckey R. and Cameron K.J. (1993) Side-chain specificities of human and bovine cytochromes P450scc. **Eur J Biochem** **217:209-215**.

Usanov S.A., Graham S.E., Lepesheva G.I. et al., (2002) Probing the interaction of bovine cytochrome P450scc (CYP11A1) with adrenodoxin: evaluating site directed mutations by molecular modeling. **Biochemistry** **41:8310-8320**.

Venepally P. and Waterman M.R. (1995) Two Sp1-binding sites mediate cAMP-induced transcription of the bovine CYP11A gene through the protein kinase A signaling pathway. **J Biol Chem** 270:25402-25410.

Verma A., Nye J.S. and Snyder S.H. (1987). Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral type) benzodiazepine receptor. **Proc Natl Acad Sci USA** 84: 2256-2260.

Viger R.S. and Robaire B. (1996) The mRNAs for the steroid 5 α -reductase isozymes, types 1 and 2, are differentially regulated in rat epididymis. **J Androl** 17:27-34.

Vijayakumar S. and Salerno J.C. (1992) Molecular modeling of the 3-D structure of cytochrome P-450_{sc}. **Biochim Biophys Acta** 1160:281-286.

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

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

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

Vilchis F., Chávez B., and Pérez-Palacios G. (1992) The Harderian gland as a target for steroid hormone action: role and characteristics of intracellular receptors. **In: Harderian Glands: porphyrin, metabolism, behavioral and endocrine effects (Webb S.M., Hoffman R.A., Puig-Domingo M.L. and Reiter R. J., Eds.) Berlin: Springer-Verlag pp. 297-316.**

Vilchis F., Enriquez J., Queipo G. et al., (1994) Steroid 5 α -reductase activity in the Harderian glands of male and female Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). **Gen Comp Endocrinol** 96:298-308.

Vilchis F., Damsky R., Heuze Y. et al., (1996) Identification and androgen regulation of a 156-kDa hemeprotein in the Harderian gland of the Syrian hamster. **Gen Comp Endocrinol** 101:297-303.

Vilchis F. (1997) Regulación endócrina de la glándula de Harder en vertebrados. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis, Facultad de Ciencias.

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

Voutilainen R. and Miller W.L. (1986) Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450_{scc} (20,22-desmolase), P450_{c17} (17 α -hydroxylase/17,20-lyase), and P450_{c21} (21-hydroxylase) in the human fetus. **J Clin Endocrinol Metab** **63:1145-1150**.

Vreeburg J.T., Bielska M. and Ooms M. (1976) Maturation and survival of spermatozoa in the epididymis of pregnenolone treated hypophysectomized rats. **Endocrinology** **99:824-830**.

Watzka M., Bidlingmaier F., Schramm J. et al., (1999) Sex- and age-specific differences in human brain CYP11A1 mRNA. **J Neuroendocrinol** **11:901-905**.

Wehrenberg U., Ivell R., Jansen M. et al., (1994) Two orphan receptors binding to a common site are involved in the regulation of the oxytocin gene in the bovine ovary. **Proc Natl Acad Sci USA** **91:1440-1444**.

White R.E. and Coon M.J. (1982) Heme ligand replacement reactions of cytochrome P-450. **J Biol Chem** **257:3073-3083**.

Whitefield G.K., Jurutka P.W., Haussler G.A. and Haussler M.R. (1999) Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. **J Cell Biochem Suppl** **32/33: 110-122**.

Yang X., Iwamoto K., Wang M. et al., (1993) Inherited congenital adrenal hyperplasia in the rabbit is caused by a deletion in the gene encoding cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme. **Endocrinology** **132:1977-1982**.

Yeh J.R., Huang C., Wu D.A. et al., (1995) Regulation of ferredoxin gene in steroidogenic and nonsteroidogenic cells. **J Steroid Biochem Molec Biol** **53:47-51**.

Young M.J., Clyne C.D., Cole T.J. and Funder J.W. (2001) Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. **J Clin Endocrinol Metab** **86:5121-5126**.

Zhang P., Rodriguez H. and Mellon S.H. (1995) Transcriptional regulation of P450_{scc} gene expression in neural and steroidogenic cells: implications for regulation of neurosteroidogenesis. **Mol Endocrinol** **9:1571-1582**.

PUBLICACION

Vilchis F., Chávez B., Larrea F., Timossi C., and Montiel F. (2002) The cDNA Cloning and Tissue Expression of the Cytochrome P450scc from Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*). **General and Comparative Endocrinology 126:279-286.**



ACADEMIC
PRESS

General and Comparative Endocrinology 126 (2002) 279–286

GENERAL AND COMPARATIVE
ENDOCRINOLOGY

www.academicpress.com

The cDNA cloning and tissue expression of the cytochrome P450scc from Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*)

F. Vilchis,^{a,*} B. Chávez,^a F. Larrea,^a C. Timossi,^b and F. Montiel^c

^a Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga, No. 15, México DF 14000, Mexico

^b UIM Reproductive Medicine, IMSS, México DF, Mexico

^c Department of Biology, Facultad de Química UNAM, México DF, Mexico

Accepted 31 January 2002

Abstract

In this study we report the cloning and sequencing of a cDNA for cholesterol side chain cleavage cytochrome P450scc from Syrian hamster adrenal glands. Isolation of P450scc mRNA was carried out with degenerate primer PCR together with 5' and 3' RACE protocol. The full-length cDNA comprises an open reading frame of 1563 bp encoding a polypeptide of 520 amino acid residues. The predicted protein sequence exhibits well-preserved heme- and steroid-binding domains and shares 89% amino acid sequence identity with rat and mouse enzymes. Transient transfection of HEK-293 cells with the cloned cDNA leads to the formation of pregnenolone from 25-hydroxycholesterol. Northern blot analysis showed expression of mRNAs for P450scc in the major steroidogenic tissues, namely, the adrenal cortex, testis, and ovary. In addition, tissue distribution analysis using the coupled reaction of RT-PCR and Southern blotting revealed that the mRNA of the enzyme is also expressed in various nonendocrine tissues, including the epididymis, Harderian gland, and lungs. The relative abundance of specific transcripts at these novel sites suggests that P450scc could potentially play an important role in regulating local steroid hormone synthesis. © 2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: CYP11A1; Adrenal cortex; Heme; Epididymis; Pregnenolone

1. Introduction

The biosynthesis of steroid hormones in animal tissues involves the participation of at least five distinct forms of cytochrome P450 and two hydroxysteroid dehydrogenases. In all the steroidogenic pathways the initial and rate-limiting step is the cleavage of the side chain from cholesterol to yield pregnenolone, a reaction catalyzed by cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 (P450scc), the product of the *CYP11A1* gene (Nelson et al., 1993; Omura and Morohashi, 1995). This enzyme is part of an electron transport system located on the matrix side of the inner mitochondrial membrane, which includes an NADPH-dependent ferredoxin reductase, an iron-sulfur protein ferredoxin, and the

P450scc (Chung et al., 1997). In most species, pregnenolone is the metabolic precursor from which all of the steroid hormones are synthesized, the gonads and adrenals being the main steroidogenic organs (Burstein and Gut, 1971; Hanukoglu, 1992; Miller, 1988). Over the last few years several reports indicate that P450scc is present not only in gonads, the placenta, or adrenals but also in other tissues that are not generally considered steroidogenic. Thus, P450scc expression has been detected in different cell types of skin (Keeney et al., 1995; Slominski et al., 1996), the peripheral nervous system and the white matter cells of the brain (Iwahashi et al., 1990; Le Goascogne et al., 1987; Stromstedt and Waterman, 1995; Zhang et al., 1995), the hindgut (Keeney et al., 1995), and the pancreas, among others (Morales et al., 1999). More recently unpublished experimental observations from our laboratory have led us to consider alternate sites for steroid production in hamsters. Such was the case of the Harderian gland, a

* Corresponding author. Fax: +525-655-9859.

E-mail address: vilchisuf@prodigy.net.mx (F. Vilchis).

lipid-rich intraorbital structure whose porphyrinogenic activity has been shown to be highly influenced by trophic hormones and other hormonal stimuli (Buzzell et al., 1995; Payne, 1994; Sakai, 1981; Vilchis et al., 1992). As an initial step in the study of the specific expression of steroidogenic enzymes, we isolated the cDNA for P450scc and examined its mRNA levels in various tissues. The data presented here suggest the presence of this cytochrome in various nonsteroidogenic organs of the Syrian hamster, including the Harderian gland and epididymis.

2. Materials and methods

2.1. Extraction of RNA

Adult golden hamsters were housed under lighting conditions of 14 h light:10 h dark and given free access to food and water. The animals were decapitated and tissues were immediately excised, quick frozen on dry ice, and stored at -80°C until assayed. Total cellular RNA was extracted with TRIzol reagent (Life Technologies, Grand Island, NY) and polyadenylated (poly(A)⁺) RNA was isolated using the FastTrack mRNA isolation kit from Invitrogen (Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. When required, poly(A)⁺ RNA from hamster adrenal glands was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) with the SuperScript preamplification system (Life Technologies) as described elsewhere (Méndez et al., 1999).

2.2. Isolation of hamster P450scc cDNA

Two sets of degenerate oligonucleotides designed from the sequences already reported for P450scc of bovine (Morohashi et al., 1984), rat P450scc (Oonk et al., 1990), and human P450scc (Chung et al., 1986) were used to PCR amplify adrenal gland cDNAs, thus obtaining specific PCR fragments of the hamster enzyme. The PCR products were resolved on agarose gels, eluted, and purified through Centricon-30 columns (Amicon, Beverly, MA) for sequencing analysis. The sequences of these hamster P450scc fragments were aligned with that of rat P450scc and shown to have a highly preserved nucleotidic sequence which confirmed their authenticity. Gene-specific PCR primers derived from these sequences were used in experiments to ascertain the 5'- and 3'-end regions, using the method of rapid amplification of the cDNA ends (5', 3' RACE).

The PCR reactions to generate both the 5' and 3' cDNA fragments were carried out with the Marathon cDNA Amplification kit of Clontech (Palo Alto, CA) following its protocol and using gene-specific primers; CYP11 (CTGGAAATTCTGCATGTGATGGTAATG,

for 5'-RACE) and H95 (AACCTCATCCTGATGCC TGAGAAG, for 3'-RACE) and the adaptor primers included in the kit. Subsequently the full-length cDNA for P450scc was amplified by PCR using the eLONGase enzyme mix (Life Technologies) and a pair of oligonucleotides derived from the 5'- and 3'-RACE fragments. The sequences of forward and reverse primers used were 5'-CTGGAGGTTAAGGG-TAGAGACAGGC-3' and 5'-TTCTGGAGATACAGAGACACCCACC-3'. After 30 cycles of amplification (denaturing at 94°C for 45 s; annealing at 54°C for 45 s; extension at 72°C for 90 s) with a final extension step of 7 min, the expected PCR products (1700 bp) were inserted in the TA cloning vector pcDNA3.1 from Invitrogen using the GFP fusion TOPO cloning kit according to the suppliers' recommendations. The ligated products were transformed into competent cells, single colonies were picked, and plasmid DNA was amplified. The plasmid DNA was subjected to restriction analysis with *EcoRV* and *XbaI* and applied on 1.5% agarose gels to verify orientation of the cDNA inserts. At least three clones (pCYP11A1Ma) were sequenced in both directions to determine the sequence of hamster P450scc.

2.3. Sequence analysis

The nucleotide sequences of the P450scc PCR products and clones were determined through direct sequencing using the Thermosequenase ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ddNTP}$) terminator cycle sequencing kit (Amersham Life Sciences, Cleveland, OH), as described previously (Chávez et al., 2000).

2.4. Transfection assays

Human embryonic kidney cells (HEK-293) were maintained in DMEM supplemented with 5% FCS and $5\mu\text{g/ml}$ of geneticin at 37°C in a 5% CO_2 incubator. Cells were grown to 80% of confluence in 75-cm^2 flasks and then scraped and plated at an initial density of 2×10^5 cells/well in six-well cell culture dishes for 24 h. HEK cells were then washed with OptiMEM and transiently transfected with a total of $2.4\mu\text{g}$ of DNA (pCYP11A1Ma)/dish using $5.6\mu\text{l}$ of lipofectamine (Life Technologies, Gaithersburg, MD) and $800\mu\text{l}$ of OptiMEM per well (in triplicate). After 5 h of incubation, $800\mu\text{l}$ of DMEM-5% FCS was added to each well to stop the reaction. Transfected cells were cultured for 24 or 48 h in the absence or the presence of $25\mu\text{M}$ 25-hydroxycholesterol (5-cholestene-3 β -25-diol) before harvesting for steroid quantification. Concentration of pregnenolone (5-pregnen-3 β -ol-20-one) in the culture supernatants was determined by liquid-phase radioimmunoassay (Morales et al., 1999). A β -galactosidase histochemical staining assay was included as an efficiency control in each transfection study. Transfection

efficiencies by these procedures were determined to be 80–90% with the pCMV sport- β -gal cDNA (Life Technologies).

2.5. RT-PCR analysis

To study the expression levels, the RNA isolated from different hamster tissues was reverse transcribed and subsequently PCR amplified to generate a partial P450scc cDNA. Reactions were carried out basically as described before, using the sense and antisense primers 5'-GAGTCCCAGCAGTTCATCGATGCC-3' and 5'-TTCTGGAGATACAGAGACACCCACC-3', respectively. A set of oligonucleotides for cyclophilin (Díaz et al., 2000), which yielded a 453-bp RT-PCR product, was used in parallel reactions to monitor the amount of mRNA transcribed and amplified.

2.6. Northern and Southern blot analyses

For Northern blots, 20 μ g of total cellular RNA (obtained from the ovary, testis, liver, lung, Harderian glands) or 100 ng of poly(A)⁺ RNA from the adrenal glands was size fractionated on 1.2% agarose gels, containing 6.0% formaldehyde. After electrophoresis, RNA was transferred into Hybond N⁺ nylon membranes (Amersham, UK) by capillary diffusion and fixed by UV cross-linking. Filters were prehybridized for 2 h at 65 °C in a Rapid-hyb buffer solution (Amersham, UK) and further hybridized for 6 h at 65 °C.

A 550-bp PCR fragment amplified from pCY-P11A1Ma was labeled with [³²P]dCTP by random primer and used as a radioactive probe in Northern and Southern blot assays. For Southern blots, 5- μ l aliquots of RT-PCR products (of different hamster tissues) were separated by electrophoresis on 1% agarose gels, transferred to nylon membranes, and hybridized under conditions similar to those described previously (Morales et al., 1999).

3. Results

To isolate the hamster P450scc cDNA sequence 5' and 3' RACE were performed on adaptor-ligated adrenal gland cDNA. The nucleotide sequence of the isolated full-length cDNA is 1822 bp in length, containing a short 5'-untranslated region of 42 bp, an open reading frame of 1560 bp with an ATG start site and a TAG termination signal, and a longer 3'-untranslated region of 220 bp. The AATAAA motif is found at position 1797. This encodes a protein of 520 amino acids with an estimated molecular weight (MW) of 60270. The cDNA and derived amino acid sequences for Syrian hamster P450scc are shown in Fig. 1. The sequence (AGTATGCTG) surrounding the first methionine codon

(ATG) essentially conforms to the Kozak site (A/GccATGGat) (Kozak, 1991). Comparison of the deduced amino acid sequence with that of other rodents (Fig. 2) showed that hamster P450scc shares an 89.1% identity with the mouse enzyme and an 89.7% identity with the rat enzyme. Likewise, the predicted protein sequence contains two cysteine residues and two characteristic motifs found in some steroidogenic P450s (including P450scc), namely, a heme-binding site and a steroid-binding site; both regions appear highly conserved among these three species (Fig. 2). The amino acid length, base pair number, percentage of homology, and cysteine position of the hamster P450scc are shown for comparative purposes in Table 1. Northern blot analysis of P450scc revealed a major transcript of approximately 1.8 kb in length, which was present at different levels, depending on the RNA preparations. Thus, samples of poly(A)⁺ RNA exhibited a single transcript, whereas those of total cellular RNA showed an intense hybridization signal at about 1.8 kb and a much weaker signal at about 3.4 kb (Fig. 3). The RNA length coincided with that predicted from cDNA sequencing. By Northern blot, specific hybridization signals were practically undetectable in other tissues examined (Fig. 3). Nevertheless, the tissue distribution of the P450scc mRNA was further assessed by using RT-PCR assays in combination with Southern hybridization. As illustrated in Fig. 4, we detected the predicted 972-bp cDNA product of the P450scc gene in various tissues, namely, adrenal, ovary, testis, lung, Harderian gland, and epididymis (Fig. 4). Likewise, no amplification product was detected from cerebellum, brain, kidney, or hepatic tissue even when the PCR products were hybridized with a ³²P-labeled specific probe (Fig. 4B). To determine whether the cloned cDNA was indeed functional, we examined its catalytic ability through transfection assays. As can be seen in Fig. 5, embryonic kidney cells transfected with the pCYP11A1Ma vector were able to transform 25-hydroxycholesterol into pregnenolone, thus reflecting functional enzymatic activity. In addition, pregnenolone formation was found to be proportional to time of incubation. These data were interpreted as demonstrating that cloned cDNA contains an open reading frame encoding P450scc.

4. Discussion

In this report we describe the cloning and expression of a cDNA encoding an enzyme possessing cholesterol side chain cleavage activity. The hamster enzyme shares high amino acid identity with the P450scc of other vertebrates and contains the structural domains, typical of the cytochrome P450 superfamily. The predicted amino acid sequence of this protein indicates the presence of

-42 agagacagggcgtcagtaagaagtgcacagctgtggggacagt

```

ATG CTG GCC AAA GGA CTT TCC TTG CGC TCA GTG CTG GCC AAA GGC TGC CAA CCT TTC TTG 60
Met Leu Ala Lys Gly Leu Ser Leu Arg Ser Val Leu Ala Lys Gly Cys Gln Pro Phe Leu 20
AGC CCT ACC TGG CAG AGT TCA GTG CTG GCT ACT GGA GGG GGA GCT AAT ATC TCT ACC AAT 120
Ser Pro Thr Trp Gln Ser Ser Val Leu Ala Thr Gly Gly Gly Ala Asn Ile Ser Thr Asn 40
AGC CCT CGT CCC TTC AAT GAG ATT CCT TCC CCC GGT GAC AAT GGT TGG CTA AAC CTG TAC 180
Ser Pro Arg Pro Phe Asn Glu Ile Pro Ser Pro Gly Asp Asn Gly Trp Leu Asn Leu Tyr 60
CAC TTC TGG AGG GAG AAT GGC ACA CAC AGA ATC CAT TAC CAT CAC ATG CAG AAT TTC CAG 240
His Phe Trp Arg Glu Asn Gly Thr His Arg Ile His Tyr His His Met Gln Asn Phe Gln 80
AAG TAT GGC CCC ATT TAC AGG GAG AAG CTT GGC AAT AAG GAT TCT GTT TAT AAT CTG GAC 300
Lys Tyr Gly Pro Ile Tyr Arg Glu Lys Leu Gly Asn Lys Asp Ser Val Tyr Ile Leu Asp 100
CCT GAA GAT GCA GCA CAG CTC TTT TTA AGC GAA GGT CCC TAC CCA GAA CGA TAT CTT GTG 360
Pro Gln Asp Ala Ala Gln Leu Phe Leu Ser Glu Gly Pro Tyr Pro Glu Arg Tyr Leu Val 120
CCC CCC TGG GTC GCC TAT CAC CAG TAT TAC AAG AGA CCC ATA GGG GTC CTG TTT AAG AGT 420
Pro Pro Trp Val Ala Tyr His Gln Tyr Tyr Lys Arg Pro Ile Gly Val Leu Phe Lys Ser 140
TCA GAA GCT TGG AAG AAA GAT AGA CTT GTC CTA AAC CAG GAA GTG ATG GCA CCT GAA GCC 480
Ser Glu Ala Trp Lys Lys Asp Arg Leu Val Leu Asn Gln Glu Val Met Ala Pro Glu Ala 160
ATC AAG AAC TTC GTG CCC CTG CTG GAA GGT GTA GGT CAG GAC TTC ATC AAC GTC TTG CAC 540
Ile Lys Asn Phe Val Pro Leu Leu Gly Val Val Glu Asp Phe Ile Asn Val Leu His 180
AGA CGC ATC AAG CAG CAG AAG TCT GGA AAT TTC TCA GGG GAC ATC AGC GAT GAC CTG TTC 600
Arg Arg Ile Lys Gln Gln Lys Ser Gly Asn Phe Ser Gly Asp Ile Ser Asp Asp Leu Phe 200
CGC TTT GCC TTT GAG TCC ATC ACC AGT GGT GTA TTT GGG GAG CGC CTG GGG ATG TTG GAG 660
Arg Phe Ala Phe Glu Ser Ile Thr Ser Val Val Phe Gly Glu Arg Leu Gly Met Leu Glu 220
GAG ATT GTG GAC CCT GAG TGC CAG CGG TTC ATC GAT GCC ATC TAC CAG ATG TTC CAC ACC 720
Glu Ile Val Asp Pro Glu Ser Gln Arg Phe Ile Asp Ala Ile Tyr Gln Met Phe His Thr 240
AGT GTC CCC ATG CTC AAC CTG CCT CCA GAA CTT TTT CGA TTC TTC AGA ACT AAG ACC TGG 780
Ser Val Pro Met Leu Asn Leu Pro Pro Glu Leu Phe Arg Phe Phe Arg Thr Lys Thr Trp 260
AAG GAG CAT GCA GCT GCC TGG GAT ATG AAT TTC AAA AAA GCT GAT GAT TAT ACA CAG ACC 840
Lys Glu His Ala Ala Ala Trp Asp Met Ile Phe Lys Lys Ala Asp Asp Tyr Thr Gln Thr 280
TTC TAC TGG GAC TTA AGA CAG AAG CAA GAG TTC AGC AAG TAC CCT GGT GTC CTT TAC AGC 900
Phe Tyr Trp Asp Leu Arg Gln Lys Gln Glu Phe Ser Lys Tyr Pro Gly Val Leu Tyr Ser 300
CTC CTG GGT GGC AAC AAG CTG CCC TTC AAG AAC ATC CAG GCC AAC ATT ACG GAG ATG CTG 960
Leu Leu Gly Gly Asn Lys Leu Pro Phe Lys Asn Ile Gln Ala Asn Ile Thr Glu Met Leu 320
GCA GGA GGC GTA GAC ACG ACC TCC ATG ACC CTG CAG TGG AGC CTT TAT GAG ATG GCA CAC 1020
Ala Gly Gly Val Asp Thr Thr Ser Met Thr Leu Gln Trp Ser Leu Tyr Glu Met Ala His 340
AAC TTG AAG GTA CAG GAG ATG CTG CGG GCA GAG GTT CTG GCT GCC CGG CGT CAG GCC CAG 1080
Asn Leu Lys Val Gln Glu Met Leu Arg Ala Glu Val Leu Ala Ala Arg Arg Gln Ala Gln 360
GGA GAC ATG GTC AAG ATG GTG CAG TTG GTC CCA CTC CTA AAA GCC AGC ATC AAG GAG ACA 1140
Gly Asp Met Val Lys Met Val Gln Leu Val Pro Leu Leu Lys Ala Ser Ile Lys Glu Thr 380
CTG AGA CTC CAC CCC ATC TCT GTG ACC GTA CAG AGG TAT CTT GTG GAT GAC CTG GTA CTT 1200
Leu Arg Leu His Pro Ile Ser Val Thr Val Gln Arg Tyr Leu Val Asp Asp Leu Val Leu 400
CGA AAT TAC AGG AAT CCT GCC AAG ATG TTG GTG CAG GTG GCT AAC TAT GCC ATG GGC CGA 1260
Arg Asn Tyr Arg Ile Pro Ala Lys Met Leu Val Gln Val Ala Asn Tyr Ala Met Gly Arg 420
GAA CCC ASC TTC TTC CCC AAC CCA AAC AAG TTT GAC CCA ACT CGT TGG CTG GAA AAA AGC 1320
Glu Pro Ser Phe Phe Pro Asn Pro Asn Lys Phe Asp Pro Thr Arg Trp Leu Glu Lys Ser 440
AAA AAT ACC ACC CAC TTC CGT TAC TTG AGC TTT GGC TGG GGT GTT CGT CAG TGT CTG GGC 1380
Lys Asn Thr Thr His Phe Arg Tyr Leu Ser Phe Gly Trp Gly Val Arg Gln Cys Leu Gly 460
CGG CGG ATT GCA GAG CTG GAG ATG ACC ATC TTC CTC ATC AAT GTG CTG GAG AAC TTT AGA 1440
Arg Arg Ile Ala Gln Leu Glu Met Thr Ile Phe Leu Ile Asn Val Leu Glu Asn Phe Arg 480
ATT GAA CTC CAA AGT CTC CAT GAT GTG GGG ACC AAG TTC AAC CTC ATC CTG ATG CCT CAG 1500
Ile Glu Leu Gln Ser Leu His Asp Val Gly Thr Lys Phe Asn Leu Ile Leu Met Pro Glu 500
AAG CCC ATC CTC TTC AAC CTC CAG CCT CTC AAG AAG GAC CTT GGG ACA ACC ACG AAC AGA 1560
Lys Pro Ile Leu Phe Asn Leu Gln Pro Leu Lys Lys Asp Leu Gly Thr Thr Thr Asn Arg 520
TAG ggtggcactgtctgaacttcagactggagtcacatggggagatggcccagtggggcccatttgggtgggtgtctct
gtatcccgaaacactgctcctttggggtggttttagctctcagtgcccaactgcttaggttagccaggccctcct
ctccttctctctctccttttacttaccctgaaggttaataaacacatgaactctgaaaaaa...

```

Fig. 1. Nucleotide and predicted amino acid sequences of the hamster cholesterol side chain cleavage P450 cDNA. Position +1 is assigned to the first nucleotide of the putative initiator codon. Numbering of the nucleotides (above) and the amino acid (underneath) is shown. The AATAAA polyadenylation signal is underlined. This sequence appears in the NCBI gene data bank with Accession No. AF323965.

two stretches located toward the carboxyl-terminal region (residues 370–386 and 451–471) which are thought to function as the binding sites for the steroid and heme groups, respectively (Morohashi et al., 1984; Picado-Leonard and Miller, 1988). Both domains appear to be

well conserved among the different species; in hamsters, mice, and rats, for example, they present 100% sequence homology. Likewise, the consensus steroid-binding site of hamster shows 100% homology with a similar tract from bovine (Morohashi et al., 1984), human (Chung

Hamster	MLAKGLSLRSVLAKGCQPFLLSPTWQSSVLATGGGANI-STNSPRPFNEIPSPGDNGWLNLYHFWR
Mouse	MLAKGLSLRSVLVKGCQPFLLSPTWQGPVLSTGKAG-TSTSSPRSFNEIPSPGDNGWLNLYHFWR
Rat	MLAKGLCLRSVLVKSCQPFLLSPTWQGPGLATGNGAGISSTNSPRSFNEIPSPGDNGWINLYHFWR
Hamster	ENGTHRIHYHHMQNFQKYGPPIYREKLGKNDKSVYILDPEAAQLFLSEGPYPERYLVPVWVAYHQY
Mouse	ESGTQKIHYHQMSFQKYGPPIYREKLGLESVYIVDPKASILFSCGPNPERFLVPVWVAYHQY
Rat	ENGTHRIHYHHMQNFQKYGPPIYREKLGKNDKSVYILDPEAAQLFLSEGPYPERYLVPVWVAYHQY
Hamster	YKRPIGVLFKSSSEAWKKDRILVNLQEVMAPEAIKKNFVPLLEGVVDFFINVLHRRRIKQKSGNFSGD
Mouse	YQRPIGVLFKSSDAWKDRIVNLQEVMAFGAIKKNFVPLLEGVAQDFIKVLHRRRIKQKSGNFSGV
Rat	YQRPIGVLFKSSDAWRKDRIVNLQEVMAFDSIKKNFVPLLEGVAQDFIKVLHRRRIKQKSGKFSGD
Hamster	ISDDLFRFAFESITTSVVFGERLGMLEIIVDPESQRFIDAIYQMFHTSVPMNLNPPPELFRFRTRKT
Mouse	ISDDLFRFESISVIFGERMGMLEIIVDPEAQRFINAVYQMFHTSVPMNLNPPDFRLLRTRKT
Rat	ISDDLFRFAFESITTSVVFGERLGMLEIIVDPESQRFIDAVYQMFHTSVPMNLNMPDLFRFRTRKT
Hamster	WKEHAAAWDMIFKKADDTYTFYWDLRQKQEFKYPGVLYSLLGGNKLFPKNIQANITEMLAGGV
Mouse	WKDHAAAWDVIFNKADEYTNFYWDLRQKQDFSKYPGVLYSLLGGNKLFPKNIQANITEMLAGGV
Rat	WKDHAAAWDVIFSKADEYTNFYWDLRQKQDFSKYPGVLYSLLGGNKLFPKNIQANITEMLAGGV
Hamster	DFTSMTLQWLSLYEMAHNLKVOEMLRAEVLAARRQAQGDMAKVMVQIVPLLKASIKETLRLHPISVT
Mouse	DFTSMTLQWNLVYEMAHNLKVOEMLRAEVLAARRQAQGDMAKVMVQIVPLLKASIKETLRLHPISVT
Rat	DFTSMTLQWNLVYEMAHNLKVOEMLRAEVLAARRQAQGDMAKVMVQIVPLLKASIKETLRLHPISVT
Hamster	VQRYLVDDLVLNRNYRIPAKMLVQVANYAMGREPSFFPNPKFDPTRWLEKSNQNTTTHFRYLSFGWG
Mouse	LQRYTVNDLVLNRNYKIPAKTLVQVASFAMGRDPGFFPNPKFDPTRWLEKSNQNTTTHFRYLSFGWG
Rat	LQRYIVNDLVLNRNYKIPAKTLVQVASYAMGRESFFPNPKFDPTRWLEKSNQNTTTHFRYLSFGWG
Hamster	<u>VQCLGRRLAELEMTIFLINVLENFRIEQLSLHDVGTKEFNLLMPEKPILENLQPLKDLGTTN</u>
Mouse	<u>VQCLGRRLAELEMTIFLLINLLENFRIEVQNLRDVGTKEFNLLMPEKPILENLQPLKDLGPAVT</u>
Rat	<u>VQCLGRRLAELEMTIFLINVLENFRIEVQSLRDVGTKEFNLLMPEKPILENLQPLKDLGSTMP</u>
Mouse	RKDNTVN
Rat	RKGDTV

Fig. 2. Amino acid sequence comparison of hamster cytochrome P450_{scc} to the mouse and rat enzyme. Residues conserved among species (bold) are indicated with the proposed sites for steroid (boxed)- and heme-binding domains (underlined).

Table 1
Characteristics of the P450_{scc} from rodents and human

	Base pairs	Amino acids	Identity (%)	Cys number
Hamster	1560	520	100	2 (16, 458)
Human	1566	522	80.2	1 (462)
Rat	1581	527	89.7	4 (7, 16, 111, 459)
Mouse	1581	527	89.1	3 (16, 110, 458)

et al., 1986), and porcine P450_{scc} (Mulheron et al., 1989) and more than 64% homology with the P450_{scc} from chicken (Nomura et al., 1997) and rainbow trout (Takahashi et al., 1993).

A number of reports have indicated that the majority of nuclear-encoded mitochondrial proteins are synthesized as large precursors with cleavable amino-terminal presequences. Extrapeptides of mitochondrial matrix/inner membrane proteins are extremely variable in both length and amino acid sequence (Hurt and van Loon, 1986; Lill and Neupert, 1996). Thus, in bovine, the precursor of P450_{scc} has been found to consist of 520 amino acids, with a mitochondrial targeting sequence of 39 residues (Morohashi et al., 1984). In hamster, the

corresponding NH₂-terminal extrapeptide shows a moderate sequence homology (40%) with that of bovine. However, this putative presequence contains several basic and hydroxylated amino acids whose preponderance is characteristic of mitochondrial targeting sequences from imported proteins (Lill and Neupert, 1996; von Heijne, 1986). The presence of positively charged (2 Lys, 1 Arg) and hydroxylated (6 Ser, 2 Thr) residues, together with the lack of acidic amino acids or extended hydrophobic stretches within the first 40 residues of the hamster P450_{scc}, conforms to the general rule for the presequence (Hurt and van Loon, 1986; von Heijne, 1986).

As occurs in other cytochromes P450_{scc} already known, the hamster enzyme contains two cysteine residues, one of which is within the predicted heme-binding site (Cys₄₅₈), which is likely the fifth ligand of the heme, as has previously been suggested (Morohashi et al., 1984). The heme-binding domain of hamster P450_{scc} also showed 90% homology (on average) with that of the other species referred to above.

As mentioned before, the cleavage of cholesterol side chain to yield pregnenolone involves the participation of

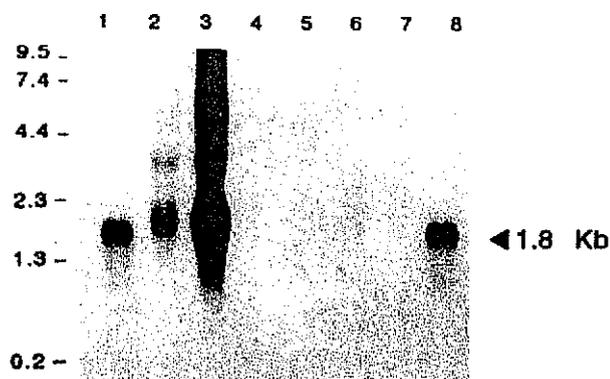


Fig. 3. Northern blot of P450scc RNA from adult hamster tissues. Aliquots of poly(A)⁺ RNA (approximately 120 ng) from adrenal gland (lanes 1 and 8) or total cellular RNA (20 µg/lane) prepared from testis (lane 2), ovary (lane 3), lung (lane 4), liver (lane 5), male Harderian gland (lane 6), and female Harderian gland (lane 7) were transferred to nylon filters and hybridized at 65 °C for 4 h with a ³²P-labeled P450scc probe. The filter was exposed to X-ray films for 2 h at -70 °C. Size markers are a 0.24- to 9.5-kb RNA ladder.

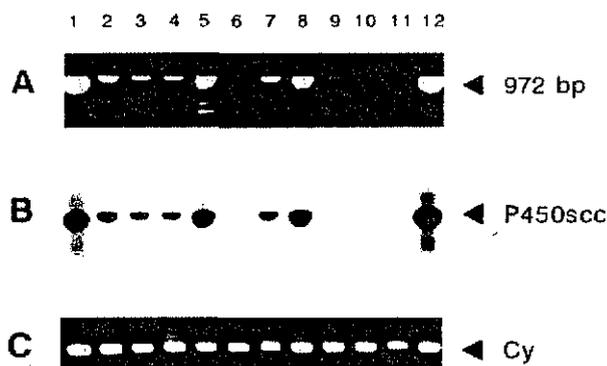


Fig. 4. RT-PCR analysis of P450scc expression in adult hamster tissues. RNA was transcribed into cDNA and subjected to PCR amplification. RNAs were prepared from adrenal gland (lanes 1 and 12), male Harderian gland (lane 2), female Harderian gland (lane 3), lung (lane 4), testis (lane 5), cerebral cortex (lane 6), ovary (lane 7), epididymis (lane 8), liver (lane 9), cerebellum (lane 10), and kidney (lane 11). The PCR products (972 bp) were visualized by ethidium bromide stain (A) or by Southern hybridization with a ³²P-labeled P450scc probe (B). A control PCR was performed with all cDNAs, using a set of primers for cyclophilin which yields a 450-bp RT-PCR product (C).

an electron transport system constituted of ferredoxin, ferredoxin reductase, and P450scc. In turn, the expression of this enzymatic complex is considered a distinctive feature of primary steroidogenic organs (Miller, 1988). More recent evidence from site-directed mutagenesis indicates that certain basic residues of the C-terminal region are critical for proper enzyme activity. The results from those studies demonstrated that residues Lys₄₀₅, Arg₄₂₅, and Arg₄₂₆ are involved not only in the formation of a heme-binding center but also in the electrostatic interaction of cytochrome P450scc with its physiological partner, ferredoxin (Azeva et al., 2001).

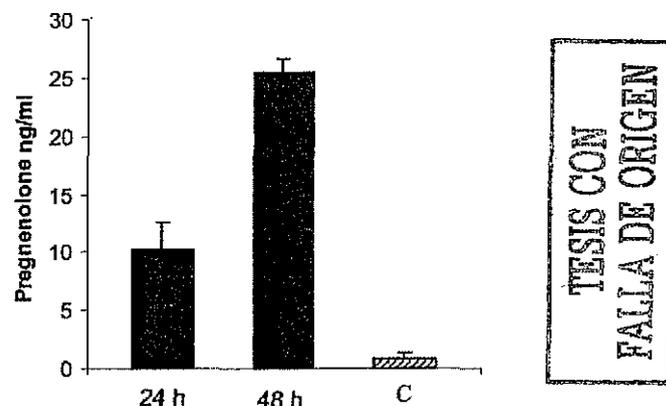


Fig. 5. Formation of pregnenolone from 25-hydroxycholesterol in HEK-293 cells. Cultured cells were transfected with the pCYP11A1Ma vector and maintained at 37 °C for different time periods in the presence (24–48 h) or the absence (C) of 25 µM 25-hydroxycholesterol substrate. Each bar represents mean values ± SD. For details see the text.

During the last few years data from molecular and immunohistochemical studies have shown the presence of P450scc in various sites other than the major sources of steroid hormones. Thus far, the expression of the *CYP11A1* gene is well documented in tissues such as the pancreas, submandibular gland, stomach, normal and pathological human skin, gut, and certain areas of the brain, where the finding of gene-specific transcripts has been related to steroidogenic activity (Le Goascogne et al., 1987; Morales et al., 1999; Slominski et al., 1996; Zhang et al., 1995).

In the present study, Northern blot analysis of RNA preparations from different tissues of male and female hamsters with a P450scc DNA probe showed positive hybridization in RNA samples of endocrine glands with little or no detectable hybridization signal in other tissues, including brain cortex. The *CYP11A1* mRNA was easily detected in both adrenals and gonads, as expected. These results are in agreement with recent molecular studies aimed at determining the temporal expression of P450scc in the developing hamster ovary (Schwartz and Roy, 2000). Using the sensitive RT-PCR assay, gene transcripts were also found in Harderian gland, epididymis, and lung in addition to the adrenal, testis, and ovary. Likewise, the RT-PCR of RNA followed by Southern hybridization confirmed the presence of the predicted 972-bp fragment of P450scc in these tissues. Under the same conditions the transcript was not detected in the kidney, liver, cerebellum, or brain cortex. Unlike previous reports, where P450scc and its mRNA have been demonstrated in the brain and peripheral nervous system of rodents (Le Goascogne et al., 1987; Stromstedt and Waterman, 1995), we observed no gene expression in the hamster brain. This discrepancy may be explained by the brain area we used for RNA

isolation. As is known, CYP11A1 expresses preferentially in oligodendrocytes of myelinated regions of the brain, olfactory lobes, and hypothalamus. At these sites, the expression of the enzyme results in the *de novo* synthesis of neurosteroids which have been shown to be active at GABA_A receptors and have profound effects on behavior and memory (Hu et al., 1987; Iwahashi et al., 1990; Zhang et al., 1995). Because of the relatively low expression levels of CYP11A1 at neural cells, additional molecular and immunohistochemical studies have to be carried out in order to clarify whether hamster brain contains P450 activity. Although we have no direct evidence to show functional enzymatic expression in the lungs, epididymis, or Harderian glands, our results regarding the abundance of P450scc transcripts at these peripheral organs strongly suggest that they may achieve local steroidogenic activity. In support of this view, it has been reported that pregnenolone or its metabolic derivatives elicit physiological effects on these peripheral organs (Dalla et al., 1992; Mooradian et al., 1987; Vilchis et al., 1992). In this regard, there are experimental data suggesting a stimulatory role of 11-ketopregnenolone, pregnenolone, and other 5 β -pregnanes on mammalian erythropoiesis, most probably mediated throughout the induction of σ -aminolevulinic acid synthetase (ALA-S), the rate-limiting enzyme in the porphyrin biosynthetic pathway (Gordon et al., 1970). As is known, the Harderian glands of hamster yield and store large amounts of protoporphyrins and exhibit a marked sexual dimorphism in ALA-S expression at glandular level (Payne, 1994; Vilchis et al., 1996).

In conclusion, using a combination of RT-PCR and RACE we have isolated the P450scc cDNA of Syrian hamster. A comparison of the amino acid sequence of this enzyme indicates moderate to strong conservation of the protein within divergent vertebrate groups. P450scc mRNA expression levels in lung, epididymis, and Harderian gland represents preliminary evidence of cholesterol side chain cleavage activity at these sites. The availability of full-length cDNA for hamster P450scc will facilitate studies of the tissue-specific regulation of CYP11A1 gene expression in this species.

Acknowledgments

This work was supported by CONACYT Grant 0010P-M (México). We thank Biol. Roberto Chavira for pregnenolone RIA determinations and Dr. Ivonne Heuze for providing the hamsters for this research.

References

- Azeva, T.N., Gilep, A.A., Lepesheva, G.L., Strushkevich, N.V., Usanov, S.A., 2001. Site-directed mutagenesis of cytochrome P450scc. II. Effect of replacement of the Arg425 and Arg426 residues on the structural and functional properties of the cytochrome P450scc. *Biochemistry (Mosc)* 66, 564–575.
- Burstein, S., Gut, M., 1971. Biosynthesis of pregnenolone. *Rec. Prog. Horm. Res.* 27, 303–349.
- Buzzell, G.R., Blank, J.L., Vaughan, M.K., Reiter, R.J., 1995. Control of secretory lipid droplets in the Harderian gland by testosterone and the photoperiod: comparison of two species of hamsters. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99, 230–238.
- Chávez, B., Valdez, E., Vilchis, F., 2000. Uniparental disomy in steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 3147–3150.
- Chung, B., Matteson, K.J., Voutilainen, R., Mohandas, T.K., Miller, W.L., 1986. Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8962–8966.
- Chung, B., Guo, L.-C., Chou, S.-J., 1997. Transcriptional regulation of the CYP11A1 and ferredoxin genes. *Steroids* 62, 37–42.
- Dalla, V.L., Belvedere, P., Simontacchi, C., Colombo, L., 1992. Extraglandular hormonal steroidogenesis in aged rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43, 1095–1098.
- Díaz, L., Sánchez, I., Avila, E., Halhali, A., Vilchis, F., Larrea, F., 2000. Identification of a 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene transcription product in cultures of human syncytiotrophoblast cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2543–2549.
- Gordon, A.S., Zanjani, E.D., Levere, R.D., Kappas, A., 1970. Stimulation of mammalian erythropoiesis by 5 β -H steroid metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65, 919–924.
- Hanukoglu, I., 1992. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43, 779–804.
- Hu, Z.Y., Bourreau, E., Jung-Testas, I., Robel, P., Baulieu, E.-E., 1987. Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8215–8219.
- Hurt, E.C., van Loon, A.P.G.M., 1986. How proteins find mitochondria and intramitochondrial compartments. *Trends Biochem. Sci.* 11, 204–207.
- Iwahashi, K., Ozaki, H.S., Tsubaki, M., Ohnishi, J., Takeuchi, Y., Ichikawa, Y., 1990. Studies of the immunohistochemical and biochemical localization of the cytochrome P-450_{scc}-linked monooxygenase system in the adult rat brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1035, 182–189.
- Keeney, D.S., Ikeda, Y., Waterman, M.R., Parker, K.L., 1995. Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 gene expression in the primitive gut of the mouse embryo does not require steroidogenic factor 1. *Mol. Endocrinol.* 9, 1091–1098.
- Kozak, M., 1991. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* 115, 887–903.
- Le Goascogne, C., Robel, P., Gouézou, M., Sanànes, N., Baulieu, E.E., Waterman, M., 1987. Neurosteroids: cytochrome P-450_{scc} in rat brain. *Science* 237, 1212–1215.
- Lill, R., Neupert, W., 1996. Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. *Trends Cell Biol.* 6, 56–61.
- Méndez, M.C., Chávez, B., Echeverría, O., Vilchis, F., Vasquez-Nin, G.H., Pedernera, E., 1999. Evidence for estrogen receptor expression in germ cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Cell Tissue Res.* 298, 145–152.
- Miller, W.L., 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* 9, 295–318.
- Mooradian, A.D., Morley, J.E., Korenman, S.G., 1987. Biological actions of androgens. *Endocr. Rev.* 8, 1–28.
- Morales, A., Cuéllar, A., Ramírez, J., Vilchis, F., Díaz-Sánchez, V., 1999. Synthesis of steroids in pancreas: evidence of cytochrome P-450scc activity. *Pancreas* 19, 39–44.

- Morohashi, K., Fujii-Kuriyama, Y., Okada, Y., Sogawa, K., Hirose, T., Inayama, S., Omura, T., 1984. Molecular cloning for mRNA of mitochondrial cytochrome P-450 (SCC) of bovine adrenal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4647–4651.
- Mulheron, G.W., Stone, R.T., Miller, W.L., Wise, T., 1989. Nucleotide sequence of cytochrome P-450 cholesterol side-chain cleavage cDNA isolated from porcine testis. *Nucleic Acids Res.* 17, 1773.
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyerisen, R., et al., 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12, 1–51.
- Nomura, O., Nakabayashi, O., Nishimori, K., Mizuno, S., 1997. The cDNA cloning and transient expression of a chicken gene encoding cytochrome P-450_{sc}. *Gene* 185, 217–222.
- Omura, T., Morohashi, K., 1995. Gene regulation of steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 19–25.
- Oonk, R.B., Parker, K.L., Gibson, J.L., Richards, J.S., 1990. Rat cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450_{sc}) gene: structure and regulation by cAMP in vitro. *J. Biol. Chem.* 265, 22392–22401.
- Payne, A.P., 1994. The Harderian gland: a tercentennial review. *J. Anat.* 185, 1–49.
- Picado-Leonard, J., Miller, W.L., 1988. Homologous sequences in steroidogenic enzymes, steroid receptors and steroid binding protein suggest a consensus steroid-binding sequence. *Mol. Endocrinol.* 2, 1145–1150.
- Sakai, T., 1981. The mammalian Harderian gland: morphology, biochemistry, function and phylogeny. *Arch. Histol. Jpn.* 44, 299–333.
- Schwartz, J.R., Roy, S.K., 2000. Developmental expression of cytochrome P450 side-chain cleavage and P450 17 α -hydroxylase messenger ribonucleic acid and protein in the neonatal hamster ovary. *Biol. Rep.* 63, 1586–1593.
- Slominski, A., Ermak, G., Mihm, M., 1996. ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 2746–2749.
- Stromstedt, M., Waterman, M.R., 1995. Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Mol. Brain Res.* 34, 75–88.
- Takahashi, M., Tanaka, M., Sakai, N., Adachi, S., Miller, W.L., Nagahama, Y., 1993. Rainbow trout ovarian cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (P450_{sc}): cDNA cloning and mRNA expression during oogenesis. *FEBS Lett.* 319, 45–48.
- von Heijne, G., 1986. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* 5, 1335–1342.
- Vilchis, F., Chávez, B., Cerbón, M.A., Pérez-Palacios, G., 1992. The Harderian gland as a target for steroid hormone action: role and characteristics of intracellular receptors. In: Webb, S.M., Hoffman, R.A., Puig-Domingo, M.L., Reiter, R.J. (Eds.), *Harderian Glands: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects*. Springer, Berlin, pp. 297–316.
- Vilchis, F., Damsky, R., Heuze, Y., Enríquez, J., Chávez, B., 1996. Identification and androgen regulation of a 156 kDa heme protein in the Harderian gland of the Syrian hamster. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101, 297–303.
- Zhang, P., Rodriguez, H., Mellon, S.H., 1995. Transcriptional regulation of P450_{sc} gene expression in neural and steroidogenic cells: implications for regulation of neurosteroidogenesis. *Mol. Endocrinol.* 9, 1571–1582.