

ANA LETÍCIA GORI LUSA

Estudo do Efeito Bioquímico e Estrutural de
Novas Mutações em Enzimas da
Esteroidogênese.

- Campinas –

- 2013 –

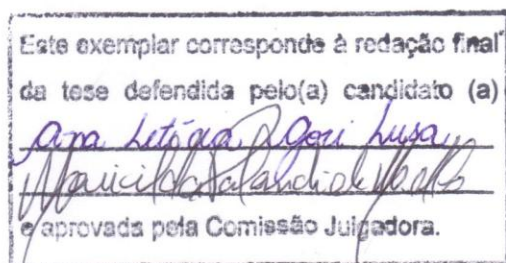


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA LETÍCIA GORI LUSA

“ESTUDO DO EFEITO BIOQUÍMICO E ESTRUTURAL DE NOVAS MUTAÇÕES EM ENZIMAS DA ESTEROIDOGÊNESE”



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Doutora em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Dra. Maricilda Palandi De Mello
Coorientadora: Dra. Fernanda Caroline Soardi

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira – CRB 8/6972

L975e Lusa, Ana Leticia Gori, 1983-
Estudo do efeito bioquímico e estrutural de novas mutações em enzimas da esteroidogênese / Ana Letícia Gori Lusa. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Maricilda Palandi de Mello. Coorientador: Fernanda Caroline Soardi.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Citocromo P450. 2. Esteróide 21-hidroxilase. 3. 3-Hidroxiesteróide desidrogenase. 4. Mutação. 5. Atividade enzimática. I. Mello, Maricilda Palandi de. II. Soardi, Fernanda Caroline. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Study of the biochemistry and structural effects of rare mutations in steroidogenesis enzymes

Palavras-chave em inglês:

Cytochrome P450

Steroid 21-hydroxylase

3-Hydroxysteroid dehydrogenases

Mutation

Enzymatic activity

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Maricilda Palandi de Mello [Orientador]

Cláudia Vianna Maurer Morelli

Edmilson Ricardo Gonçalves Maria de Fatima Sonati

Luciana de Campos Leite Medeiros

Data de defesa: 03-05-2013

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 3 de maio de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maricilda Palandi De Mello (orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli



Assinatura

Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves



Assinatura

Profa. Dra. Maria De Fatima Sonati



Assinatura

Dra. Luciana De Campos Leite Medeiros



Assinatura

Profa. Dra. Janete Maria Cerutti

Assinatura

Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni

Assinatura

Dr. Lúcio Fabio Caldas Ferraz

Assinatura

Aos meus pais, Jaime e Pascoala, e ao meu irmão, Gustavo.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pela força para passar por todas as pedras do caminho.
Aos meus pais e ao meu irmão, pessoas mais parecidas com anjos, que são exemplos de vida, são amigos, me dão força e amor. Obrigada por tudo.

Aos meus avós que me mostraram uma vida cheia de exemplos.

Aos meus tios e primos que me mostraram que sempre estão do meu lado.

A minha cunhada, Helena, que mesmo a pouco tempo na família fez uma grande demonstração de amor e apoio a nós todos.

Ao Vitor, uma pessoa especial que apareceu na minha vida no momento certo e que me trouxe muita segurança e calma, além de ser um ótimo companheiro.

À Profa. Maricilda Palandi de Mello pela orientação, paciência nesses anos do doutorado.

À Fernanda Caroline Soardi pela co-orientação e ajuda no trabalho e por ser a mão amiga nas horas complicadas.

Ao Celso Eduardo Benedetti pela ajuda e pelas dicas nos experimentos.

À Profa. Edí Lucia Sartorato e a Profa. Anete Pereira de Souza.

Às pessoas que me deram uma ajuda diretamente nesse trabalho: Renata Loureiro, Daiane Belgini, Ana Carolina Crivelin. Vocês me ajudaram muito nas horas que eu precisava.

A todos do laboratório que me ajudaram de muitas formas nesse trabalho: Emerson (Creyto), Priscila, Paulo, Renan, José Luiz (Zelo), Fer3, Flávia (Flor), Rogério (Batata), Cristiane, Débora, Mara, Flávia (Elfo), Milena, Nathy, Erika (Foca), Nathy Graviola, Mari Q, Carol Paraná, Diego, Denise, Sueli, Vanessa, Reginaldo, Fábio, Elton, Helena, Adriana, Rose, Renata, Paula, Jéssica, Talita, Francine, Carol Conti, Carol Vida Louca, Vanessa, Gianine, Taciane, Pamela, Ana Paula, Camila Mathias

Ao pessoal do laboratório da Profa. Anete: Marcelo, Nani, Lilian, Cleoton, Aline, André, Juliano, Maria Augusta. Obrigada por toda a ajuda e me desculpem por ter atrapalhado tanto.

Ao pessoal do LNBio: Andrea Balan, Carolzinha, Nadia, Germana, Kelvin, Alexandre, Carol Guzzi, Ana Carolina Figueira, André Ambrósio, Renata, Vanessa, Aline, Melissa, Mariana, Alexandre, Cristiane, Américo, Gustavo, Kelvin, Wanderley (pelos inúmeros sequenciamentos). Esses grandes amigos que me ajudaram também nessa etapa de vida.

Ao pessoal da secretaria Sandra, a Tânia e Gabriela pelas inúmeras dúvidas tiradas durante esses anos e pelas ajudas. Às meninas da faxina, Solange e Kátia, pelo auxílio e pelas longas conversas.

As minhas amigas de hoje e sempre, pessoas que entraram na minha vida e foram ficando: Thaíza, Cristiane, Tatiane, Polyanna, Marcela Veludo, Marcela, Mariana Gonzaga, Dani Chiarelli, Amanda, Patrícia.

Às amigas que dividiram apartamento comigo, a Carol e a Karina, a Ingrid e a Elisa e a Michelle, vocês me ajudaram muito e me ouviram quando eu mais precisava.

À FAPESP pelo incentivo e subsídio no desenvolvimento do estudo e da pesquisa.

E a todos os que ajudaram diretamente e indiretamente e minha memória não foi capaz de lembrar.

OBRIGADA POR TUDO. ESSE TRABALHO TAMBÉM É DE VOCÊS.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT.....	xix
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A FAMÍLIA DOS CITOCROMOS P450.....	1
1.2. A ESTEROIDOGÊNESE NAS GLÂNDULAS SUPRA- RENAL.....	7
1.3. A ENZIMA 21-HIDROXILASE.....	9
1.4. HIPERPLASIA CONGÊNITA DA ADRENAL.....	16
1.4.1. Deficiência de 21-hidroxilase.....	17
1.4.2. Deficiência da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase...	25
1.5. ANÁLISE ESTRUTURAL.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
3. MÉTODOS.....	31
3.1. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA.....	31
3.2. MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA E SUB-CLONAGEM DO cDNA.....	32
3.3 TRANSFECCÃO EM CÉLULAS COS.....	35
3.5. OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	37

3.6. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL.....	38
3.7. ENSAIO DE β -GALACTOSIDASE.....	39
3.8. WESTERN BLOTTING.....	39
3.9. ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	41
3.10. ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS.....	42
3.11. CINÉTICA DA PROTEÍNA.....	43
3.12. ESTUDO <i>IN SILICO</i>	44
4. RESULTADOS.....	47
4.1. ANÁLISES PRÉVIAS QUE DERAM SUPORTE AO TRABALHO.....	47
4.2. ANÁLISE DA CONSERVAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS...55	
4.3. ANÁLISE BIOQUÍMICA DAS MUTAÇÕES.....57	
4.3.1. Preparo dos plasmídios e subclonagens.....57	
4.3.2. Atividade enzimática.....60	
4.3.3 <i>Western blotting</i>63	
4.4. MODELAGEM DA 21-HIDROXILASE.....64	
4.5. ESTUDO <i>IN SILICO</i> COM 3-BETA-HIDROXISTEROIDE DESIDROGENASE.....81	
5. DISCUSSÃO.....85	
6. CONCLUSÃO.....93	
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....95	
8. ANEXOS.....118	
8.1. DECLARAÇÃO.....118	
8.2. ARTIGOS.....119	

ABREVIATURAS

Δ_4^5 -diol - eandrost-5-eno-3- β , 17 β -diol

Δ^4 -Dione - 17 α -, Δ^4 androstenediona

11-DOL - 11-desoxicortisol

11-DOC e DOC-11- desoxicorticosterona

17OH- Preg - 17-hidroxipregnenolona

17-OHP - 17 α -hidroxiprogesterona

3 β -HSD - 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

BSA - albumina sérica bovina

cDNA - DNA complementar

CNVs – sigla em inglês de *copy number variation* para variação no número de cópias

CRH - hormônio liberador de corticotrofina

CYP ou P450 - citocromos P450

CYP101 - P450cam - Camphor 5-monooxygenase

CYP11B1 - 11 β -hidroxilase

CYP17 - 17 α -hidroxilase

CYP19 – aromatase

P450c21-21-OHD - 21-hidroxilase

CYP21A2- gene da 21-hidroxilase

CYPOR - citocromo P450 oxidoreductase

DHEA - desidroepiandrosterona

4 Δ -A- Δ^4 -androstenediona

DHT - diidrotestosterona

DMEM – sigla em inglês de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* para meio Eagle modificado por Dulbecco para cultura de células

DTT - Ditiotreitól

EDTA- sigla em inglês de *Ethylenediamine tetraacetic acid* para ácido etilenodiamino tetra-acético

FAD - sigla em inglês para dinucleotídeo de flavina-adenina

FMN - sigla em inglês para flavina mononucleotídeo

HCA- hiperplasia congênita da adrenal

HLA - sigla em inglês de *human leukocyte antigen* para antígeno leucocitário humano

HSD3B2 - 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2

NAD(P)H - sigla em inglês de *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*

NC - forma não clássica de deficiência de 21-hidroxilase

ONPG - sigla em inglês para 2-Nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo

P e PROG - progesterona

PBS - sigla em inglês de *Phosphate Buffered Saline* para tampão fosfato-salino

PDB - sigla em inglês de *Protein Data Bank*

PS - forma perdedora de sal de deficiência de 21-hidroxilase

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SDS - sigla em inglês de *Sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE - sigla em inglês de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

T - testosterona

TBS-T – Tampão com Tris-HCl e *Tween* 20.

VS - forma virilizante simples de deficiência de 21-hidroxilase

β -gal - β -galactosidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do grupamento heme que se liga às P450s.	3
Figura 2 - Ação das enzimas monoxidases P450 da classe I e da classe II.	3
Figura 3 - Esquema de ação das monooxigenases P450 ligadas à membrana e sua interação com a coenzima P450 oxidoreductase.	4
Figura 4 - Representação da orientação dos grupamentos das CYPs da classe II em relação à membrana.	5
Figura 5 - Esquema do mecanismo de oxidação pelas enzimas da família P450 onde R-H representa o substrato e R-OH, o produto.	6
Figura 6 - Esquema da esteroidogênese.	8
Figura 7 - Esquema das reações catalisadas pela enzima CYP21A2 na via de síntese do cortisol (superior) e da aldosterona (inferior).	10
Figura 8 – Estrutura da CYP21A2 humana (2GEG) obtido por modelamento através da comparação com a estrutura cristalizada da enzima CYP2C5 de coelho (1DT6).	12
Figura 9 - Características secundárias da estrutura da CYP21A2 modelada com base nas CYP2C5, CYP51 e CYP2B4.	13
Figura 10 – Estrutura da CYP21A2 bovina (PDB ID:3QZ1) obtido por difração de raio-X.	16
Figura 11: Esquema resumido da metodologia usada nesse trabalho.	32
Figura 12 - Sequenciamento do gene <i>CYP21A2</i> do paciente.	48
Figura 13 - Sequenciamento do exon 8 do paciente 112Ya1 e de seus pais.	49
Figura 14 - Fragmento dos cromatogramas da paciente 108Xa1 e de seu pai.	51
Figura 15 - Sequenciamento da paciente 147Xa1 e de seu pai.	53
Figura 16 - Fragmento do sequenciamento do exon 9 da paciente 210Xa1.	54
Figura 17 - Alinhamento da sequência protéica da 21-hidroxilase humana com cinco sequências de 21-OH de mamíferos.	55
Figura 18 - Gel de agarose 1% com resultado da amplificação, com os <i>primers</i> do exon 3 normal sense e o exon 6 normal antisense.	58
Figura 19 - Parte dos cromatogramas dos cDNAs que foram alterados por mutagênese sítio-dirigida, a direita o alinhamento das sequências mutante e normal do gene <i>CYP21A2</i> .	59
Figura 20 - Teste em gel de agarose 1% do plasmídeo pALTER-cDNA após a realização da mutagênese sítio-dirigida com p.Pro267Leu.	60

Figura 21 - (a) Análise em SDS-PAGE da expressão de 21-hidroxilase em células COS-7. b) Resultado do reconhecimento da proteína CYP21A2 pelos anticorpos específicos na membrana de nitrocelulose obtida pela transferência do SDS-PAGE mostrado em (a).	64
Figura 22 - Modelo estrutural da CYP21A2 com base na estrutura da 21-hidroxilase bovina.	64
Figura 23 - Gráficos de contatos do resíduo L388, aminoácido vizinho a deleção.	65
Figura 24 - Gráficos de contatos do resíduo H392, aminoácido vizinho a deleção.	66
Figura 25 - Gráfico de contatos dos resíduos da tríade E351, R354, R356, região de ligação as proteínas acessórias.	67
Figura 26 - Modelo estrutural da 21-hidroxilase com base na estrutura da <i>Mammalian cytochrome P450 2C5</i> (PDB-ID 1DT6).	68
Figura 27 - Gráfico de contatos dos resíduos vizinhos à deleção.	69
Figura 28 - Gráfico de contatos dos resíduos da tríade de ligação às proteínas acessórias.	70
Figura 29 - Gráfico de contatos dos resíduos da região de ligação ao grupamento heme.	71
Figura 30 - Modelo molecular da CYP21 humana, em destaque a região de ligação ao substrato.	72
Figura 31 - Modelo do <i>SwissModel</i> da proteína 21-hidroxilase nativa com base na estrutura CYP21 bovina (PDB-ID 3QZ1) onde se evidenciam os resíduos correspondentes às mutações identificadas	73
Figura 32 - Comparação das interações do resíduo 113 na proteína nativa e na proteína com a mutação p.Ser113Phe.	73
Figura 33 - Comparação dos contatos do resíduo 113 da proteína nativa com a proteína com mutação Ser113Phe .	74
Figura 34 - Comparação das interações do resíduo 172 na proteína nativa, na proteína com mutação Ile172Asn e na proteína com a combinação de mutações p.Ile172Asn e p.Val358Ile.	75
Figura 35 - Comparação dos contatos do resíduo 172 na proteína nativa com a proteína com mutação p.Ile172Asn e com a proteína com a mutação p.Ile172Asn combinada com a p.Val358Ile.	75
Figura 36 - Comparação das interações feitas pelo resíduo 358 na proteína nativa, proteína com mutação p.Val358Ile e na proteína com a combinação das mutações p.Ile172Asn e p.Val358Ile.	76
Figura 37 - Comparação dos contatos do resíduo 358 na proteína nativa com a proteína com a mutação p.Val358Ile e com a proteína com a mutação p.Ile172Asn combinada com a p.Val358Ile.	77
Figura 38 - Esquema das interações que o resíduo 267 faz na proteína nativa e na proteína com mutação p.Pro267Leu.	77
Figura 39 - Contatos do resíduo 267 na proteína nativa e na proteína com a mutação p.Pro267Leu.	78
Figura 40 - Gráficos das interações feitas pelo resíduo 281 na proteína nativa, na proteína com a mutação p.Val281Leu e na proteína com a combinação de mutações p.Val281Leu e p.Arg426Cys	79
Figura 41 - Gráfico de contatos do resíduo 281 na proteína nativa com a proteína com a mutação p.Val281Leu e com a proteína com a mutação p.Val281Leu combinada com a mutação p.Arg426Cis.	79

Figura 42 - Esquema de interações do resíduo 426 na proteína nativa, na proteína com a mutação p.Arg426Cys e na proteína com a combinação de mutações p.Val281Leu e p.Arg426Cys.	80
Figura 43 - Comparação do contatos do aminoácido 426 na proteína nativa com a proteína com mutação Arg426Cis e com a proteína com a combinação das mutações p.Val281Leu com a p.Arg426Cis.	81
Figura 44 - Comparação parcial das seqüências de aminoácidos das isoenzimas 3 β -HSD de mamíferos.	82
Figura 45 - Modelo estrutural da 3 β -HSD2 nativa com o aminoácido P222 em vermelho. Sobreposição da estrutura da proteína nativa e das mutantes de 3 β -HSD2, ressaltando a cadeia lateral proeminente da glutamina em comparação com a prolina. Sobreposição da P222 na proteína nativa e a treonina na enzima mutante. Contatos internos da P222. Contatos internos de Q222. (F) Contatos internos de T222.	83
Figura 46 - Sobreposição dos modelos de 3 β -HSD2. Em azul, encontra-se o modelo da proteína nativa, em rosa, o modelo da proteína com o aminoácido mutante Q222 e, em verde, o modelo da proteína com o aminoácido mutante T222.	84

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1: Porcentagem relativa de atividade enzimática residual das proteínas mutantes frente ao substrato 17-OH Progesterona.	61
Gráfico 2: Porcentagem relativa de atividade enzimática residual das proteínas mutantes frente ao substrato Progesterona.	62

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Resíduos importantes no sítio ativo de ligação ao esteroide na enzima CYP21A2.	14
Tabela 2: Resíduos importantes na CYP21A2 para interação com a coenzima.	15
Tabela 3. Oligonucleotídeos para mutagênese sítio-dirigida.	33
Tabela 4. <i>Primers</i> específicos para o cDNA do gene <i>CYP21A2</i> .	34

Tabela 5: Resultados das predições <i>in silico</i> do efeito das mutações sobre a proteína.	56
Tabela 6: Constante cinética aparente para proteína nativa (P450c21) e para a mutante p.Pro267Leu	61
Tabela 7. Apresentação dos resultados referentes a cada paciente, relacionando os estudos <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> com os fenótipos.	86

RESUMO

A Hiperplasia congênita da Adrenal (HCA) é uma das doenças mais comuns com herança autossômica recessiva. Uma das causas é a deficiência da 21-hidroxilase que surge por mutações no gene *CYP21A2*. O desequilíbrio na síntese de cortisol causa um estímulo excessivo das glândulas adrenais pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e, conseqüentemente, à hiperplasia da glândula e ao aumento na síntese de andrógenos. O presente trabalho teve por objetivo clonar e expressar variantes do gene *CYP21A2* e, avaliar as variantes enzimáticas da 21-hidroxilase quanto à atividade residual, comparando suas formas nativa e mutantes. Foi também realizado o estudo *in silico* para se comparar as estruturas das enzimas 21-hidroxilase e 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (HSD3B2) avaliando o impacto das alterações provocadas por mutações sobre a estrutura da proteína nativa.

Para a enzima 21-hidroxilase, as mutações analisadas quanto à atividade foram: p.Ser113Phe, p.Pro267Leu, p.Val358Ile, p.Arg426Cis e, as combinações p.Ile172Asn+p.Val358Ile e p.Val281Leu+p.Arg426Cis. Nos testes de atividade enzimática, as enzimas com as mutações p.Val358Ile e as combinações p.Ile172Asn+p.Val358Ile e p.Val281Leu+p.Arg426Cis apresentaram valores de atividade residual compatíveis com a forma perdedora de sal. Por outro lado, a enzima com a mutação p.Pro267Leu apresentou atividade residual maior que 50%, compatível com mutações da forma não clássica. As mutações p.Ser113Phe e p.Arg426Cis, por sua vez, apresentaram atividade residual entre 2 e 7% que, em relação aos controles utilizados, foram correspondentes à forma clássica virilizante simples.

Os modelos estruturais gerados para as enzimas 21-hidroxilase portadoras da deleção p.(Gln389_Ala391del) e das mutações individuais ou combinadas acima citadas foram comparados ao da enzima nativa. Estudo similar foi realizado com enzimas HSD3B2 nativa e portadoras de duas mutações, p.Pro222Gln e p.Pro222Thr, relacionadas à forma perdedora de sal da deficiência de HSD3B2.

Esse estudo demonstrou boa correlação das mutações encontradas nos pacientes com os seus fenótipos tanto no que diz respeito à atividade enzimática quanto às alterações estruturais. Assim, ficou demonstrado que este tipo de abordagem é eficaz para a avaliação dos aspectos funcionais de mutações inéditas.

ABSTRACT

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is one of the most common hereditary autosomal recessive diseases. 21-hydroxylase deficiency is one important cause of the disease and results from mutations in *CYP21A2* gene. The unbalance in cortisol synthesis leads to excessive stimulation of adrenal glands by adrenocorticotrophic hormone (ACTH), consequently, to adrenal hyperplasia and excessive androgen synthesis. The present study aimed to obtain and express *CYP21A2* clones carrying sequence variations and to evaluate 21-hydroxylase enzymatic residual activities of variant enzymes in comparison to the wild-type. *In silico* studies were also performed to compare the structure of 21-hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD3B2) evaluating the impact of mutations upon the native structure of the enzymes.

Residual activity analyses for 21-hydroxylase enzyme comprised the mutations p.Ser113Phe, p.Pro267Leu, p.Val358Ile and the combined mutations p.Ile172Asn+p.Val358Ile and p.Val281Leu+p.Arg426Cys. The assays indicated that p.Val358Ile and p.Ile172Asn+p.Val358Ile and p.Val281Leu+p.Arg426Cys reduced *CYP21A2* activity to levels corresponding to the salt wasting form. Whereas the enzyme bearing p.Pro267Leu mutation showed residual activity higher than 50% indicating a nonclassic mutation. Conversely, p.Ser113Phe and p.Arg426Cys mutations showed residual activities that varied between 2% and 7% that, compared to controls, corresponded to simple virilizing form.

Structural models generated for 21-hydroxylase enzyme with p.(Gln389_Ala391del) and each individual or combined mutations cited above have been compared to the native enzyme. Similar study was performed with HSD3B2 enzyme in its native and mutated forms with p.Pro222Gln e p.Pro222Thr that are related to the salt wasting form of HSD3B2 deficiency.

This study demonstrated a good genotype-phenotype correlation in patients either for residual activities or for structural changes. Therefore, it has been demonstrated that such analyses are effective to evaluate functional aspects for novel mutations.

INTRODUÇÃO

A FAMÍLIA DOS CITOCROMOS P450

Os citocromos P450 (CYPs ou P450s) compreendem uma superfamília de enzimas que metabolizam os xenobióticos (Nelson *et al.*, 1996; Ingelman-Sundberg, 2004). Considera-se que sejam responsáveis pelo metabolismo da maioria dos compostos exógenos e sintéticos, incluindo carcinógenos e drogas, transformando-os em produtos menos tóxicos e mais solúveis para serem mais facilmente excretados. A ação dos citocromos P450 faz com que mais de 200.000 produtos químicos sejam metabolizados e acredita-se que as diferentes susceptibilidades a problemas de saúde induzidos por agentes químicos possam ser decorrentes da grande variabilidade nos níveis de P450 encontrada em cada indivíduo, variabilidade esta que reflete suas várias formas polimórficas (Phillips *et al.*, 2001). Consequentemente, mutações nos genes que as codificam resultam em erros inatos do metabolismo e contribuem para várias doenças clinicamente relevantes. Os estudos detalhados das funções bioquímicas e das particularidades estruturais de cada um dos componentes dessa classe de enzimas têm direcionado uma terapêutica mais individualizada (Ingelman-Sundberg, 2001; Evans e Relling, 2004).

Em geral, as citocromo P450 agem no retículo endoplasmático, mas em células animais também agem em mitocôndrias, onde são encontradas na membrana interna. As enzimas humanas da superfamília CYP contribuem para a síntese dos hormônios esteróides, prostaciclina, tromboxano, colesterol e ácidos biliares, bem como para a degradação de compostos endógenos, tais como ácidos graxos, ácido retinóico, esteróides e compostos exógenos que incluem drogas e substâncias cancerígenas (Nebert e Russell, 2002). As citocromos P450 microsossomais são sintetizadas com uma sequência líder que leva a enzima a se inserir no retículo endoplasmático para reconhecimento do sinal de

partículas (Sakaguchi *et al.*, 1984). Um sinal de parada de transferência seguido de uma sequência transmembrana *leader* localizada no N-terminal interrompe a translocação da enzima através da membrana. Como resultado, o domínio catalítico fica retido na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático (Sakaguchi *et al.*, 1987; Monier *et al.*, 1988; Szczesna-Skorupa e Kemper, 1989). As P450s microsossomais parecem conter regiões adicionais de interação com a membrana porque elas se ligam às membranas mesmo após a eliminação da hélice transmembrana do N-terminal (Pernecky *et al.*, 1993). As P450s mitocondriais também são sintetizadas com sequências líder que vão orientá-las para a mitocôndria. Estes líderes são clivados após a translocação para a membrana mitocondrial interna onde os P450s ligam-se à matriz da membrana, sem a utilização de uma hélice transmembrana (Dubois *et al.*, 1981; Ogishima *et al.*, 1985). As interações moleculares que sequestram as P450s mitocondriais para membrana não são claras e podem ser semelhantes ao mecanismo pelo qual algumas P450s microsossomais associam-se com as membranas, pois são expressas sem sequências líder.

As enzimas citocromo P450 são monooxigenases encontradas em muitos tipos de tecidos de grande relevância fisiológica. As monooxigenases citocromo P450 (P450s) são biocatalisadores versáteis que catalisam a oxidação de hidrocarbonetos de forma específica por localização, o que é uma tarefa desafiadora para catalisadores químicos. As enzimas citocromo P450 contêm um grupamento heme b e foram reconhecidas e definidas como uma classe distinta de hemoproteínas cerca de 50 anos atrás (Klingenberg, 1958: citado em Urlacher e Girhard, 2012). O heme é um grupo prostético consistindo de um íon ferro coordenado por quatro moléculas de porfirina (Fig. 1); nas P450s o grupamento heme está ligado à apoproteína através de uma cisteína bastante conservada evolutivamente. O grupamento heme nestas enzimas é essencial, pois é usado para exercer a função de monooxigenase, peroxidases e peroxigenases (Degtyarenko e Archakov, 1993; Nelson *et al.*, 1993; Omura e Sato, 1964).

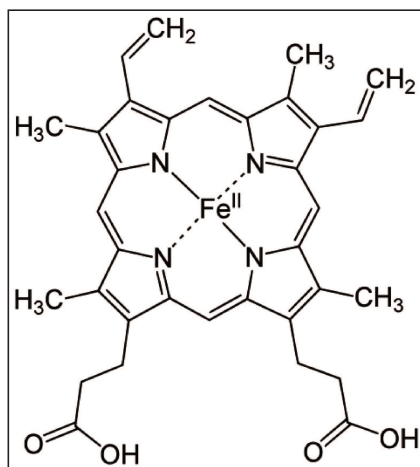


Figura 1 – Estrutura do grupamento heme que se liga às P450 (Yikrazuul, 2010).

Quase todas as P450s são monooxigenases que utilizam elétrons derivados de cofactores como NADH ou NADPH. Para ter atividade catalítica, as P450s devem estar associadas a proteínas parceiras do tipo redox, que possam promover a transferência dos elétrons de NADPH para o centro do grupo heme da P450. De uma forma geral, com base nos tipos de enzimas redox que participam na transferência de elétrons, as P450s podem ser classificadas em duas classes (Fig. 2). As P450s da classe I compreendem uma pequena redutase contendo uma ferredoxina ferro-enxofre (2Fe-2S) e um dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD). Na classe II, os elétrons são transferidos através de uma citocromo P450 redutase (CYPOR) contendo um mononucleotídeo FAD e uma flavina (FMN) (Fig. 2) (revisto em Hannemann *et al.*, 2007).

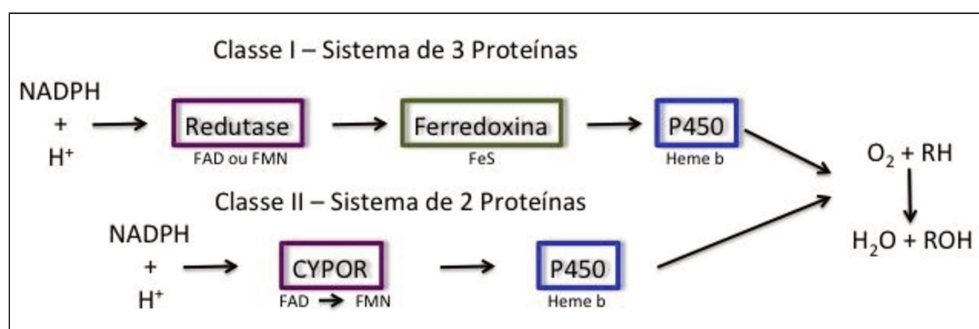


Figura 2 - Ação das enzimas monooxigenases P450 da classe I e da classe II (adaptado de Urlacher e Girhard, 2012).

As enzimas da classe I são encontradas nas membranas mitocondriais de eucariotos e na maioria das bactérias e requerem uma redutase contendo o dinucleotídeo flavina-adenina (FAD) e uma proteína de ferro-enzofre como coenzimas; as da classe II estão ligadas ao retículo endoplasmático e interagem diretamente com uma redutase contendo FAD e flavina mononucleótido (FMN) como coenzimas (Urlacher e Girhard, 2012).

Assim, a enzima P450, que se encontra geralmente ligada à membrana, utiliza uma coenzima redutase que faz a transferência de elétrons do NADPH para o citocromo P450, uma vez que o NADPH doa elétrons em pares e as enzimas citocromo P450 aceitam apenas 1 elétron (Fig. 3). Para muitas reações oxidativas típicas, as enzimas P450 utilizam o O_2 e dois elétrons do NADPH e, são mediadas pelos parceiros flavoproteínas redox e proteínas ferro-enzofre, para catalisar a monoxigenação de numerosos substratos exógenos e endógenos (Hrycay e Bandiera, 2009; Ortiz de Montellano, 1989).

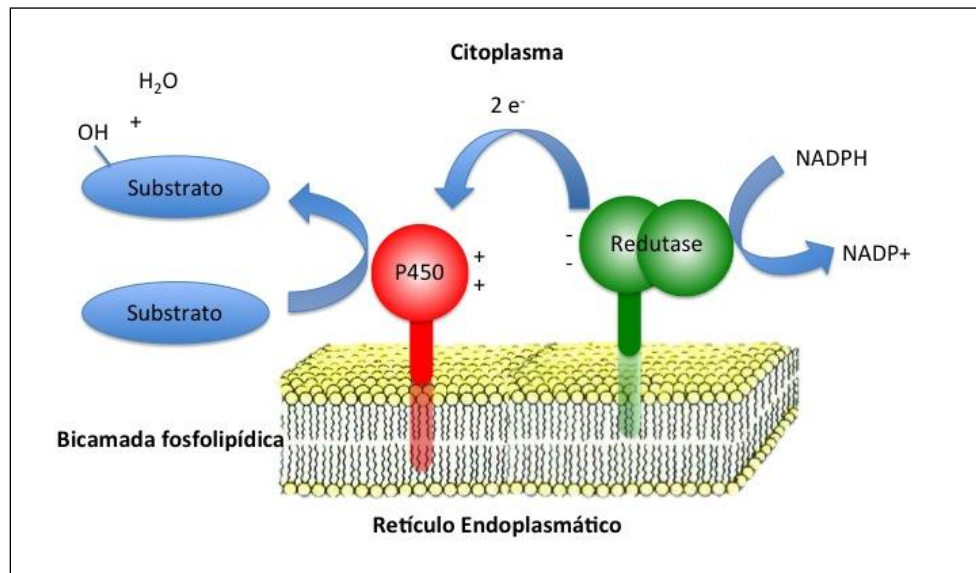


Figura 3 - Esquema de ação das monooxigenases P450 ligadas à membrana e sua interação com a coenzima P450 oxidoreductase (adaptado de Després *et al.*, 2007).

As P450 microsossomais estão ligadas ao retículo endoplasmático por apenas um ou dois peptídeos transmembrânicos localizados no N-terminal das proteínas, e o sítio ativo faz parte de um domínio citoplasmático.

Por alinhamento de várias sequências de citocromos P450, Nelson e Strobel (1988) identificaram 11 segmentos com potencial de atravessar a membrana para ancoramento das enzimas. Após análise cuidadosa de cada região candidata, duas regiões dentro dos primeiros 66 aminoácidos próximos ao terminal NH₂ foram consideradas como os únicos peptídeos transmembrânicos das P450 microsossomais. Assim, um modelo foi proposto onde o sítio de ligação do substrato fica voltado para a membrana, o grupamento heme se posiciona em paralelo com a superfície da membrana, e os dois segmentos transmembrana no terminal NH₂ ancoram a proteína na bicamada (Fig. 4). Esses mesmos autores publicaram em 1989 um estudo da estrutura secundária das citocromo P450s baseando-se também no alinhamento das sequências de várias enzimas. Assim, propuseram que nessa classe as proteínas apresentam estrutura secundária com pelo menos 10 alfa-hélices e 6 folhas-beta (Nelson e Strobel, 1989).

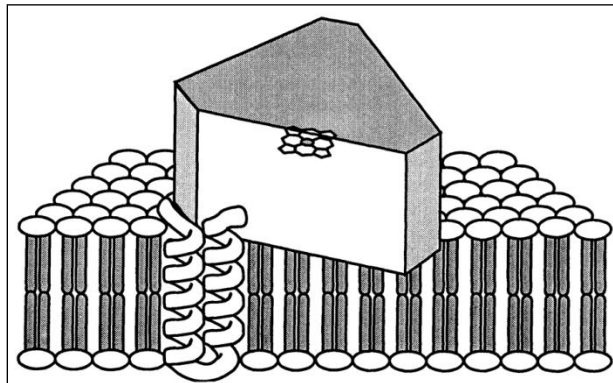


Figura 4 - Representação da orientação dos grupamentos das CYPs da classe II em relação à membrana (Nelson e Strobel, 1988).

As P450 exibem especificidade ao substrato, porém estas enzimas retêm a capacidade de catalisar a cisão da ligação da molécula de O₂ enquanto esta molécula está ligada ao grupamento heme. Esta restrição estrutural se reflete na conservação espacial na P450s das hélices I, o eixo de ligação ao grupamento heme, e o local de transferência de elétrons, a hélice L e a alça b. A manutenção funcional destas características limita as formas possíveis que podem ser adotadas pelo sítio ativo. Como ocorrem diferenças estruturais significativas nos locais de ligação ao substrato entre as P450s, isso dificulta grandemente a modelagem dessas enzimas (Willians *et al.*, 2000).

De acordo com um dos modelos de catálise da P450 (Rein e Jung, 1993), o mecanismo de ação das enzimas resume-se em algumas etapas intermediárias envolvendo complexos instáveis até a liberação do produto (Fig. 5). No primeiro passo da reação se dá a ligação do substrato para a oxidação (férica, Fe^{3+}) pela enzima. Um elétron é doado pela P450 redutase para a enzima de modo que o ferro fique no estado reduzido (ferroso, Fe^{2+}). Esse complexo de ligações com a molécula de oxigênio e a recepção do segundo elétron pelas proteínas acessórias gera a ligação da molécula de oxigênio com carga negativa. Dois prótons são doados em sucessão para a molécula de água pelo grupo carboxila do resíduo ácido, transferidos para a hidroxila da treonina conservada e finalmente doados ao átomo de oxigênio distal (Ravichandran *et al.*, 1993). O átomo de oxigênio distal é então liberado como molécula de água (H_2O), deixando o ferro no estado Fe^{3+} . O átomo de oxigênio é altamente reativo (o complexo ferro-oxigênio é a porção “feril”) e ataques ao substrato, resultam numa hidroxilação (Meunier *et al.*, 2004; Guengerich e Isin, 2008).

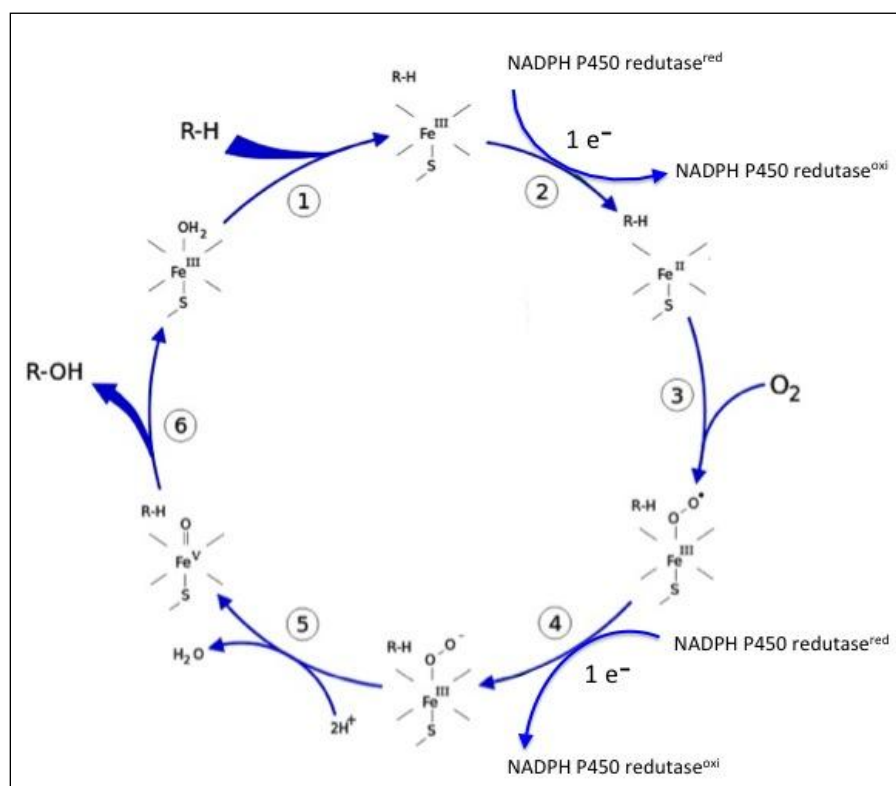


Figura 5 - Esquema do mecanismo de oxidação pelas enzimas da família P450 onde R-H representa o substrato e R-OH, o produto (adaptado de Slashme, <http://en.wikipedia.org/wiki/File:P450cycle.svg>).

As famílias das CYPs classificadas de 1 a 3 (com base na sequência de aminoácidos comum entre os membros) estão envolvidas com a fase I do metabolismo humano de drogas e compostos xenobióticos, enquanto que as outras famílias (CYP 4, 11, 17, 19, 21) estão envolvidas no metabolismo de compostos endógenos como ácidos graxos, esteróides, eicosanoides, ácidos biliares e vitaminas solúveis em gorduras (Ingelman-Sundberg, 2005).

A análise dos dados dos genomas humanos revela 57 genes funcionais de CYP (codificam uma enzima ativa) e 58 pseudogenes (Nelson *et al.*, 2004).

A ESTEROIDOGÊNESE NAS GLÂNDULAS SUPRA-RENAIS

As glândulas adrenais ou supra-renais, localizadas no polo superior de cada rim, estão divididas em medula, centro e córtex, na região periférica. Na medula são produzidas as catecolaminas, epinefrinas e norepinefrinas, em resposta à estimulação simpática. No córtex é onde se dá a esteroidogênese através da qual são produzidos os hormônios corticosteróides (mineralocorticóides e glicocorticóides) e também os hormônios sexuais (esteróides androgênicos) (New, 1994; White e Speiser, 2000).

Os principais hormônios produzidos pelo córtex são o cortisol (glicocorticóide) e a aldosterona (mineralocorticóide). Os glicocorticóides estão relacionados com o catabolismo protéico, fornecendo glicose ao organismo através da transformação de proteínas pela indução das enzimas de gliconeogênese no fígado. A aldosterona é regulada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona e pelos níveis de potássio sérico. Os mineralocorticóides atuam nos túbulos renais, aumentando a reabsorção de íons de sódio pelos rins, saliva e trato digestivo (White, 1994).

A esteroidogênese é controlada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é secretado pela hipófise anterior. A liberação do ACTH é controlada pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH), também chamado de fator regulador de corticotrofina, produzido pelo hipotálamo. O ACTH se liga a receptores específicos na membrana plasmática das células do córtex adrenal e exerce controle sobre a secreção do cortisol,

estimulando a conversão do colesterol em pregnenolona, que é a etapa limitante de esteroidogênese da adrenal. O cortisol plasmático é, por sua vez, o regulador do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, controlando a produção de ACTH e CRH, mecanismo denominado de retroalimentação ou *feedback* negativo (White e Speiser, 2000). Uma vez estimulada a esteroidogênese, os hormônios são produzidos em três vias metabólicas. Na via dos mineralocorticóides, a pregnenolona formada é transportada da mitocôndria ao retículo endoplasmático, onde é desidrogenada na posição 3 β pela enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (HSD3B2), originando a progesterona. Nas zonas reticular e fasciculada, a enzima 17 α -hidroxilase (CYP17), catalisa a 17 α -hidroxilação da progesterona e da pregnenolona, sendo a 17 α -hidroxiprogesterona (17-OHP) precursora do cortisol. A 17-OHP é, em seguida, hidroxilada na posição 21 por outra enzima da família do citocromo P450, a 21-hidroxilase (CYP21A2), produzindo o esteróide 11-desoxicortisol (S). Este composto é transportado para a membrana interna da mitocôndria, onde é hidroxilado por uma quarta enzima da família do citocromo P450, a 11 β -hidroxilase (CYP11B1), dando origem ao cortisol (Fig. 6) (White e Speiser, 2000; Nimkarn e New, 2008).

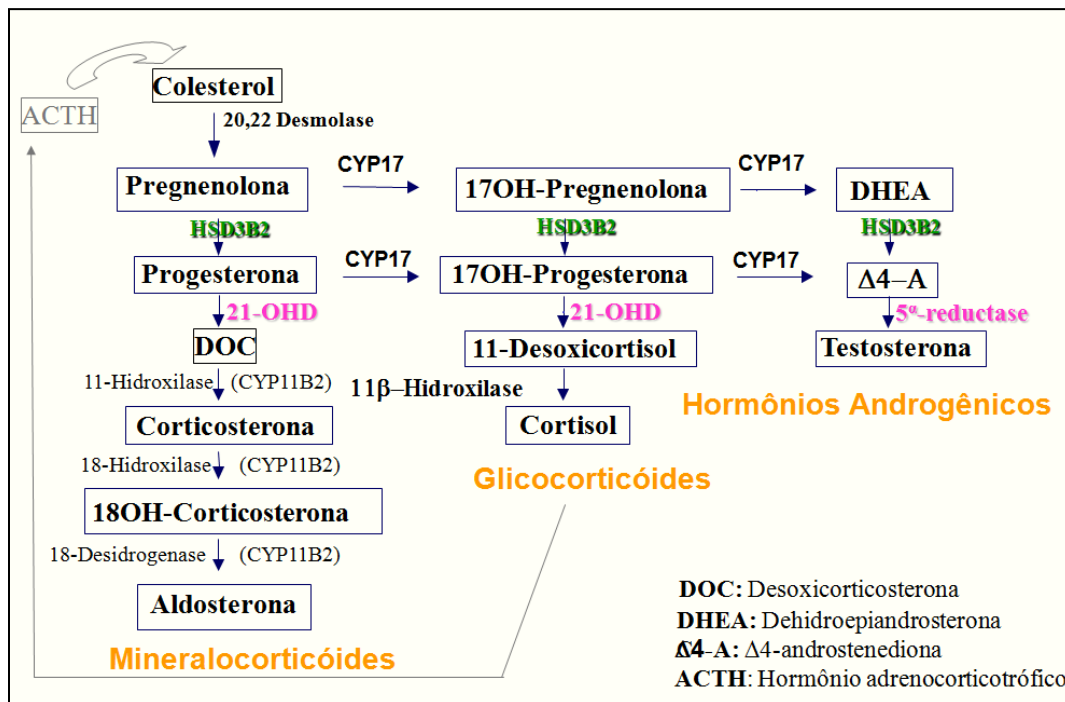


Figura 6 - Esquema da esteroidogênese (Adaptado de Torresani, 2007). Onde: DOC - desoxicorticosterona, DHEA desidroepiandrosterona, Δ 4-A- Δ 4-androstenediona.

A CYP11B2, que participa das três etapas de conversão da desoxicorticosterona em aldosterona (Fig. 6), é encontrada apenas na zona glomerulosa. A zona glomerulosa é deficiente na atividade da 17 α -hidroxilase, tornando esta zona incapaz de sintetizar cortisol ou androgênios. A progesterona é hidroxilada no carbono 21 (pela enzima CYP21A2) formando 11-desoxicorticosterona (DOC), que é hidroxilada, pela ação de 11 β -hidroxilase da enzima CYP11B2, produzindo corticosterona. A corticosterona, por sua vez, dá origem à aldosterona através da atividade de aldosterona sintase, também exercida pela enzima CYP11B2. A secreção de aldosterona é regulada primariamente pelas concentrações de renina, angiotensina e potássio sérico (Nimkarn e New, 2008).

Na via dos andrógenos, a enzima CYP17 atua como 17,20-liase, convertendo a 17-hidroxipregnenolona e a 17-hidroxiprogesterona nos andrógenos desidroepiandrosterona (DHEA) e Δ 4-androstenediona, respectivamente (Fig. 6). O DHEA pela ação da HSD3B2 dá origem à Δ 4-androstenediona, que é reduzida à testosterona pela enzima 17-cetoesteróide redutase (New *et al.*, 1989; White e Speiser, 2000).

Das cinco enzimas chaves para a esteroidogênese, quatro, a 21-hidroxilase, a 11-hidroxilase, a 18-hidroxilase e a 20,22-desmolase, pertencem à família das citocromo P450.

A ENZIMA 21-HIDROXILASE

A CYP21A2 humana é uma enzima do tipo citocromo P450 e foi purificada pela primeira vez por Kominami *et al.* (1980) a partir de microssomos do córtex adrenal de bovinos. Nesse trabalho ficou estabelecida a atividade frente aos substratos 17-hidroxiprogesterona e progesterona, sendo observada uma maior atividade na hidroxilação C-21 da 17-hidroxiprogesterona para produzir o cortisol. Foi ainda na década de 80 que a interação da 21-hidroxilase com a P450 oxidorreductase ficou comprovada (Kominami *et al.*, 1984). A 21-hidroxilase catalisa a hidroxilação da 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) em 11-desoxicortisol (11-DOC) e converte progesterona

(P) em desoxicorticosterona (Fig. 7). Quando produzida em células de mamífero, a enzima recombinante humana apresenta cinéticas diferentes frente a cada um dos substratos, sendo o K_m para a 17-OHP de 1,2 μM e para a progesterona, de 2,8 μM . Ainda, a V_{max} para a hidroxilação da 17-OHP é duas vezes maior que para a progesterona (Tusie-Luna *et al.*, 1990).

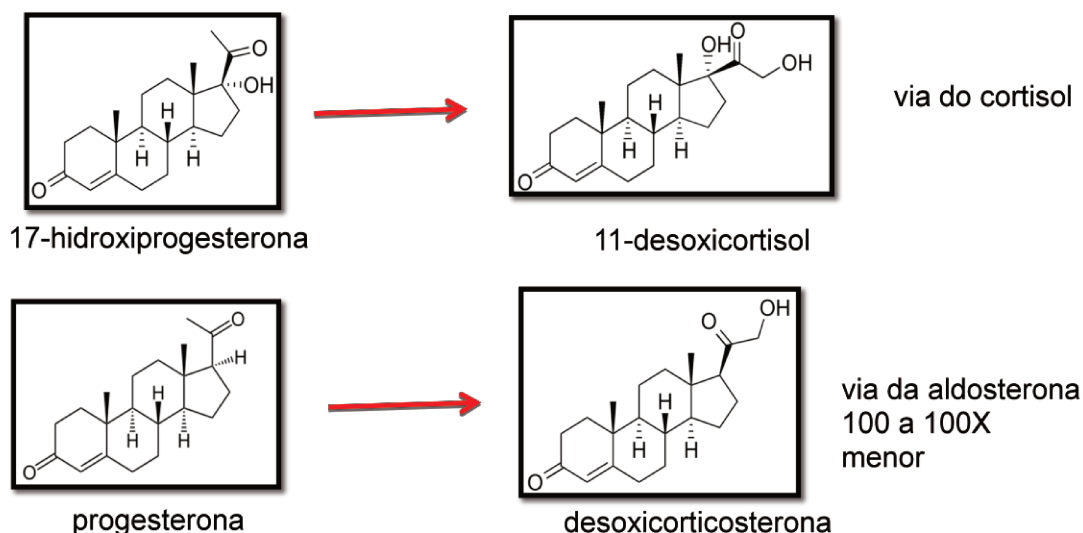


Figura 7 - Esquema das reações catalisadas pela enzima CYP21A2 na via de síntese do cortisol (superior) e da aldosterona (inferior). (Jag, 2005)

Ainda nos anos 80, a sequência de aminoácidos da enzima 21-hidroxilase suína foi determinada (Haniu *et al.*, 1987). Com um conteúdo de 492 aminoácidos, corresponde a uma massa molecular de aproximadamente 55 kDa. Possui um total de nove resíduos de cisteína, sete dos quais, estavam localizados no terminal amino da enzima e dois no terminal carboxílico, um dos quais, localizado no sítio de ligação do grupamento heme, altamente conservado entre todas as enzimas do tipo citocromo P450.

A CYP21 humana, mais tarde denominada CYP21A2, é formada por 494 ou 495 resíduos de aminoácido, dependendo da presença ou ausência de um resíduo de leucina entre as posições 9 e 10, e apresenta uma massa molar de 52 KDa (Higashi *et al.*, 1986; White *et al.*, 1986; Rodrigues *et al.*, 1987). É sintetizada no córtex da adrenal e participa da via metabólica de síntese de cortisol e aldosterona (revisado em White e Speiser, 2000). O alinhamento das sequências de aminoácidos de muitas P450s identificou um pequeno número de resíduos fortemente conservados, que se presume serem importantes

para a função catalítica e para a topologia de membrana (Nelson e Strobel, 1989; Black, 1992). No entanto, as primeiras estruturas tridimensionais de enzimas P450 foram deduzidas a partir de estudos cristalográficos de raios-X de P450s bacterianas, devido à dificuldade de cristalização das proteínas de membrana. A P450cam (CYP101, cânfora 5-exo-hidroxilase de *Pseudomonas putida*) foi a primeira a ser estudada, pois é uma molécula solúvel, mas com pouca semelhança na estrutura primária (cerca de 15%) com as P450s eucarióticas (Poulos, 1991). Por outro lado, a P450BM-3 de *Bacillus megaterium*, agora denominada CYP102, é uma proteína mais complexa que guarda uma similaridade de 35% às eucarióticas (Ruettinger *et al.*, 1989). O domínio P450 dessa enzima é 25-30% idêntico aos das famílias CYP4 e CYP52 eucarióticas e aproximadamente 20% idêntico ao da CYP21A2 (White e Speiser, 2000). Este domínio foi objeto de análises cristalográficas (Ravichandran *et al.*, 1993) e serviu de molde para o primeiro modelamento tridimensional da CYP21A2 (Lewis e Lee-Robichaud, 1998). As sequências dos sítios de ligação aos substratos das P450s que metabolizam os esteroides se assemelham aos locais de ligação ao substrato de todas P450s em geral. Assim, comparações das sequências de 21 e 17-hidroxilase e colesterol demolase (CYP21, CYP17, CYP11A) identificaram duas áreas altamente conservadas, uma próxima ao N-terminal (Q53 a R60 na CYP21) e outra próxima ao C-terminal (L342 ao V358 na CYP21) (White, 1987; Picado-Leonard e Miller, 1988). A estrutura da CYP102 confirmou parte da primeira porção como uma cavidade que constitui o sítio de ligação ao substrato.

Embora, este modelo não possa ser considerado tão preciso quanto modelos análogos obtidos com enzimas como CYP19 (aromatase) (Graham *et al.*, 1995) ou CYP17 (17-hidroxilase), quando se tomam por base as considerações termo-dinâmicas (Auchus e Miller, 1999), algumas análises e estudos funcionais de CYP21A2 que se basearam neste modelo foram aceitos como válidos (Lewis e Lee-Robichaud, 1998; Mornet e Gibrat, 2000).

Mais recentemente, um modelo de CYP21A2 foi descrito com base na CYP2C5 de coelho (Robins *et al.*, 2006), a primeira estrutura eucariótica de proteína de membrana a ser resolvida e depositada no banco RCSB Protein Data Bank

(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) sob número de acesso 1DT6 (Williams *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002; Wester *et al.*, 2003).

No estudo da estrutura da CYP21A2 baseado na da CYP2C5 de coelho ficou demonstrado que, de forma geral, dada a similaridade entre as duas proteínas, a estrutura da CYP21A2 é compatível com a CYP2C5, sendo que a maioria dos elementos da estrutura secundária se mostrava conservada, com poucas exceções, a saber: 1) o final da hélice B não era compatível com o que se define como estrutura secundária; 2) a folha β 1-5 formada por dois resíduos não forma a estrutura β ; 3) a hélice F é menor no modelo CYP21A2 do que na estrutura CYP2C5; e, 4) a região 215-219 da hélice G forma um loop somente no modelo de Robins *et al.* (2006). Neste caso ficou também demonstrado que o sítio de ligação ao grupo heme ficava entreposto entre as hélices I (no interior da proteína) e L (no exterior), onde cerca de 60% dos resíduos são conservados entre a CYP21A2 e CYP2C5, porém apresentam 30% de identidade sequencial (Robins *et al.*, 2006). A estrutura do modelo gerado para a CYP21A2 foi depositada no banco RCSB Protein Data Bank sob o número de acesso 2GEG (Fig. 8).

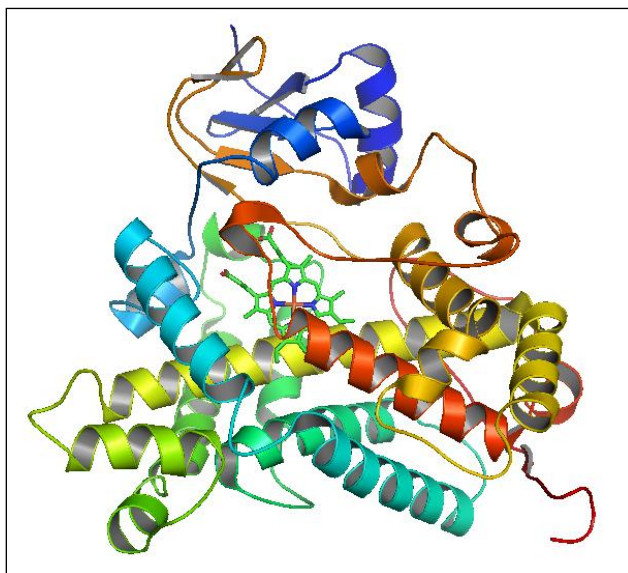


Figura 8 – Estrutura da CYP21A2 humana (2GEG) obtido por modelamento através da comparação com a estrutura cristalizada da enzima CYP2C5 de coelho (1DT6) (Robins *et al.*, 2006).

Sabendo-se que o grupamento ferro-heme é crítico para a função catalítica das P450s, a região de sua ligação foi analisada cuidadosamente, das seis posições de

coordenação, quatro estabelecem interações com o anel protoporfirina. Uma das duas outras posições axiais coordena-se com o grupo sulfidril da cisteína (C428 na CYP21A2), que está localizada na região altamente conservada e que se liga ao grupamento heme, próximo ao C-terminal, já citada anteriormente. Por esta razão qualquer mutação no C428 da CYP21A2 destruirá completamente a atividade enzimática (Wu e Chung, 1991). Da mesma forma, a maioria dos resíduos que compõem o sítio de ligação ao heme é conservada entre as duas estruturas.

De uma forma geral, ficaram estabelecidas as regiões de estruturas secundárias e os domínios de ligação aos substratos e ao grupamento heme (Fig. 9).

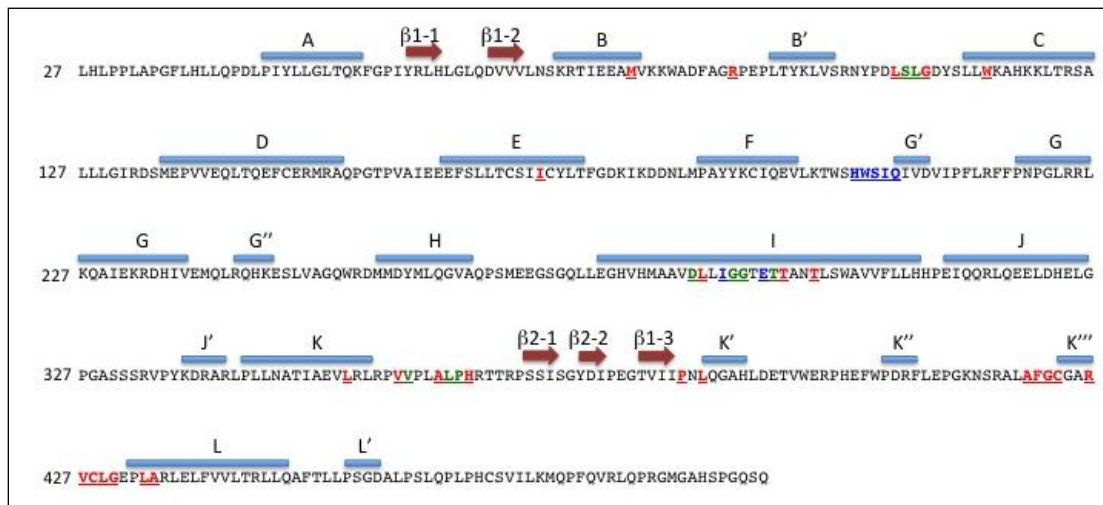


Figura 9 - Características secundárias da estrutura da CYP21A2 modelada com base nas CYP2C5, CYP51 e CYP2B4. As barras azuis representam as alfa-hélices e as setas marrons as folhas beta. Os resíduos em vermelho são os envolvidos na ligação com o grupamento heme, os em azul compõem o sítio de ligação aos esteroides e os em verde se ligam tanto ao esteroide quanto ao heme (adaptado de Robins *et al.*, 2006).

Em relação ao sítio de ligação do substrato, o modelo foi obtido por comparação à CYP51, cuja estrutura complexada ao substrato havia sido resolvida (Podust *et al.*, 2004). Os 16 resíduos incluídos nesta região estão discriminados na Tabela 1. A maioria destes resíduos é hidrofóbica, o que facilita a interação com o substrato. Como os substratos das P450s, os esteróides, são moléculas relativamente hidrofóbicas, os sítios de ligação a esses substratos devem primariamente se constituir de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. A maioria dos resíduos descritos na Tabela 1 é hidrofóbica e, portanto, devem contribuir com as interações com os substratos. Os ligantes do outro eixo do

grupamento heme são os da ligação à molécula de água e ao O₂. A molécula de água é ligada em paralelo ao eixo de coordenação com o átomo de ferro. A molécula de água se encaixa na região ácida que é conservada na hélice “I” adjacente (aspartato e glutamato) e no resíduo de treonina (E294 e T295 na CYP21A2). Mutações na treonina correspondente em outras P450s destroem ou causam danos graves na atividade enzimática (Raag *et al.*, 1991; Curnow *et al.*, 1993).

Tabela 1: Resíduos importantes no sítio ativo de ligação ao esteroide na enzima CYP21A2 (Robins *et al.*, 2006).

Resíduos*	Localização
S108 - L109	<i>loop</i> entre as hélices B' e C
H203 - W204 - S205 - I206 - Q207	<i>loop</i> de conexão entre as hélices F e G'
D287 - I290 - G291 - G292 - E294 - T295	parte central da hélice I
V359 - L363 - P364	Loop entre a hélice K e a folha β 1-4

*A numeração se refere à isoforma com 5 leucinas entre as posições 9 e 10.

A CYP21A2 interage com a citocromo P450 NADPH oxidorreductase (CYPOR) para sua ação enzimática (Kominami *et al.*, 1984). Por analogia aos sítios de interação com enzimas acessórias das enzimas CYP2B4 e CYP17, considera-se que os resíduos descritos na tabela 2 sejam os que diretamente interagem com a coenzima no caso da CYP21A2 (Auchus e Miller, 1999; Geller *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2003). Estes sete resíduos estão localizados na superfície da proteína, arranjados espacialmente em um plano paralelo ao do grupamento heme e no lado oposto do esteroide.

Tabela 2: Resíduos importantes na CYP21A2 para interação com a coenzima (Robins *et al.*, 2006).

Resíduos*	Localização
K117, K121	hélice C
R132	hélice D
K414	<i>loop</i> entre a hélice K'' e K'''
R426	Hélice K'''
R435	Hélice L
R339	Hélice J'

*A numeração se refere à isoforma com 5 leucinas entre as posições 9 e 10.

Recentemente, um grupo de pesquisadores americanos e japoneses cristalizaram a CYP21A2 bovina (Fig. 10), que guarda uma similaridade de 79% com a humana. Mediante a inserção de duas mutações que não afetaram sua atividade enzimática, produziram uma enzima à qual deram a denominação de C3B21RA (Zhao *et al.*, 2012). Esta construção apresentou atividade frente aos dois substratos (progesterona e 17-OH-progesterona). A estrutura obtida foi a do complexo enzima - 17-hidroxiprogesterona, numa resolução de 3,0 Å. O empacotamento da proteína se mostrou semelhante aos das outras CYPs obtidas anteriormente, inclusive ao do modelo descrito por Robins *et al.* (2006), sendo que a maior diferença foi registrada nas regiões de *loop*, onde o modelo de Robins *et al.* (2006) apresentava maior divergência de sequência com a estrutura da proteína utilizada como modelo. O implemento na resolução das regiões de ligação ao substrato, porém, também foi importante, porque no modelo anterior, o substrato era o estriol e, no modelo recente, o substrato cristalizado junto com a proteína foi a 17-hidroxiprogesterona, substrato natural da enzima CYP21A2.

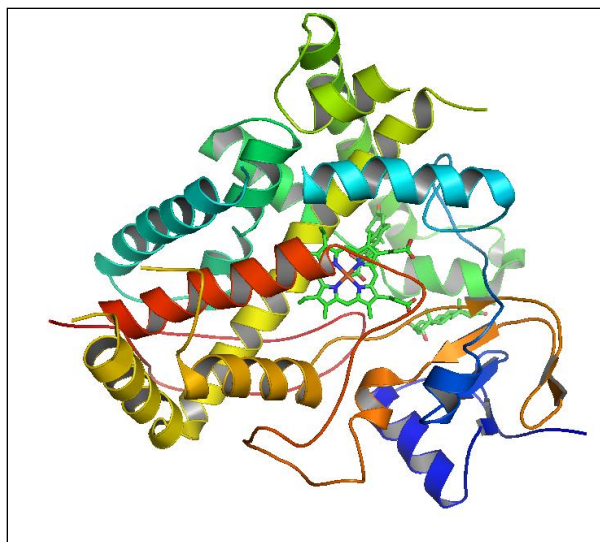


Figura 10 – Estrutura da CYP21A2 bovina (PDB ID:3QZ1) obtido por difração de raio-X (adaptado de Zhao *et al.*, 2012).

Um modelo da CYP21A2 humana foi obtido utilizando a estrutura cristalizada bovina (Haider *et al.*, 2013). A estrutura não diferiu muito das anteriores, contendo 16 alfa-hélices e 9 folhas beta. Neste modelo, 35 resíduos ficaram posicionados a no máximo de 5 Å do grupamento heme e duas regiões de ligação ao substrato 17-hidroxiprogesterona ficaram bem definidas. Uma região se localiza na frente da hélice I e sobre o sítio de ligação ao grupo heme. Os resíduos V100, S108, L109, V197, L198, W201, I230, R233, V286, D287, G291, T295, V359, L363, S468, and V469 a no máximo de 5 Å desta cavidade de ligação ao substrato. Por outro lado, há outra região de ligação mais distal incluindo os resíduos L39, L63, G64, L65, Q66, V68, P94, Q207, D210, V211, L361, A362, P364, V383, I385, V440 e C467 (Haider *et al.*, 2013).

HIPERPLASIA CONGÊNITA DA ADRENAL

A Hiperplasia Congênita da Adrenal (HCA) é causada por deficiência da atividade de qualquer uma das enzimas necessárias para a síntese de cortisol (Fig. 6). Os resultados dessas deficiências enzimáticas são a diminuição da produção de cortisol com o aumento da secreção de ACTH (New, 1998). A estimulação excessiva pelo ACTH

causa a hipertrofia da zona fasciculada e reticular e consequente hiperplasia típica da adrenal e um aumento do nódulo da adrenocortical (Witchel e Azziz, 2011).

Dentre as principais formas de HCA, se destaca a deficiência da 21-hidroxilase (21-OHD), que ocorre em cerca de 90% dos casos. Na maioria das populações, a deficiência da 11 β -hidroxilase (11 β -OHD) compreende em torno de 5-8% dos casos (Zachmann *et al.*, 1983) e da 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) em aproximadamente 1% dos casos de hiperplasia congênita da adrenal, com uma incidência de 1 para 100.000 nascimentos, sendo estas duas últimas mais frequentes em populações que apresentam grande número de casamentos consangüíneos (Al-Jurayyan, 1995).

Deficiência de 21-hidroxilase

A deficiência da 21-hidroxilase é clinicamente classificada em duas formas: na forma clássica, presente ao nascimento, ocorre o bloqueio total ou parcial da atividade enzimática e na forma não clássica envolve o bloqueio parcial da atividade enzimática, sendo geralmente menos grave que a forma clássica, podendo se manifestar mais tardiamente, ou mesmo permanecer assintomática (Speiser e New, 1985; Lajic e Wedell, 1996).

A forma clássica da enzima 21-OHD se caracteriza pelo excesso de produção de andrógenos que leva à virilização de fetos do sexo feminino. Esta forma da doença foi subdividida em duas variantes, a perdedora de sal (PS), na qual os indivíduos afetados, além da virilização, apresentam perda de sal devido à deficiência da síntese de aldosterona; e a virilizante simples (VS) onde não há perda de sal (New e Levine, 1984; New, 1994). O efeito do bloqueio enzimático na síntese de mineralocorticóides resulta na forma PS de 21-OHD, pois a não produção de aldosterona leva à perda de sal, desidratação e hipotensão arterial (Zachmann *et al.*, 1983, Levine *et al.*, 1980; Rösler *et al.*, 1982).

O gene da 21-hidroxilase (*CYP21A2*) se localiza no braço curto do cromossomo 6, na região do complexo principal de histocompatibilidade (HLA), adjacente aos *loci C4A* e *C4B*, os quais codificam para o quarto componente do complemento (Dupont *et al.*,

1977; Dupont *et al.*, 1980). Assim como várias enzimas da família CYP450, para a CYP21A2 existem duas cópias gênicas, *CYP21A2* (forma ativa) e *CYP21A1P*, um pseudogene não funcional (White e Speiser, 2000). Os genes *CYP21A2* e *C4* são alternados entre si e são transcritos na mesma direção. O gene *CYP21A2* contém 10 éxons, cobrindo uma região cromossômica de 2,7 kb. Embora *CYP21A2* e *CYP21A1P* tenham aproximadamente 98% de homologia, *CYP21A1P* é um pseudogene por apresentar mutações deletérias (White e Speiser, 2000). Uma consequência da organização em tandem dos genes *CYP21* e *C4* é que esta favorece eventos de *crossing-over* desigual nessa região (White e Speiser, 2000; Strachan, 1991). Portanto, a recombinação das unidades mal pareadas durante a meiose I pode levar à formação de gametas com um número variável de unidades completas (Werkmeister *et al.*, 1986). Realmente, a variação no número de cópias gênicas (CNVs – *copy number variation*) neste loco tem sido reportada por três autores (Yang *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2002; Parajes *et al.*, 2008).

Assim, o primeiro defeito molecular observado no gene *CYP21A2* e relacionado com HCA foi uma deleção de 30 kb incluindo o gene *CYP21A2* e o *C4B* (Carrol *et al.*, 1985; Rumsby *et al.*, 1986). Em seguida foram descritos eventos de conversão (Harada *et al.*, 1987; Urabe *et al.*, 1990). No entanto, alelos não relacionados com a doença podem apresentar deleções de 30 kb também, mas neste caso envolvem o pseudogene e o gene *C4A* ou *C4B*, e duplicações caracterizando a variabilidade numérica do locus (Yang *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2002; Parajes *et al.*, 2008).

As deleções e conversões em larga escala, que geralmente formam genes híbridos *CYP21A1P/A2*, são encontrados em apenas 8-12% dos alelos nos casos de deficiência da 21-hidroxilase no Brasil (de-Araújo *et al.*, 1996; Bachega *et al.*, 1999; Bachega *et al.*, 2004). Para os alelos portadores de deleção, por sua vez, foram identificados nove haplótipos diferentes indicando uma variabilidade alélica para esse tipo de mutação entre os pacientes (Coeli *et al.*, 2010). Por outro lado, pequenas deleções, inserções e trocas pontuais de nucleotídeos, normalmente presentes no pseudogene e consideradas microconversões, representam de 73 a 77% dos alelos ficando em média 15% atribuídos a mutações mais raras (Bachega *et al.*, 1998; Paulino *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2003). Algumas destas mutações, no entanto, estão, geralmente, ausentes nos alelos *CYP21A1P*,

podendo representar um efeito fundador em determinadas populações (banco de mutações: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm>).

São nove as mutações encontradas no *CYP21A1P* que podem, individualmente ou em grupos, afetar o gene *CYP21A2*, provocando danos com diferentes graus de gravidade à função enzimática normal (Krone e Arlt, 2009). O efeito funcional de cada microconversão foi investigado *in vitro*, introduzindo-as por mutagênese sítio dirigida no cDNA do gene *CYP21A2*, clonado num vetor apropriado, e avaliando-se sua expressão. Vários sistemas de expressão foram usados, tais como transfecção com plasmídios em células de mamíferos, infecção de células de mamíferos com vírus da vaccinia ou mesmo expressão em bactérias ou leveduras (Higashi *et al.*, 1988; Chiou *et al.*, 1990; Hu e Chung, 1990; Tusie-Luna *et al.*, 1990; Higashi e Fujii-Kuriyama, 1991; Tusie-Luna *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1991; Wu e Chung, 1991; Helmberg *et al.*, 1992; Kohn *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1996; Lajic *et al.*, 1997; Nikoshkov *et al.*, 1997; Nikoshkov *et al.*, 1998). Em geral, os resultados relativos aos efeitos de uma mutação particular sobre a atividade enzimática não dependem do método usado para a expressão, visto que é feita uma comparação com alguns controles. As mutações do tipo *frameshift* e mutações *nonsense* alteram drasticamente a estrutura e a função da proteína, abolindo completamente a atividade enzimática. Essas mutações estão associadas com a forma clínica mais grave, perdedora de sal. No entanto, as mutações do tipo *missense* podem provocar graus variados de atividade enzimática e, portanto, dependendo do genótipo, podem dar origem a diversas formas fenotípicas da deficiência da 21-hidroxilase.

Levando-se em conta o duplo heterozigoto, o fenótipo deve ser deduzido por aquela que determinar menor dano à atividade enzimática. Assim, a forma clínica PS seria determinada pela combinação de duas mutações graves, a VS por uma grave e uma intermediária ou por duas intermediárias e a não clássica por duas mutações brandas ou uma branda combinada com uma grave ou uma intermediária. Há, entretanto, vários portadores da deficiência que não se enquadram neste padrão (Miller, 1991; Mornet *et al.*, 1991), isso devido a uma variação individual nos níveis da síntese das enzimas mutantes ou no catabolismo, ou ainda na variação da excreção dos vários hormônios esteroides (Mornet *et al.*, 1991).

O fenótipo VS é devido a uma mutação da enzima 21-hidroxilase que afeta a atividade da 17-OHP e mantém a produção da aldosterona relativamente intacta. Assim, a causa mais provável da diferença fenotípica entre as formas VS e PS, é a diferença da atividade de 21-hidroxilase frente aos substratos progesterona e 17-OHP. Como a aldosterona é normalmente secretada numa razão de 100-1000 vezes menor do que o cortisol, torna-se evidente que a atividade da 21-hidroxilase terá que diminuir a níveis extremamente baixos para que a falta de aldosterona se manifeste. Assim, a síntese de aldosterona ocorre com 1% de atividade normal da 21-hidroxilase, evitando a perda de sal e resultando num fenótipo VS (White e Speiser, 2000). A microconversão associada a esse fenótipo é a Ile172Asn, que mantém cerca de 1% de atividade da enzima 21-hidroxilase (Amor *et al.*, 1988; Chiou *et al.*, 1990).

Nos pacientes com a forma clássica de hiperplasia, a conversão da progesterona e da 17-OHP é feita pelo caminho alternativo e resulta em andrógenos, como a diidrotestosterona (DHT). No caminho alternativo, 17-OHP é transformado pela atividade 17-20-liase da P450c17, 17- β hidroxisteroide desidrogenase, e posteriormente pela 5 α -reductase, resultando na síntese da diidrotestosterona. Nos fetos femininos acometidos, a elevação dos níveis de 17-OHP causa o aumento na biossíntese de DHT, contribuindo para a ambiguidade genital (Witchel e Azziz, 2011).

A forma não clássica (NC) é associada com sintomas menos acentuados de hiperandrogenismo. Esta forma é causada pela deficiência de 21-hidroxilase e níveis baixos de precursores dos esteróides da adrenal. As manifestações clínicas de baixos níveis de andrógenos são variáveis. Indivíduos do sexo feminino usualmente nascem com genitália externa normal (clitoromegalia pode eventualmente ser observada), podendo ocorrer sinais de excesso de andrógenos no desenvolvimento pós-natal em ambos os sexos. Crianças com essa forma da doença apresentam crescimento dos pêlos pubianos, puberdade precoce e aceleração do crescimento, associada ao avanço da idade óssea (Araújo *et al.*, 2007). No sexo feminino, podem se manifestar sintomas, tais como: calvície temporal, menarca atrasada, ovário policístico e irregularidades menstruais. Em adultos, pode-se encontrar acne cística, fertilidade reduzida e baixa estatura pela fusão prematura da epífise. Os estudos de famílias com indivíduos afetados podem revelar portadores assintomáticos (New, 2006; Gonçalves, 2007).

A associação entre a forma clínica e a classe da mutação patológica discutida em trabalhos é geralmente concordante, mas a distinção entre as formas VS, PS e NC não é absoluta (Sinnott *et al.*, 1992; Speiser *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1995a; Koppens *et al.*, 1998; Krone *et al.*, 2000).

Foram descritas 130 mutações raras pontuais que são independentes do pseudogene, descritas na população ou em algumas famílias separadas (Minutolo *et al.*, 2011). O efeito funcional de cada mutação *missense* foi investigado *in vitro* introduzindo-as por mutagênese sítio dirigida no cDNA do gene *CYP21A2* clonado num vetor apropriado e avaliando sua expressão. A maneira mais simples para comparar são os estudos para saber se a mutação reduz drasticamente ou parcialmente a atividade enzimática. A melhor forma de se medir a quantidade de reação é fazer o teste de atividade da proteína mutante em relação à nativa.

Algumas mutações *missense* no gene *CYP21A2* alteram a cinética enzimática. As enzimas mutantes são sintetizadas, mas são menos eficientes que a proteína nativa (Witchel e Azziz, 2011). As estratégias para analisar a atividade das enzimas mutantes envolvem a clonagem dos genes *CYP21A2* mutantes e normais, transfecção e expressão desses genes em células *COS* e análise quantitativa da atividade dos produtos enzimáticos formados frente aos seus substratos (Kawamoto *et al.*, 1992, Naiki *et al.*, 1993, Nikoshkov *et al.*, 1997, Lajic *et al.*, 2002).

Diversas mutações foram encontradas nas regiões de ligação ao substrato e causam danos severos à atividade da proteína. Na região conservada, próxima ao N-terminal, foram encontradas duas mutações, a p.Gli56Arg e a p.Tir60Asn, ambas associadas à forma clássica da 21-OHD. A mutação p.Gli56Arg (c.166G>A) foi identificada no alelo paterno de uma paciente com a forma virilizante simples da HCA. Ela estava em heterozigose composta com a mutação IVS2-13A/C>G, que é derivada do pseudogene e é considerada geralmente forma perdedora de sal. A mutação p.Gli56Arg não apresentou atividade enzimática com a 17OHP, mas apresentou 1,4% de atividade usando a progesterona como substrato o que a coloca na faixa das mutações não perdedoras de sal (Soardi *et al.*, 2008). Em relação à estrutura protéica, há evidências que o resíduo 56 é altamente conservado em proteínas CYP21 de mamíferos e sua localização está entre duas regiões de contato com a membrana. A p.Gli56Arg muda um resíduo

neutro para um hidrofílico básico na região da superfície, o que provavelmente altera a interação com a membrana (Willians *et al.*, 2000). Na região conservada do C-terminal foram encontradas diversas outras mutações, sendo que a maioria causou perda severa da atividade enzimática (p.Arg342Tri, p.Arg342Pro, p.Glu352Lis, p.Leu354Arg, p.Arg355His, p.Arg355Cis, p.Arg357Pro, p.Arg357Gln, p.Arg357Tri).(Soardi *et al.*, 2008)

A mutação rara p.Glu351Lis no gene CYP21A2 foi encontrada em um paciente do sexo masculino com a forma virilizante simples de HCA. A mutação p.Glu351Lis pontual está localizada na tríade ERR da CYP21A2. A tríade ERR é o motivo glutamina-arginina-arginina conservado em todas as sequências das citocromos P450. O resíduo glutamina e a primeira arginina são conservados em todas as enzimas do citocromo P450s. Assim a segunda arginina pode estar presente também como histidina ou asparagina. Entretanto a tríade ERR esta envolvida em algumas etapas de ligação ao grupamento heme pela monoxigenase citocromo P450, o que faz com que a mutação p.Glu351Lis cause perda severa, mas não completa da atividade enzimática da CYP21A2. A análise funcional em células COS-7 revelou uma redução da conversão de 17-OHP em 11-desoxicortisol, com atividades de 1,1+/-0,5%, e da progesterona em 11-deoxicorticosterona, com atividade de 1,2+/-0,3% em relação a proteína normal. Analisando os mutantes artificiais (p.Glu351Asp, p.Glu351Ile), qualquer mutação nesse resíduo não causa a recuperação da atividade de 21-hidroxilase *in vitro*. Esses efeitos podem ser explicados pelas mudanças estruturais induzidas pelas mutações, que foi demonstrada no modelo tridimensional da estrutura da proteína CYP21A2. A combinação da função da enzima *in vitro* e a análise da proteína computadorizada do resíduo 351 da proteína CYP21A2 ocorre a partir da evidência da tríade ERR como fundamental elemento na estrutura das enzimas citocromo P450s (Krone *et al.*, 2005).

Uma mutação derivada do pseudogene é frequente entre os pacientes com 21-OHD é a p.Arg356Tri (Chiou *et al.*, 1990). Outras duas mutações foram encontradas nessa região no mesmo aminoácido, Arg 356, que foram estudadas por Lajic *et al.* (1997). As duas mutações, p.Arg356Pro e p.Arg356Gln, foram reconstruídas por mutagênese sitio dirigida *in vitro*, as proteínas foram expressas em COS-1, e a atividade enzimática foi determinada nos dois substratos naturais, 17-OHP e progesterona. O

mutante p.Arg356Pro reduziu a atividade enzimática para 0,15% em ambos os substratos, enquanto que o p.Arg356Gln exibiu 0,65% da atividade normal com a 17-OHP e 1,1% da atividade normal com a progesterona, ambas características da forma perdedora de sal. Essas atividades correspondem aos níveis de manifestação da doença encontrados nos pacientes com forma clássica perdedora de sal. A Arg 356 está localizada na região que faz parte da interação para a reação redox, de acordo com a modelagem da estrutura dos dois outros membros da superfamília de citocromo P450 (Lajic *et al.*, 1997).

Como já dito antes, os resíduos 342 ao 358 têm sido sugeridos como região de ligação aos esteróides (Picado-Leonard *et al.*, 1988). A sequência do sítio de ligação aos esteróides necessita da carga do aminoácido arginina 356 (Picado-Leonard *et al.*, 1988). A alteração de Arg para Tri pode não ser drástica para o enovelamento da proteína, ainda que destrua a capacidade da enzima se ligar ao esteróide (Chiou *et al.*, 1990).

Na região de ligação das proteínas acessórias foram também encontradas mutações que foram analisadas bioquímica e estruturalmente. As P450s microsossomais e mitocondriais aceitam elétrons das citocromo P450 oxidoreductase ou adrenodoxina, respectivamente. Em ambas as reações químicas, os estudos sugerem que os aminoácidos básicos (geralmente lisina) das P450s interagem com os resíduos ácidos das proteínas acessórias. Os estudos cristalográficos da CYP102 sugerem um encaixe no sítio da redutase formado em parte pelas hélices B, C, D, J9 e K. A hélice K se pensava anteriormente interagir com o substrato. Estudos feitos pela mutagênese da CYP11A mostram que uma modificação em qualquer um dos dois resíduos de lisina na hélice K destrói a atividade enzimática sem afetar a ligação com o substrato (Wada e Waterman, 1992), semelhante a estudos com a CYP17, que a mutagênese da arginina na região perturba as interações com a citocromo P450 redutase e citocromo b5 (Geller *et al.*, 1999). Como citado anteriormente, existem algumas mutações que ocorrem naturalmente nas argininas (R354 e R356) dessa região, na CYP21A2, que diminuem drasticamente a atividade enzimática (Chiou *et al.*, 1990; Lajic *et al.*, 1997; Lobato *et al.*, 1999). Apenas dois resíduos básicos, um na hélice K e o outro no peptídeo de ligação ao heme (R323 e R398 em CYP102), correspondentes aos R354 e R426 na CYP21A2, são completamente conservados em todos os P450s de eucariotos, sugerindo que outros resíduos

positivamente carregados que não são completamente conservados possam ser necessários para a ligação às proteínas acessórias (Shimizu *et al.*, 1991).

Em estudo de Baumgartner-Parzer *et al.* (2001), cerca de 1,2% dos 165 pacientes relatados não possuíam nenhuma mutação já descrita (White e Speiser, 2000; Morel e Miller, 1991; Speiser *et al.*, 1992; Wedell *et al.*, 1994; Krone *et al.*, 2000). Os sequenciamentos completos do DNA de um dos pacientes que não possuíam nenhuma mutação já descrita e de suas duas irmãs afetadas revelaram que possuíam uma grande deleção no gene no alelo paterno e a mutação ainda não descrita p.Arg426His no gene CYP21A2 do alelo materno, correspondendo a 0,6% dos 168 alelos não caracterizados causadores de HCA. A atividade do mutante p.Arg426His é fortemente diminuída para 5,2% do normal. Esse resultado corresponde a grau de manifestação da doença de pacientes com a forma clássica da HCA. Quando introduzida na sequência e expressa em culturas de células, a mutação p.Arg426His não apresentou atividade enzimática frente ao substrato 17-OH-progesterona comparando à proteína nativa. As três irmãs diagnosticadas com HCA clássica apresentaram virilização acentuada da genitália externa (Prader IV, sem crises de perda de sal), com o alelo paterno com uma grande deleção no gene CYP21, sem outro defeito no alelo materno além da mutação p.Arg426His.

Nos primeiros de trabalhos de triagem de mutações (Lau *et al.*, 2001, Soardi *et al.*, 2008), realizados em nosso grupo de pesquisa, foram encontradas dez mutações que não eram derivadas do pseudogene, duas do tipo *frameshift*; uma nonsense; uma alterando o sítio doador e uma o sítio receptor de *splicing* no íntron 2; uma troca nucleotídica no íntron 7 e cinco do tipo *missense*. O estudo das atividades residuais das cinco mutações do tipo *missense* demonstrou seus efeitos deletérios (Soardi *et al.*, 2008). No entanto, conforme a casuística era ampliada, novas mutações foram identificadas, para as quais havia necessidade do estudo de atividade residual. São elas: p.Ser113Phe, p.Pro267Leu, p.Val358Ile, p.Arg426Cys e as combinações p.Ile172Asp+p.Val358Ile e p.Val281Leu+p.Arg426Cys. Estas foram investigadas no presente trabalho.

Deficiência da 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase

A enzima 3 β -HSD em geral está ligada à membrana e precisa do NAD⁺ como coenzima para catalisar a desidrogenação da 3 β -hidroxiesteroide e a $\Delta^5 \rightarrow 4$ isomerização dos precursores esteroides da pregnenolona, 17-hidroxipregnenolona (17OH- Preg), dehidroepiandrosterona (DHEA), e androst-5-eno-3- β , 17 β -diol (Δ_4^5 -diol) para progesterona (P), 17 α -hidroxiprogesterona (17-OHP), Δ^4 androstenediona (Δ^4 -Dione), e testosterona (T), respectivamente (Rhéaume *et al.*, 1991; Lachance *et al.*, 1990; Lorence *et al.*, 1990; Rhéaume *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 1991; De Launoit *et al.*, 1992). Em adição, essas enzimas catalisam a degradação da 5 α -pregnanes e 5 α -androstanes, tais como a diidrotestosterona (DHT).

Todos os membros das 3 β -HSD, exceto os do tipo 4, possuem atividade desidrogenase e isomerase irreversível. A atividade desidrogenase dez vezes mais lenta é o passo limitante, mas a 3 β -HSD e a isomerase tem sido purificadas como uma proteína única na placenta humana, testículos e glândulas adrenais de rato e glândulas adrenais de boi (Luu-The *et al.*, 1988; Thomas *et al.*, 1988). O isolamento do cDNA e das isoenzimas tipo I e II da expressão *in vitro* humana foi confirmado que as atividades 3 β -HSD e Δ^5 - Δ^4 isomerase funcionam como uma proteína única. Entretanto, dados obtidos com experimentos de radiomarcção por afinidade (Thomas *et al.*, 1992) e inibição (Luu-The *et al.*, 1991) são consistentes com sítios catalíticos bifuncionais que adotam uma conformação diferente para cada atividade. A enzima inicia a reação de 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase usando o coenzima NAD⁺. A coenzima em sua forma reduzida, NADH, que é resultante da atividade desidrogenase, ativa a isomerase por indução de mudança conformacional da proteína 3 β -HSD (Thomas *et al.*, 1995).

A estrutura e a expressão tecido-específica foram caracterizadas em dois tipos de cDNAs de 3 β -HSD humana, codificando isoenzimas denominadas do tipo I e do tipo II, que possuem homologia de 93,5% entre si (Luu-The *et al.*, 1989; Lorence *et al.*, 1990; Rhéaume *et al.*, 1991). O gene do tipo I (*HSD3B1*) codifica uma isoenzima de 372 aminoácidos que é expressa predominantemente na placenta e tecidos periféricos, tais como pele e glândulas mamárias, enquanto o gene do tipo II (*HSD3B2*) codifica uma isoenzima de 371 aminoácidos que é quase exclusivamente expressa nas adrenais e nas

gônadas (Rhéaume *et al.*, 1991). A estrutura completa de cada gene foi determinada e indica a presença de quatro éxons e três introns presentes num fragmento genômico de cerca de 7,8 kb (Lachance *et al.*, 1990, 1991, 1992; Lorence *et al.*, 1990). Os genes *HSD3B1* e *HSD3B2* foram mapeados por hibridização *in situ* na região 1p13.1 do cromossomo 1 (Morrison *et al.*, 1991; Bérubé *et al.*, 1989).

Embora a deficiência da 3 β -HSD na forma clássica seja rara, consistindo em menos de 1% dos casos de hiperplasia congênita das supra-renais, a forma menos grave ou não clássica é considerada muito frequente e, muitas vezes, responsável por hirsutismo e/ou irregularidades menstruais (principalmente a síndrome do ovário policístico) em mulheres (Bongiovanni, 1962; Zachmann *et al.*, 1979; Pang *et al.*, 1983; Chang *et al.*, 1993; Rosenfield *et al.*, 1980; Pang, 2001). Entretanto, critérios diagnósticos confiáveis para a forma não clássica são difíceis de estabelecer, consistindo principalmente de proporções alteradas de esteroides β^5 e β^4 (Mathieson *et al.*, 1992; Schram *et al.*, 1992; Azziz *et al.*, 1993; Barnes *et al.*, 1991).

Já foram caracterizadas 36 mutações diferentes no tipo II do gene da 3 β -HSD em pacientes com a forma perdedora de sal (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=HSD3B2>). Pacientes com a forma clássica perdedora de sal tem mutações no gene *HSD3B2* que eliminam ou praticamente abolem sua atividade (Rhéaume *et al.*, 1992; Simard *et al.*, 1993). Os casos de deficiência de 3 β -HSD de forma não clássica têm muita semelhança clínica com a gama de defeitos observados para a enzima 21-hidroxilase e, por analogia com a relação das formas clássica e não clássica, foram também chamadas de deficiência da 3 β -HSD clássica e não clássica. Sugere-se que esse defeito hormonal possa ser possivelmente uma variação alélica da forma clássica da doença. Até o momento, a porcentagem de pacientes com a forma não clássica e que realmente possuem mutações no gene *HSD3B2* não é conhecida. O fato de que nenhuma mutação tenha sido encontrada em pacientes com deficiência não clássica de 3 β -HSD sugere fortemente que essa doença não resulte de uma isoenzima mutante do tipo II. Isso está em contraponto às formas perdedoras de sal e não perdedoras de sal da deficiência clássica da 3 β -HSD, nas quais várias mutações foram encontradas.

Duas mutações no gene de *HSD3B2* relacionadas à forma perdedora de sal foram encontradas no mesmo códon. A mutação *missense* p.Pro222Tre é altamente danosa para a atividade enzimática (Pang *et al.*, 2002), não apresenta atividade enzimática *in vitro*, estando associada à ambiguidade genital e perda de sal num paciente masculino. Essa mutação foi descrita em dois pacientes algerianos.

ANÁLISE ESTRUTURAL

A especificidade das interações entre as proteínas é determinada por suas propriedades físicas, químicas e estruturais. Assim, é necessário o conhecimento detalhado da estrutura tridimensional das proteínas envolvidas para entender as interações entre elas. Porém, a estrutura molecular de algumas proteínas ainda não foi determinada devido à dificuldade de cristalização pelos métodos convencionais que devem anteceder às medidas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Leliveld *et al.*, 2003). Para estudos da estrutura molecular tridimensional é necessário que a molécula de proteína inteira, ou parte dela, esteja em forma de cristal. No caso da proteína 21-hidroxilase, um de seus domínios faz parte da membrana plasmática, o que, pela hidrofobicidade da molécula, dificulta sua cristalização e, conseqüentemente, a determinação tridimensional da sua estrutura (Robins *et al.*, 2006).

A técnica alternativa para estudo de proteínas cujas estruturas ainda não estejam resolvidas e a predição das interações com outras proteínas é a modelagem por homologia. Esse método, usado para identificação de função de proteínas e de possíveis alterações nas funções causadas por mutações, é basicamente direcionado pelo paradigma sequência-estrutura-função (Rychlewski *et al.*, 1999). Ao se empregar essa abordagem, é possível construir a melhor estrutura de uma proteína, prevista a partir de sua sequência de aminoácidos (alvo), com base na estrutura tridimensional conhecida de membros relacionados da família (modelos) que já se encontre depositada no banco de proteínas (PDB - Protein Data Bank). Modelos de 'baixa resolução' obtidos através de modelagem por homologia fornecem informações essenciais do arranjo espacial de grupos importantes de resíduos (Panigrahi *et al.*, 2012).

Para enriquecer os estudos da deficiência de 21-hidroxilase, alguns trabalhos vem usando o modelo molecular tridimensional da CYP21 para relacionar os mecanismos da patogenicidade de uma determinada mutação através de uma análise *in silico* e compará-las aos efeitos bioquímicos observados nas análises de expressão e ensaios enzimáticos. O primeiro modelo de sítio ativo da proteína CYP21 foi a CYP101 de *Pseudomonas putida* (Lin *et al.*, 1994). Entretanto, ao passar dos anos, um grande número de estruturas de CYPs vem sendo determinadas e depositadas no banco de dados de proteínas (PDB) (Berman *et al.*, 2000), onde cinco são de mamíferos, incluindo três proteínas humanas (Schoch *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2004). A primeira estrutura de P450 de eucarioto determinada, CYP2C5, foi a P450 2C5 expressa em microsossomos de coelho. Essa proteína foi usada para modelagem da CYP21 humana, pelo fato de possuir o mesmo substrato.

Além disso, modelos individuais foram calculados para investigação de mecanismos moleculares de todas as variantes alélicas da CYP21 (Robins *et al.*, 2006). Recentemente, as análises *in silico* das mutações p.Arg132Cis, p.Glu149Cis, p.Met283Val e p.Glu431Lis indicaram mudanças na estabilidade da proteína ou na carga da superfície das proteínas mutantes (Minutolo *et al.*, 2011). Outro estudo mostrou que a mutação p.Ile77Tre alterou um resíduo chave da ligação ao substrato (Tardy *et al.*, 2010). Como essa é uma área que sempre tem novidades, a estrutura da 21-hidroxilase bovina foi determinada recentemente (Zhao *et al.*, 2012). Essa estrutura possui alta similaridade com a humana.

A análise estrutural da 3 β -HSD também apresenta a limitação de que parte dessa proteína ligada a membrana. A atividade enzimática tem se localizado nas frações microsossomais e mitocondriais (Luu-The *et al.*, 1988; Thomas *et al.*, 1988). A atividade é mais alta na fração microsossomal e a atividade mitocondrial é vista como resultado de uma contaminação microsossomal, apesar dos estudos de presença da atividade de 3 β -HSD na mitocôndria (Sauer *et al.*, 1994; Cherradi *et al.*, 1994). Pouco é conhecido da ancoragem dessa proteína na membrana. Análise da sequência de aminoácidos predizem dois domínios transmembrânicos. Um dos domínios é um segmento de 26 resíduos no C-terminal entre os resíduos 283 e 308, que é extremamente hidrofóbico e está presente em

todos os membros 3β -HSD e outro mais curto que é um segmento de 16 resíduos entre 75 e 91, identificado em todos os membros, exceto nas enzimas 3β -HSD do tipo II de roedores e bovinos e do tipo V de roedores (Morel *et al.*, 1997).

Todas as mutações *nonsense* ou frameshift são responsáveis pela forma perdedora de sal severa e prevêm uma proteína truncada sem o domínio transmembrânico do C-terminal, exceto a 318delC. Em contraste, a mutação p.Ala82Ile, localizada na região menos conservada do domínio, é encontrada em pacientes com a forma não perdedora de sal (Mendonça *et al.*, 1994).

A análise estrutural e funcional de enzimas, como a 21-hidroxilase e a 3β -hidroxisteróide desidrogenase, busca entender melhor porque a sua deficiência causa tantos prejuízos para o organismo humano. Nesse estudo, buscamos de várias formas analisar o funcionamento da enzima modificado por algumas alterações encontradas em pacientes, que poderão ajudar no entendimento de outros casos que podem aparecer.

OBJETIVOS

- Investigação da atividade das enzimas 21-hidroxilase modificadas pelas mutações p.Ser113Phe, p.Pro267Leu, p.Val358Ile, p.Arg426Cys e combinações p.Ile172Asn+p.Val358Ile, e p.Val281Leu+p.Arg426Cys no respectivo gene.
- Investigação, por modelamento, das alterações estruturais nas proteínas 21-hidroxilase e 3-beta-hidroxiesteroide desidrogenase promovidas pelas mutações do tipo *missense*. Análises feitas com as mesmas mutações da atividade enzimática e uma deleção, Q389, G390, A391 na 21-hidroxilase e p. Pro222Thr e p.Pro222Gln na 3-beta-hidroxiesteroide desidrogenase.
- Comparação da relação genótipo-fenótipo através da relação entre a atividade e a estrutura encontrada para cada mutação com fenótipo característico das deficiências da 21-hidroxilase.

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Esta avaliação (Fig.11) se inicia pelo ensaio de mutação sítio-dirigida que consiste em introduzir uma mutação no cDNA do gene *CYP21A2* normal já clonado. Após este procedimento, a inserção correta da mutação é confirmada por sequenciamento pelo equipamento da empresa Applied Biosystems do modelo 3130xl. Os fragmentos dos clones resultantes são subclonados em vetores de expressão em mamíferos e transfectados em células *COS*, que são células derivadas de fígado de macaco africano estabelecidas em cultura (Robins *et al.*, 2006). As expressões e atividades residuais são analisadas por quantificação relativa quanto à produção de proteínas e quanto à atividade enzimática frente aos seus substratos específicos, comparando-se os resultados com os da enzima normal (Barbaro *et al.*, 2004; Krone *et al.*, 2005).

Para se estabelecer a correlação genótipo-fenótipo de cada mutação aqui incluída, a saber: p.Ser113Phe, p.Pro267Leu, p.Val358Ile, p.Arg426Cys e as combinações p.Ile172Asp+p.Val358Ile e p.Val281Leu+p.Arg426Cys; as mutações p.Ile172Asn e p.Val281Leu, cujas atividades enzimáticas já se conhece e estão correlacionadas com as formas virilizante simples e não-clássica, respectivamente, foram também introduzidas no cDNA de *CYP21A2* e utilizadas como referências. Além disso, os plasmídios sem o cDNA de *CYP21A2* (*mock*) e com o cDNA normal (*wild type*), também foram transfectados em células *COS* como controles negativo (0%) e positivo (100%), respectivamente.

Assim, serão detalhas a seguir cada etapa metodológica utilizada.

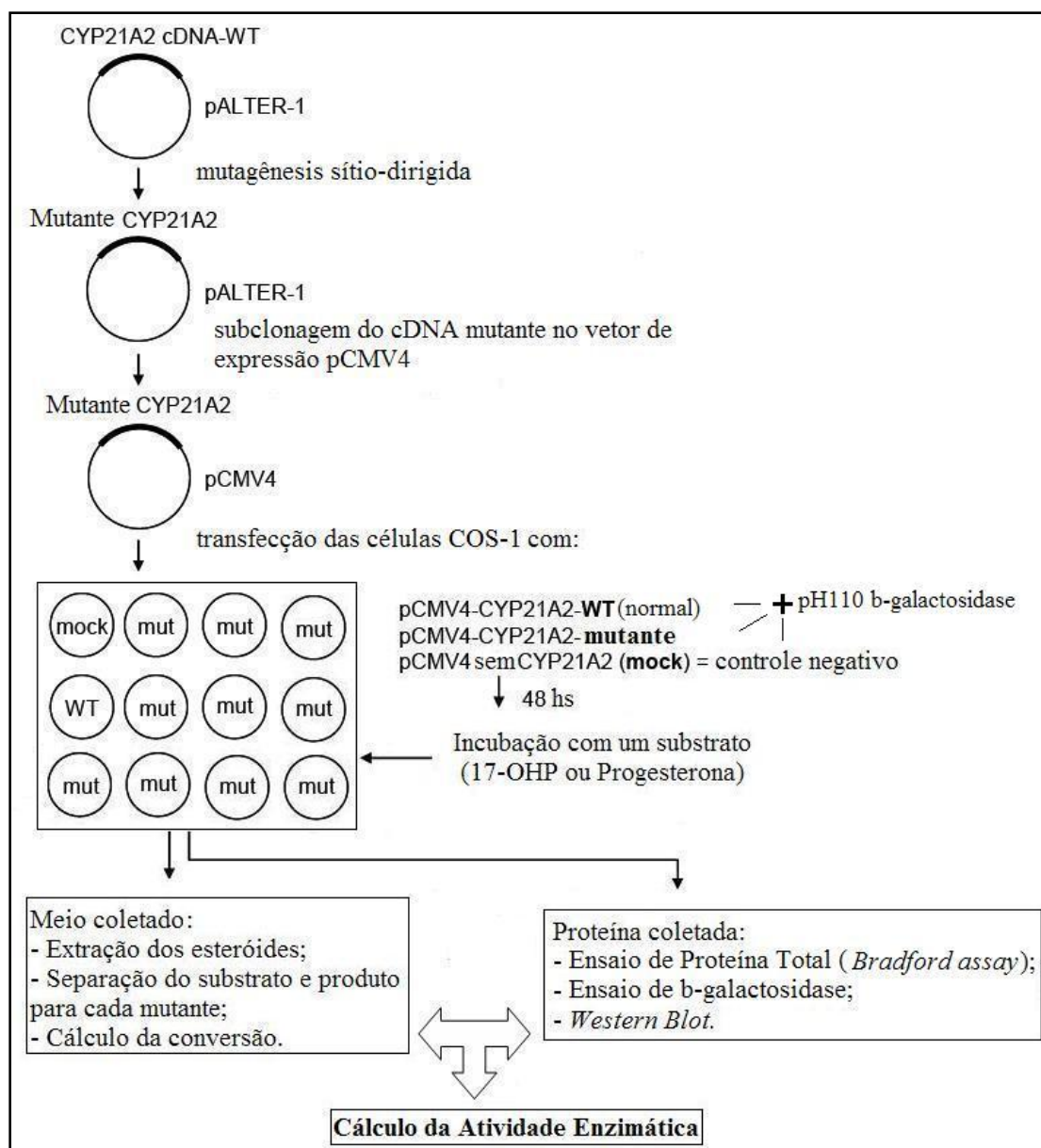


Figura 11 - Esquema resumido da metodologia usada nesse trabalho. Começando pela mutagenese sítio dirigida do cDNA do gene CYP21A2, passando pela subclonagem do cDNA no vetor de expressão pCMV4, pela transfecção em células de mamíferos até a coleta das proteínas para o cálculo de atividade enzimática.

MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA E SUB-CLONAGEM DO cDNA

O cDNA completo correspondente ao gene humano *CYP21A2* (Chiou *et al.*, 1990) havia sido sub-clonado no vetor pALTER e modificado através de metodologia descrita

por Nikoshkov *et al.* (1997). Este vetor foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Anna Wedell do Instituto Karolinska (Suécia). Para cada mutação sob estudo foram desenhados e sintetizados pares de oligonucleotídeos complementares entre si, através dos quais as mutações foram introduzidas no cDNA do gene *CYP21A2* contido no vetor pALTER (Promega Corporation, Estados Unidos) (Tabela 3). Para que isso acontecesse, foram realizadas as PCRs iniciais para as mutagêneses sítio-dirigidas seguindo-se as instruções do *kit QuikChange® Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene, Agilent Technologies Company, Estados Unidos). A amplificação por técnicas convencionais de PCR se estende por todo o vetor incluindo o inserto, mas para se garantir a fidelidade da amplificação foi utilizada a enzima com atividade exonucleásica *Pfu Turbo* DNA polimerase. Nos casos onde foram inseridas duas mutações em um mesmo cDNA, foi feito esse mesmo procedimento, porém o cDNA inicial já possuía uma das mutações, previamente confirmada.

Após o término dos ciclos de amplificação, foi adicionada a enzima *Dpn* I, a qual reconhece e digere o DNA parental proveniente da bactéria, vetor selvagem, pelo fato deste estar metilado.

Tabela 3. *Oligonucleotídeos* para mutagênese sítio-dirigida.

Oligos	Sequência do primer(5'→3')	Sentido
mSer113Phe-F	TCCTTGGGAGACTACTTCCTGCTCTGGAAAGCC	Sense
mSer113Phe-R	GGCTTTCCAGAGCAGGAAGTAGTCTCCCAAGGA	Antisense
mVal358Ile -F	CGAGGTGCTGCGCCTGTGGCCCGTTGTGCCCT	Sense
mVal358Ile -R	AGGGCACAACGGGCCACAGGCGCAGCACCTCG	Antisense
mArg426Cis-F	CTTCGGCTGCGGTGCCTGCGTGTGCCTGGGCGA	Sense
mArg426Cis-R	TCGCCCAGGCACACGCAGGCACCGCAGCCGAAG	Antisense
mIle172Asn-F	CTCACCTGCAGCATCAACTGTTACCTCACCTTC	Sense
mIle172Asn-R	GAAGGTGAGGTAACAGTTGATGCTGCAGGTGAG	Antisense
mVal281Leu-F	TCCTGGAAGGGCACTTGACATGGCTG	Sense
mVal281Leu-R	CAGCCATGTGCAAGTGCCCTTCCAGGA	Antisense
mPro267Leu-F	CAAGGGGTGGCGCAGCTGAGCATGGAAGAGGGC	Sense
mPro267Leu-R	GCCCTCTCCATGCTCAGCTGCGCCACCCCTTG	Antisense

Após a amplificação, os produtos foram usados para transformar células de *E.coli* (DH5 α) de acordo com Sambrook *et al.* (1989). As transformações em células competentes da bactéria foram realizadas por eletroporação ou por transformação química. Devido ao baixo rendimento do procedimento de mutação sítio-dirigida, o uso de duas técnicas diferentes foi necessário para se conseguir melhor eficiência de transformação. Para quase todas as amostras de cDNA, a transformação mais eficiente foi a técnica de transformação química.

As colônias recombinantes foram selecionadas por resistência à tetraciclina e submetidas à mini-preparação de plasmídios utilizando-se parte do *kit Plasmid Midi* (QIAGEN, Alemanha). Estes plasmídios foram, então, submetidos à digestão pelas enzimas de restrição *Bgl* II e *Kpn* I, para liberação do inserto do cDNA da *CYP21A2* e, assim, verificar sua presença nos clones recombinantes selecionados. Alternativamente, foram realizadas PCRs com *primers* que anelam no exon 3 normal e exon 6 normal, para uma verificação rápida de que o gene estava presente no plasmídio. As amostras das mini-preparações, para as quais as PCRs foram positivas, foram sequenciadas utilizando-se *primers* específicos para o cDNA do gene *CYP21A2* (Tabela 4), com o objetivo de se confirmar a correta inserção de cada mutação. Para cada construção plasmidial com o cDNA do gene *CYP21A2* foram realizadas, em geral, noventa e seis reações de PCR, das quais cerca de três ou quatro foram submetidas ao sequenciamento.

Tabela 4. *Primers* específicos para o cDNA do gene *CYP21A2*. (Soardi.,2008)

<i>Primers</i>	<i>Sequência do primer (5'→3')</i>	<i>Localização</i>	<i>Sentido</i>
CYP21cDNA100	TTGCTGCAGCCCGACCTCCCA	Exon 1	<i>Sense</i>
CYP21cDNA101	GACGTGATTCCCTTTCTCAGG	Exon 7	<i>Sense</i>
CYP21cDNA102	ATCGCCGAGGTGCTGCGCCTG	Exon 10	<i>Sense</i>
CYP21cDNA13	AAGTGGCTCAGGTCTGCCAGC	Exon 2	<i>Antisense</i>

Verificadas as mutações, os cDNA foram subclonados no vetor pCMV4 (Stratagene) que é próprio para a expressão em células de mamíferos, pois possui um promotor de citomegalovírus e tem origem de replicação normal do vírus SV40. Cada construção contendo os cDNAs foi digerido com as enzimas *Bgl* II e *Kpn* I para liberar o

inserto do vetor pALTER e, subcloná-lo no vetor pCMV4. Este vetor foi previamente preparado por digestão com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Kpn* I para receber o inserto.

A reação de ligação foi realizada por ação da enzima T4 DNA ligase (Promega), que catalisou esta reação entre o vetor pCMV4 e os cDNAs do gene CYP21A2, ambos digeridos com as enzimas de restrição acima detalhadas. A reação de ligação constituiu de:

- 6µl da amostra do cDNA do gene CYP21A2;
- 2µl da amostra do vetor pPCMV4, na mesma concentração da amostra do gene;
- 1µl da enzima T4 DNA ligase;
- 1µl de tampão da enzima;

O volume final da reação foi de 10µl. A reação foi feita overnight a 4°C.

Após a ligação dos insertos contendo as mutações ao vetor de expressão pCMV4, as amostras foram transformadas em células *E.coli* (DH5α). Seguindo o mesmo procedimento descrito acima para seleção, agora por resistência à ampicilina, e identificação de clones recombinantes, alguns plasmídios foram escolhidos por PCR e sequenciados, como descrito anteriormente. Após o sequenciamento, as amostras de pCMV4 contendo as mutações inseridas de forma correta foram submetidas ao preparo de plasmídio em maior escala utilizando o *kit Plasmid Midi* (QIAGEN, Alemanha), seguido-se o protocolo do fabricante.

Os plasmídios utilizados como referências, a saber, aqueles contendo o cDNA do gene normal *CYP21A2* (*wild type*) e o plasmídio sem inserto (*mock*) foram também preparados pelo método descrito acima.

TRANSFECCÃO EM CÉLULAS COS

A linhagem de células utilizadas foi a COS-7, variante da COS-1 que contém o antígeno T. Quando transfectada com o vetor pCMV4, proporciona altos níveis de expressão devido aos genes virais necessários para gerar múltiplas cópias do vetor (Gluzman *et al.*, 1981).

Uma alíquota de 1 mL de células foi descongelada e colocada em 5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino estéril e gentamicina (DMEM +/+) em frasco de cultura T75. As células foram incubadas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ e 90% de umidade. A primeira passagem foi realizada 48 horas após o descongelamento: o meio foi descartado e as células foram lavadas gentilmente com 5 mL de PBS (Invitrogen Corporation, Estados Unidos), que foram descartados para se adicionar em seguida 1 mL de tripsina. Após as células se desprenderem do fundo do frasco, foram colhidas, centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de meio, que foi repassado para um novo frasco onde 10 mL de DMEM +/+ foram adicionados e, novamente incubadas em estufa nas mesmas condições usadas no processo de descongelamento. Após a primeira passagem, foram realizados dois novos repiques, onde as células foram tripsinizadas e todo volume foi transferido para novos frascos contendo 10 mL de meio cada, que foram incubados novamente nas condições citadas acima. As células foram mantidas em estufa sob atmosfera de CO₂, como descrito acima, até o momento da preparação para transfecção.

Para a transfecção de cada plasmídeo procedeu-se da seguinte forma: em primeiro lugar, o *pellet* de células foi ressuspensado em 1 mL de meio de cultura e, com o auxílio de uma pipeta, foram distribuídos em placas de doze poços para cultura, preparadas anteriormente contendo meio DMEM+/, num volume de 20 µL em cada poço. As placas foram homogeneizadas manualmente. Após 24 horas de incubação a 37°C em estufa de CO₂, a confluência celular de 50 a 70% foi considerada ideal para a realização do processo de transfecção.

Cerca de duas horas antes de se realizar a transfecção, o meio sobre as células foi retirado e descartado e adicionou-se o mesmo volume de meio DMEM -/- (sem soro fetal bovino e sem gentamicina, à temperatura ambiente). A transfecção foi realizada utilizando o reagente FuGene6® (Roche, Suíça) e XtremeGENE HP DNATransfection Reagent® (Roche, Suíça), que é um combinado de lipossomos que forma um complexo com o DNA, transportando-o para o interior das células. A transfecção foi realizada em conjunto (co-transfecção) com os plasmídios pCMV4 contendo os cDNAs *CYP21A2* normal e mutante e o plasmídeo pH110 contendo o gene repórter LacZ (Pharmacia, GE Healthcare, Reino Unido). Em um mesmo tubo de 1,5 mL foram adicionados: 1 µg de

pCMV4-CYP21A2, 0,25 µg de pH110-β galactosidase e 50 µL de meio DMEM -/-. Essa mistura foi incubada durante 5 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, 2 µL de cada reagente FuGene 6 ® e XtremeGENE ® foram adicionados em cada tubo. Os tubos foram incubados por 15 minutos, e foram em seguida distribuídos nos poços de forma a abranger todo o espaço. A placa foi incubada por 48 horas em estufa padronizada e cada experimento continha um poço por amostra, porém estas placas foram feitas em duplicatas por experimento e esse experimento precisou ser repetido vinte e sete vezes nesse estudo, devido a alguns experimentos não chegarem aos valores esperados para a validação dos experimentos, valores do controle negativo de até 5% e do controle positivo de 45% ou mais na relação entre produto e substrato.

OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS

A atividade de cada construção de *CYP21A2* frente aos dois substratos, a 17-hidroxiprogesterona (17-OHP), que produz o 11-desoxicortisol na via dos glicocorticoides, e a progesterona (PROG), que produz a 11-desoxicorticosterona na via dos mineralocorticóides, foi verificada com o extrato celular bruto, através de ensaio realizado após 48 horas da co-transfecção das células COS-7 com o vetores contendo os cDNAs mutados e normal e o gene repórter.

O meio DMEM +/- foi totalmente removido e , em seguida, às amostras normal e mutantes, foram adicionados 10 µM de 17-OHP triciada (³H, American Radiolabeled Chemicals, Estados Unidos) e 2 µM da não triciada (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), ambas em tampão 0,2 M de fosfato de potássio monobásico com pH 7,2, 4 mM NADPH (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e para completar o meio DMEM+/. Esse mesmo procedimento foi feito com 10 µM de progesterona triciada (Perkin Elmer) e 0,1 µM não triciada (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), concentração menor que a usada com 17-OHP, porém com os mesmos tampões, a mesma concentração de NADPH e meio DMEM+/>.

Após 20 minutos de incubação a 37°C em estufa com atmosfera de CO₂, os sobrenadantes foram coletados e após 24 horas foram analisados quanto à formação de produtos, para avaliação da atividade enzimática residual em cada construção mutante.

As células ainda aderidas às placas foram tripsinizadas e lavadas gentilmente com PBS. Paralelamente, as células foram colhidas para os testes de atividade de beta-galactosidase, para verificar se a expressão havia ocorrido satisfatoriamente através dos plasmídios co-transfectados nas células. Os procedimentos de transfecção foram feitos em duplicata, para a utilização das células nas medidas de atividade de beta-galactosidase e para o *Western blotting*. Para as amostras que seriam utilizadas no *Western blotting*, o meio DMEM +/+ foi retirado e as amostras normal e mutantes foram acrescidas de uma solução tampão de amostra com 2xSDS, tampão de ressuspensão celular e DTT, como se encontra descrito abaixo.

QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL

A quantificação do extrato protéico de alto peso molecular obtido das células COS-7 foi realizada pelo método de Bradford (1976). Após a sonicação das células desprendidas com tripsina, a proteína solúvel contida no sobrenadante foi quantificada com o reagente Bradford (Bio-Rad, Estados Unidos). A albumina sérica bovina (BSA) foi usada como padrão e preparada nas concentrações de: 0,2 µg/µL, 0,4 µg/µL, 0,6 µg/µL, 0,8 µg/µL e 1,0 µg/µL. De cada padrão, 20 µL foram colocados em 980 µL do tampão de ensaio de proteína (*Bio-Rad® Protein assay buffer*) diretamente na cubeta de leitura de 1 mL. O mesmo procedimento foi feito com as proteínas (20 µL do extrato protéico foram adicionados a 980 µL do tampão de ensaio de proteína).

As soluções foram homogeneizadas. Após incubação por 20 minutos em temperatura ambiente, foram feitas as leituras de absorbância em 590 nm. Os ensaios de concentração de proteína somente foram considerados quando o fator de correlação (R²) obtido era maior ou igual 0,95. R² indica quão bom é o ajuste da curva em relação aos pontos experimentais e este fator varia de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo da unidade, melhor é o ajuste.

ENSAIO DE B-GALACTOSIDASE

O ensaio de β -galactosidase com ONPG (2-Nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo) foi usado para referência interna nos estudos de transfecção. A β -galactosidase (β -gal) age em galactosídeos simples como o ONPG, assim como na clivagem de lactose. A hidrólise de ONPG pela β -gal resulta na liberação de galactose e do o-nitrofenol, um componente cromogênico amarelo cujo máximo de absorção de luz é em 420 nm. O gene LacZ, que codifica a β -galactosidase, quando ligado a certos promotores é utilizado como repórter quando a intenção é observar a interação proteína-proteína ou a ativação da transcrição em condições experimentais, uma vez que a maioria dos tipos celulares de cultura de mamíferos contém baixos níveis de atividade de β -gal endógena. Assim, o ensaio de β -gal foi utilizado como controle de transfecção.

O ensaio seguiu o protocolo abaixo:

Extrato protéico.....	30 μ l
100x Tampão de Magnésio (100 mM MgCl ₂ e 2-Mercaptoetanol 5 M.....	3 μ l
ONPG em tampão NaH ₂ PO ₄ 0,2 M	66 μ l
Tampão de Fosfato de Sódio 0,1 M, pH 7,3.....	q.s.p 300 μ l

A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos, ou até a solução ficar amarelada. Acrescentando-se em seguida 0,5 ml de Na₂CO₃ 1 M para inativar a β -galactosidase e maximizar a absorbância do ONPG em 420 nm. Assim, para verificar a quantidade de proteína, a absorbância de todas as amostras foi determinada , utilizando-se como branco a solução com PBS, substituindo o extrato protéico no protocolo acima.

WESTERN BLOTTING

A técnica de *Western blotting* foi utilizada para verificar se a proteína CYP21A2 foi expressa pelas células transfectadas, através da observação do tamanho correto revelado pelo anticorpo específico, e em que quantidades. A análise por *Western blotting* foi realizada com as proteínas obtidas de células coletadas diretamente do poço com tampão de amostra.

O tampão de amostra consistiu do tampão para ressuspender células (NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH7.6, EDTA 1 mM); típico tampão de amostra para *Western blotting* 2X (Tris 100 mM pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, DTT 50 mM e 1% de azul de bromofenol, além de solução de DTT 1 M, na razão 4:5:1).

As amostras foram então desnaturadas a 80°C por 5 minutos e aplicadas em gel SDS-PAGE 10%, juntamente com o padrão de peso molecular (*Prestained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas). A eletroforese se desenvolveu por 2 horas, a 140 V. Durante este período, o material necessário para transferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi preparado. A membrana e quatro papéis de filtro, juntamente com as esponjas que ajudam a embeber a membrana, ficaram imersos em tampão de transferência (Tris 48 mM, Glicina 39 mM, Metanol 20% e SDS 0,037%). Após a eletroforese, o conteúdo do gel foi transferido para a membrana de nitrocelulose (*Nitrocellulose Membranes for Blotting*, Sigma-Aldrich), utilizando-se o sistema de transferência. Em primeiro lugar colocou-se o gel em contato direto com a membrana, sendo que na parte externa foram colocados dois papéis de filtro de cada lado do gel e da membrana e duas esponjas. Em seguida foram levados à cuba de transferência. A eletrotransferência ocorreu durante 2 horas a 25 V. Outro método de transferência usado foi o sistema a seco *IBLOT GEL TRANSFER SYSTEM* da Invitrogen, com o kit *Ibлот gel Transfer Stacks Nitrocellulose*. A membrana foi, então, lavada rapidamente com tampão TBS-T (150mM de NaCl, 20 mM de TrisHCl pH7.6 e 1% de Tween 20). Para verificar a eficiência da transferência, a membrana foi corada com *Ponceau* por 5 minutos sob leve agitação e fotografada. Em seguida, a membrana foi agitada durante 2 horas em tampão TBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado. Descartado o tampão, foi adicionado o anticorpo primário policlonal contra CYP21A2 humana produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology) na proporção de 1:2.000 em TBS-T com 5% de leite permanecendo em leve agitação *overnight* em baixa temperatura (Lajic *et al.*, 2002). A membrana foi novamente lavada com TBS-T e, em seguida permaneceu sob agitação por 2 horas em TBS-T 5% leite, bloqueando a primeira reação. Ela foi exposta ao anticorpo secundário anti-rabbitIgG (Santa Cruz Biotechnology) em TBS-T 5% leite na proporção de 1:1.500. Após a incubação a membrana foi novamente lavada com TBS-T, em seguida foram

adicionados os reagentes *Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit®* (Bio-Rad), para revelação da membrana através da reação com a fosfatase alcalina.

ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os sobrenadantes colhidos após a incubação com os esteróides triciados (átomos de H substituídos por trítio) foram divididos em dois tubos (125 µL/tubo) para análise em duplicata. Foram analisadas separadamente as produções de 11-desoxicortisol e de 11-desoxicorticosterona, resultantes da conversão dos substratos 17-OHP e PROG, respectivamente, para se estimar a atividade enzimática residual de cada construção. A cada tubo foram adicionados 250 µL de diclorometano, permanecendo sob agitação por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm, onde os esteróides foram eluídos em diclorometano (fase incolor) e separados do meio DMEM (fase rosa). As fases contendo os esteróides foram separadas e colocadas em tubos novos. Os tubos foram centrifugados a vácuo, até completa evaporação do solvente. Os precipitados foram ressuspensos em 15 µL contendo os substratos, 17-OHP e PROG, e seus respectivos produtos, 11-desoxicortisol e 11-desoxicorticosterona não marcados e dissolvidos em metanol. Estes esteróides foram usados como marcadores na concentração de 0,5 µg/µL. As misturas permaneceram em agitação por 15 minutos. Os 15 µL de cada amostra foram aplicados em placa de cromatografia de camada delgada de gel de sílica sobre alumínio (TLC, Perkin-Elmer) respeitando uma distância de 2,0 cm entre uma amostra e outra. A separação de substratos e produtos se desenvolveu em misturas de solventes sendo clorofórmio-acetato de etila (80:20, v/v) para os ensaios com o substrato 17-OHP e cicloexano-acetato de etila (50:50, v/v) para os ensaios com o substrato PROG. A cromatografia foi realizada por capilaridade em uma cuba de vidro por 45 minutos. Em seguida, deixou-se a placa secar em temperatura ambiente. As marcas correspondentes aos substratos e aos produtos puderam ser visualizadas sob luz ultra-violeta (UV) e delimitadas manualmente. Foram então recortadas e colocadas em frascos individuais com 5 mL de solução Ultima Gold (PerkinElmer) para análise em contador de cintilação líquida (LS6500 Scintillation

Counting System - Beckman Coulter). Após a leitura, a porcentagem de conversão foi calculada pela fórmula:

$$\frac{\text{Produto}}{(\text{produto} + \text{substrato})} \times 100$$

Foram considerados como valores de conversão para cada mutação os correspondentes à média de cada duplicata. Para os cálculos de atividade residual relativa foram feitos ensaios com o plasmídio pCMV4-CYP21A2 contendo a proteína normal (*wildtype*), cujos resultados foram considerados 100% de atividade, e o plasmídio pCMV4 vazio (*mock*), que não expressa a proteína CYP21A2 e foi, portanto, considerado 0% de atividade enzimática. Os ensaios foram considerados válidos somente quando apresentaram valores de conversão para o controle *wild type*, de no mínimo, 45% em relação ao *mock* frente aos dois substratos.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

As análises dos dados obtidos foram realizadas em planilhas do programa Microsoft *Excel*®, onde a atividade específica da proteína normal (*wt*), das variantes e do controle negativo (*mock*) foi determinada considerando-se:

$\frac{([\text{pCMV4-CYP21A2 inicial}] \times \text{Valor de Conversão encontrado}/100)/\text{Total de proteína em mg}}{\text{Tempo de incubação com o substrato marcado radioativamente em minutos}}$
--

Total de proteína em mg é dado por: Concentração de proteína em µg/µL x 0,1.

Como a atividade específica do controle negativo esperada era nula ($V_{\text{mock}} = 0$), para normalização dos resultados a atividade basal encontrada foi retirada por subtração da atividade das variantes e da proteína normal ($V_{\text{proteína}} - V_{\text{mock}}$). Para o cálculo da atividade relativa, o valor da atividade específica da proteína normal menos a atividade

específica encontrada no controle negativo foi arbitrariamente considerada 100%. Assim, a atividade relativa em porcentagem para as variantes foi dada por:

$$\frac{(V_{\text{proteína mutada}} - V_{\text{mock}})}{(V_{\text{proteína normal}} - V_{\text{mock}})} \times 100$$

Foram realizados 10 e 17 experimentos independentes para o substrato 17-OHP e PROG respectivamente; desses, os que apresentaram valores de concentração de proteína semelhantes e bons resultados de conversão (conversão da proteína normal acima de 45%), foram considerados. Os cinco melhores experimentos foram utilizados para calcular a média tanto das atividades específicas quanto relativas de cada variante da proteína e controles.

CINÉTICA DA PROTEÍNA

O estudo cinético da atividade protéica foi empregado para o caso onde a conversão observada apresentava valores normais, ou muito altos. A análise foi baseada na equação de Michaelis-Menten, a qual é definida com a equação da velocidade para reações catalisadas por enzimas que têm apenas um substrato:

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]}$$

Esta equação relaciona a velocidade inicial (v_0), a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e a concentração inicial do substrato ($[S]$) por intermédio da constante de Michaelis-Menten (K_m), sendo o K_m igual a $[S]$ quando v_0 é a metade da $V_{\text{máx}}$. A constante de Michaelis de uma enzima é um parâmetro importante não somente para a descrição matemática da cinética enzimática, mas também para o ensaio quantitativo da atividade enzimática e para comparação entre os mutantes.

O valor de K_m para uma determinada enzima pode ser obtido pela aproximação de uma série de experimentos únicos em que a v_0 da reação é medida em diferentes concentrações iniciais do substrato, em uma concentração fixa da proteína. Para

CYP21A2 foram utilizadas as seguintes concentrações iniciais de substrato: 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 3 µM, 4 µM e 7 µM.

Para obtenção de gráficos dos dados experimentais a equação de Michaelis-Menten foi transformada algebricamente na equação de Lineweaver-Burk, através da substituição dos valores inversos em ambos os lados da equação:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{\text{máx}} [S]}$$

Quando $1/v_0$ é colocado em um gráfico contra $1/[S]$, obtém-se uma linha reta, com inclinação de $K_m/V_{\text{máx}}$ e intercepção no eixo $1/v_0$ (Y) de $1/V_{\text{máx}}$ e no eixo $1/[S]$ (X) de $-1/K_m$. Esse gráfico do duplo-recíproco permite uma determinação mais exata de $V_{\text{máx}}$ e fornece valores importantes quando feitos ensaios de inibição enzimática.

A análise dos gráficos foi realizada considerando os coeficientes angular (a) e linear (b). Foram aceitos os experimentos que apresentavam todos os gráficos (proteína normal e proteína mutante) com fator de correlação (R^2) maior ou igual a 0,95.

ESTUDO *IN SILICO*

No estudo *in silico*, foram incluídas as mutações missenses já referidas e ainda a deleção p.(Gln389_Ala391del) na enzima CYP21A2, e as mutações missenses p.Pro222Gln e p.Pro222Thr na enzima HSD3B2.

Este estudo foi realizado avaliando-se em primeiro lugar a conservação e o possível papel deletério das mutações individuais, através de predição utilizando a estrutura linear das proteínas. A segunda abordagem envolveu o estudo das alterações estruturais provocadas pelas trocas de aminoácidos através da modelagem molecular.

Para a primeira abordagem foram utilizados dois algoritmos que avaliam quão deletérias podem ser as substituições de aminoácidos em uma determinada proteína. O *Polymorphism Phenotyping v2*, que abreviadamente é conhecido como *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>), é uma ferramenta que prediz o

possível impacto de uma substituição de aminoácidos sobre a estrutura e função de uma proteína humana; o SIFT (<http://sift.jcvi.org>) é um algoritmo que prediz se uma substituição de aminoácido pode afetar a função proteica baseado no grau de conservação dos resíduos dos aminoácidos nos alinhamentos de sequências contidas no PSI-Blast que são relacionadas com a proteína em questão.

A segunda abordagem foi conseguir modelos estruturais que pudessem indicar, com base na estrutura proteica, quais seriam os efeitos das substituições de amino ácidos. O estudo estrutural da enzima CYP21A2 iniciou-se através da busca por um citocromo P450 que já tivesse sido cristalizado e cuja estrutura pudesse ser usada de base para se obter um modelo de CYP21A2 humana, uma vez que esta não havia sido cristalizada. A primeira estrutura identificada no banco *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) foi a P450 2C5 de coelho que foi a primeira proteína do tipo citocromo P450 de mamíferos a ser cristalizada (PDB-ID 1DT6, cadeia A). Esta apresenta 30% de identidade com a CYP21A2 humana. No início do ano de 2012 foi publicada a estrutura da primeira CYP21A2 isolada de bovinos (PDB ID: 3QZ1) (Zhao *et al.*, 2012), cuja sequência apresenta identidade de 80% com a proteína humana. Assim, no presente estudo foram construídos dois modelos, com fins comparativos e de validação de estudos anteriores onde a estrutura da P450 2C5 de coelho foi utilizada como base do modelo estrutural.

A modelagem molecular foi realizada através do programa de computador ModWeb (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/scgi/modweb.cgi>). Os modelos foram examinados e editados utilizando o programa *Millennium Sting* (CNPTIA-Embrapa) e analisadas as proteínas nativa e mutantes em relação as regiões das mutações e da deleção.

No caso do gene HSD3B2, foi feito o alinhamento das isoenzimas 3 β -HSD de mamíferos pelo ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), a modelagem molecular foi realizada através do programa de computador MODELLER (Eswar *et al.*, 2000; Marti-Renom *et al.*, 2000; Sali e Blundell, 1993; Fiser *et al.*, 2000), onde foi encontrada uma identidade de 31% com a proteína Vestitone Reductase da Alfalfa (*Medicago sativa* L.) (PDB-ID 2P4H, cadeia X). As imagens dos modelos foram examinadas e editadas utilizando-se o programa *Millennium Sting* (CNPTIA-Embrapa) e,

após analisar a proteína nativa e as proteínas mutadas p.Pro222Gln e p.Pro222Thr, suas regiões de ligação ao substrato e de ligação à membrana foram comparadas.

RESULTADOS

ANÁLISES PRÉVIAS QUE DERAM SUPORTE AO TRABALHO

A análise em busca da identificação de mutações nos genes *CYP21A2* e *HSD3B2* em pacientes com hiperplasia congênita da adrenal devido às deficiências das enzimas 21-hidroxilase e 3- β -hidroxiesteroide desidrogenase é realizada rotineiramente no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG. Como resultado desta triagem, houve a identificação de mutações novas ou raras para as quais há necessidade de se avaliar, de forma qualitativa e quantitativa, o reflexo sobre a função enzimática. Este trabalho consistiu, portanto, em estudar os efeitos funcionais e/ou estruturais de três mutações novas e duas pouco frequentes no gene *CYP21A2* que foram por nós identificadas, tanto de forma isolada como em associação com outras mutações conhecidas derivadas do pseudogene. Neste último caso, o estudo foi necessário porque o fenótipo dos pacientes era mais grave do que o previsto pelo genótipo, caso se considerasse apenas o efeito das mutações conhecidas. Foi realizada também a avaliação estrutural de uma mutação no gene *HSD3B2*.

Desta forma, a primeira mutação investigada no gene *CYP21A2* foi a p.Ser113Phe. Esta mutação é resultado da troca c.338C>T e não havia sido identificada em nenhum estudo anterior (Fig. 12 A). A paciente portadora desta mutação apresentava heterozigose com a mutação p.Val281Leu (Fig. 12 B). Apesar de não ter disponíveis amostras de DNA dos genitores para se verificar a segregação das mutações, considerou-se que o genótipo mais provável desta paciente fosse a heterozigose composta destas duas mutações, pois a paciente apresentava o fenótipo de deficiência de 21-hidroxilase da forma não-clássica.

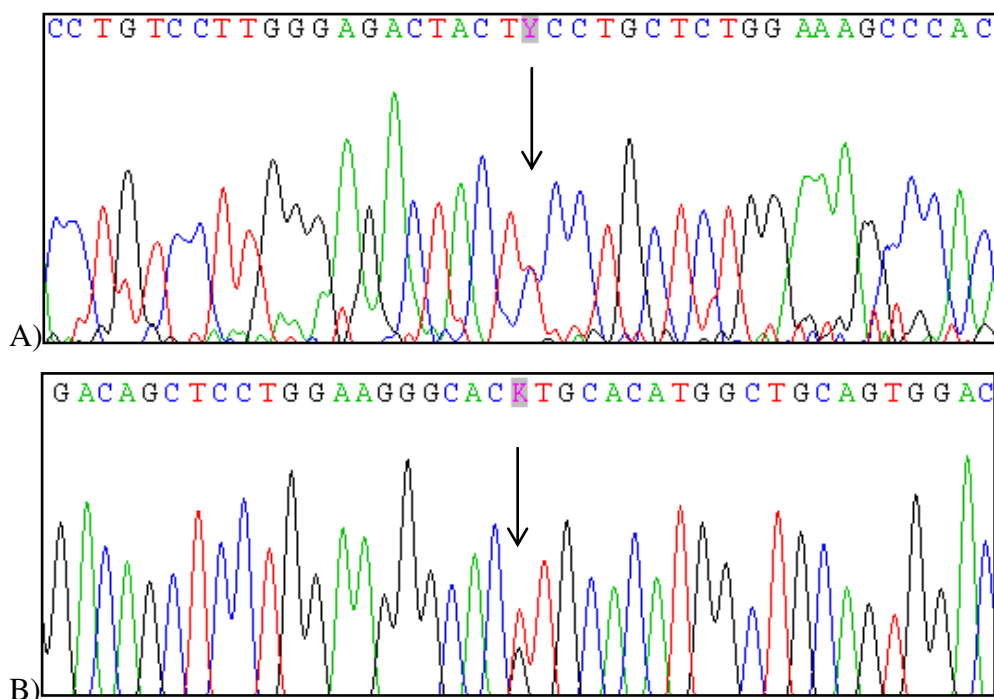


Figura 12 - Sequenciamento do gene *CYP21A2* do paciente. A) parte do cromatograma do exon 3, onde a seta indica a troca c.338C>T em heterozigose, que resulta na mutação p.Ser113Phe e B) parte do cromatograma do éxon 7, onde a seta evidencia a troca c.841G>T em heterozigose, que resulta na mutação p.Val281Leu.

A segunda mutação que foi identificada pela primeira vez em um paciente com a forma perdedora de sal da deficiência de 21-hidroxilase foi a troca c.1072G>A, localizada no exon 8 do gene *CYP21A2* que leva à mutação p.Val358Ile (Fig. 13 A). Pela análise prévia de PCR-alelo-específica para as mutações presentes normalmente no pseudogene *CYP21A1P*, foram identificadas no paciente em questão as mutações p.Ile172Asn, herdada do pai e, a IVS2-13A/C>G, herdada da mãe. O fenótipo previsto por tal genótipo é o de virilizante simples, o que não era condizente com o fenótipo de perdedor de sal, como citado anteriormente. Portanto, o sequenciamento do gene *CYP21A2* deste paciente revelou a heterozigose da troca c.1072G>A descrita acima. O sequenciamento das amostras de DNA de seus pais (Fig. 13 B, C) confirmou a segregação da mutação p.Val358Ile em associação com a mutação p.Ile172Ans no alelo paterno.

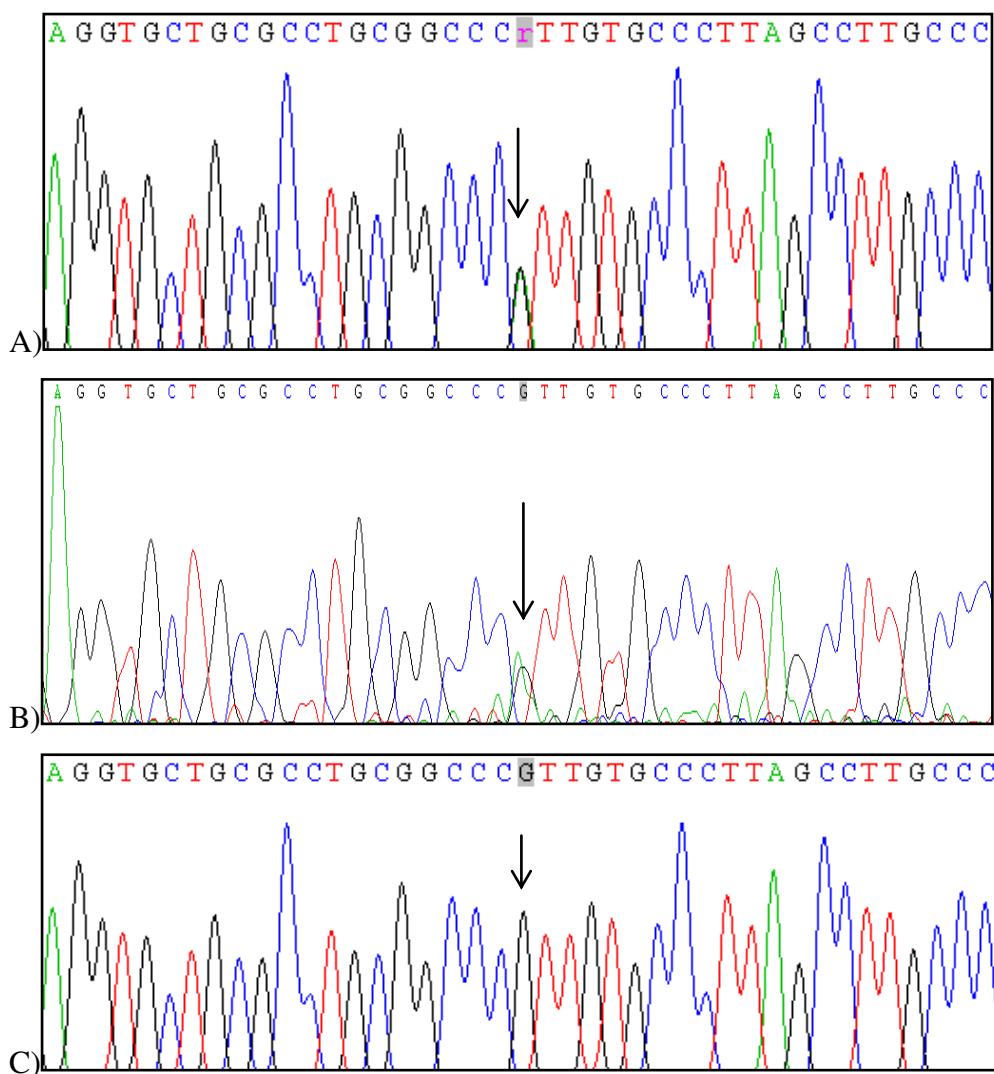


Figura 13 - Sequenciamento do exon 8 do DNA do paciente 112Yal e de seus pais. A) Fragmento do cromatograma do paciente, onde a seta indica a troca c.1072G>A em heterozigose (p.Val358Ile); B) fragmento do cromatograma do pai do paciente, onde a heterozigose para a mutação pode ser observada; C) fragmento do cromatograma da mãe do paciente indicando o G correspondente à sequência nativa.

A terceira mutação no gene *CYP21A2* aqui estudada foi a p.Arg426Cys. A paciente portadora desta mutação apresentava quadro clínico da deficiência de 21-hidroxilase na forma clássica perdedora de sal. Previamente, havia sido realizada a análise pela técnica de *Southern blot*, que revela a presença de deleção ou conversão em larga escala no genótipo. Cada um destes eventos mutacionais formam um gene híbrido *CYP21A1P/CYP21A2* cuja composição pode variar. O estudo pela técnica de PCR alelo-específica, na qual se identificam mutações derivadas do pseudogene, havia sido também realizado. O *Southern blot* indicou uma conversão em larga escala no alelo herdado da

mãe, sendo que o gene híbrido é portador de sequências derivadas do pseudogene numa região que se estende desde o terminal 5' até o intron 6. A PCR alelo-específica indicou a mutação p.Val281Leu herdada no alelo paterno. Da mesma forma descrita para o segundo paciente, o genótipo encontrado não estava de acordo com o fenótipo, uma vez que indicava a forma não-clássica da doença, ao passo que a paciente apresentava a forma clássica perdedora de sal. Após o sequenciamento do gene *CYP21A2* da paciente, verificou-se hemizigose da troca nucleotídica c.1276C>T, que putativamente leva à mutação p.Arg426Cys (Fig. 14 A, B). Este resultado indicava que a mutação era provavelmente herdada do pai, uma vez que o sequenciamento foi seletivo para o alelo paterno. O alelo materno não foi amplificado nem sequenciado, pois era um gene híbrido com o exon 6 mutante, sendo que o *primer* seletivo utilizado para amplificação e sequenciamento foi o exon 6 normal. O sequenciamento do gene *CYP21A2* do pai confirmou tal segregação (Fig. 14 C).

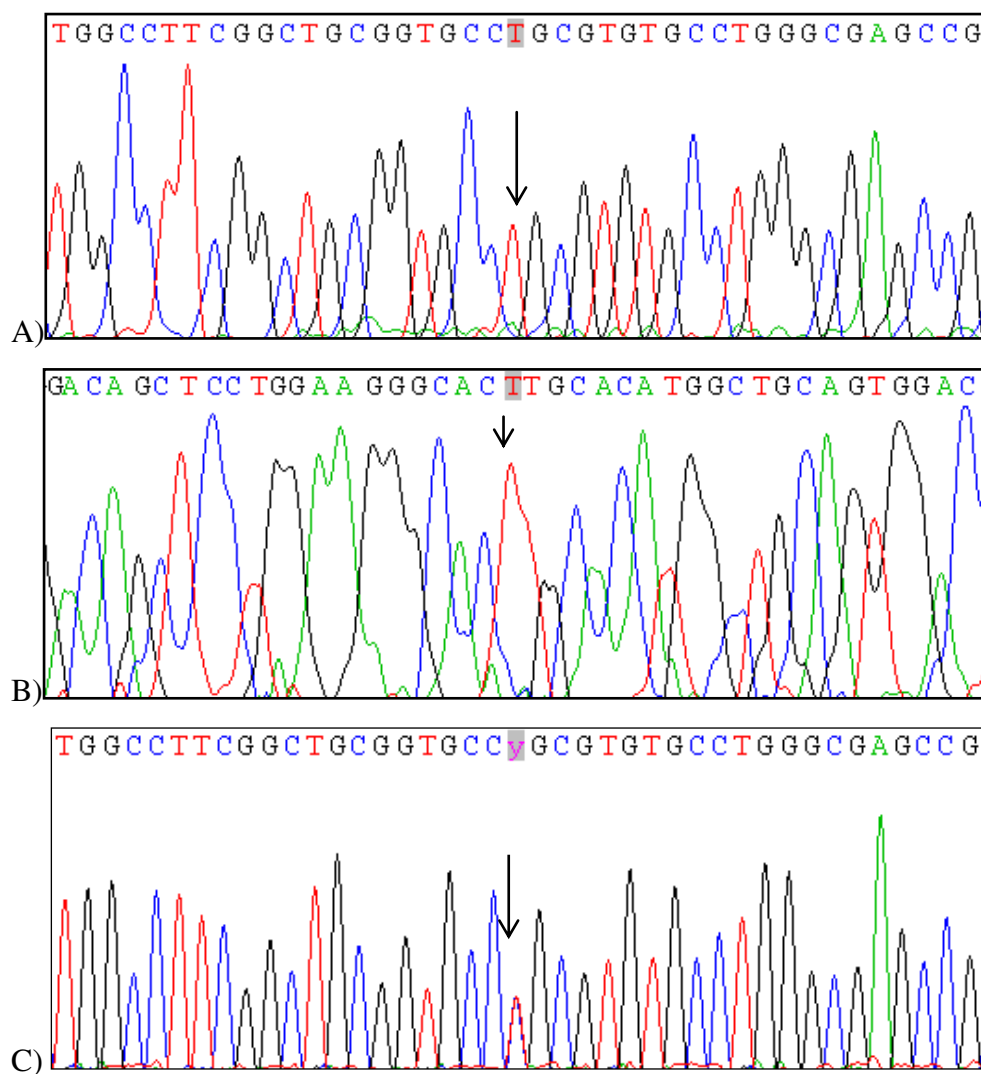


Figura 14 - Fragmento dos cromatogramas do DNA do paciente 108Xa1 e de seu pai, onde: A) fragmento do exon 10, onde a mutação c.1276C>T (p.Arg426Cys) está indicada pela seta; B) fragmento do exon 7 onde a mutação p.Val281Leu encontra-se destacada; C) fragmento do exon 10 do pai da paciente, onde a seta indica a mutação c.1276C>T.

A quarta mutação incluída neste estudo foi identificada em uma paciente encaminhada para investigação de mutações no gene *CYP21A2* por apresentar quadro clínico de puberdade precoce, para a qual foi levantada a suspeita de deficiência de 21-hidroxilase na forma tardia ou não-clássica. As análises de *Southern blot* e de PCR alelo-específica não revelaram nenhuma mutação. No sequenciamento foi identificada, em heterozigose, a mutação p.Pro267Leu, que é resultante da troca nucleotídica c.800C>T localizada no exon 7 (Fig. 15 A). Esta troca já constava do banco de seqüências e está identificada com o número rs142028935. A frequência média registrada para o alelo C é

de 98%, enquanto que para o alelo T é de 2%. No entanto, seu efeito sobre a estrutura e função da *CYP21A2* não havia sido investigado. Além disso, como esta alteração não havia sido identificada em mais de 400 alelos investigados em nosso laboratório, houve-se por bem incluí-la neste trabalho. A paciente herdou a mutação de seu pai e, associada à mutação p.Pro267Leu, foi identificada outra troca nucleotídica localizada no intron 2 (fig. 15 B, C), a c.293-80G>A, registrada sob o número rs79249676 e que também apresenta uma frequência global de 98% para o alelo G, sendo a variante A observada principalmente na população de origem asiática.

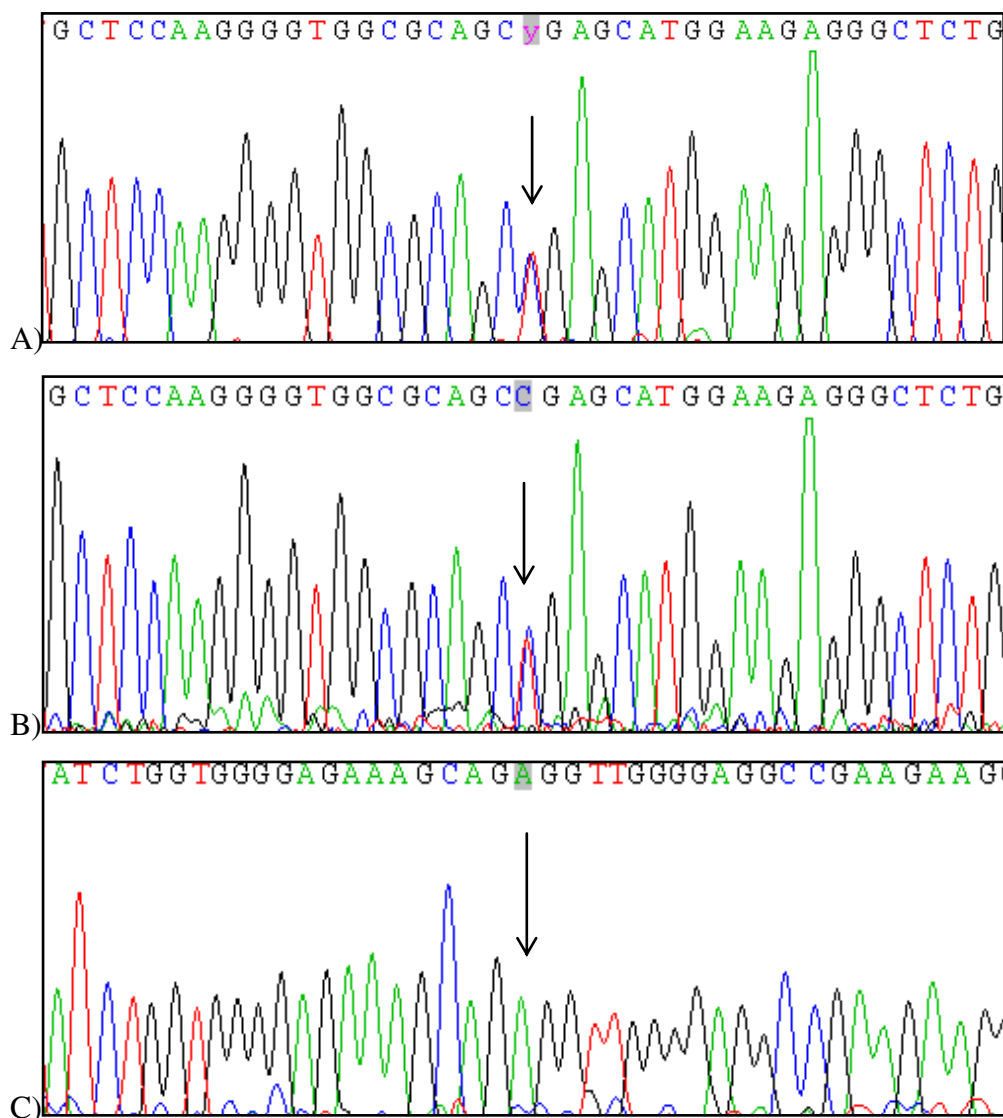


Figura 15 - Sequenciamento do fragmento do DNA da paciente 147Xa1 e de seu pai. A) Fragmento do exon 7 da paciente onde a alteração c.800C>T (p.Pro267Leu) pode ser observada em heterozigose; B) sequenciamento da mesma região do pai do. paciente; C) sequenciamento específico do alelo c.293-13C[&] do pai da paciente onde a variação c.293-80G>A, herdada pelo paciente pode ser observada.

Obs &; Quando um indivíduo é heterozigoto c.293-13A/C faz-se amplificação alelo específica de cada alelo, pois na amplificação padrão o alelo portador da variante C tende a não amplificar quando na presença da variante A no genótipo. Assim, o sequenciamento específico dos alelos é feito em separado.

Ainda no gene *CYP21A2*, uma quinta mutação foi aqui incluída para o estudo de modificações estruturais. A mutação c.1166_1175delAGGCGCCCA, localizada no exon 9, foi identificada em uma paciente com hiperplasia congênita da adrenal devido à deficiência de 21-hidroxilase na forma clássica perdedora de sal. A análise de *Southern blot* indicou uma deleção formando um gene híbrido semelhante ao descrito acima para a

paciente portadora da terceira mutação. O gene híbrido foi herdado da mãe, ao passo que no alelo paterno não foi identificada nenhuma mutação. O sequenciamento revelou a deleção de 9 nucleotídeos citada acima, observada em hemizigose na paciente (fig. 16). Esta mutação leva à deleção p.(Gln389_Ala391del) e não muda o quadro de leitura da proteína.

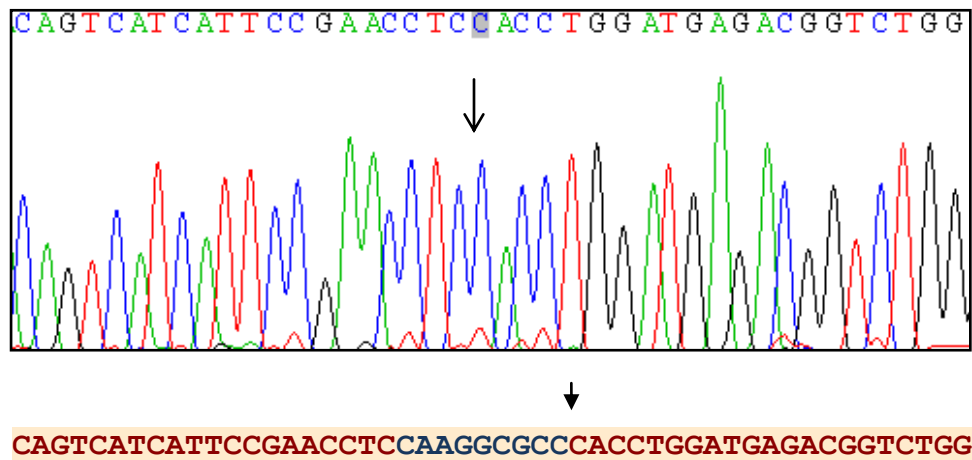


Figura 16 - Fragmento do sequenciamento do exon 9 do DNA do paciente 210Xa1, a sequência em bases nucleotídicas evidencia a região da deleção c.1166_1175delAGGCGCCCA, a seta indica o nucleotídeo posterior a deleção.

Para finalizar, foi incluída também a análise das mudanças estruturais provocadas pela mutação p.Pro222Gln no gene *HSD3B2*, identificada em homozigose em um paciente com hiperplasia congênita da adrenal por deficiência de 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase na forma clássica perdedora de sal. A mutação é resultado da troca nucleotídica c.665C>A. A análise da família demonstrou que ambos os pais e uma irmã não afetada são heterozigotos da mutação, resultado esperado dada a consanguinidade dos pais.

ANÁLISE DA CONSERVAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

A primeira análise feita para avaliar o grau de gravidade de cada substituição de aminoácidos resultantes das mutações foi o alinhamento das sequências da 21-hidroxilase de várias espécies de mamíferos, para verificação da conservação desses aminoácidos (Fig. 17). Os resíduos S113, I172, V281, V358 e R426 são conservados em todas as espécies avaliadas, refletindo a importância destes para a função e estrutura protéica. Por outro lado, o resíduo P267 apresentou variação dentro de uma região pouco conservada. Nessa posição foram observados aminoácidos de diferentes características. A prolina, que tem como característica ser neutra, apolar e hidrofóbica, aparece apenas na proteína humana, ao passo que a glutamina que é também neutra, mas polar e hidrofílica, aparece em quatro espécies de mamíferos diferentes.

S113

I172

Homo sapiens (Homem)

P L T Y K L V S R N Y P D L S L G D Y S L L W K I18.....P V A I E E E F S L L T C S I I C Y L T F 178

Sus scrofa (Porco)

I P S Y K L A S Q H C P D I S L G D Y S L F W K I18.....P V T I Q K E F S L L T C S I I C C L T F 178

Bos taurus (Boi)

I P S Y K L V S Q R C Q D I S L G D Y S L W K I18.....P V T I Q K E F S L L T C S I I C Y L T F 178

Canis lupus familiaris (Cão)

T P S Y K L V S L H H Q D L S L G D Y S L L W K I17.....P V A I Q K E F S L L T C A I I C H L T F 177

Rattus norvegicus (Rato)

I L D G K M N - - - F D I S L M G D Y S L T W K I16.....S V A I H K E F S L L T C S I I S C L T F 176

Mus musculus (Camundongo)

M L N G K M D - - L D I S L G D Y S L M W K I14.....P V A I H K E F S F L T C S I I S C L T F 174

* * * * *

* * * * *

P267

V281

V358

Homo sapiens (Homem)

M L Q G V A Q P S M E E G S G Q L L E G H V H M A A D L L I G G T E T T A 298.....V V P L A L P H R T 368

Sus scrofa (Porco)

M L Q E A G R Q E V E E G Q Q L L E G H V H M S V D L F I G G T E T T A 296.....V V P L A L P H R A 366

Bos taurus (Boi)

M L Q G V G R Q R V E E G Q Q L L E G H V H M S V D L F I G G T E T T A 296.....V V P L A L P H R A 366

Canis lupus familiaris (Cão)

M L Q R V G R L R A E E G Q Q L L E G H V H M S V D L F I G G T E T T A 295.....V V P L A L P H C T 365

Rattus norvegicus (Rato)

M L Q G V E K Q R D A D P G Q L H E R H V H M S V D L F V G G T E T T A 295.....V V P M A L P H R A 362

Mus musculus (Camundongo)

M L Q G V E K Q R D G K D E R L H E G H V H M S V D L F I G G T E T T A 292.....V V P L A L P H R A 359

* * * * *

* * * * *

* * * * *

R426

Homo sapiens (Homem)

A L A F G C G A R V C L G E P L A R L E 437

Sus scrofa (Porco)

A L A F G C G A R V C L G E P L A R L E 435

Bos taurus (Boi)

A L A F G C G A R V C L G E S L A R L E 436

Canis lupus familiaris (Cão)

V L A F G C G A R V C L G E P L A R L E 434

Rattus norvegicus (Rato)

I P T F G C G A R V C L G E P L A R L E 432

Mus musculus (Camundongo)

T P S F G C G A R V C L G E P L A R L E 429

Figura 17 - Alinhamento da sequência proteica da 21-hidroxilase humana com cinco sequências de 21-OH de mamíferos. As sequências foram obtidas no banco de sequência de proteínas Uniprot (<http://www.uniprot.org/>).

De acordo com a conservação desses aminoácidos foram feitas análises das mutações na função da proteína final, por meio de ferramentas de bioinformática. Os programas usados para tal enfoque foram o *SIFT* e o *Polyphen-2* (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados das predições *in silico* do efeito das mutações sobre a proteína. Onde o algoritmo SIFT considera que mutações com pontuação <0.05 são prejudiciais a proteína (intoleráveis), enquanto para o Polyphen-2 pontuações =1 são consideráveis possivelmente prejudiciais a proteína. Para fins de comparação foram utilizadas as mutações provenientes do pseudogene: p.Arg356Tri (clássica, perdedora de sal, sem atividade enzimática), p.Ile172Asn (clássica, virilizante simples, com atividade enzimática basal), p.Pro30Leu (não-clássica, com pouca atividade enzimática), p.Val281Leu (não-clássica, com atividade enzimática intermediária) e p.Pro483Ser (não-clássica, com alta atividade enzimática).

Mutação	SIFT	Predição SIFT	Polyphen-2	Predição Polyphen-2
p.Ser113Phe	0.02	prejudicial (intolerável)	1.000	provavelmente prejudicial
p.Pro267Leu	0.31	Tolerável	0.017	benigna (normal)
p.Val358Ile	0.58	Tolerável	0.923	possivelmente prejudicial
p.Arg426Cis	0	prejudicial (intolerável)	1.000	provavelmente prejudicial
p. Arg356Tri	0.02	prejudicial (intolerável)	1.000	provavelmente prejudicial
Controle os				
p.Ile172Asn	0	prejudicial (intolerável)	1.000	provavelmente prejudicial
Controle VS				
p.Pro30Leu	1	Tolerável	1.000	provavelmente prejudicial
Controle NC				
p.Val281Leu	1	Tolerável	1.000	provavelmente prejudicial
Controle NC				
p.Pro483Ser	0.13	Tolerável	1.000	provavelmente prejudicial
Controle NC				

Nas predições *in silico*, as mutações p.Ser113Phe e p.Arg426Cis apresentaram pontuações esperadas para mutações deletérias, causadoras de dano de função à enzima. Os valores encontrados para essas duas mutações foram compatíveis com aqueles observados para as mutações clássicas virilizante simples p.Ile172Asn e p.Arg356Tri.

A mutação p.Val358Ile apresentou pontuação de 0.58 para o algoritmo SIFT, valor considerado tolerável para a proteína, possivelmente com pouco impacto sobre sua

função. Já a pontuação obtida para o algoritmo Polyphen-2 foi de 0.923, valor considerado possivelmente prejudicial para a atividade enzimática. A variação de classificação dessa mutação frente aos algoritmos avaliados pode ser resultado dos diferentes bancos de sequências em que se baseiam esses programas de análises, uma vez que o SIFT usa sequências do genoma humano e a conservação como base e o Polyphen-2 se baseia em sequências e estrutura de proteínas de vertebrados. Os valores encontrados *in silico* para essa mutação sugerem sua classificação como não-clássica, associada a um fenótipo menos grave que os relacionados às mutações não-clássicas p.Pro30Leu, p.Val281Leu e p.Pro483Ser.

A mutação p.Pro267Leu apresentou pontuação de 0.31 para o algoritmo SIFT, valor considerado tolerável para a proteína, possivelmente sem grande impacto sobre sua função. Na análise com o algoritmo Polyphen-2, a pontuação desta mutação foi de 0.017, equivalente à esperada para uma variação normal, benigna, sem influência sobre a atividade enzimática. Os valores encontrados nas predições *in silico*, mesmo quando comparados às mutações proveniente do pseudogene, não permitem inferir se essa alteração seria uma variante normal ou uma mutação não-clássica menos grave.

ANÁLISE BIOQUÍMICA DAS MUTAÇÕES

Preparo dos plasmídios e subclonagens

Para realização dos testes de atividade enzimática residual das enzimas mutantes foi necessário o uso de controles para delimitação da faixa de variação entre 0% e 100%, para se estabelecer a comparação percentual da conversão substratos/produtos. Sendo assim, foram usadas as amostras de pCMV4-cDNA *CYP21A2* normal e pCMV4-vazio. Estes foram utilizados para a transformação em bactérias *E. coli* e preparados em larga escala para posterior transfecção em células COS.

Duas mutações, cujas atividades já eram conhecidas, foram usadas como controles da atividade enzimática para as faixas relativas às formas virilizante simples e não-clássica. Assim, foram utilizados vetores contendo os cDNAs da 21-hidroxilase portadores das mutações derivadas do pseudogene p.Val281Leu, que é referência para a

forma não clássica, p.Ile172Asn, que é referência para a forma virilizante simples. Como no caso do vetor contendo o cDNA normal e no mock, os vetores com as mutações p.Val281Leu e p.Ile172Asn também foram preparados previamente a este trabalho. Para obter maior quantidade dos plasmídios para posterior utilização nos experimentos de transfecção, estes clones foram expandidos e isolados por preparação em larga escala (Soardi *et al.*, 2008).

Após a preparação em larga escala dos plasmídios pCMV4, a fim de se confirmar a presença dos fragmentos correspondentes ao cDNA sem e com as mutações, foi realizada uma reação de PCR para amplificação de um fragmento específico do gene com dois *primers* que anelam em exons do gene *CYP21A2* (Fig. 18). Todos os controles com o cDNA de *CYP21A2* apresentaram a amplificação do fragmento, confirmando a inserção do gene no vetor. Em seguida, as construções foram sequenciadas para verificação da integridade e presença da alteração de interesse no cDNA.

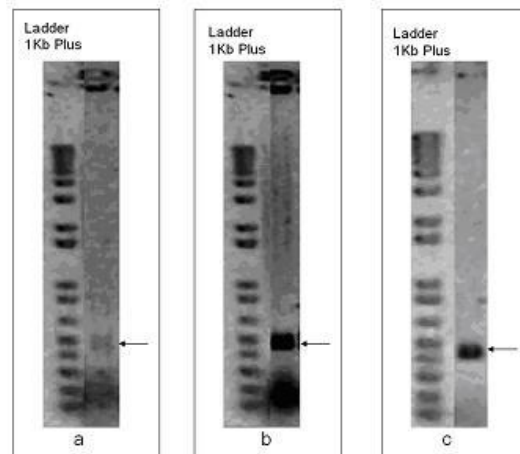


Figura 18 - Gel de agarose 1% com resultado da amplificação, com os *primers* do exon 3 normal sense e o exon 6 normal antisense, onde a seta está indicado o produto da amplificação. Na primeira coluna o ladder 1 Kb Plus. a) amostra do cDNA com a mutação p.Val281Leu; b) amostra de cDNA sem mutação (normal); c) amostra do cDNA com a mutação p.Ile172Asn.

As mutações p.Ser113Phe, p.Pro267Leu, p.Val358Ile, p.Arg426Cys e as combinações de mutações p.Ile172Asn+p.Val358Ile e p.Val281Leu+p.Arg426Cys foram inseridas no cDNA de *CYP21A2* incluso no vetor pALTER por mutagênese sítio-dirigida. A correta inserção das mutações foi confirmada por seqüenciamento (Fig. 19).

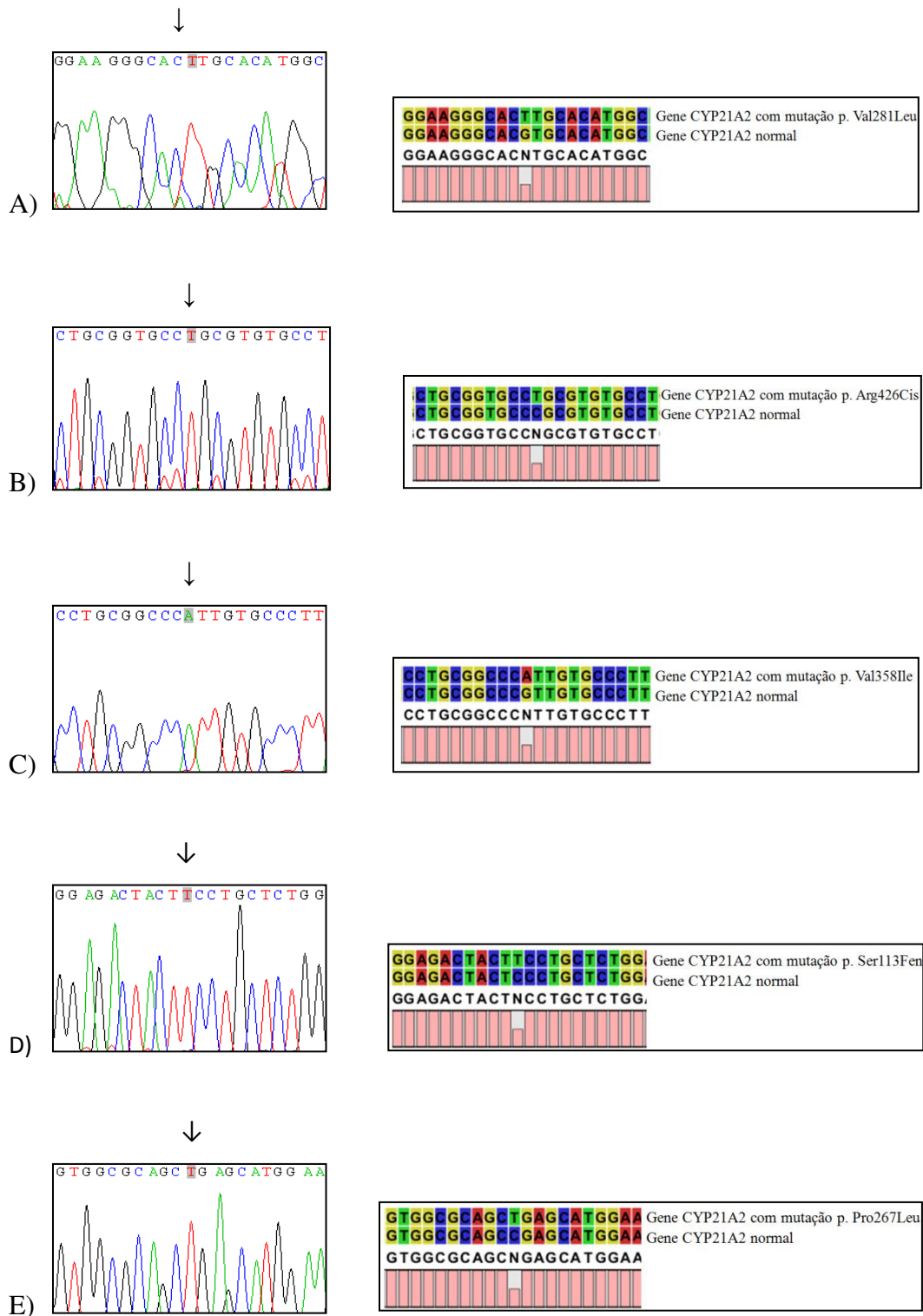


Figura 19 - Parte dos cromatogramas dos cDNAs que foram alterados por mutagênese sítio-dirigida, a direita o alinhamento das sequências mutante e normal do gene *CYP21A2*. (A) sequência do cDNA com a mutação p.Val281Leu; (B) sequência do cDNA com a mutação p.Arg426Cis; (C) sequência do cDNA com a mutação p.Val358Ile; (D) sequência do cDNA com a mutação p.Ser113Phe e (E) sequência do cDNA com a mutação p.Pro267Leu.

Após a confirmação das mutações, os plasmídios (Fig.20a) foram clivados com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Kpn* I, que liberam o inserto do vetor (Fig. 20b).

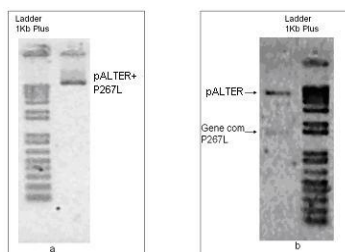


Figura 20 - Teste em gel de agarose 1% do plasmídio pALTER-cDNA após a realização da mutagênese sítio-dirigida com p.Pro267Leu (a), em(b) a digestão com *Kpn* I e *Bgl* II do vetor pALTER-CYP21A2 p.Pro267Leu.

Os insertos foram subclonados no vetor de expressão pCMV4. A correta inserção do cDNA no vetor de expressão foi confirmada por sequenciamento. Conferidas as sequências, os plasmídios foram produzidos e extraídos em larga escala.

Atividade enzimática

Os dados do genótipo dos pacientes e a conservação dos aminoácidos foram usados para iniciar estudos de alterações significativas causadas pelas mutações. A partir daí, foi quantificada a atividade enzimática das proteínas nas quais cada mutação foi inserida.

Os cinco melhores experimentos com o substrato 17-OH progesterona foram utilizados para calcular a média das atividades específicas e relativas de cada variante e dos controles.

Os testes foram dosados através do cintilômetro e feitos cálculos de atividade, porém esses dados foram calculados em relação à quantidade de proteína total (Bradford) e atividade da β -galactosidase. As médias dos valores das amostras dos cinco testes foram colocadas em um gráfico (Gráfico 1).

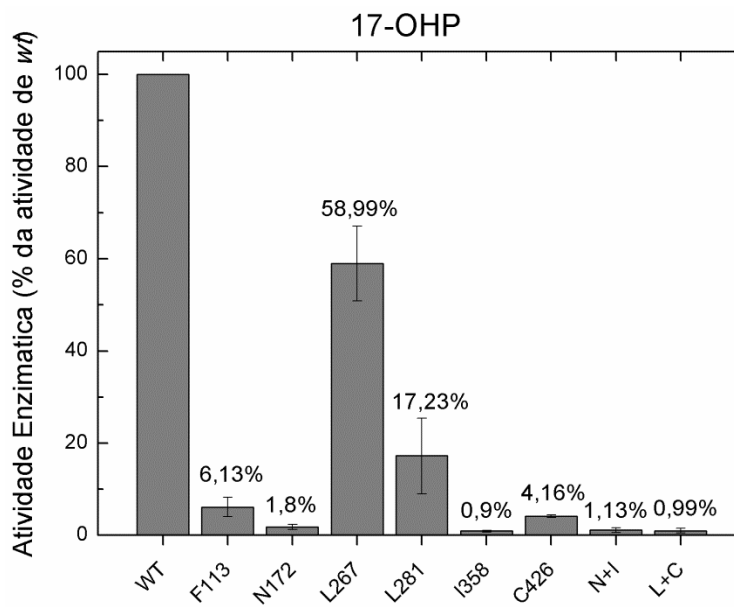


Gráfico 1: Porcentagem relativa de atividade enzimática residual das proteínas mutantes frente ao substrato 17-OH Progesterona.

A proteína com a mutação p.Pro267Leu apresentou alta atividade, com valor de conversão muito próximo ao da proteína nativa. Para saber se esta mutação é de fato uma mutação que causa a forma não clássica da doença ou se é uma mutação neutra, dois ensaios de cinética enzimática foram realizados com o substrato 17-OHP (Tabela 6).

Tabela 6: Constante cinética para proteína nativa (P450c21) e a mutante p.Pro267Leu.

	17 OHP		
	K_M (mg)	V_{MAX} (pmol/mg.min ⁻¹)	V_{MAX}/K_M
WT	11,7± 0.1(n=3)	1111±493 (n=3)	95
Pro267Leu	9.2± 0.1(n=3)	833±277 (n=3)	91

Na determinação da constante cinética, a capacidade de ligação ao substrato foi de mesma grandeza entre a proteína mutante e a nativa, com V_{MAX} menor para a mutante, característica da forma não clássica da doença.

Ensaio de atividade enzimática também foram feitos com a progesterona como substrato, porém inicialmente os testes com esse substrato não foram conclusivos. Para se

elevar a confiabilidade dos resultados, foram necessários vários testes, como a alteração da relação progesterona marcada e não marcada com trício presentes na reação, além da variação da proporção de substrato e NADPH em relação à quantidade de células.

Após diversas modificações na concentração da progesterona não marcada e na modificação do solvente da cromatografia, de clorofórmio para ciclohexano, encontramos medidas com melhores valores para atividade enzimática, onde a proteína nativa apresentou cerca de 10% de conversão frente ao substrato. As medidas do cintilômetro, para quantificação do produto em relação ao substrato, foram padronizadas em relação à quantidade de proteína, medida por Bradford, e os testes de β -galactosidase. A média dos valores dos cinco melhores experimentos foi plotada em gráfico (Gráfico 2).

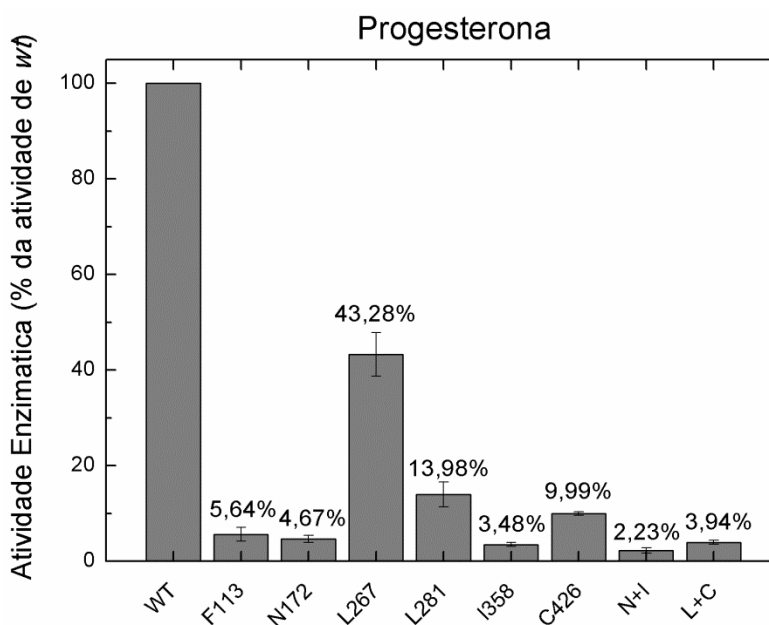


Gráfico 2: Porcentagem relativa de atividade enzimática residual das proteínas mutantes frente ao substrato Progesterona.

As proteínas mutantes apresentaram diferentes atividades relativas para o substrato progesterona e 17-OH progesterona. Os controles desse experimento foram a mutação p. Ile172Asn, que já vem sendo estudada como virilizante simples e que apresentou atividade de 1,79 e 4,67% em relação à proteína nativa e com a 17-OHP e progesterona como substrato, respectivamente, e a mutação p.Val281Leu, também já estudada como não clássica, com atividade de 17,23% em testes com a 17-OHP e

13,98% com a progesterona. Nesse trabalho, as mutações p.Ser113Phe e p.Arg426Cys apresentaram valores de atividade compatíveis àqueles esperados para mutações clássicas da forma virilizante simples. A mutação p.Val358Ile, e as combinações p.Ile172Asn + p.Val358Ile e p. Val281Leu + p.Arg426Cys, apresentaram valores para classificação como associadas ao fenótipo de mutações clássicas da forma perdedora de sal. A mutação p.Pro267Leu apresentou valores de atividade próximo a da proteína normal, frente aos dois substratos, valores maiores que os observados para a mutação p.Val281Leu. Devido aos dados encontrados para atividade enzimática e aqueles obtidos no estudo de cinética enzimática, essa mutação está associada ao fenótipo não-clássico da deficiência de 21-OH.

Western blotting

A análise em *Western blot* foi feita para verificar se a proteína 21-hidroxilase estava sendo expressa em quantidades suficientes através do procedimento adotado. Para isso, foram usados anticorpos primários que reconhecem a região entre os aminoácidos 21-320 mapeados próximos ao N-terminal da CYP21A2 humana. As amostras controles e mutantes apresentaram expressão de proteína no tamanho da 21-hidroxilase, em SDS-PAGE (Fig. 21a) e ao serem transferidas para uma membrana de nitrocellulose (Fig. 21b), reagiram com os anticorpos primário e secundário.

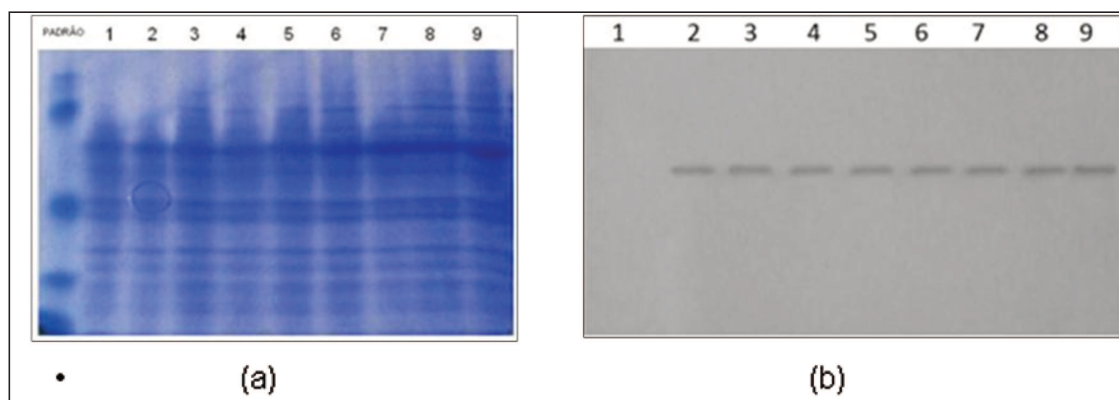


Figura 21 - (a) Análise em SDS-PAGE da expressão de 21-Hidroxilase em células COS-7. Sendo: Padrão, o padrão de peso molecular; linha 1, produto obtido do plasmídeo pCMV4 sem o gene *CYP21A2*; linha 2, produto obtido do plasmídeo pCMV4 com o gene *CYP21A2* nativo; linha 3, produto obtido do gene com a mutação p.S113L; linha 4, produto obtido do gene com a mutação p.Ile172Asn; linha 5, produto obtido do gene com a mutação p.Pro267Leu; linha 6, produto obtido do gene com a mutação p.Val281Leu; linha 7, produto obtido do gene com a mutação p.Val358Ile; linha 8, produto obtido do gene com a mutação p.Arg426Cys e a linha 9, produto obtido do gene com a mutação combinada p.Ile172Asn+P.Val358Ile. (b) Resultado do reconhecimento da proteína CYP21A2 pelos anticorpos específicos na membrana de nitrocelulose obtida pela transferência do SDS-PAGE mostrado em (a).

MODELAGEM DA 21-HIDROXILASE

Analizando o modelo com base na estrutura da 21-hidroxilase bovina (Fig.22), foi feita a comparação da estrutura da 21-hidroxilase nativa com a que possui uma deleção de 9 pares de bases, que suprimem os aminoácidos Q389, G390 e A391. O paciente que possui essa deleção apresentou um quadro clínico de HCA clássica.

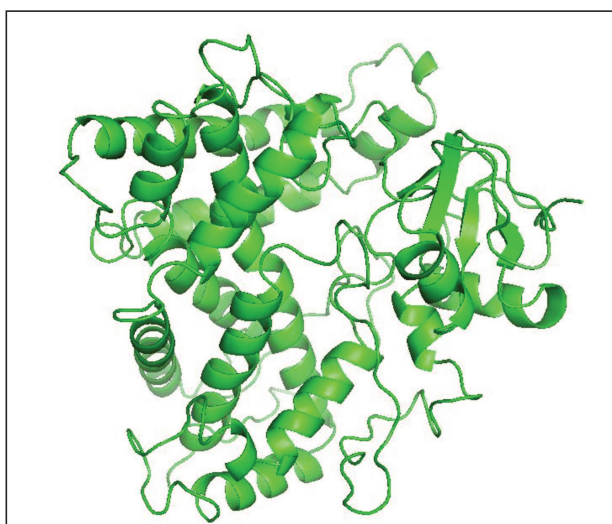


Figura 22 - Modelo estrutural da CYP21A2 com base na estrutura da 21-hidroxilase bovina.

A deleção de 9 pares de bases causou modificações estruturais locais e globais na proteína. O aminoácido leucina 388, anterior a deleção, na proteína alterada perdeu a maioria de suas interações (Fig.23a), principalmente entre os aminoácidos excluídos e região proximal a deleção, porém fez novos contatos com os aminoácidos A418 e P358 (Fig.23b).

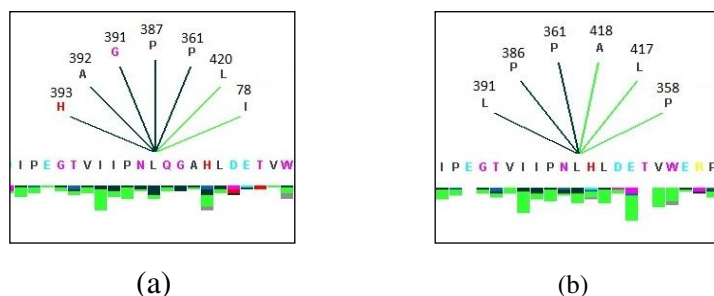


Figura 23 - Gráficos de contatos do aminoácido L388, aminoácido vizinho a deleção, onde (a) é a proteína normal e (b) proteína com a deleção. Na proteína normal o aminoácido L388 faz ligações de hidrogênio de cadeia principal-cadeia principal com os aminoácidos H393, A392, G391, P387, P361, além de interagir hidrofobicamente com os aminoácidos L420, I78. Na proteína contendo a deleção este aminoácido perde as ligações de hidrogênio com os aminoácidos da deleção e região, mas mantém os contatos com o P387 e P361. Interage hidrofobicamente com o aminoácido A418 e P358, além de manter a interação hidrofóbica com o L417. Onde as ligações de hidrogênio estão representadas pela cor preta (cadeia principal – cadeia principal) e azul escuro (cadeia principal-cadeia lateral) e em verde as interações hidrofóbicas.

O aminoácido histidina 392, posterior à deleção, sofreu perda de todas suas interações (Fig.24a e Fig.24b). Na proteína mutante, esta histidina estabelece novas interações com os aminoácidos prolina 46, isoleucina 47, arginina 357 e asparagina 387 (Fig.24b).

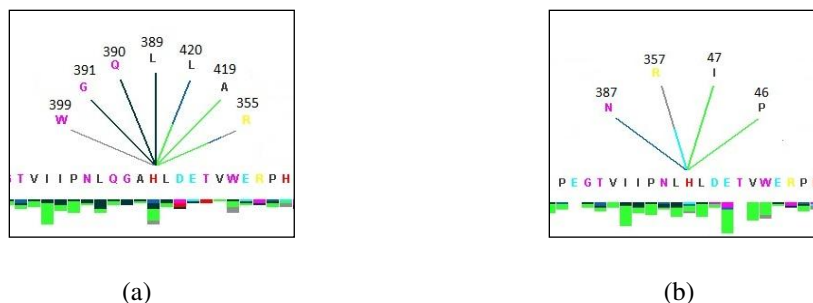


Figura 24 - Gráficos de contatos do aminoácido H392, aminoácido vizinho a deleção, onde (a) proteína nativa e (b) proteína com deleção. Na proteína nativa o aminoácido H392 interage hidrofobicamente com os aminoácidos L420, A419, R355. Ainda, na proteína nativa este aminoácido apresenta ligação de hidrogênio (cadeia principal-cadeia principal) com G391, Q390, L389 e interação por carga positiva com W399. Na proteína contendo a deleção este aminoácido perde todas suas interações iniciais e estabelece novas interações hidrofóbicas com I47 e P46 e uma por ligação de hidrogênio de cadeia principal-cadeia principal com N387. Onde as ligações de hidrogênio estão representadas pela cor preta (cadeia principal – cadeia principal) e azul escuro (cadeia principal-cadeia lateral), em azul claro as interações de carga repulsiva e em verde as interações hidrofóbicas.

A deleção dos aminoácidos Q389, G390 e A391 também altera as interações com as proteínas acessórias, cuja região de ligação é composta pela tríade E351, R354 e R356 (Fig.25). O aminoácido E351 não apresentou alterações em suas interações. A arginina 354 perde a interações com o aminoácido histidina 393, enquanto que a arginina 356 passa a interagir com este mesmo aminoácido.

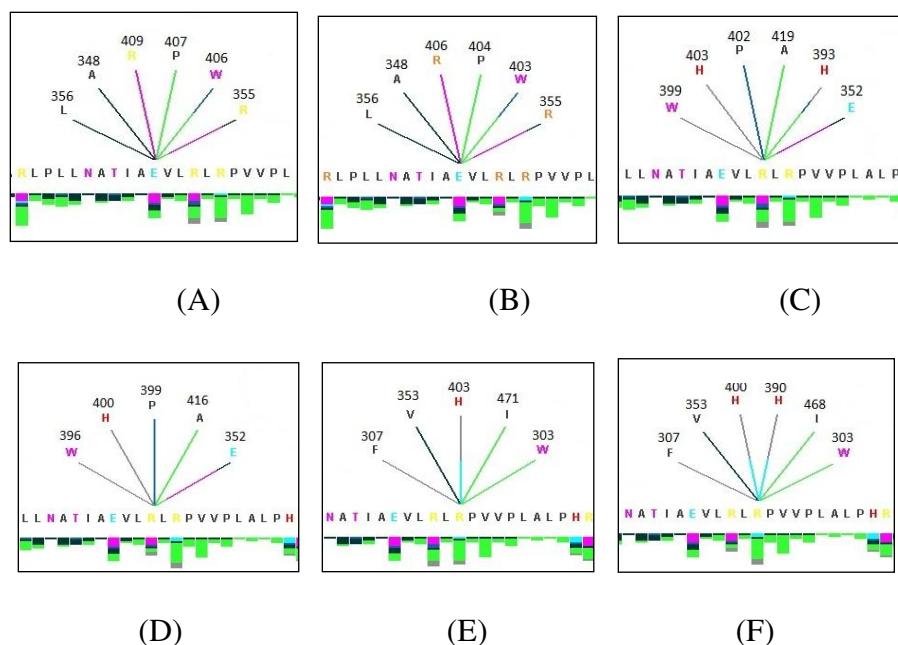


Figura 25 - Gráfico de contatos dos aminoácidos da tríade E351, R354, R356, região de ligação as proteínas acessórias: (A) contatos do aminoácido E351 na proteína nativa, que se liga por hidrogênios com os aminoácidos L356 e A348, interage hidrofobicamente com o P407 e W406 e por cargas atrativas com o R409 e R355; (B) contatos do aminoácido E351 na proteína com a deleção, mantendo os mesmos contatos; (C) contatos do aminoácido R354 na proteína nativa, que interage aromaticamente com os aminoácidos W399, H403, hidrofobicamente com o A419 e H393, liga-se por hidrogênios com o P402 e por cargas atrativas com o E352; (D) na proteína com a deleção o R534 só não mantém a ligação com o H393; (E) o aminoácido R356 da proteína nativa interage aromaticamente com os aminoácidos F307, H403, hidrofobicamente com o I471 e W303 e liga-se por hidrogênios ao V353; (F) aminoácido R356 da proteína com a deleção tem os mesmos contatos da proteína nativa e interage aromaticamente com a H393. Onde as ligações de hidrogênio estão representadas pela cor preta (cadeia principal – cadeia principal) e azul escuro (cadeia principal-cadeia lateral), em azul claro as interações de carga repulsiva, em magenta as interações de carga atrativa e em verde as interações hidrofóbicas.

As outras regiões importantes para a atividade enzimática, como a região de ligação ao substrato (Q53-R60 e L342-V358), a região de ligação ao grupamento heme C428, a ligação ao O₂ e H₂O pelo ácido glutâmico 294 e à treonina 295 não apresentaram diferenças estruturais.

A análise utilizando a proteína CYP21A2 bovina como molde para se investigar as consequências de mutações na proteína humana começou a ser usada recentemente (conforme descrito em métodos). Todas as análises estruturais de mutações em CYP21A2 humana publicadas anteriormente eram realizadas utilizando-se a proteína P450 2C5 de coelho como molde (Fig. 26). Com a intenção de validar as análises estruturais feitas

previamente por diferentes grupos de pesquisa, o estudo *in silico* com este molde foi realizado para as proteínas normal e mutantes.



Figura 26 - Modelo estrutural da 21-hidroxilase com base na estrutura da *Mammalian cytochrome P450 2C5* (PDB-ID 1DT6).

Para a deleção de 9 pares de bases, que suprimem os aminoácidos Q389, G390 e A391, a análise com o modelo baseado na estrutura de CYP450 2C5 também demonstrou que a deleção causou modificações estruturais locais e globais na proteína. Nos aminoácidos vizinhos à deleção, a L388 e a H392, ocorrem perda de interações da proteína nativa e ganho de interações na proteína alterada (Fig.27a e 27b). Da mesma forma que observado na modelagem da 21-OH bovina, os aminoácidos vizinhos à deleção sofreram modificações em seus contatos internos. O aminoácido leucina 388 interage na proteína nativa, hidrofobicamente, com os aminoácidos H298, A329, S330, R333 e H392 (Fig. 26a); na proteína alterada essas interações são perdidas. As ligações por ponte de hidrogênio de cadeia principal com os aminoácidos G390 e A391 também são perdidas na proteína mutante, sendo estabelecidas três novas interações por pontes de hidrogênio de cadeia principal com os aminoácidos P387, L391 e D392 (Fig. 27b). O aminoácido H392, devido à deleção, perde as interações observadas na proteína nativa (Fig. 27c), e estabelece novas interações hidrofóbicas com P380 e P387 e uma ligação por pontes de hidrogênio de cadeia principal com H388 (Fig. 27d).

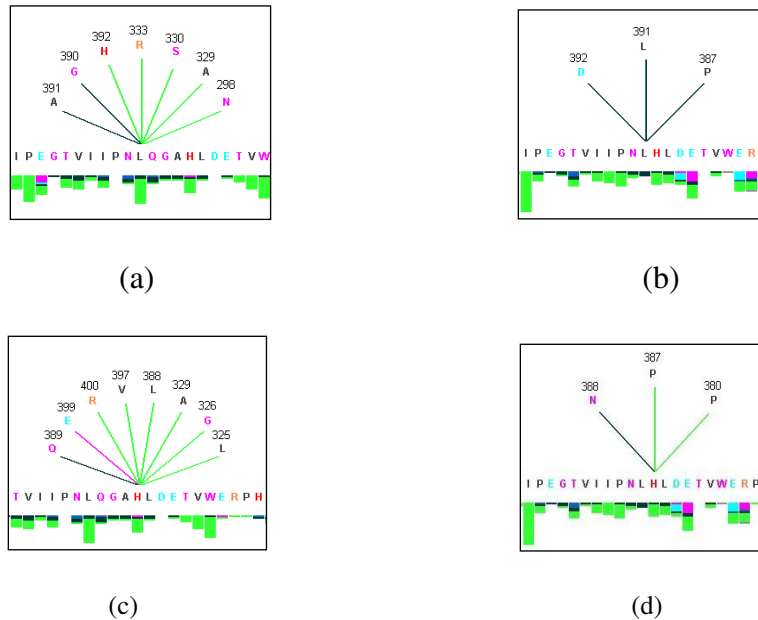


Figura 27 - Gráfico de contatos dos aminoácidos vizinhos a deleção. Contatos internos na proteína nativa (a) e proteína mutante (b) para o aminoácido L88. Contatos internos na proteína nativa (c) e proteína mutante (d) para o aminoácido H392. Onde as ligações de hidrogênio estão representadas pela cor preta (cadeia principal – cadeia principal) e azul escuro (cadeia principal-cadeia lateral), em azul claro as interações de carga repulsiva, em magenta as interações de carga atrativa e em verde as interações hidrofóbicas.

Considerando as regiões importantes para a atividade enzimática (White e Speiser, 2000) pode-se visualizar que, da mesma forma que observado para o modelo na análise baseada na proteína bovina, a região de ligação às proteínas acessórias sofreu alteração em suas interações (Fig. 28). A arginina 354 ganhou duas interações (Fig. 28a e 28b), enquanto que a R356 perde as suas duas interações (Fig. 28c e 28d). O E351 perde a interação com a A362 e faz uma interação com outra região, a K75, na proteína com a deleção (Fig. 28e e 28f).

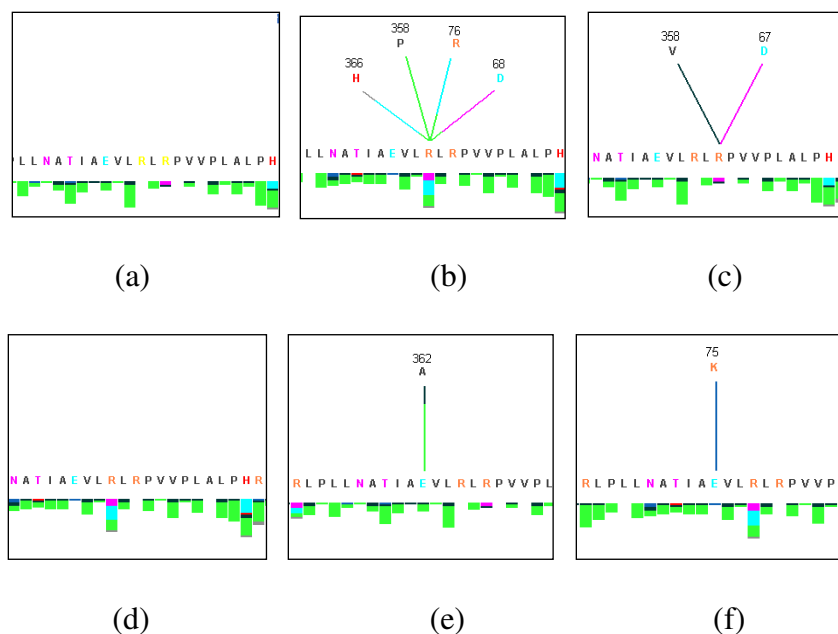


Figura 28 - Gráfico de contatos dos aminoácidos da tríade de ligação às proteínas acessórias. Em (a) R354 na proteína nativa e (b) na proteína com a deleção. Na proteína nativa o aminoácido 354 não faz contatos outros aminoácidos, enquanto que na proteína com a deleção estabelece interações de carga repulsiva com a histidina 366 e a arginina 76, interações hidrofóbicas com a prolina 358 e aspartato 68 e interações de carga atrativa com o aspartato 68, além de ligações de hidrogênio com a histidina 366. Em (c) os contatos do aminoácido R356 na proteína nativa e (d) na proteína com a deleção. Na proteína nativa o aminoácido 356 faz ligações de hidrogênio com a valina 358 e interações de carga atrativa com o aspartato 67, enquanto que a proteína com a deleção não apresenta contatos. Em (e) as interações de E351 na proteína nativa e (f) proteína com deleção. O glutamato 351 na proteína nativa faz ligação de hidrogênio e interação hidrofóbica com a alanina 362, na proteína mutante perde esta interação e estabelece uma ligação de hidrogênio com a lisina 75. Sendo representadas pela cor verde as interações hidrofóbicas, as ligações de hidrogênio pela cor preta (cadeia principal – cadeia principal) e azul escuro (cadeia principal-cadeia lateral), em azul claro as interações de carga repulsiva e em magenta as interações de carga atrativa.

Entretanto, diferentemente do observado para o outro modelo, neste modelo, outras regiões importantes para a atividade enzimática, como a região de ligação ao grupamento heme e a região de ligação ao substrato, também sofreram alterações em suas interações.

Na região de ligação ao grupamento heme, a arginina 426 mantém apenas duas de suas interações na proteína com a deleção (Fig. 29a e 29b), ocorrendo a troca de sete interações na proteína mutante em relação à normal, incluindo a perda de interação com a região 125 a 132. A cisteína 428 perde uma ligação com a glicina 430, mantendo as demais ligações da CYP21A2 normal em relação à mutante (Fig. 29c e 29d).

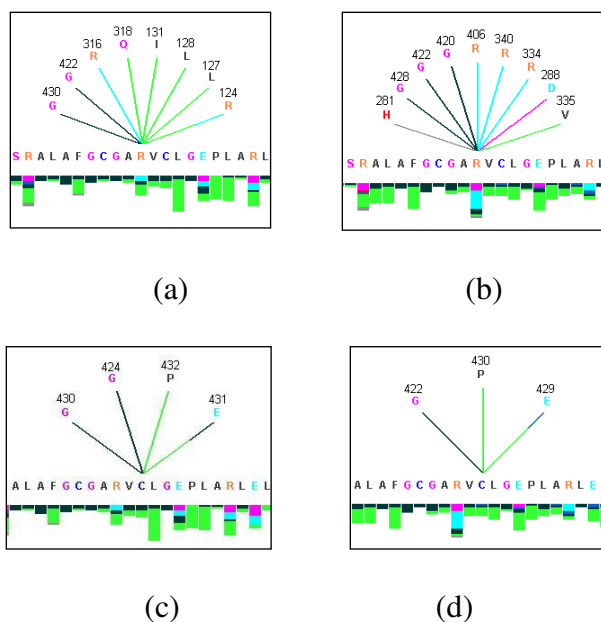


Figura 29 - Gráfico de contatos dos aminoácidos da região de ligação ao grupamento heme, com R426 na proteína normal (a) e na proteína mutada (b) e C428, na proteína nativa (c) e na proteína com a deleção (d). Na proteína nativa o aminoácido arginina 426 faz ligações de hidrogênio com a glicina 430 e 422, interações hidrofóbicas com a glutamina 318, isoleucina 131, leucina 128, leucina 127 e arginina 124, além de interações de carga repulsiva com a arginina 316 e 124. O aminoácido 428 faz ligações de hidrogênio com a glicina 430 e 424, glutamato 431, além de interações hidrofóbicas com a prolina 432 e o glutamato 431. Na proteína com a deleção o aminoácido arginina faz ligações de hidrogênio com a histidina 281, as glicinas 428, 422, 420, interações de carga repulsiva com as argininas 406, 340 e 334, interações de carga atrativa aspartato 288 e interações hidrofóbicas com a valina 335. No caso do aminoácido cisteína na proteína com a deleção os contatos são os mesmos da proteína nativa, menos a ligação de hidrogênio com a glicina 430. Estão representadas as ligações de hidrogênio pela cor preta (cadeia principal – cadeia principal) e azul escuro (cadeia principal-cadeia lateral), em azul claro as interações de carga repulsiva, em magenta as interações de carga atrativa e em verde as interações hidrofóbicas.

Na região de ligação ao substrato (Q53-R60) ocorre uma alteração estrutural na proteína contendo a deleção, onde a redução da folha beta e aumento da alça dessa região podem ser observadas (Fig. 30).

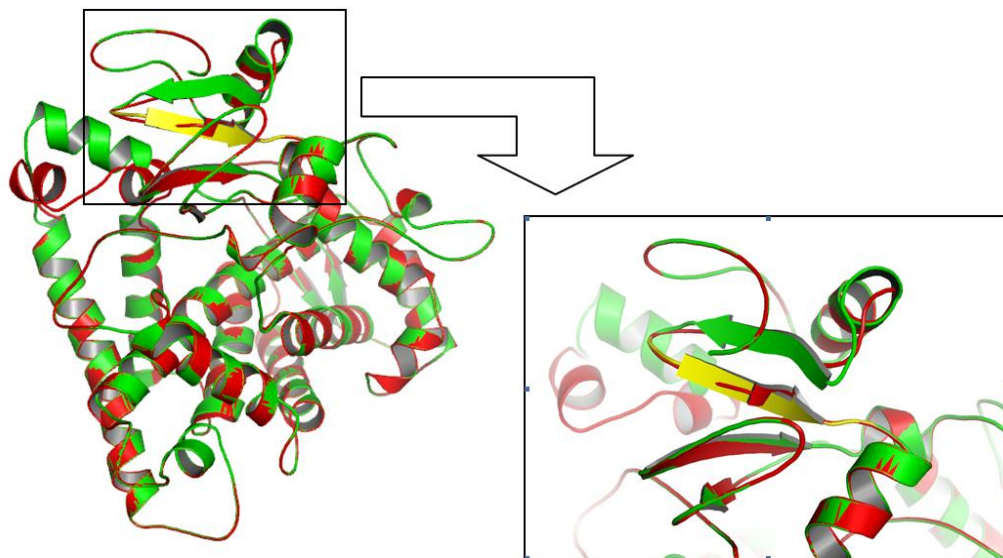


Figura 30 - Modelo molecular da CYP21 humana, em destaque a região de ligação ao substrato (em amarelo a proteína nativa e em vermelho a proteína com a deleção).

As duas análises *in silico* para deleção demonstraram ser concordantes em relação à gravidade das conseqüências da perda dos três aminoácidos para a estrutura protéica.

O outro estudo feito com a 21-hidroxilase, usando como base a 21-hidroxilase bovina foi feito com as mutações *missenses* que foram estudadas quanto à atividade (Fig. 31). A proteína nativa e as mutantes foram modeladas e comparadas entre si, bem como comparadas aos modelos baseados em P450 2C5.

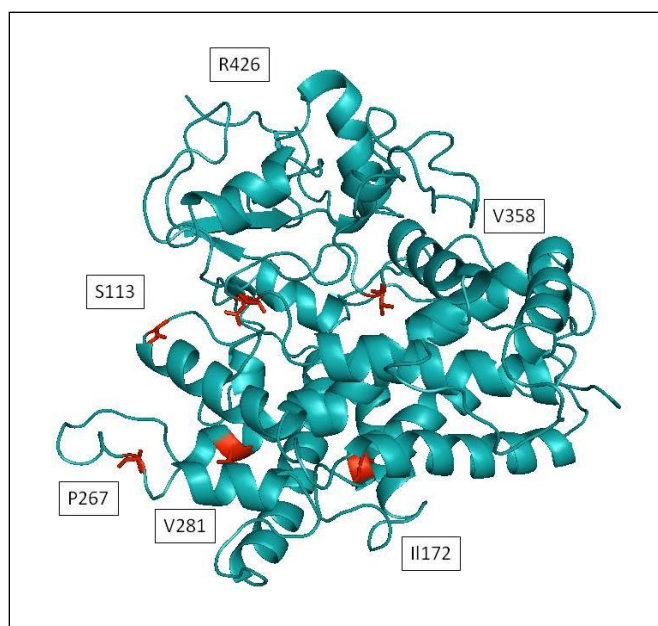


Figura 31 - Modelo do SwissModel da proteína 21-hidroxilase nativa com base na estrutura CYP21 bovina (PDB-ID 3QZ1) com os aminoácidos onde foram encontradas as mutações evidenciados.

A primeira análise foi feita com a proteína com a mutação p.Ser113Phe, verificando as ligações intra-protéicas. Na proteína nativa o aminoácido 113 faz ligações de hidrogênio (cadeia principal-cadeia principal) com o triptofano 117 e a leucina 116, enquanto a proteína com a mutação mantém essas interações e estabelece uma interação hidrofóbica com a leucina 116 (Fig. 32).

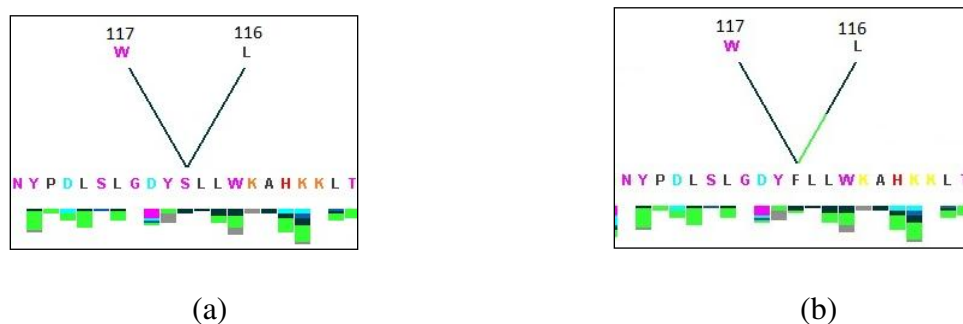


Figura 32 - Comparação das interações do aminoácido 113 na proteína nativa (a) e na proteína com a mutação p.Ser113Phe (b). Em verde, as interações hidrofóbicas e em preto as ligações de hidrogênio (cadeia principal- cadeia principal).

Não foram observadas alterações nas interações do aminoácido F113 em relação ao S113 usando como molde a P450 2C5 de coelho (PDB ID: 1DT6).

Tanto na proteína nativa como na mutante o aminoácido 113 faz ligações de hidrogênio (cadeia principal-cadeia principal) com a lisina 118 e com o ácido aspártico 112 (Fig.33). Resultado compatível ao observado na análise do modelo baseado em CYP21A2 bovina, onde o aminoácido F113 manteve as interações de S113 com L116 e W117 (Fig.32).

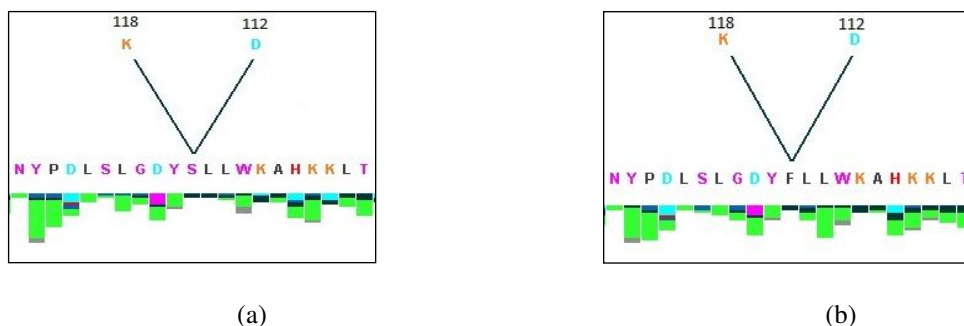


Figura 33 - Comparação dos contatos do aminoácido 113 da proteína nativa (a) com a proteína com mutação Ser113Phe (b). Na proteína nativa a serina da posição 113 estabelece ligações de hidrogênio (cadeia principal-cadeia principal) com a lisina 118 e o aspartato 112. Na proteína com a mutação p.Ser113Phe são mantidos os mesmos contatos. Estão representadas as ligações de hidrogênio pela cor preta (cadeia principal – cadeia principal).

A outra mutação analisada foi a p.Ile172Asn, onde o aminoácido da posição 172 na proteína nativa faz ligação de hidrogênio (cadeia principal-cadeia principal) com a treonina 169, interações hidrofóbicas com a tirosina 191, metionina 188, leucina 187, glicina 179, treonina 169 (Fig. 34a). Na proteína com a mutação p.Ile172Asn, as interações hidrofóbicas com a tirosina 191 e treonina 169 são perdidas (Fig. 34b). Ainda, analisamos as interações deste aminoácido para a proteína com a combinação das mutações p.Ile172Asn + p.Val358Ile, onde se verificou que o noácido 172 não apresenta alteração em suas interações em relação a proteína com essa mutação isolada (Fig. 34c).

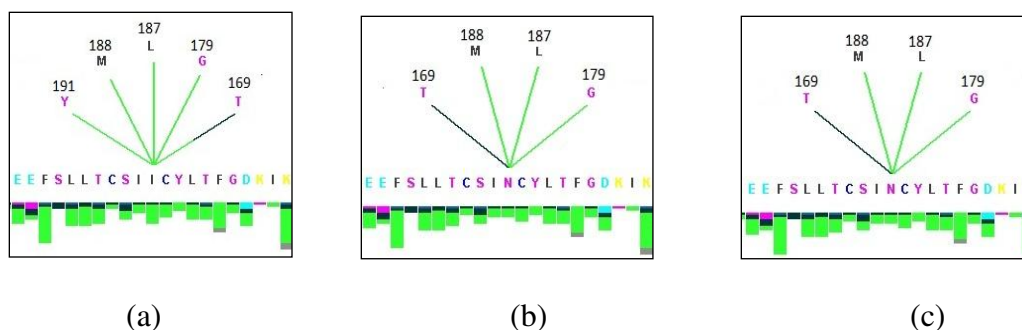


Figura 34 - Comparação das interações do aminoácido 172 na proteína nativa (a), na proteína com mutação Ile172Asn (b) e na proteína com a combinação de mutações p.Ile172Asn + p.Val358Ile (c). Em verde as interações hidrofóbicas e em preto as ligações de hidrogênio (cadeia principal-cadeia principal).

Na análise estrutural usando P450 2C5 como molde para a mutação p.Ile172Asn (Fig.35), apesar do número de interações na proteína normal e na proteína mutante ser o mesmo para os dois modelos, os tipos de interações divergem em relação às observadas usando como molde a CYP21 bovina. Tanto em relação às interações do aminoácido normal (Fig.35a) e do mutante (Fig.35b), quanto em relação às interações na combinação de mutações (Fig.35c). Na análise estrutural da mutação p.Ile172Asn combinada com a p. P.Val358Ile, as interações observadas são com os mesmos aminoácidos que observados para a proteína nativa, sendo apenas estabelecida uma nova ligação de hidrogênio de cadeia principal com cadeia lateral para o aminoácido 170 (Fig.35c).

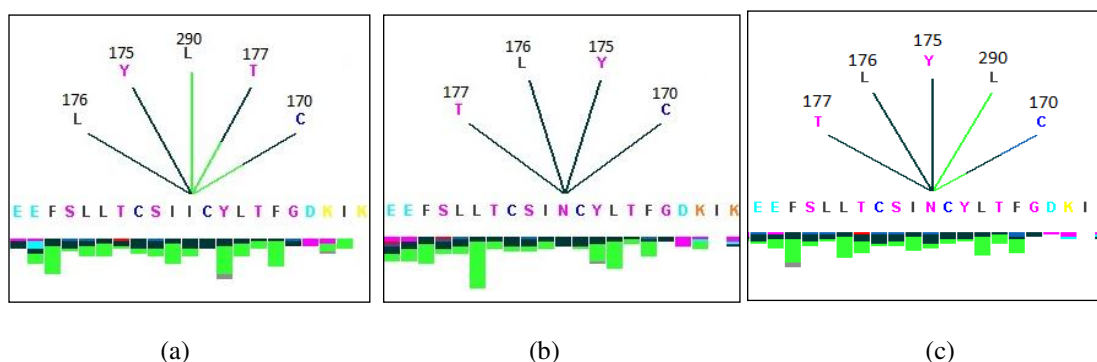


Figura 35 - Comparação dos contatos do aminoácido 172 da proteína nativa (a) com a proteína com mutação p.Ile172Asn (b) e com a proteína com a mutação p.Ile172Asn combinada com a p. P.Val358Ile (c). Na proteína nativa o aminoácido 172 faz interações hidrofóbicas com a leucina 290, treonina 177 e cisteína 170, além de ligações de hidrogênio com a leucina 176, tirosina 175, treonina 177 e cisteína 170. Na proteína com a mutação isolada o aminoácido 172 faz apenas as ligações de hidrogênio, enquanto que na proteína com as mutações combinadas, o aminoácido faz as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas com a leucina 290 e a cisteína 170 da proteína nativa. Em verde as interações hidrofóbicas, em preto as ligações de hidrogênio (cadeia principal- cadeia principal) e em azul as ligações de hidrogênio (cadeia principal- cadeia lateral).

A mutação p.Val358Ile não teve alterações em suas interações em relação à proteína nativa (Fig. 36a e 36b). O aminoácido mutante I358 também foi analisado combinado a mutação p.Ile172Asn, sendo que a combinação de mutações também não afetou as interações do aminoácido (Fig. 36c). Apesar das interações permanecerem mantidas na proteína mutante, esse aminoácido participa do sítio de ligação ao substrato e a troca de uma valina por uma isoleucina, pode afetar a eficiência desta ligação. Ambos os aminoácidos apresentam carga neutra, no entanto, possuem massa molecular distinta, o que pode interferir na velocidade de ligação com o substrato. A valina tem a massa molecular de 99,1 g, enquanto a isoleucina tem massa de 113,2 g. A cadeia lateral maior do aminoácido isoleucina pode ainda causar um impedimento estérico na região.

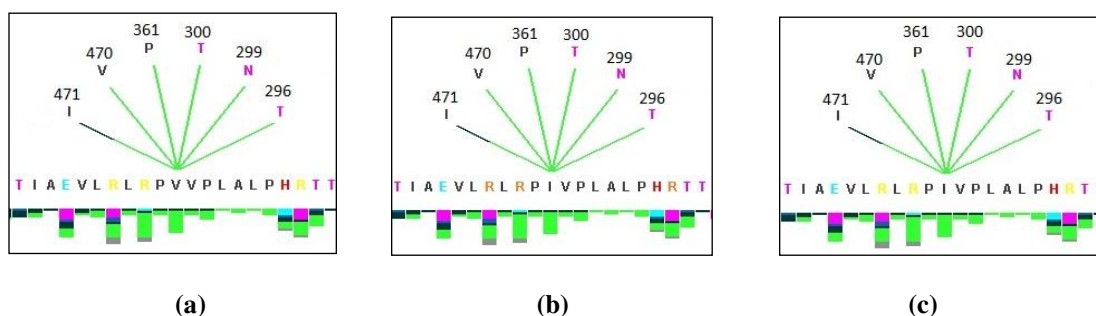


Figura 36 - Comparação das interações feitas pelo aminoácido 358 na proteína nativa (a), proteína com mutação p.Val358Ile (b) e na proteína com a combinação da mutação p. Ile172Asn + p.Val358Ile (c). Em verde as interações hidrofóbicas e em preto as ligações de hidrogênio (cadeia principal- cadeia principal).

Diferentemente do observado para o modelo baseado na CYP21 bovina, no modelo construído usando como molde a P450 2C5 foram observadas alterações nas interações da mutação p.Val358Ile isolada (Fig. 37), resultado da baixa similaridade entre o molde e o modelo nessa região. Na proteína nativa, o aminoácido 358 faz ligações de hidrogênio (ligação de cadeia principal com a cadeia principal) com a leucina 472 e interações hidrofóbicas com a isoleucina 471, prolina 361, arginina 357, asparagina 299 (Fig. 37a). Na proteína com a mutação p.Val358Ile, uma nova interação hidrofóbica é feita com o triptofano 303 (Fig. 37b), enquanto na proteína com a combinação das mutações p.Ile172Asn e a p.Val358Ile, o aminoácido 358 não faz a ligação com o triptofano 303, mas sim uma interação hidrofóbica com a treonina 300 (Fig. 37c).

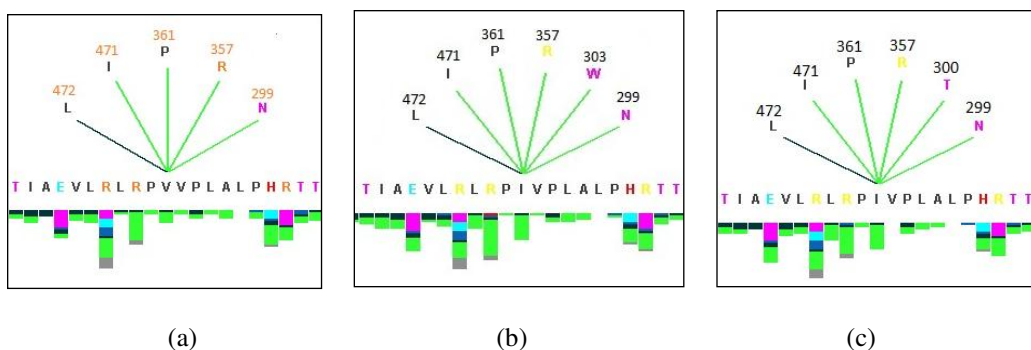


Figura 37 - Comparação dos contatos do aminoácido 358 da proteína nativa(a) com a proteína com mutação p.Val358Ile (b) e com a proteína com a mutação p.Ile172Asn combinada com a p.Val358Ile(c). Na proteína nativa o aminoácido 358 faz ligações de hidrogênio (cadeia-principal – cadeia principal, em preto) com a leucina 472 e interações hidrofóbicas (em verde) com a isoleucina 471, prolina 361, arginina 357 e asparagina 299. Na proteína com a mutação isolada, o aminoácido mutado faz os mesmos contatos que a proteína nativa, exceto pela nova interação hidrofóbica com o triptofano 303. Na proteína com as mutações combinadas p.Ile172Asn+p.Val358Ile, o aminoácido 358 faz os mesmos contatos da proteína nativa e mais uma interação hidrofóbica com a treonina 300.

Na análise da mutação p.Pro267Leu, o aminoácido P267 na proteína nativa faz interações hidrofóbicas com o aminoácido alanina da posição 266 e valina 265 (Fig. 38a). A proteína com a mutação p.Pro267Leu perde as interações e faz uma nova interação hidrofóbica com a leucina 277 (Fig. 38b).

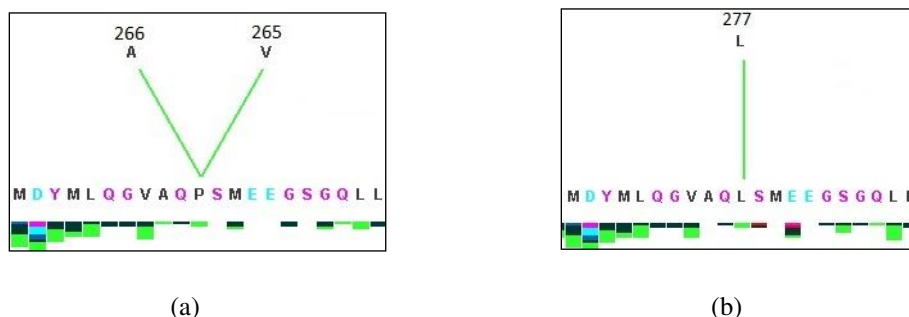


Figura 38 - Esquema das interações que o aminoácido 267 faz na proteína nativa (a) e na proteína com mutação Pro267Leu (b). Em verde estão indicadas as interações hidrofóbicas.

Na análise da mutação p.Pro267Leu (Fig. 39) usando como molde P450 2C5 os resultados foram distintos, o aminoácido prolina na proteína nativa faz interação hidrofóbica com o aminoácido ácido glutâmico da posição 272, entretanto, na proteína

com a mutação p.Pro267Leu, o tipo de interação com o ácido glutâmico 272 muda para ligação de hidrogênio (cadeia principal com a cadeia principal) e duas novas interações são feitas com a glicina 264, por ligação de hidrogênio, e com o ácido glutâmico 271, por interação hidrofóbica. A região contendo o aminoácido 267 não é preservada entre o molde e o modelo, o que pode justificar tamanha divergência entre os modelos baseados na P450 2C5 e a CYP21 bovina.

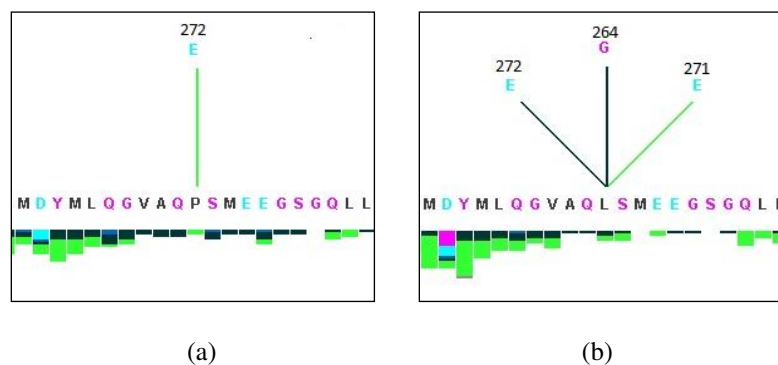


Figura 39 - Contatos do aminoácido 267 da proteína nativa(a) com a proteína com mutação Pro267Leu (b). Na proteína nativa o aminoácido 267 estabelece interação hidrofóbica somente com o glutamato 272. Na proteína com a mutação p.Pro267Leu a interação hidrofóbica com o glutamato 272 é substituído por uma ligação de hidrogênio e estabelece novas ligações de hidrogênio com a glicina 264 e interações hidrofóbicas com o glutamato 271. Em verde estão indicadas as interações hidrofóbicas e em preto as ligações de hidrogênio de cadeia principal com cadeia principal.

Ainda foi feita a análise *in silico* da mutação p.Val281Leu, onde a proteína nativa tinha, na posição 281, uma valina que faz ligação de hidrogênio (cadeia principal-cadeia principal) com a alanina da posição 286, a glicina 280 e o ácido glutâmico 279, além de interações hidrofóbicas com a valina da posição 265 e a leucina 262 (Fig. 40a). Na proteína com a mutação, a leucina 281 também faz ligações de hidrogênio (cadeia principal-cadeia principal) com a alanina 286 e glicina 280, e interações hidrofóbicas com a leucina 262, porém faz ligações de hidrogênio com a alanina 285 e com a metionina 284 e interações hidrofóbicas com a metionina 261 e a leucina 242, não encontradas na proteína nativa (Fig.40b). Na proteína com a combinação de mutações p.Val281Leu + p.Arg426Cys, as interações não foram alteradas em relação à proteína só com a mutação p.Val281Leu (Fig. 40c).

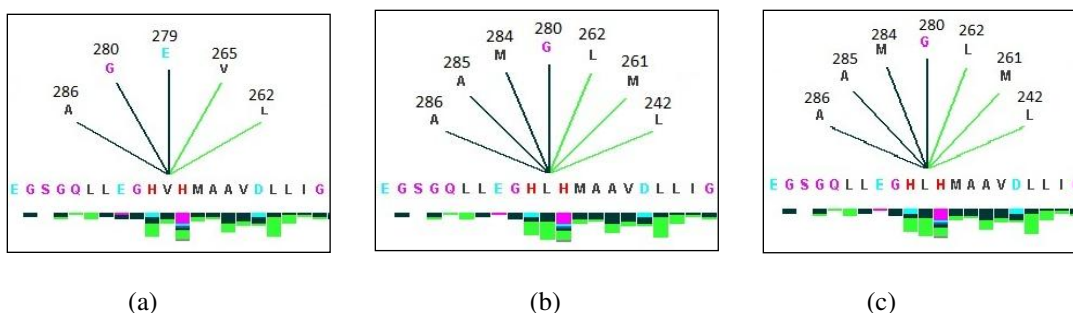


Figura 40 - Gráficos das interações feitas pelo aminoácido 281 na proteína nativa (a), na proteína com mutação p.Val281Leu (b) e na proteína com a combinação de mutações p.Val281Leu + p.Arg426Cys (c). Em verde as interações hidrofóbicas e em preto as ligações de hidrogênio (ligação entre as cadeias principais).

Da mesma forma que observado para a mutação p.Pro267Leu, a mutação p.Val281Leu (Fig. 41) está em uma região não preservada entre o modelo e o molde 1DT6, sendo as interações observadas para esse modelo divergentes das interações observadas para o modelo baseado em CYP21 bovina. Na proteína nativa, a valina faz ligações de hidrogênio (cadeia principal com cadeia principal) com a alanina 286 e a leucina 278, além de interação hidrofóbica com a leucina 242 (Fig. 41a). Na proteína com a mutação, a leucina 281 faz as mesmas interações que a proteína nativa, porém, faz em adição, uma interação hidrofóbica com a metionina 261 (Fig. 41b). Na proteína com a combinação p.Val281Leu + p.Arg426Cys, o aminoácido leucina 281 faz as mesmas interações que a proteína mutante isolada (Fig. 41c)

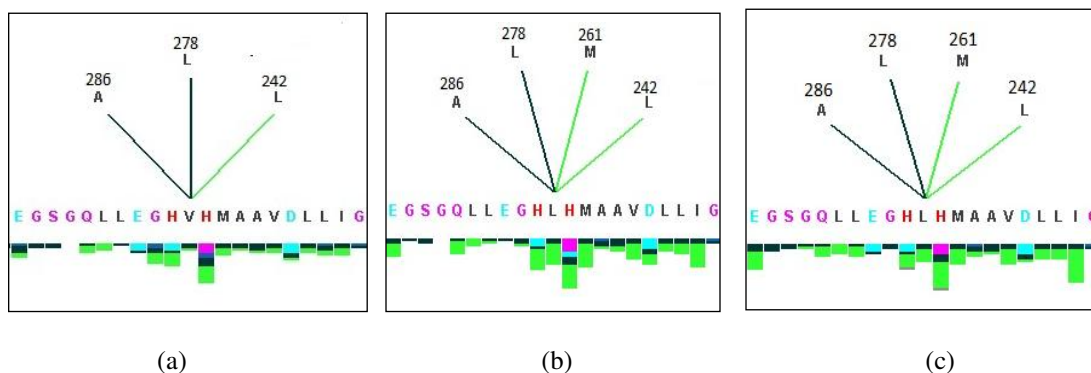


Figura 41 - Gráfico de contatos do aminoácido 281 da proteína nativa (a) com a proteína com mutação Val281Leu (b) e com a proteína com a mutação p.Val281leu combinada com a mutação p.Arg426Cis(c). A proteína nativa faz ligações de hidrogênio com a alanina 286 e a leucina 278 e interações hidrofóbicas com a leucina 242. Na proteína com a mutação, os contatos desse aminoácido são os mesmos e ainda adiciona-se uma interação hidrofóbica com a metionina 261. Na proteína com as duas mutações combinadas o aminoácido 281 faz os mesmos contatos da proteína com a mutação isolada. Em verde as interações hidrofóbicas e em preto as ligações de hidrogênio (ligação entre as cadeias principais).

Por último, foi feita a análise na proteína com a mutação p.Arg426Cys. Na proteína nativa, o aminoácido arginina faz ligação de hidrogênio de cadeia lateral com cadeia principal com a serina 109 e a lisina 121, e ligação de hidrogênio entre cadeias principais com a cisteína 429 e a glicina 425. Além disso, R426 faz uma ligação aromática com a tirosina 113, interação hidrofóbica com o triptofano 117 e uma interação de carga repulsiva com a arginina 92 (Fig.42a). Na proteína mutante o aminoácido C426 mantém somente as interações com K121, G425 e C429 (Fig.42b). Na proteína com a mutação p.Arg426Cys combinada com a p.Val281Leu, o aminoácido cisteína 426 faz as mesmas interações que o aminoácido da proteína com a mutação isolada (Fig. 42c).

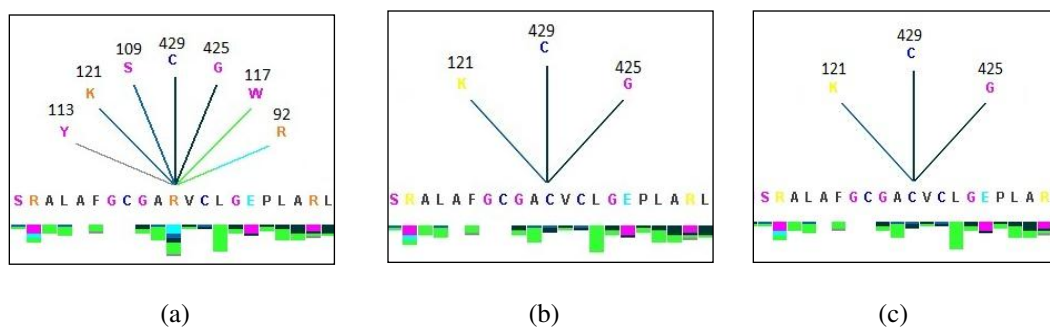


Figura 42 - Esquema de interações do aminoácido 426 na proteína nativa (a), na proteína com mutação p.Arg426Cys (b) e na proteína com a combinação entre a mutação p.Val281Leu e p.Arg426Cys (c). As interações hidrofóbicas estão representadas pela cor verde. Em azul as ligações de hidrogênio (cadeia lateral-cadeia principal), em cinza, interações aromáticas e em preto as ligações de hidrogênio (cadeia principal-cadeia principal).

A análise da proteína com a mutação p.Arg426Cys também foi realizada usando como molde a proteína P450 2C5 (Fig.43). Na proteína nativa, a arginina faz ligação de hidrogênio com a glicina 111 e a alanina 90, interações hidrofóbicas com a histidina 366, arginina 92, triptofano 86, interações aromáticas com o triptofano 117, tirosina 105, tirosina 113, triptofano 86, interações de carga atrativa com o ácido aspártico 112 e interações de carga repulsiva com a arginina 92 (Fig.43a). Na proteína mutante, o aminoácido da posição 426 faz interação hidrofóbica com o triptofano 86 (Fig.43b). Na proteína com a mutação p.Arg426Cys combinada com a p.Val281Leu, o aminoácido

cisteína 426 faz interações hidrofóbicas com a histidina 366 e também com o triptofano 86 (Fig.43c).

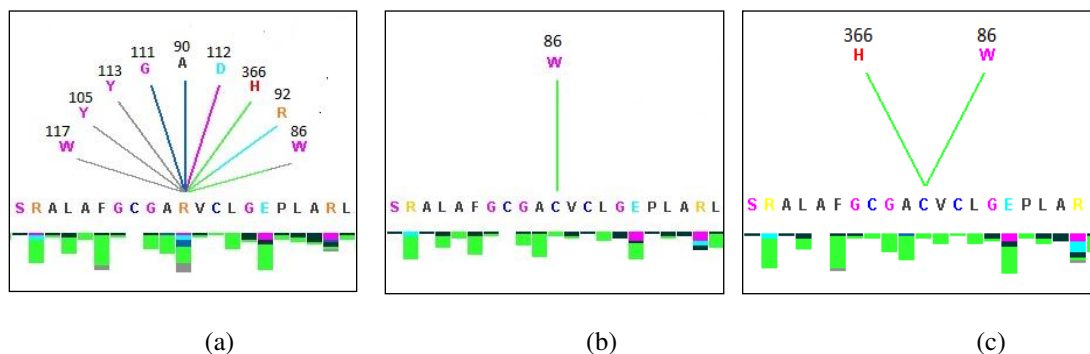


Figura 43 - Comparação dos contatos do aminoácido 426 na proteína nativa(a) com a proteína com mutação Arg426Cis (b) e com a proteína com a combinação das mutações p.Val281Leu com a p.Arg426Cis(c). Na proteína nativa o aminoácido 426 faz interações aromáticas com o triptofano 117 e 86 e tirosina 113 e 105; ligações de hidrogênio com a glicina 111 e alanina 90; interações de carga atrativa com o aspartato 112; interações hidrofóbicas com a histidina 366 e triptofano 86 além das interações de carga repulsiva com arginina 92. Na proteína com a mutação isolada o aminoácido 426 só faz as interações hidrofóbicas com o triptofano 86, as demais não ocorrem nessa proteína. Na proteína com a combinação de mutações este aminoácido faz interações hidrofóbicas com o triptofano 86 e a histidina 366. Estão representadas as ligações de hidrogênio pela cor azul escuro (cadeia principal-cadeia lateral), em azul claro as interações de carga repulsiva, em magenta as interações de carga atrativa, em verde as interações hidrofóbicas e em cinza as interações aromáticas.

ESTUDO *IN SILICO* COM 3-BETA-HIDROXISTEROIDE DESIDROGENASE

A proteína HSD3B2 foi analisada *in silico* para as mutações p.Pro222Gln (Moisan *et al.*, 1999) e p.Pro222Thr, mutação já descrita no mesmo aminoácido. A conservação do aminoácido foi confirmada por comparação das seqüências das isoenzimas da 3 β -HSD de mamíferos (Fig. 44).

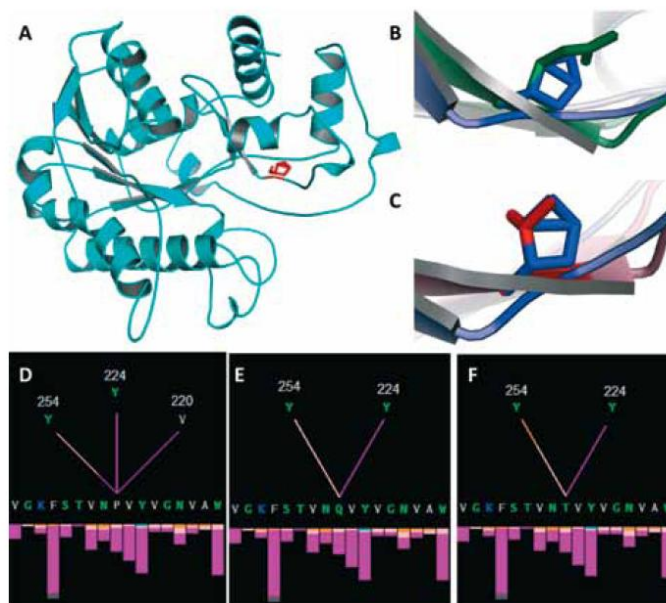


Figura 45 - (A) Modelo estrutural da 3 β -HSD2 nativa com o aminoácido P222 em vermelho. (B) Sobreposição da estrutura da proteína nativa e das mutantes de 3 β -HSD2, demonstrando a cadeia lateral proeminente da glutamina (verde) em comparação com a prolina (azul). (C) Sobreposição da P222 na proteína nativa (azul) e a treonina na enzima mutante (vermelha). (D) Contatos internos da P222. (E) Contatos internos de Q222. (F) Contatos internos de T222. As interações hidrofóbicas são identificadas pela cor magenta, as ligações de hidrogênio entre cadeias principais pela cor rosa e as ligações de hidrogênio cadeia lateral- cadeia principal pela cor laranja.

Após a análise da região da mutação foi feita a análise das regiões funcionais da proteína em relação às mutações. O domínio de ligação à membrana corresponde à região dos resíduos 176-186 and 251-274 (Thomas *et al.*, 1993). Na sobreposição dos modelos referentes à proteína nativa, à proteína com a mutação p.Pro222Gln e com a mutação p.Pro222Thr (Fig.46), ocorre modificação estrutural especificamente na região entre os aminoácidos 251 a 274. A proteína nativa apresenta, nesta região de ligação, uma alça, enquanto as proteínas mutadas apresentam uma folha- β .

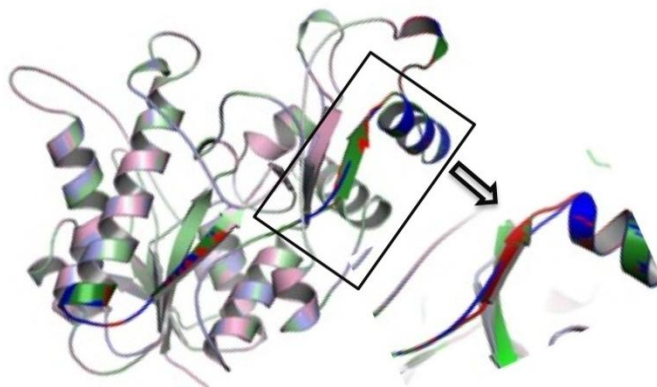


Figura 46 - Sobreposição dos modelos de 3 β -HSD2. Em azul encontra-se o modelo da proteína nativa, em rosa, o modelo da proteína com o aminoácido mutante Q222 e em verde o modelo da proteína com o aminoácido mutante T222 (verde). A região correspondente ao domínio de ligação ao substrato encontra-se identificada por diferentes cores: nativa (azul), Q222 (vermelha) e T222 (verde). Em detalhe, a região de ligação ao substrato, referente à região dos resíduos 251 ao 274.

DISCUSSÃO

A 21-hidroxilase adrenocortical é uma das enzimas chaves na biossíntese dos mineralocorticóides e dos glicocorticóides. Mutações no gene *CYP21A2* tem sido relatadas em indivíduos afetados com Hiperplasia Congênita da Adrenal com deficiência da 21-hidroxilase. Até o momento, um grande número de mutações diferentes no gene *CYP21A2* tem sido descritas. Muitos pacientes são heterozigotos e seus fenótipos dependem da combinação das mutações (White e Speiser, 2000). Muitos dos resultados da substituição de aminoácidos causam distúrbios da função essencial e /ou modificam a estrutura da proteína.

Nos últimos anos, estudos têm sido feitos para prever atividades das proteínas mutantes. Devido à impossibilidade prática para resolver toda estrutura mutante, pelo preço elevado e tempo consumido nos experimentos de atividade *in vitro*, a modelagem por homologia pode ser uma possível ferramenta para avaliar, como método baseado em estrutura, a atividade da proteína e os danos para a estabilidade. A qualidade e a precisão usados pelo SWISSMODEL e pelo MODWEB depende da alta resolução e da identidade da estrutura modelo, usualmente determinada pela cristalografia de raio-X. No caso da 21-hidroxilase (P450 CYP21A2) humana, a precisão pode ser considerada alta, visto que a 21-hidroxilase bovina com 80% de identidade tem sua estrutura resolvida por forma experimentais de difração de raio-X. Os estudos prévios, porém, tinham sido feitos com a proteína com 30% de identidade, mesma proteína usada em trabalhos já publicados (Robins *et al.*, 2006).

No presente estudo, foram investigadas três mutações novas e pouco frequentes e duas combinações encontradas em pacientes com deficiência de 21-hidroxilase (Tabela 7). Considerando que nenhuma das mutações foi encontrada individualmente e que todas, menos a p.Pro267Leu, afetam resíduos da 21-hidroxilase conservados em espécies de mamíferos, o prejuízo da atividade enzimática deve ser considerado.

Tabela 7. Apresentação dos resultados referentes a cada paciente, relacionando os estudos *in vitro* e *in silico* com o fenótipo.

Pacientes	Mutações	Estudo <i>in vitro</i>	Estudo <i>in silico</i>	Fenótipo
1	p.Ser113Phe e p.Val281Leu	Baixa atividade Padrão de não clássica	Altera ligação ao grupamento heme Altera ligação a água e ao oxigênio	não clássico
2	p.Ile172Asn+p.Val358Ile e IVS2-13A/C>G	Baixíssima atividade	Altera a ligação com o substrato e a água e o oxigênio	perdedor de sal.
3	p.Pro267Leu e IVS2-80G>A	Atividade próxima a normal	Altera alça externa da proteína	Hiperandrogenismo-não clássica
4	p.Val281Leu+p.Arg426Cys e conversão em larga escala	Baixíssima atividade	Altera região de ligação a água e ao oxigênio e das proteínas acessórias	perdedor de sal
5	Deleção do Q389, G390 e A391 e deleção	-----	Altera ligações dos aminoácidos vizinhos e a ligação as proteínas acessórias	perdedor de sal
6	p.P222Q na 3-beta HSD	-----	Altera região da mutação e ligação a membrana	Perdedor de sal

No paciente com fenótipo da forma não clássica da HCA, a mutação encontrada em um dos alelos foi a p.Ser113Phe. A análise de expressão *in vitro* da proteína modificada pela mutação revelou uma baixa atividade da 21-hidroxilase (6,1% e 5,6% da atividade da proteína nativa para 17 OHP e progesterona, respectivamente). Essa atividade foi comparada aos níveis de atividade da enzima com a mutação p.Ile172Asn, controle de virilizante simples no limite de perdedora de sal (Tusie-Luna *et al.*, 1990, Chiou *et al.*, 1990) e a mutação p.Val281Leu, controle de mutação não clássica (Tusie-Luna *et al.* 1990, Wu e Chung, 1991). Sendo assim, o paciente com a mutação p.Ser113Phe apresentou atividade mais próxima ao controle virilizante simples, porém o

fenótipo do paciente foi devido á mutação p.Val281Leu que estava presente no outro alelo.

Na análise *in silico*, foi verificada cada mutação de forma separada, considerando as interações que o aminoácido alterado fazia na proteína nativa e na mutante, tanto no modelo com maior identidade como no de menor identidade. Usando o modelo com maior identidade, na proteína mutante p.Ser113Phe, a fenilalanina da posição 113 faz ligações de hidrogênio com o aminoácido leucina 116, aminoácido localizado próximo à região de ligação ao grupamento heme (Wu e Chung, 1991) e das proteínas acessórias (Geller *et al.*, 1999). A região de ligação a proteínas acessórias é descrita em outros estudos, como essencial para a função da proteína, a maioria das mutações que modificam essa região causam danos gravíssimos a atividade da proteína. Essa região apresentam mecanismos eletrostáticos que são considerados significativos para a orientação positiva da superfície da proteína acessória negativa, sendo a região que causa trocas de elétrons entre as duas (Robins *et al.*, 2006).

No modelo de menor identidade, o aminoácido 113 na proteína mutante e na nativa não alteram seus contatos, porém, por serem aminoácidos de características diferentes, serina é polar neutra e a fenilalanina é apolar, podem ocorrer alterações estruturais que flanqueiam esse aminoácido. Nesse modelo, a mutação está presente na hélice G', que está bem próxima à região de ligação com o grupamento heme. A região de ligação ao grupamento heme é importante para a proteína, visto que sua modificação causa danos severos a sua atividade. Essa região formada por uma cavidade cys altera o enovelamento estrutural da proteína. Geralmente, modificações nessa região estão associadas a forma virilizante simples da doença (Robins *et al.*, 2006).

A Val281Leu é uma mutação muito frequente nos pacientes com a forma não clássica da HCA, que transporta o haplótipo HLA B14; DR1, uma associação que é presumivelmente devido a um efeito fundador de algumas populações (Speiser *et al.* 1988). Em algumas populações, como os judeus do Leste Europeu, este é um polimorfismo genético muito comum, com frequência de mais de 10% (Speiser *et al.*, 1985, Sherman *et al.*, 1988); em contraste, na triagem molecular de recém-nascidos normais na Nova Zelândia, a frequência de portadores foi de 2% (Fitness *et al.*, 1999). Em geral, aproximadamente 70% de todos os alelos não clássicos são portadores

da mutação Val281Leu (Blanche *et al.*, 1997, Barbat *et al.* 1995). Esta mutação resulta em uma enzima com 50% da atividade normal com o substrato 17-OHP, mas apenas 20% de atividade normal para progesterona (Tusie-Luna *et al.* 1990, Wu e Chung, 1991). Nesse estudo, na proteína com a mutação p.Val281Leu, usando o modelo de maior identidade, a L281 faz interações com os aminoácidos 285, 284, 261 e 242, mas perde contatos com o 279 e 265, sendo que os novos contatos estão na mesma hélice da região de ligação ao oxigênio e à água (Raag *et al.*, 1991, Curnow *et al.*, 1993). A região de ligação ao oxigênio e a água é uma cavidade, que apresenta uma polaridade característica para que ocorram a doação e o recebimento dos prótons pelas partes envolvidas. Uma modificação nessa região geralmente apresenta severos danos à atividade da proteína (Robins *et al.*, 2006).

Já no modelo com menor identidade, o aminoácido mutado faz contato com a M261, próxima à região de ligação ao grupamento heme. Estudos com esse modelo sugeriram que a enzima mutante não é normalmente localizada no retículo endoplasmático (Tusie-Luna *et al.* 1990) e pode afetar a ligação com o grupamento heme (Wu e Chung, 1991). Uma outra possibilidade é que esta mutação esteja localizada na hélice I conservada, que contém os resíduos envolvidos na transferência de prótons (White e Speiser, 2000)

O paciente com o fenótipo da forma perdedora de sal apresentou a combinação das mutações p.Ile172Asn e p.Val358Ile. A proteína mutante com essa combinação apresentou uma atividade residual (1,1% e 2,2% de atividade da proteína nativa de 17-OH progesterona e progesterona). Após a comparação com a atividade dos controles, a atividade ficou abaixo do limite de perdedora de sal. Nesse mesmo estudo, foi feita uma análise *in vitro* com a proteína com a mutação p.Val358Ile, que também apresentou uma atividade muito baixa (0,9% e 3,5% de atividade da proteína nativa da 17 OHP e progesterona), que pode ser considerada como perdedora de sal.

Na análise *in silico* da proteína mutante p.Ile172Asn, com o modelo de maior identidade, a asparagina 172 perde os contatos com a tirosina 191 e treonina 169. Esses dois aminoácidos estão perto da região de ligação ao oxigênio e água (Raag *et al.*, 1991, Curnow *et al.*, 1993), região importante para a atividade, e a perda desses contatos pode influenciar diretamente esse domínio. Essa mesma região é alterada na proteína nativa

usando o modelo de menor identidade, visto que o aminoácido 172 faz interações com a leucina 290.

No modelo com menor identidade, o resíduo isoleucina normalmente nesta posição na hélice E, é fortemente conservada em muitas enzimas P450, pois é essa região que interage com a membrana do retículo endoplasmático (Monier *et al.*, 1988). A mutação deste resíduo hidrofóbico para um polar pode perturbar este tipo de interação e enfraquecer a associação da enzima com o retículo endoplasmático, o que pode levar a uma localização errada em relação ao retículo (Tusie-Luna *et al.*, 1990, Hsu *et al.*, 1996). Alternativamente, a mutação pode interromper uma interação hidrofóbica intramolecular de estabilização da estrutura secundária da enzima, a enzima mutante não é sensível à digestão pela protease e não se incorpora corretamente ao grupamento heme (Hsu *et al.*, 1996). Devido à aldosterona ser normalmente secretada a uma taxa 100-1000 vezes menor do que a de cortisol, a atividade da 21-hidroxilase teria que estar a níveis muito baixos para se tornar limitante da velocidade da biossíntese da aldosterona. Aparentemente, tão pouco como 1% da atividade normal permite síntese de aldosterona suficiente para evitar a perda significativa do sal na maioria dos casos.

Já na proteína com a mutação p.Val358Ile, seguindo o modelo de 21-hidroxilase bovina, a isoleucina da posição 358 não altera os contatos com relação à valina dessa posição na proteína nativa, porém este aminoácido está diretamente envolvido na ligação com o substrato (White, 1987; Picado-Leonard e Miller, 1988), de forma que a alteração desse aminoácido, quanto a seu peso molecular, altera a estrutura dessa importante região da proteína, o que pode dificultar a ligação do substrato a essa região e alterar bastante a atividade da 21-hidroxilase. A região de ligação ao substrato é a região mais dificilmente predita em modelos de CYPs, porque ela varia quanto ao substrato da enzima. No caso dos modelos usados, o substrato é o mesmo da 21-hidroxilase. Essa região causa danos gravíssimos a atividade visto que a sua estrutura é específica para o seu substrato, qualquer modificação pode causar a perda de atividade. Normalmente, mutações que causam danos nessa região estão relacionados a forma perdedora de sal da deficiência da 21-hidroxilase.

Quando usamos como modelo o citocromo P450 de mamíferos, ocorre alteração em interações do aminoácido 358 com o triptofano 303 ou com a treonina 300, que estão

na alça da hélice K, próximos à região de ligação ao oxigênio e à água e ligação às proteínas acessórias. A alteração na região de ligação a água e ao oxigênio pode causar ineficiência na troca de prótons, ação importante para a atividade da proteína. Essa região precisa de um equilíbrio para que ocorra a ligação desses compostos. Assim, como a região de ligação as proteínas acessórias atividade essencial para a proteína, pois é essa proteína acessória que transfere apenas um elétron para a 21-hidroxilase funcionar.

Outro paciente apresentava a forma clássica perdedora de sal na qual foram identificadas as mutações p.Val281Leu e p.Arg426Cis no alelo paterno e um gene híbrido com as sequências do pseudogene numa região se estendendo do terminal 5' até o intron 6. A atividade da proteína com a mutação p.Val281Leu, combinada com a p.Arg426Cis, foi medida como sendo muito baixa (0,9% e 3,94% de atividade da proteína nativa com o substrato 17-OH progesterona e progesterona), considerada perdedora de sal comparando-se com os valores mais altos da mutação p.Ile172Asn. Outro estudo feito, para esse paciente, foi a análise *in vitro* da proteína com a mutação p. Arg426Cis (4.2% e 9,9% de atividade da proteína nativa frente ao substrato 17-OH progesterona e progesterona), cuja teve atividade característica de virilizante simples, já havia sido mostrada em outro estudo (Grischuk *et al.*, 2006).

No estudo *in silico*, a proteína com mutação p.Arg426Cis apresenta no modelo com maior identidade, o aminoácido cisteína da posição 426 faz interações novas com os aminoácidos da posição 113, 109, 117, 92, aminoácidos próximos à região de ligação com o oxigênio, à água (Raag *et al.*, 1991, Curnow *et al.*, 1993) e com às proteínas acessórias (Geller *et al.*, 1999). No modelo com menor identidade, a cisteína da posição 426 perde contatos com triptofano117, tirosina 105, tirosina 113, glicina 111, alanina 90, ácido aspártico 112, histidina 366 e arginina 92 existentes na proteína nativa. Esses contatos são feitos com aminoácidos próximos à região de ligação ao grupamento heme (Wu e Chung, 1991) e ao substrato (White, 1987; Picado-Leonard e Miller, 1988). A arginina da posição 426 está localizada numa cavidade cys altamente conservada. Essa arginina também é encontrada na CYP450 de mamíferos, sendo um dos quatro resíduos que coordenam a região de ligação do grupamento heme (Hasemann *et al.*, 1995, Mornet, 2000). Portanto, a substituição pela cisteína nessa posição leva a perdas na função da enzima. Como já foi discutido, a região de ligação a água, ao oxigênio e ao grupamento

heme são importantes e a região de ligação as proteínas acessórias são importantes para a função da 21-hidroxilase, as alteração dessas regiões causam um desequilíbrio na atividade.

A mutação p.Pro267Leu foi identificada em heterozigose em paciente com puberdade precoce, o que foi associada à forma não clássica da deficiência de 21-hidroxilase. A mutante Pro267Leu é parcialmente ativo (59% e 43,3 % em relação à nativa para 17-OH progesterona e progesterona) e a determinação da constante cinética aparente revela que a afinidade ao substrato (K_M) tem a mesma grandeza para as enzimas normal e a mutante. Esses dados podem confirmar o diagnóstico da forma não clássica. A expressão de todas as construções foi eficiente, segundo indicou a avaliação por *Western blot* (Tardy *et al.*, 2010).

Na estudo *in silico* com a proteína mutante p.Pro267Leu, no modelo com maior identidade, a leucina da posição 267 faz interações com o aminoácido 277, em vez de interações com o 266 e 265, o que não deve afetar tanto a estrutura visto que a posição está em uma alça externa da proteína, longe das regiões mais importantes. Na proteína mutante, no modelo de menor identidade, ocorre uma ligação com o ácido glutâmico 272 e com a glicina 264, que não está presente na proteína nativa, resíduos estes que estão presentes na alça entre a hélice G' e a C, que não fazem parte das regiões preservadas da proteína.

Outra análise feita somente no estudo *in silico* foi de uma deleção na 21-hidroxilase. Na proteína com a deleção leucina 388 à histidina 392, usando como modelo a proteína 21-hidroxilase bovina, ocorrem alterações na região de ligação às proteínas acessórias, onde o aminoácido 393 troca o contato com a arginina 354 pela arginina 356, o que leva à perda drástica de atividade enzimática (Chiou *et al.*, 1990; Lajic, *et al.*, 1997; Lobato *et al.*, 1999). Na proteína com a mesma deleção, porém, usando como modelo o citocromo P450 de mamíferos, ocorre com alterações nas interações dos aminoácidos vizinhos à deleção, na região de ligação às proteínas acessórias (Geller *et al.*, 1999), na região de ligação ao grupamento heme (Wu e Chung, 1991) e na região de ligação ao substrato (Q53-R60) (White, 1987; Picado-Leonard e Miller, 1988) onde ocorre uma alteração estrutural na proteína mutante, a redução da folha beta e aumento da alça dessa região.

Os estudos estruturais foram feitos usando os dois modelos, tanto com o de maior identidade a 21-hidroxilase bovina, como a de menor identidade a citocromo P450 de mamíferos. A estrutura de 21-hidroxilase bovina só foi resolvida há alguns meses, por isso, a maioria dos estudos foram feitos com a de menor identidade. O modelo de menor identidade possui muitas informações quanto à localização das mutações já estudadas e às áreas afetadas por elas. Porém, o modelo de maior identidade explica melhor a relação entre o fenótipo do paciente e as alterações estruturais que as mutações aqui estudadas causam.

Os estudos com o modelo de menor identidade e o de maior identidade foram feitos de forma comparativa, para analisar se as mutações causam as mesmas modificações nos dois modelos. Analisamos se os dados da literatura corroboravam com os dados do novo modelo.

O estudo *in silico* da 3 β -HSD foi feito, usando como modelo, uma proteína com baixa identidade, porém, nesse caso, não encontramos outra proteína com maior identidade. As duas mutações encontradas no mesmo aminoácido dessa proteína apresentaram modificações significativas. Apesar de só a mutação p. Pro222Thr ter apresentado uma ligação mais estável com a tirosina 254, as duas mutações levaram a diferenças estruturais na região transmembrânica.

Analisando a região de ligação à membrana, vimos que a modificação de um aminoácido interno (posição 222) pode provocar modificações na parte externa e até mesmo na região funcional da proteína. Essa região modificada pode estar causando a perda de atividade e a modificação da localização dessa proteína, o que pode explicar o quadro clínico da forma perdedora de sal do paciente. A importância desse aminoácido é vista na conservação deste em várias espécies de mamíferos.

A combinação de técnicas é fundamental para definir o efeito da mutação e auxiliar no correto diagnóstico do paciente, o que pode auxiliar em um tratamento mais eficiente e rápido.

CONCLUSÕES

As mutações *missense* que causam a deficiência da 21-hidroxilase em alguns pacientes vêm sendo amplamente estudada, como visto na literatura, por métodos *in silico* e *in vitro*. Essas mutações causam alterações na atividade e na estrutura da proteína. As melhores análises para os danos na atividade das proteínas mutadas são, de fato, aquela feita nos modelos com o molde de maior identidade, porém, a maior parte dos estudos já tinham sido feitos com o outro modelo.

Nesse estudo, as proteínas com mutações p.Ser113Phe, p.Val358Ile, p.Arg426Cis e as combinações p.Ile172Asn com a p.Val358Ile e p.Val281Leu com a p.Arg426Cis tiveram uma perda de atividade considerável em relação à proteína nativa.

A proteína com a mutação p.Val358Ile e a com a combinação p. Ile172Asn com a p.Val358Ile tiveram atividade muito baixa, o que foi explicado estruturalmente pela localização desse aminoácido no sítio de ligação ao substrato, o que estaria relacionada à forma perdedora de sal da HCA. A combinação das mutações p.Val281Leu e p.Arg426Cis também apresentou atividade muito baixa, porém, as mutações isoladas não causaram modificações estruturais significativas. Isso pode ser explicado pela baixa identidade da região de ligação desses aminoácidos com a proteína modelo. Essa combinação está presente em um paciente com fenótipo perdedor de sal, o que corrobora com os resultados da atividade dessa combinação de mutações.

As proteínas com as demais mutações tiveram atividade baixa, relacionadas à forma virilizante simples da HCA. Nos estudos *in silico*, observou-se a relação dessas com alterações nas outras regiões importantes da proteína, como a região de ligação ao grupamento heme, ao oxigênio e à água.

A proteína com a mutação p.Pro267Leu teve atividade semelhante à da nativa, apresentando padrão de HCA não clássico ou mutação neutra. Estruturalmente, essa mutação altera uma alça externa da proteína, longe das regiões funcionalmente importantes. Os estudos de cinética enzimática confirmaram que esta é uma mutação da forma não clássica.

A deficiência de 3 β -HSD também vem sendo amplamente estudada, como foi visto na literatura. Os estudos *in silico* vêm para ajudar a aumentar o conhecimento das alterações que as mutações *missense* causam na estrutura dessa proteína. Nesse estudo, duas mutações presentes no mesmo aminoácido, p.Pro222Thr e p.Pro222Gln, causaram modificações na região de ligação da proteína à membrana, o que pode explicar o fenótipo da forma perdedora de sal do portador dessas mutações.

Esse trabalho mostrou dados das enzimas 21-hidroxilase e 3 β -HSD que poderão ser usados em pesquisas com mutações novas ou já descritas nas regiões daquelas que estudamos. Isso é um grande avanço, visto que a parte estrutural dessas enzimas é pouco conhecida e vem sendo essencial para novas descobertas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-JURAYYAN, N. Congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency in Saudi Arabia: clinical and biochemical characteristics. *Acta Paediatr* 1995; 84: 651-4.
- AMOR M, PARKER KL, GLOBERMAN H, NEW MI, WHITE PC. Mutation in the CYP21 gene (Ile 172Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 1600-1604.
- ARAÚJO M, SANCHES MR, SUZUKI LA, GUERRA JRG, FARAH SB, DE MELLO MP. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29:1-13.
- ARAÚJO RS, MENDONÇA BB, BARBOSA AS, LIN CJ, MARCONDES JA, BILLERBECK AE, BACHEGA TA. Microconversion between *CYP21A2* and *CYP21A1P* promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrin Metab.* 2007; 10; 2006-2163.
- AUCHUS R J, MILLER W L. Molecular modeling of human P450c17 (17 α -hydroxylase/17, 20-lyase): insights into reaction mechanisms and effects of mutations. *Mol Endocrinol* 1999; 13:1169–1182.
- AZZIZ R, BRADLEY EL JR, POTTER HD, BOOTS LR. 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency in hyperandrogenism. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 168(3 Pt 1):889-95.
- BACHEGA TA, BILLERBECK AE, MADUREIRA G, ARNHOLD IJ, MEDEIROS MA, MARCONDES JA, LONGUI CA, NICOLAU W, BLOISE W, MENDONÇA BB. Low frequency of CYP21B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Hered.* 1999; 49:9-14.
- BACHEGA TA, BILLERBECK AE, MADUREIRA G, MARCONDES JA, LONGUI CA, LEITE MV, ARNHOLD IJ, MENDONÇA BB. Molecular

- genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(12):4416-9.
- BACHEGA TA, BILLERBECK AE, PARENTE EB, LEMOS-MARINI SH, BAPTISTA MT, MELLO MP, GUERRA G JR, KUPERMAN H, SETIAN N, DAMIANI D, TORRES N, CASTRO MD, MENDONÇA BB. Multicentric study of Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency: a genotype-phenotype correlation. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004;48(5):697-704. Epub 2005. Review.
 - BARBARO M, LAJIC S, BALDAZZI L, BALSAMO A, PIRAZZOLI P, CICOGNANI A, WEDELL A, CACCIARI E. Functional analysis of two recurrent amino acid substitutions in the CYP21 gene from Italian patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(5): 2402-2407.
 - BARBAT B, BOGYO A, RAUX-DEMAY MC, KUTTENN F, BOUE J, SIMON-BOUY B, SERRE JL, MORNET E. Screening of CYP21 gene mutations in 129 French patients affected by steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum Mutat* 1995; 5:126–130.
 - BARNES HJ, ARLOTTO MP, WATERMAN MR. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 α -hydroxylase in *Escherichia coli* (steroid hydroxylase/bacterial expression/reductase). *Proc. Natl. Acad. Sci. Biochemistry USA* 1991; 88: 5597-5601.
 - BERMAN HM, WESTBROOK J, FENG Z, GILLILAND G, BHAT TN, WEISSIG H, SHINDYALOV IN, BOURNE PE. The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 235–242.
 - BÉRUBÉ D, LUU THE V, LACHANCE Y, GAGNÉ R, LABRIE F. Assignment of the human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene (HSD3) to the p13 band of chromosome 1. *Cytogenet Cell Genet.* 1989;52(3-4):199-200.
 - BLACK SD. Membrane topology of the mammalian P450 cytochromes. *Faseb J* 1992; 6:680–685.
 - BLANCHE H, VEXIAU P, CLAUIN S, LE GALL I, FIET J, MORNET E, DAUSSET J, BELLANNE-CHANTELOT C. Exhaustive screening of the 21-

- hydroxylase gene in a population of hyperandrogenic women. *Hum Genet.* 1997; 101:56 – 60.
- BONGIOVANNI AM. The adrenogenital syndrome with deficiency of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Invest.* 1962; 41: 2086-92.
 - BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72:248-254 (1976).
 - CARROL MC, CAMPBELL RD, PORTER RP. Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:521-525.
 - CHANG YT, KAPPY MS, IWAMOTO K, WANG J, YANG X, PANG S. Mutations in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in a patient with classic salt-wasting 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Res.* 1993; 34(5):698-700.
 - CHERRADI N, DEFAYE G, CHAMBAZ EM. Characterization of the 313-hydroxysteroid dehydrogenase activity associated with bovine adrenocortical mitochondria. *Endocrinology* 1994; 134: 1358-1364.
 - CHIOU SH, HU MC, CHUNG BC. A missense mutation at Ile172-Asn or Arg356-Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem* 1990; 265: 3549–3552.
 - CHUNG BC. Steroid deficiency syndromes in mice with targeted disruption of Cyp11a1. *Endocr Res.* 2002; 28(4): 575
 - COELI FB, SOARDI FC, BERNARDI RD, DE ARAÚJO M, PAULINO LC, LAU IF, PETROLI RJ, DE LEMOS-MARINI SH, BAPTISTA MT, GUERRA-JÚNIOR G, DE-MELLO MP. Novel deletion alleles carrying CYP21A1P/A2 chimeric genes in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *BMC Med Genet.* 2010; 11: 104.
 - CURNOW KM, SLUTSKER L, VITEK J, COLE T, SPEISER PW, NEW MI, WHITE PC, PASCOE L. Mutations in the CYP11B1 gene causing congenital

- adrenal hyperplasia and hypertension cluster in exons 6, 7, and 8. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1993; 90: 4552–4556.
- DE LAUNOIT Y, ZHAO HE, BRLANGER A, LABRIE F, SIMARD J. Expression of liver-specific member of the 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase family, an isoform possessing an almost exclusive 3-ketosteroid reductase activity. *J Biol Chem.* 1992; 267:4513-4517.
 - DEGTYARENKO KN, ARCHAKOV AI. Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS Lett.* 1993; 332(1-2):1-8.
 - DESPRÉS L, DAVID JP, GALLET C. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution.* 2007; 22-6: 298–307.
 - DUBOIS RN, SIMPSON ER, TUCKEY J, LAMBETH JD, WATERMAN MR. Evidence for a higher molecular weight precursor of cholesterol side-chain-cleavage cytochrome P-450 and induction of mitochondrial and cytosolic proteins by corticotropin in adult bovine adrenal cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1981; 78(2):1028-32.
 - DUPONT B, OBERFIELD SE, SMITHWICK EM, LEE TD, LEVINE LS. Close genetic linkage between HLA and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *Lancet* 1977; II: 1309-1311.
 - DUPONT B, O'REILLY RJ, POLLACK MS, GOOD RA. Histocompatibility testing for clinical bone marrow transplantation and prospects for identification of donors other than HLA genotypically identical siblings. *Haematol Blood Transfus.* 1980;25:121-34.
 - ESWAR NM, MARTI-RENOM A, WEBB B, MADHUSUDHAN MS, ERAMIAN D, SHEN M, PIEPER U, SALI A. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 2000; 15: 5.6.1-5.6.30.
 - EVANS WE, RELLING MV. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 2004; 429: 464–468.
 - FISER RK, SALI A. Modeling of loops in protein structures, *Protein Science* 2000; 9: 1753-1773.

- FITNESS J, DIXIT N, WEBSTER D, TORRESANI T, PERGOLIZZI R, SPEISER PW, DAY DJ. Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:960–966.
- GELLER DH, AUCHUS RJ, MILLER WL. P450c17 mutations R347H and R358Q selectively disrupt 17,20-lyase activity by disrupting interactions with P450 oxidoreductase and cytochrome b5. *Mol Endocrinol* 1999; 13:167–175.
- GLUZMAN Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 1981; 23:175-182.
- GONÇALVES, J.; FRIÃES, A.; MOURA, L. Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency. *Expert reviews in molecular medicina* 2007; 9-11: 1-23.
- GRAHAM-LORENCE S, AMARNEH B, WHITE RE, PETERSON JA, SIMPSON ER. A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450. *Protein Sci.* 1995; 4: 1065–1080.
- GRISCHUK Y, RUBTSOV P, RIEPE FG, GRÖTZINGER J, BELJELARSKAIA S, PRASSOLOV V, KALINTCHENKO N, SEMITCHEVA T, PETERKOVA V, TIULPAKOV A, SIPPELL WG, KRONE N. Four novel missense mutations in the CYP21A2 gene detected in Russian patients suffering from the classical form of congenital adrenal hyperplasia: identification, functional characterization, and structural analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(12):4976-80. Epub 2006 Sep 19.
- GUENGERICH FP, ISIN EM. Mechanisms of Cytochrome P450 Reactions. *Acta Chim. Slov* 2008; 55: 7–19.
- HAIDER S, ISLAM B, D'ATRI V, SGOBBA M, POOJARI C, SUN L, YUEN T, ZAIDI M, NEW MI. Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2013; 110(7):2605-10.

- HANIU M, YANAGIBASHI K, HALL PF, SHIVELY JE. Complete amino acid sequence of 21-hydroxylase cytochrome P-450 from porcine adrenal microsomes. Arch Biochem Biophys. 1987; 254(1): 380-4.
- HANNEMANN, F, BICHET A, EWEN KM, BERNHARDT R. Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains. Biochim Biophys Acta 2007; 1770: 330–344.
- HARADA F, KIMURA A, IWANAGA T, SHIMOZAWA K, YATA J, SASAZUKI T. Gene conversion-like events cause steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:8091-8094.
- HASEMANN CA, KURUMBAIL RG, BODDUPALLI SS, PETERSON JA, DEISENHOFER J. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. Structure 1995; 3: 41–62.
- HELMBERG A, TUSIE-LUNA MT, TABARELLI M, KOFLER R, WHITE PC. R339H and P453: *CYP21A2* mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions. Mol. Endocrinol 1992b; 6: 1318-1322.
- HIGASHI Y, YOSHIOKA H, YAMANE M, GOTOH O, FUJII-KURIYAMA Y. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 2841–2845.
- HIGASHI Y, TANAE A, INOUE H, HIROMASA T, FUJII-KURIYAMA Y. Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P450(C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85: 7486-7490.
- HIGASHI Y, FUJII-KURIYAMA Y. Functional analysis of mutant P450(C21) genes in COS cell expression system. Methods Enzymol 1991; 206:166–173.
- HRYCAY EG, BANDIERA SM. Cytochrome P450 enzymes, in: S.C. Gad (Ed.), Preclinical Development Handbook: ADME and Biopharmaceutical Properties, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, 2008: 627–696.

- HSU LC, HSU NC, GUZOVA JA, GUZOV VM, CHANG SF, CHUNG BC. The common I172N mutation causes conformational change of cytochrome P450c21 revealed by systematic mutation, kinetic, and structural studies. J Biol Chem. 1996; 271:3306–3310.
- HU MC, HSU LC, HSU NC, CHUNG BC. Function and membrane topology of wild-type and mutated cytochrome P-450c21. Biochem J 1996; 316: 325–329.
- HU, MC; CHUNG, BC. Expression of human 21-hydroxylase (P450c21) in bacterial and mammalian cells: a system to characterize normal and mutant enzymes. Mol Endocrinol 1990; 4: 893–898.
- INGELMAN-SUNDBERG M. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. Toxicol Appl Pharmacol. 2005; 207(2 Suppl): 52-6.
- INGELMAN-SUNDBERG M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. J Intern Med. 2001; 250: 186-200.
- INGELMAN-SUNDBERG M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. Trends Pharmacol. Sci. 2004; 25: 193-200.
- JOHNSON EF, WESTER MR, STOUT CD. The structure of microsomal cytochrome P450 2C5: a steroid and drug metabolizing enzyme. Endocr Res. 2002; 28(4): 435-41.
- KAWAMOTO T, MITSUUCHI Y, TODA K, YOKOYAMA Y, MIYAHARA K, MIURA S, OHNISHI T, ICHIKAWA Y, NAKAO K, IMURA H. Role of steroid 11- β hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992; 89: 1458-1462.
- KLINGENBERG M. Pigments of rat liver microsomes. Arch. Biochem. Biophys. 75, 376–386 – citado em Urlacher VB, Girhard M. 2012 Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. Trends Biotechnol. 1958; 30(1): 26-36.
- KOHN B, DAY D, ALEMZADEH R, ENERIO D, PATEL SV, PELCZAR JV, SPEISER PW. Splicing mutation in *CYP21A2* associated with delayed

- presentation of salt-wasting congenital adrenal hyperplasia. *Am J Med Genet* 1995; 57: 450–454.
- KOMINAMI S, HARA H, OGISHIMA T, TAKEMORI S. Interaction between cytochrome P-450 (P-450C21) and NADPH-cytochrome P-450 reductase from adrenocortical microsomes in a reconstituted system. *J Biol Chem.* 1984; 259(5):2991-9.
 - KOMINAMI S, OCHI H, KOBAYASHI Y, TAKEMORI S. Studies on the steroid hydroxylation system in adrenal cortex microsomes. Purification and characterization of cytochrome P-450 specific for steroid C-21 hydroxylation. *J Biol Chem.* 1980; 255(8): 3386-94.
 - KOPPENS PF, HOOGENBOEZEM T, DROP SL, DE MUINCK-KEIZER-SCHRAMA SM, DEGENHART HJ. Aldosterone production despite absence or defectiveness of the CYP21 genes in two patients with salt-losing congenital adrenal hyperplasia caused by steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 49(6): 815-22.
 - KRONE N, BRAUN A, ROSCHER AA, KNORR D, SCHWARZ HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from Southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1059–1064.
 - KRONE N, RIEPE FG, GÖTZE D, KORSCH E, RISTER M, COMMENTZ J, PARTSCH CJ, GRÖTZINGER J, PETER M, SIPPELL WG. Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 11-hydroxylase deficiency: Functional characterization of two novel point mutations and a three base pair deletion in the CYP11B1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; no prelo.
 - KRONE N, ARLT W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009; 23(2): 181-92.
 - LACHANCE Y, LUU-THE V, LABRIE C, SIMARD J, DUMONT M, DE LAUNOIT Y, GUÉRIN S, LEBLANC G, LABRIE F. Characterization of human 3[3-hydroxysteroid dehydrogenase/A5-A4 isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 20469- 20475.

- LACHANCE Y, LUU-THE V, LABRIE C, SIMARD J, DUMONT M, DE LAUNOIT Y, GUÉRIN S, LEBLANC G, LABRIE F. Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. J Biol Chem. 1992; 267(5): 3551. Erratum for J Biol Chem. 1990; 265(33): 20469-75.
- LACHANCE, Y.; LUU-THE, V.; VERREAULT, H.; DUMONT, M.; RHEAUME, E.; LEBLANC, G. AND LABRIE, F. Structure of the human type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase (3 β -HSD) gene: adrenal and gonadal specificity. DNA and Cell Biol. 1991; 10: 701-711.
- LAJIC S, LEVO A, NIKOSHKOV A, LUNDBERG Y, PARTANEN J, WEDELL A. A cluster of missense mutations at Arg356 of human steroid 21-hydroxylase may impair redox partner interaction. Hum Genet 1997; 99: 704–709.
- LAJIĆ S, CLAUIN S, ROBINS T, VEXIAU P, BLANCHÉ H, BELLANNE-CHANTELOT C, WEDELL A. Novel mutations in CYP21 detected in individuals with hyperandrogenism. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2002; 87(6): 2824-2829.
- LAJIC, S; WEDELL, A. An íntron 1 splice mutation and a nonsense mutation (W23X) in CYP21 causing severe congenital adrenal hyperplasia. Hum. Genet 1996; 98: 182-184.
- LAU IF, SOARDI FC, LEMOS-MARINI SHV, GUERRA JR G, BAPTISTA MTM, DE MELLO MP. The insertion H28+C in the CYP21 gene: a novel frameshift mutation in a Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:5877-5880.
- LELIVELD SR, ZHANG YH, ROHN JL, NOTEBORN MH, ABRAHAMS JP. Apoptin induces tumor-specific apoptosis as a globular multimer. J Biol Chem 2003; 278: 9042–9051.
- LEVINE LS, RAUH W, GOTTESDIENER K, CHOW D, GUNCZLER P, RAPAPORT R, PANG S, SCHNEIDER B, NEW MI. New Studies of 11-beta-Hydroxylase and 19-Hydroxylase Enzymes in the Hypertensive Form of Congenital Adrenal Hyperplasia. J Clin Endocr Metab 1980; 50: 258-263.

- LEWIS DF, LEE-ROBICHAUD P. Molecular modelling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP21 based on the CYP102 crystal structure. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998; 66: 217–233.
- LIN D, ZHANG LH, CHIAO E, MILLER WL. Modeling and mutagenesis of the active site of human P450c17. *Mol Endocrinol* 1994; 8:392–402
- LOBATO MN, ORDONEZ-SANCHEZ ML, TUSIE-LUNA MT, MESEGUER A. Mutation analysis in patients with congenital adrenal hyperplasia in the Spanish population: identification of putative novel steroid 21-hydroxylase deficiency alleles associated with the classic form of the disease. *Hum Hered* 1999; 49: 169–175.
- LORENCE MC, CORBIN CJ, KAMIMURA N, MAHENDROO MS, MASON JI. Structural analysis of the gene encoding human 3beta- hydroxysteroid dehydrogenase A5----4-isomerase. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 1850-1855.
- LUU THE V, LACHANCE Y, LABRIE C, LEBLANC G, THOMAS JL, STRICKLER RC, LABRIE F. Full length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human 3 beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol.* 1989; 3-8: 1310-2.
- LUU-THE V, CÔTÉ M, LABILE F. Purification of human placental 3[3-hydroxysteroid dehydrogenase/A5-isomerase. *Clin Invest Med* 1988; 11: C.200.
- LUU-THE V, TAKAHASHI M, DELAUNOIT Y, DUMONT M, LACHANCE Y, LABRIE F. Evidence for distinct dehydrogenase and isomerase sites within a single 3[5-hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4- ene isomerase protein. *Biochemisto*, 1991; 30: 8861-8865.
- MARTI-RENOM MA, STUART A, FISER A, SÁNCHEZ R, MELO F, SALI A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2000; 29: 291-325.
- MATHIESON J, COUZINET B, WEKSTEIN-NOEL S, NAHOUL K, TURPIN G, SCHAISON G. The incidence of late-onset congenital adrenal hyperplasia due to 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency among hirsute women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1992; 36(4): 383-8.

- MCBRIDE MW, MCVIE AJ, BURRIDGE SM, BRINTNELL B, CRAIG N, WALLACE AM, WILSON RH, VARLEY J, SUTCLIFFE RG. Cloning, expression, and physical mapping of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene cluster (HSD3BP1-HSD3BP5) in human. *Genomics* 1999; 61: 277-284.
- MENDONCA BB, RUSSEL AJ, VASCONCELOS-LEITE M, ARNHOLD IJ, BLOISE W, WAJCHENBERG BL, NICOLAU W, SUTCLIFFE RG, WALLACE AM. Mutation in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II associated with pseudohermaphroditism in males and premature pubarche or cryptic expression in females. *J. Mol. Endocrinol.* 1994; 12: 119-122.
- MEUNIER B, DE VISSER SP, SHAIK S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem Rev.* 2004; 104(9):3947-80.
- MILLER, WL. Congenital Adrenal Hyperplasias. *Endocrinol Metab Clin North America* 1991; 20:721-740.
- MINUTOLO C, NADRA AD, FERNÁNDEZ C, TABOAS M, BUZZALINO N, CASALI B, BELLI S, CHARREAU EH, ALBA L, DAIN L. Structure-based analysis of five novel disease-causing mutations in 21-hydroxylase-deficient patients. *PLoS One.* 2011; 6(1):e15899.
- MOISAN, A.M.; RICKETTS, M.L.; TARDY, V.; DESROCHERS, M.; MEBARKI, F.; CHAUSSAIN, J.L.; CABROL, S.; RAUX-DEMAY, M.C.; FOREST, M.G.; SIPPELL, W.G.; PETER, M.; MOREL, Y. AND SIMARD, J. New insight into the molecular basis of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: identification of eight mutations in the HSD3B2 gene eleven patients from seven new families and comparison of the functional properties of twenty-five mutant enzymes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 12: 4410-4425.
- MONIER S, VAN LUC P, KREIBICH G, SABATINI DD, ADESNIK M. Signals for the incorporation and orientation of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol.* 1988; 107(2): 457-70.
- MOREL Y, MILLER WL. Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Adv Hum Genet* 1991; 20:1–68

- MOREL Y, MÃBARKI F, RHÉAUME E, SANCHEZ TR, FOREST MG, SIMARDT J. Structure-function relationships of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Contribution made by the molecular genetics of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Steroids* 1997; 62: 176-184.
- MORNET E, GIBRAT JF. A 3D model of human P450c21: study of the putative effects of steroid 21-hydroxylase gene mutations. *Hum Genet* 2000; 106: 330–339.
- MORNET E, CRÉTÉ P, KUTTENN F, RAUX-DEMAY MC, BOUÉ J, WHITE PC, BOUÉ A. Distribution of deletion and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 48: 79-88.
- MORRISON KE, MARIYAMA M, YANG-FENG TL, REEDERS ST. Sequence and localization of a partial cDNA encoding the human α 3 chain of type IV collagen. *Am J Hum Genet.* 1991; 49(3): 545-54.
- NAIKI Y, KAWAMOTO T, MITSUUCHI Y, MIYAHARA K, TODA K, ORII T, IMURA H, SHIZUTA Y. A Nonsense Mutation (TGG [Trp116] $\Rightarrow$ TAG [Stop] in CYP11B1 Causes Steroid 11 β -Hydroxylase Deficiency. *J Clin Endocrin Metabol* 1993; 77: 166-1682.
- NEBERT DW, RUSSELL DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet.* 2002; 360(9340): 1155-62.
- NELSON DR, KAMATAKI T, WAXMAN DJ, GUENGERICH FP, ESTABROOK RW, FEYEREISEN R, GONZALEZ FJ, COON MJ, GUNSALUS IC, GOTOH O, OKUDA K, NEBERT DW. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 1993; 12(1): 1-51.
- NELSON DR, KOYMANS L, KAMATAKI T, STEGEMAN JJ, FEYEREISEN R, WAXMAN DJ, WATERMAN MR, GOTOH O, COON MJ, ESTABROOK RW, GUNSALUS IC, NEBERT DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6(1):1-42.

- NELSON DR, STROBEL HW. On the membrane topology of vertebrate cytochrome P450 proteins. *J Biol Chem.* 1988; 263(13):6038-50.
- NELSON DR, STROBEL HW. Secondary structure prediction of 52 membrane-bound cytochromes P450 shows a strong structural similarity to P450cam. *Biochemistry* 1989; 28(2):656-60.
- NELSON DR, ZELDIN DC, HOFFMAN SM, MALTAIS LJ, WAIN HM, NEBERT DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics.* 2004; 14(1):1-18.
- NESHICH G, BORRO LC, HIGA RH, KUSER PR, YAMAGISHI ME, FRANCO EH, KRAUCHENCO JN, FILETO R, RIBEIRO AA, BEZERRA GB, VELLUDO TM, JIMENEZ TS, FURUKAWA N, TESHIMA H, KITAJIMA K, BAVA A, SARAI A, TOGAWA RC, MANCINI AL. The Diamond STING server. *Nucleic Acids Res.* 2005; **33**(web server issue): 29-35. (URL <http://sms.cbi.cnptia.embrapa.br>).
- NEW MI, GERTNER JM, SPEISER PW, DEL BALZO P. Growth and final height in classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Endocrinol Invest* 1989; 12: 91-95.
- NEW, MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4205-4214 (Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92, 142).
- NEW, MI. 21- hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1994; 48: 15-22.
- NEW, MI. Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. *Annu Rev Med* 1998; 49:311-28.
- NEW MI, LEVINE LS. Recent advances in 21-hydroxylase deficiency. *Annu. Rev. Med.* 1984; 35: 649-663.
- NIKOSHKOV A, LAJIC S, VLAMIS-GARDIKAS A, TRANEBJAERG L, HOLST M, WEDELL A, LUTHMAN H. Naturally occurring mutants of

- human steroid 21-hydroxylase (P450c21) pinpoint residues important for enzyme activity and stability. *J Biol Chem* 1998; 273:6163–6165.
- NIKOSHKOV A, LAJIC S, HOLST M, WEDELL A, LUTHMAN H. Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21- hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 194–199.
 - NIMKARN S, NEW MI. Steroid 11beta- hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19: 96-99.
 - OGISHIMA T, OKADA Y, OMURA T. Import and processing of the precursor of cytochrome P-450(SCC) by bovine adrenal cortex mitochondria. *J Biochem.* 1985; 98(3):781-91.
 - OMURA T, SATO R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J Biol Chem.* 1964; 239: 2379–2385
 - OMURA T, SATO R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem.* 1964; 239: 2370-8.
 - ORTIZ DE MONTELLANO PR. Cytochrome P-450 catalysis: radical intermediates and dehydrogenation reactions. *Trends Pharmacol Sci.* 1989; 10(9):354-9.
 - PANG S, LEVINE LS, STONER E, OPITZ JM, POLLACK MS, DUPONT B, NEW MI. Nonsalt-losing congenital adrenal hyperplasia due to 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency with normal glomerulosa function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983; 56(4): 808-18.
 - PANG S. Congenital adrenal hyperplasia owing to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2001; 1: 81-99.
 - PANG S, WANG W, RICH B, DAVID R, CHANG YT, CARBUNARU G, MYERS SE, HOWIE AF, SMILLIE KJ, MASON JI. A novel nonstop mutation in the stop codon and a novel missense mutation in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) gene causing, respectively, nonclassic and classic

- 3beta-HSD deficiency congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 6: 2556-2563.
- PANIGRAHI S, STETEFELD J, JANGAMREDDY JR, MANDAL S, MANDAL SK, LOS M. Modeling of Molecular Interaction between Apoptin, BCR-Abl and CrkL - An Alternative Approach to Conventional Rational Drug Design. *PLoS ONE* 2012; 7-1: 28395.
 - PARAJES S, QUINTEIRO C, DOMÍNGUEZ F, LOIDI L. High frequency of copy number variations and sequence variants at CYP21A2 locus: implication for the genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *PLoS One.* 2008; 3(5): 2138.
 - PAULINO LC, ARAUJO M, GUERRA G JR, MARINI SH, DE MELLO MP. Mutation distribuiton and CYP21/C4 locus variability in brazilian families with the classical form of the 21-hydroxylase deficiency. *Acta Pediatrics* 1999; 88(3): 275-83.
 - PERNECKY SJ, LARSON JR, PHILPOT RM, COON MJ. Expression of truncated forms of liver microsomal P450 cytochromes 2B4 and 2E1 in *Escherichia coli*: influence of NH2-terminal region on localization in cytosol and membranes. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1993; 90(7):2651-5.
 - PHILLIPS KA, VEENSTRA DL, OREN E, LEE JK, SADEE W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *Jama* 2001; 286: 2270–2279.
 - PICADO-LEONARD J, MILLER WL. Homologous sequences in steroidogenic enzymes, steroid receptors and a steroid binding protein suggest a consensus steroid-binding sequence. *Mol Endocrinol* 1988; 2: 1145–1150.
 - PODUST LM, YERMALITSKAYA LV, LEPESHEVA GI, PODUST VN, DALMASSO EA, WATERMAN MR. Estriol bound and ligand-free structures of sterol 14alpha-demethylase. *Structure (Camb)* 2004; 12:1937–1945.
 - POULOS TL. Modeling of mammalian P450 s on basis of P450cam X-ray structure. *Methods Enzymol* 1991; 206: 11–30
 - RAAG R, MARTINIS SA, SLIGAR SG, POULOS TL. Crystal structure of the cytochrome P-450CAM active site mutant Thr252Ala. *Biochemistry* 1991; 30:11420–11429

- RAVICHANDRAN KG, BODDUPALLI SS, HASEMANN CA, PETERSON JA, DEISENHOFER J. Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science* 1993; 261: 731–736.
- REIN H, JUNG C. Metabolic reactions: mechanisms of substrate oxygenation. In: Schenkman JB, Greim H (eds) *Cytochrome P450*. Springer-Verlag, Berlin, 1993: 105–122
- RHEAUME E, LACHANCE Y, ZHAO HF, BRETON N, DUMONT M, DE LAUNOIT Y, TRUDEL C, LUU-THE V, SIMARD J, LABRIE F. Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase in human adrenals and gonads. *Mol. Endocrinol.* 1991; 8: 1147-1157.
- RHEAUME E, SIMARD J, MOREL Y, MEBARKI F, ZACHMANN M, FOREST MG, NEW MI, LABRIE F. Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Nature Gen.* 1992; 1: 239-245.
- ROBINS T, CARLSSON J, SUNNERHAGEN M, WEDELL A, PERSSON B. Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. *Mol Endocrinol.* 2006; 20(11):2946-64.
- RODRIGUES NR, DUNHAM I, YU CY, CARROLL MC, PORTER RR, CAMPBELL RD. Molecular characterization of the HLA-lined steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO J* 1987; 6:1653–1661.
- ROSENFELD RL, RICH BH, WOLFSDORF JI, CASSORLA F, PARKS JS, BONGIOVANNI AM, WU CH, SHACKLETON CH. Pubertal presentation of congenital delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980; 51(2): 345-53.
- RÖSLER A, LEIBERMAN E, SACK J, LANDAU H, BENDERLY A, MOSES SW, COHEN T. Clinical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 beta-hydroxylase deficiency. *Horm Res* 1982; 16(3):133-41.

- RUETTINGER RT, WEN LP, FULCO AJ. Coding nucleotide 5' regulatory and deduced amino acid sequences of P-450BM-3, a single peptide cytochrome P-450: NADPH-P-450 reductase from *Bacillus megaterium*. J Biol Chem 1989; 264:10987–10995.
- RUMSBY G, CARROLL MC, PORTER RR, GRANT DB, HJELM M. Deletion of the steroid 21-hydroxylase and complement C4 genes in congenital adrenal hyperplasia, J Med Genet 1986; 23: 204-209 .
- RYCHLEWSKI L, ZHANG B, GODZIK A. Functional insights from structural predictions: analysis of the Escherichia coli genome. *Protein Sci* ; 8:614–624 (1999).
- SAKAGUCHI M, MIHARA K, SATO R. Signal recognition particle is required for co-translational insertion of cytochrome P-450 into microsomal membranes. Proc Natl Acad Sci. USA 1984; 81(11): 3361-4.
- SAKAGUCHI M, MIHARA K, SATO R. A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P-450 functions both as an insertion signal and as a stop-transfer sequence. Embo J. 1987; 6(8): 2425-31.
- SALI A, BLUNDELL TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J. Mol. Biol. 1993; 234: 779-815.
- SAMBROOK, J; FRISTSCH, EF; MANIATIS, TE. Molecular cloning: a laboratory manual, 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
- SAUER LA, CHAPMAN JC, DAUCHY RT. Topology of 3[5- hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase/A5-A4-isomerase in adrenal cortex mitochondria and microsomes. Endocrinology 1994; 134: 751-759.
- SCHOCH GA, YANO JK, WESTER MR, GRIFFIN KJ, STOUT CD, JOHNSON EF. Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site. J Biol Chem 2004; 279: 9497–9503.
- SCHRAMP P, ZERAH M, MANI P, JEWELEWICZ R, JAFFE S, NEW MI. Nonclassical 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: a review of our experience with 25 female patients. Fertil Steril. 1992; 58(1): 129-36.

- SCOTT EE, HE YA, WESTER MR, WHITE MA, CHIN CC, HALPERT JR, JOHNSON EF, STOUT CD. An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:13196–13201
- SHERMAN SL, ASTON CE, MORTON NE, SPEISER PW, NEW MI. A segregation and linkage study of classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1988; 42: 830–838.
- SHIMIZU T, TATEISHI T, HATANO M, FUJII-KURIYAMA Y. Probing the role of lysines and arginines in the catalytic function of cytochrome P450d by site-directed mutagenesis. Interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* 1991; 266:3372–3375.
- SIMARD J, RHEAUME E, SANCHEZ R, LAFLAMME N, LAUNOIT Y, LUUTHE V, VAN SETERS AP, GORDON RD, BETTENDORF M, HEINRICH U, MOSHANG T, NEW MI, LABRIE F. Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Mol. Endocrinol.* 1993; 7: 716-728.
- SINNOTT PJ, LIVIERI C, SAMPIETRO M, MARCONI M, HARRIS R, SEVERI F, STRACHAN T. CYP21/C4 Gene Organization In Italian 21-Hydroxylase Deficiency Families. *Hum. Genet.* 1992; 88: 545-551.
- SOARDI, F. Mutações novas nos genes CYP21A2 e CYP11B1 e suas alterações na atividade enzimática. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2008.
- SPEISER PW, DUPONT B, RUBINSTEIN P, PIAZZA A, KASTELAN A, NEW MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1985; 37: 650–667.
- SPEISER PW, DUPONT J, ZHU D, SERRAT J, BUEGELEISEN M, TUSIE-LUNA MT, LESSER M, NEW MI, WHITE PC. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1992; 90: 584–595.

- SPEISER PW, NEW MI, WHITE PC. Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14,DR1. *N Engl J Med.* 1988; 319: 19-23
- SPEISER, PW; NEW, MI. Genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Trends Genet.* 1985; 1: 275-278.
- STRACHAN T, WHITE PC. Molecular pathology of steroid 21-hydroxylase deficiency. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1991; 40: 537-543.
- SZCZESNA-SKORUPA E, KEMPER B. NH₂-terminal substitutions of basic amino acids induce translocation across the microsomal membrane and glycosylation of rabbit cytochrome P450_{11C2}. *J Cell Biol.* 1989; 108(4):1237-43.
- TARDY V, MENASSA R, SULMONT V, LIENHARDT-ROUSSIE A, LECOINTRE C, BRAUNER R, DAVID M, MOREL Y. Phenotype-genotype correlations of 13 rare CYP21A2 mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(3): 1288-300.
- THOMAS JL, BERKO EA, FAUSTINO A, MYERS RP, STRICKLER RC. Human placental 3[5-hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid 5-ene-isomerase: purification from microsomes, substrate kinetics, and inhibition by product steroids. *J Steroid Biochem* 1988; 31: 785-793.
- THOMAS JL, STRICKLER RC, MYERS RP, COVEY DF. Affinity labeling of human placental 3β-hydroxy-Δ⁵-steroid dehydrogenase and steroid Δ⁵-isomerase---evidence for bifunctional catalysis by a different conformation of the same protein for each enzyme activity. *Biochemistry* 1992; 31: 5522-5527.
- THOMAS JL, NASH WE, MYERS RP, CRANKSHAW MW, STRICKLER RC. Affinity radiolabeling identifies peptides and amino acids associated with substrate binding in human placental 3β-hydroxy-Δ⁵-steroid dehydrogenase. *J Biol Chem* 1993; 268: 18507-18512.
- THOMAS JL, FRIEDEN C, NASH WE, STRICKLER RC. An NADH-induced conformational change that mediates the sequential 3 β-hydroxysteroid

- dehydrogenase/isomerase activities is supported by affinity labeling and the time-dependent activation of isomerase. *J Biol Chem.* 1995; 270(36): 21003-8.
- TORRES N, MELLO MP, GERMANO CM, ELIAS LL, MOREIRA AC, CASTRO M. Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36(10): 1311-8.
 - TORRESANI T, BIASON-LAUBER A. Congenital adrenal hyperplasia: diagnostic advances. *J Inherit Metab Dis.* 2007; 30(4): 563-75. Epub 2007 Aug 10. Erratum in: *J Inherit Metab Dis.* 2007; 30(5): 832.
 - TUSIE-LUNA MT, SPEISER PW, DUMIC M, NEW MI, WHITE PC. A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 685–692.
 - TUSIE-LUNA MT, TRAKTMAN P, WHITE PC. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem.* 1990; 265: 20916-20922 (1990).
 - URABE K, KIMURA A, HARADA F, IWANAGA T, SASAZUKI T. Gene conversion in steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet* 1990; 46:1178-1186.
 - URLACHER VB, GIRHARD M. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* 2012; 30(1):26-36.
 - WADA A, WATERMAN MR. Identification by site-directed mutagenesis of two lysine residues in cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 that are essential for adrenodoxin binding. *J Biol Chem* 1992; 267: 22877-22882
 - WEDELL A, THILÉN A, RITZÉN EM, STENGLER B, LUTHMAN H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 1145-1152.
 - WEDELL A, RITZÉN EM, HAGLUND-STENGLER B, LUTHMAN H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: Three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 7232-7236.

- WERKMEISTER JW, NEW MI, DUPONT B, WHITE PC. Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet.* 1986; 39: 461-469.
- WESTER MR, JOHNSON EF, MARQUES-SOARES C, DANSETTE PM, MANSUY D, STOUT CD. Structure of a substrate complex of mammalian cytochrome P450 2C5 at 2.3 Å resolution: evidence for multiple substrate binding modes. *Biochemistry* 2003; 42: 6370-6379.
- WHITE PC. Genetics of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Recent Prog Horm Res* 1987; 43: 305-336.
- WHITE PC, CURNOW KM, PASCOE L. Disorders of steroid 11 β -hydroxylase isozymes. *Endocr Rev* 1994; 15: 421-438.
- WHITE PC, NEW MI, DUPONT B. Congenital adrenal hyperplasia (1). *N Engl J Med* 1987; 316: 1519-1524.
- WHITE PC, NEW MI, DUPONT B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5111-5115.
- WHITE PC, SPEISER PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Reviews* 2000; 21(3): 245-291.
- WHITE PC. Genetic Diseases of steroid metabolism. *Vitam Horm.* 1994; 49: 131-159.
- WILLIAMS PA, COSME J, SRIDHAR V, JOHNSON EF, MCREE DE. Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features. *J Inorg Biochem* 2000; 81: 183–190.
- WILLIAMS PA, COSME J, SRIDHAR V, JOHNSON EF, MCREE DE. The Crystallographic Structure of a Mammalian Microsomal Cytochrome P450 Monooxygenase: Structural Adaptations for Membrane Binding and Functional Diversity. *Mol Cell* 2000; 5: 121–132.
- WILLIAMS PA, COSME J, VINKOVIC DM, WARD A, ANGOVE HC, DAY PJ, VONRHEIN C, TICKLE IJ, JHOTI H. Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* 2004; 305: 683-686.

- WILLIAMS PA, COSME J, WARD A, ANGOVE HC, MATAK VINKOVIC D, JHOTI H. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* 2003; 424: 464–468
- WILSON RC, WEI JQ, CHENG KC, MERCADO AB, NEW MI. Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the 21-hydroxylase gene. *J. Clin. Endocrinol. metab.* 1995a; 80: 1635-1640.
- WITCHEL SF, AZZIZ R. Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2011; 24: 116-126.
- WU DA, CHUNG BC. Mutations of P450c12 (steroid 21-hydroxylase) at Cys428, Val281, and Ser268 result in complete, partial, or no loss of enzymatic activity, respectively. *J. Clin. Invest.* 1991; 88: 519-523.
- WU DA, HU MC, CHUNG BC. Expression and functional study of wild-type and mutant human cytochrome P450c21 in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol* 1991; 10: 201–209.
- YANG MH, LEE WI, CHEN LC, LIN SJ, HUANG JL. Intraarticular triamcinolone hexacetonide injection in children with chronic arthritis: a survey of clinical practice. *Acta Paediatr. Taiwan* 1999; 40(3): 182-5.
- YANO JK, WESTER MR, SCHOCH GA, GRIFFIN KJ, STOUT CD, JOHNSON EF. The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *J Biol Chem* 2004; 279: 38091–38094.
- ZACHMANN M, PRADER A. Unusual heterozygotes of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency confirmed by HLA tissue typing. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1979; 92(3): 542-6.
- ZACHMANN M, TASSINARI D, PRADER A. Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 β -hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983; 56: 222-9.
- ZHAO B, LEI L, KAGAWA N, SUNDARAMOORTHY M, BANERJEE S, NAGY LD, GUENGERICH FP, WATERMAN MR. Three-dimensional structure

- of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. *J Biol Chem.* 2012; 287(13):10613-22.
- ZHAO HF, LABILE C, SIMARD J, DELAUNOIT Y, TRUDEL C, MARTEL C, RHEAUME E, DUPONT E, LUUTHE V, PELLETIER G, LABRIE F. Characterization of rat 3beta 5-hydroxysteroid dehydrogenase A5-A4 isomerase cDNAs and differential tissue-specific expression of the corresponding messenger RNAs in steroidogenic and peripheral tissues. *J Biol Chem.* 1991; 266:583-593.

ANEXOS

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada: "Estudo do Efeito Bioquímico e Estrutural de Novas Mutações em Enzimas da Esteroidogênese" _____

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCEPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. _____, Instituição: _____

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. _____, Instituição: _____

(X) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. 359/2006 _____, Instituição: _____
CBMEG/ UNICAMP _____

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.


Aluno: Ana Letícia Gori Lusa


Orientador: Maricilda Palandi de Melo

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido (X) Indeferido

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Prof. Dra. Patrícia R. Böhmer Lutz
Coordenadora do
Comitê de Ética em Pesquisa
FCM/UNICAMP
Matrícula: 06125-5

Structural aspects of the p.P222Q homozygous mutation of *HSD3B2* gene in a patient with congenital adrenal hyperplasia

Aspectos estruturais da mutação homozigótica p.P222Q do gene *HSD3B2* em um paciente com hiperplasia congênita da adrenal

Ana Letícia Gori Lusa¹, Sofia Helena Valente de Lemos-Marini²,
Fernanda Caroline Soardi³, Lucio Fabio Caldas Ferraz⁴, Gil Guerra-Júnior⁵,
Maricilda Palandi da Mello⁶

¹Center for Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil

²Pediatric Endocrinology, Department of Pediatrics, Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Unicamp, Campinas, SP, Brazil

³Multidisciplinary Research Lab, Universidade São Francisco (USF), Bragança Paulista, SP, Brazil

SUMMARY

Type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^2 - Δ^4 -isomerase (3 β -HSD2), encoded by the *HSD3B2* gene, is a key enzyme involved in the biosynthesis of all the classes of steroid hormones. Deleterious mutations in the *HSD3B2* gene cause the classical deficiency of 3 β -HSD2, which is a rare autosomal recessive disease that leads to congenital adrenal hyperplasia (CAH). CAH is the most frequent cause of ambiguous genitalia and adrenal insufficiency in newborn infants with variable degrees of salt losing. Here we report the molecular and structural analysis of the *HSD3B2* gene in a 46,XY child, who was born from consanguineous parents, and presented with ambiguous genitalia and salt losing. The patient carries a homozygous nucleotide c.665C>A change in exon 4 that putatively substitutes the proline at codon 222 for glutamine. Molecular homology modeling of normal and mutant 3 β -HSD2 enzymes emphasizes codon 222 as an important residue for the folding pattern of the enzyme and validates a suitable model for analysis of new mutations. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2010;54(3):768-74

SUMÁRIO

A enzima 3 β -hidroxisteroide desidrogenase/ Δ^2 - Δ^4 -isomerase do tipo 2 (3 β -HSD2), codificada pelo gene *HSD3B2*, é importante na biossíntese de todas as classes de hormônios esteróides. As mutações no gene *HSD3B2* podem causar deficiência da 3 β -HSD2 da forma clássica. É de herança autossômica recessiva e uma das causas mais raras de hiperplasia congênita da adrenal (HCA). A deficiência dessa enzima leva frequentemente à ambiguidade genital e à insuficiência da adrenal em recém-nascidos com vários níveis de perda de sal. Neste trabalho, foi feito o estudo estrutural e molecular do gene *HSD3B2* em um paciente 46,XY, filho de pais consanguíneos, com ambiguidade genital e perda de sal. O paciente é homozigoto para a troca nucleotídica c.665C>A no éxon 4, que putativamente leva à substituição de uma prolina do códon 222 por uma glutamina. A modelagem molecular por homologia das enzimas 3 β -HSD2 normal e mutantes ressaltou que a prolina no códon 222 é um resíduo importante no enovelamento da enzima e validou um modelo adequado para avaliações de novas mutações. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2010;54(3):768-74

Correspondence to:
Maricilda Palandi da Mello
Laboratório de Genética Molecular Humana, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas
13083-875 – Campinas, SP, Brasil
Caixa postal 6000
mmello@unicamp.br

Received on Jul/20/2010
Accepted on Nov/22/2010

INTRODUCTION

The steroidogenic enzyme 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^2 - Δ^4 -isomerase (3 β -HSD) is a membrane-bound NADH-dependent enzyme involved in the biosynthesis of all the classes of steroid hormones,

namely glucocorticoids, mineralocorticoids, progesterone, androgens, and estrogens (1). These steroid hormones play an important role in processes such as differentiation, development, and growth and in physiological functions in the most human tissues (2).

The dehydroepiandrosterone (DHEA) is used as substrate in a two-step reaction catalyzed by 3 β -HSD. During the reaction, the reduction of NAD⁺ to NADH occurs by a rate-limiting activity of 3 β -HSD followed by the NADH recruitment for the activation of isomerase activity on the same enzyme. A previous model of the type I enzyme suggests that both 3 β -HSD and isomerase domains of the enzyme are linked by a shared coenzyme domain that may function as both binding site domain for NAD⁺ during the 3 β -HSD reaction and as coenzyme domain for the allosteric activation for isomerase activity (3).

In humans, there are two types of 3 β -HSD isoenzymes encoded by two genes that are very similar in structure and both are located on 1p13.1 (2,4,5). Type I gene (*HSD3B1*) is expressed in placenta and peripheral tissues. Type II gene (*HSD3B2*) encodes the adrenal and gonadal 3 β -HSD enzymes (5,6). In the adrenal, type II 3 β -HSD is a key enzyme required for the production of cortisol and aldosterone (7).

Defective mutations in the *HSD3B2* gene cause classical 3 β -HSD2 deficiency (OMIM # 201810), which is an autosomal recessive inherited form of congenital adrenal hyperplasia (CAH) that impairs steroidogenesis in both the adrenals and gonads (8-11). The clinical manifestation of classical 3 β -HSD2 deficiency ranges from salt-losing to non salt-losing forms in both sexes. In newborns, 3 β -HSD2 deficiency results in ambiguity of the external genitalia in genetic males, while affected females exhibit normal sexual differentiation or partial virilization. During adolescence, 3 β -HSD2 deficiency results in variable degrees of hypogonadism in boys and hyperandrogenism (premature pubarche and hirsutism) in girls. The nonclassical form of 3 β -HSD2 deficiency has been described in females with hyperandrogenism, but no *HSD3B2* mutations were found in those patients (12-18).

In the present study we describe the clinical and molecular characterization of a patient diagnosed as having the classical form of congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 3 β -HSD2 deficiency. Molecular analysis of the *HSD3B2* gene revealed the homozygous c.665C>A missense mutation in codon 222 changing the proline to glutamine. Molecular homology modeling of 3 β -HSD2 was performed. We used sequences of three-dimensional structure determined by X-ray crystallography that showed 30% identity with the protein sequence of 3 β -HSD2. The proposed model empha-

sizes the critical importance of the P222 residue on the overall 3 β -HSD2 enzyme integrity and activity.

CASE REPORT

The patient is a Caucasian male child born at term after an uneventful pregnancy from a consanguineous marriage. At birth he weighed 3.2 kg and his height was 50 cm. He was referred to us for investigation of ambiguous genitalia. In the first evaluation, at 23 days of life, his height was 50 cm, weight was 2.85 kg; he had a 3 cm-long phallus and complete fusion of the labioscrotal folds with only one palpable gonad. His karyotype was 46,XY. He had high serum levels of 17OHProgesterone (942 ng/mL – 28.5 nmol/L) with normal dosages of sodium (137 mEq/L) and potassium (6.0 mEq/L). Thus, diagnosis of CAH was suspected. Despite dexamethasone treatment he presented poor weight gain with a hyponatremic (129 mEq/L) dehydration episode associated with hyperkalemia (7.6 mEq/L) at 2 months of age. Laboratory investigation showed a DHEA/ Δ^4 -DIONE ratio of 17.5. Diagnosis of CAH due to 3 β -HSD deficiency was considered. Thereafter, therapy with glucocorticoid (hydrocortisone) and mineralocorticoid (fludrocortisone) replacement was established leading to gain of weight and normal growth rate.

This study was approved by the appropriate Ethics Committee from the State University of Campinas (São Paulo, Brazil) and informed consents were obtained from the patient and his parents.

METHODS

Genomic DNA was isolated from blood leukocytes using standard techniques. Primers and conditions for PCR amplification of the entire coding region of the *HSD3B2* gene were based on a published report (6). Purified PCR products were sequenced in both sense and antisense orientations using ABI PRISM 377 Automated DNA Sequencer according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, USA).

The three-dimensional structure of both mutant and native 3 β -HSD2 proteins were modeled using the crystal structure of Vestibular Reductase from *Methylobacillus* L. (Protein Data Bank accession number 2P4H) as a template (19). Models were created and validated by using default settings and parameters of the Swiss

Model web-served software. The modeled protein structures were produced and analyzed by using the web-based BlueStar STING software (20).

RESULTS

DNA sequencing of the patient's *HSD3B2* gene revealed the homozygous missense mutation p.P222Q (CCA>CAA). Both parents and his sister were found to be heterozygous for this mutation (Figure 1A). The nucleotide substitution was confirmed by at least three independent PCR and sequencing analyses, in both sense and antisense strands. Protein alignment showed that the proline at residue 222 is highly conserved among the mammalian 3 β -HSD family, as demonstrated in figure 1B.

Structural studies were carried out with both p.P222Q and p.P222T mutations for comparison purposes. Blast results for the native human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase showed the

vestitone reductase from *Medicago sativa* L. (PDB-ID 2P4H) as the most similar structure with a score of 31%. Based on this sequence identity, a three-dimensional ribbon model of human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase was constructed using the vestitone reductase sequence as template (Figure 2A). The ribbon structures for both native and for the two different 3 β -HSD2 mutants in residue 222 demonstrated a prominent side-chain group for both glutamine and threonine as compared to the native proline (Figure 2B and C). In addition, the analysis of internal contacts (Figure 2D, E, and F) showed that the native residue Pro²²² makes a hydrogen-bond with Y254 in main chain and hydrophobic interactions with Y224, V220, and also with Y254. The mutated residues Gln²²² and Thr²²² eliminate the hydrophobic interaction with Val²²⁰. In complement, T222 enzyme interacts with residue Y254 by establishing hydrogen-bonds with the main chain and side chains. The domain formed

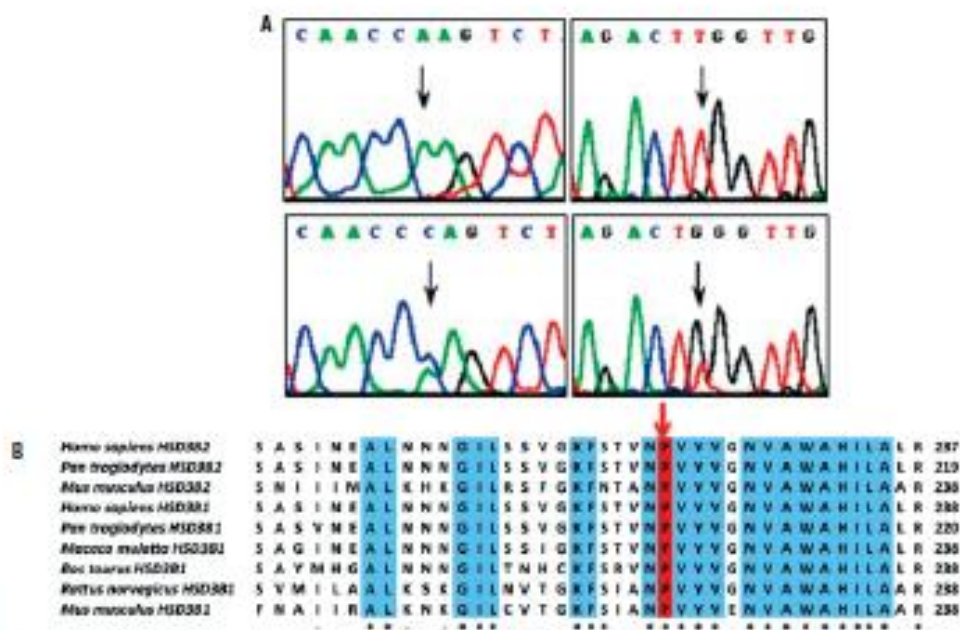


Figure 1. (A) Partial nucleotide sequence of exon 4 of the *HSD3B2* gene showing the C>A transversion (black arrows) in both sense (left) and antisense (right) strands. Upper panels show patient's sequence who is homozygous for the nucleotide change; lower panels show his sister's sequence who is heterozygous. (B) ClustalW comparison of the partial amino acid sequences of mammalian 3 β -HSD isoenzymes. Residue Pro²²² is marked in red (red arrow). Amino acid residues are designated by single letter code and numbered according to the first NH₂-terminal methionine of human 3 β -HSD2. Conserved residues in 3 β -HSD2 proteins are boxed in blue.

by residues 251-274, which is a region for substrate binding, demonstrates important structural modifications when P222 is replaced by Q222 or T222. Most

remarkable is that the wild-type protein presents a flexible turn while both mutant proteins show a β -sheet in this region (Figure 3).

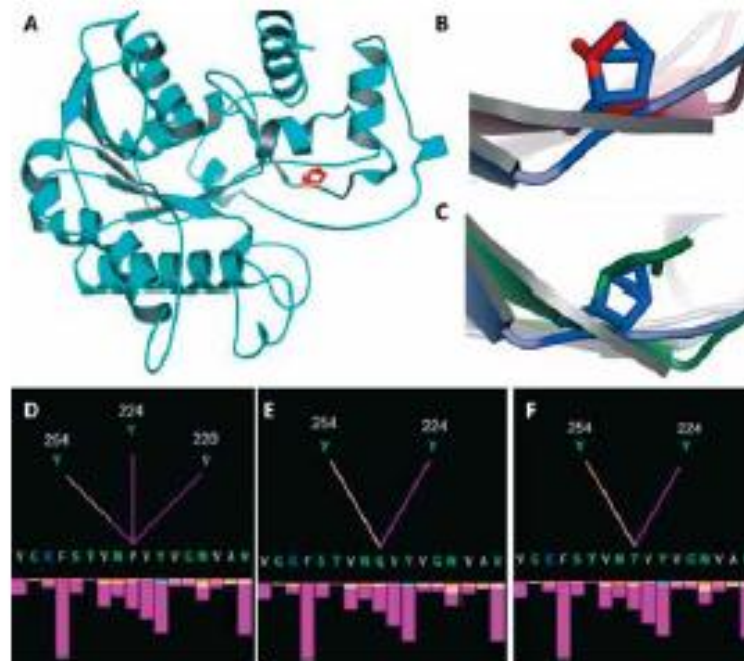


Figure 2. (A) Ribbon structure of native 3 β -HSD2 (cyan), the P222 residue is denoted in red. (B) Aligned ribbon structure of both native and mutants 3 β -HSD2 demonstrating the prominent side-chain group of the mutant threonine (red) as compared to the side-chain group of proline (blue). (C) P222 on the native enzyme (blue) and Q222 mutant enzyme (green). STING report contacts obtained from the BlueStar STING software. The images show internal contacts of proline, glutamine, and threonine on the respective native (D), Q222 (E) and T222 (F) enzymes. Lines denote different interactions: hydrophobic interactions (magenta); hydrogen bond main chain-main chain (rose); hydrogen bond side chain-main chain (salmon). Bars below each amino acid are internal contacts in each amino acid. Bar color represents the contact type and its width represents the contact number.

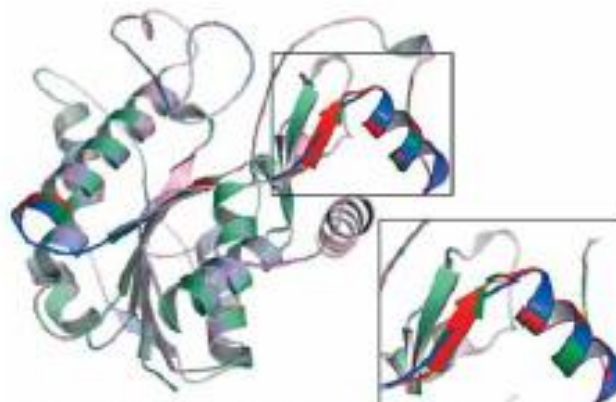


Figure 3. Overlap of wild-type structure of 3 β -HSD2 (cyan) and the Q222 (magenta) and T222 (green) mutant proteins. Substrate binding domains are identified in different colors: wild-type (blue), Q222 (red), and T222 (green). In detail, region 251-274 substrate binding domain.

DISCUSSION

p.P222Q mutation has already been described as leading to a complete loss of 3 β -HSD2 activity (21). The severe form of 3 β -HSD2 deficiency in the homozygous patient here reported confirms a good correlation genotype-phenotype for the mutation. These findings suggest that residue position 222 is important for enzymatic activity.

Two different *missense* mutations have been identified in codon 222, depending on the mutated nucleotide being located in the first or in the second nucleotide of the codon (21–23). The c.664C>A transversion in the first nucleotide of codon 222 (CCA>ACA) leads to the replacement of a proline by a threonine. The *missense* mutation p.P222T has been identified in an Eastern European female neonate with classic salt-losing disorder (23). Whereas, the transversion c.664C>A in the second nucleotide of codon 222 (CCA>CAA) converts a proline to a glutamine. The *missense* mutation p.P222Q has been previously identified in two Algerian siblings (22). In the Brazilian population the p.P222Q mutation was found in two sisters in compound heterozygosis with the p.G129R mutation (24) and in a homozygous male patient with the salt-losing form of 3 β -HSD2 deficiency (25). The case described here is a Brazilian male with typical clinical features of classical 3 β -HSD2 deficiency who is also homozygous for the p.P222Q mutation.

Both mutations on P222 residue abolished the 3 β -HSD2 activity as demonstrated by *in vitro* assays (22,23). The importance of this residue is evidenced by the fact that the residue is predicted to be within the membrane-spanning domain suggesting a putative role on the ultimate folding pattern of the enzyme (2). In addition, P222 residue is located adjacent to the substrate-binding domain being highly conserved in that particular position (26). Although both p.P222Q and p.P222T mutations render the 3 β -HSD2 enzyme with no detectable activity from the structural point of view, they probably do so due to different effects. Moisan and cols. (22) report that p.P222Q enzyme did not show any evidence of protein instability. They discuss that the absence of enzymatic activity was probably due to alterations in the catalytic activity of the enzyme, such as significant changes in the substrate-binding domain introduced by the presence of glutamine in codon 222. On the other hand, p.P222T enzyme showed no detectable signal on Western blot despite mRNA pro-

duction, suggesting a totally unstable protein (23). It was considered that the severe instability of the enzyme was the main detrimental mechanism that profoundly decreased 3 β -HSD2 activity (23). In order to obtain novel information concerning the structure-function relationship of 3 β -HSD2 mutant enzymes we characterized the functional significance of p.P222Q and p.P222T amino acid replacement in enzyme activity by molecular modeling the p.P222Q and p.P222T enzymes. To produce a three dimensional model useful for interpreting biochemical data and for proposing and testing mechanisms of action for the 3 β -HSD2 protein a model should be obtained based upon a protein with an already resolved crystallographic structure. To select such a model, one parameter was that the fold of the proteins should be similar enough so that energy of the model would be minimal (27–29). To establish similarities among candidate sequences the blast algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was used. The three-dimensional structure of human type 1 3 β -HSD/isomerase was modeled before using the crystal structure of UDP-galactose 4-epimerase from *E. coli* as template, an enzyme with 30% overall sequence identity (30). Here we tested the vestimental reductase sequence from *Medicago sativa* L. as template for a model of human type 2 3 β -HSD/isomerase to analyze the effect of mutations in the protein sequence.

The consequence of amino acid replacement on 3 β -HSD2 activity can be inferred according to the biochemical properties of each amino acid. Proline has a non-polar side-chain and is hydrophobic, tending to cluster with other hydrophobic residues on the inside of the protein. In addition, proline is a rigid amino acid due to the covalent binding of its side-chain with the nitrogen main-chain. As a consequence of this unique cyclic side-chain, proline has a significant effect upon the geometry of the backbone chain and also disrupts any regular repeating structure of the three-dimensional conformation of polypeptides. Indeed, proline can act as a structural disruptor for α -helices and as a turning point in β -sheets. As observed in figure 2B, residue Pro222 in the 3 β -HSD2 enzyme is located on the edge between an α -helix and a β -sheet. When changed to glutamine or threonine the β -sheet is maintained showing that both variations impose on the protein a drastic conformational change in this region. Both glutamine and threonine have uncharged polar side-chains and are hydrophilic residues, clustering on the outside of proteins. The distinct biochemical properties of proline,

glutamine, and threonine dictate the putative interactions of these amino acids with other surrounding residues, as summarized in figure 2C.

The mutant residues Q222 and T222 suppress hydrophobic interaction with V220, normally observed for P222. As those differences in the structure of residue 222 can affect other regions of the protein, analysis of the substrate-binding and membrane-spanning domains was performed (2,26). No change in the membrane-spanning domain (data not shown) was observed. However, modifications in one substrate-binding region were observed. The 251-274 domain in Q222 and T222 mutant protein presents a β -sheet conformation, while the wild-type has a flexible turn (Figure 3). Considering that 3β -HSD2 enzyme contains only two substrate-binding regions, residues 176-186 and 251-274 (26), this result suggests that reduction in protein activity is mainly due to an impairment of substrate binding. Finally, the native residue P222 appears to be essential for the hydrophobic surfaces on that particular position of the enzyme. Moreover, it seems to establish specific residue interactions that must be critical for the 3β -HSD2 enzyme to achieve the appropriate conformation for its catalytic activity.

In summary, this study has provided further insight concerning the structure-function relationship of 3β -HSD2 mutants. Molecular homology modeling of the mutant 3β -HSD2 showed potential roles for mutated residues. These findings have emphasized codon 222 as an important residue for catalytic activity of the enzyme and allowed us to correlate with biochemical data previously reported (23). Moreover, it can be concluded that structural analysis provides additional insight to the understanding of enzyme action and consequently, it is an important tool for genotype-phenotype correlation.

Acknowledgements: The authors would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brasília) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo for financial support. We would also like to mention Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária for allowing us to use their IT facilities.

Disclosure: no potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

REFERENCES

- Simard J, Durocher E, Mebarki F, Turgeon C, Sanchez R, Labrie Y, et al. Molecular biology and genetics of the 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/5 α -reductase gene family. *J Endocrinol*. 1996;150:S189-207.
- Labrie F, Simard J, Luo-Thé V, Belanger A, Pelletier G. Structure, function and tissue-specific gene expression of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/5 α -reductase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992;43:835-28.
- Thomas J, Diaz W, Adalagetta A, Brandt S, Fuller R, Norris W. Structure/function relationships responsible for coenzyme specificity and the isomerase activity of human type 1 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase. *J Biol Chem*. 2003;278(37):35483-90.
- McBride M, McVie A, Burnidge S, Brintnell B, Craig N, Wallace A, et al. Cloning, expression, and physical mapping of the 3β -hydroxysteroid dehydrogenase gene cluster (HSD3B1-HSD3B5) in human. *Genomics*. 1999;51:277-84.
- Lachance Y, Luo-Thé V, Verreault H, Dumont M, Rheaume E, Lablanc G, et al. Structure of the human type II 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/5 α -reductase (3β -HSD) gene: adrenal and gonadal specificity. *DNA and Cell Biol*. 1991;10:701-11.
- Rheaume E, Lachance Y, Zhao H, Britton N, Dumont M, de Launoy Y, et al. Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/5 α -reductase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol*. 1991;5:1147-52.
- Reiney W, Parker C, Fishman K, Carr S. The adrenal genetic puzzle: how do the fetal and adult pieces differ? *Endocr Rev*. 2002;23(4):671-22.
- Rheaume E, Simard J, Morin Y, Mebarki F, Zachmann M, Forest M, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3β -hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Nature Gen*. 1992;1:239-45.
- Simard J, Rheaume E, Sanchez R, Leflamme N, Leunoy Y, Luo-Thé V, et al. Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Mol Endocrinol*. 1993;7:716-28.
- Pang S. Congenital adrenal hyperplasia owing to 3β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2001;1:81-99.
- Simard J, Moisan A, Morin Y. Congenital adrenal hyperplasia due to 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/5 α -reductase deficiency. *Semin Reprod Med*. 2002;3:255-78.
- Pang S, Lerner AJ, Stoner E, Lavigne LS, Oberfield SE, Engel L, et al. Late-onset adrenal steroid 3β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. I. A cause of hirsutism in pubertal and postpubertal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:428-38.
- Schnam P, Zerah M, Mami P, Jewelewicz R, Jaffe S, New MI. Non-classical 3β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: a review of our experience with 25 female patients. *Fertil Steril*. 1992;58:129-38.
- Madina M, Hamata J, Flores M, et al. Normal ovarian function in a mild form of late-onset 3β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Fertil Steril*. 1996;66:1021-5.
- Elder-Gova T, Hurewitz A, Vecsei P, Palti Z, Milewsky A, Rösler A. Secondary biosynthetic defects in women with women with late-onset congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med*. 1990;323:865-83.
- Zerah M, Rheaume E, Mami P, Schnam P, Simard J, Labrie F, et al. No evidence of mutations in the genes for type I and type II 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) in nonclassical 3β -HSD deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79:1811-2.
- Cheng YT, Zhang L, Sakhal-Aloddour H, et al. Absence of molecular defect in type II 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) gene in premature pubertal children and hirsute female patients

- with moderately decreased adrenal 3 β -HSD activity. *Pediatr Res*. 1995;37:620-4.
18. Sekkel-Akkaddour H, Zhang L, Yang X, et al. Studies of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase genes in infants and children manifesting premature pubertal and increased ACTH stimulation D5 steroid levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:2961-5.
 19. Thoden J, Frey P, Holden H. Crystal structures of the oxidized and reduced forms of UDP-galactose 4-epimerase isolated from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1996;35:2557-66.
 20. Nishich G, Boms L, Higs R, Kuzer P, Yamagishi M, Franco E, et al. The Diamond STING server. *Nucleic Acids Res*. 2005;33 (web server issue):W29-35. (URL: <http://ima.dci.cnpq.br/ima/ima.br>).
 21. Mendonça B, Ruweel A, Viazconcelos-Leite M, Arnhold I, Blies W, Weichenberg B, et al. Mutation in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II associated with pseudhermaphroditism in males and premature pubertal or cryptic expression in females. *J Mol Endocrinol*. 1994;12:119-22.
 22. Moisan A, Ricketta M, Tardy V, Desrochers M, Melbani F, Chaussean J, et al. New insight into the molecular basis of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: identification of eight mutations in the HSD3B2 gene eleven patients from seven new families and comparison of the functional properties of twenty-five mutant enzymes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;12:4410-25.
 23. Fang S, Wang W, Rich B, David R, Chung Y, Carbonaro G, et al. A novel repeat mutation in the stop codon and a novel missense mutation in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) gene causing, respectively, nonclassic and classic 3 β -HSD deficiency congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;82:556-63.
 24. Marui S, Castro M, Latorico AC, Elias LL, Arnhold IJ, Moreira AC, et al. Mutations in the type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B2) gene can cause premature pubertal in girls. *Clin Endocrinol*. 2000;52(1):67-75.
 25. Mamejo L, Elias L, Marui S, Moreira A, Mendonça B, de Castro M. Refining hormonal diagnosis of type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency in patients with premature pubertal and hirsutism based on HSD3B2 genotyping. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(3):1287-93.
 26. Thomas J, Nash W, Myers R, Crankshaw M, Strickler R. Affinity radiolabeling identifies peptides and amino acids associated with substrate binding in human placental 3 β -hydroxy- Δ^5 -steroid dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1990;265:19507-12.
 27. Borman S. Proteomics: taking over where genomics leaves off. *Chem Eng News*. 2000;78:31-7.
 28. Sali A. Target practice. *Nat Struct Biol*. 2001;8:402-4.
 29. Vitkup D, Melamed E, Mouh J, Sender G. Completeness in structural genomics. *Nat Struct Biol*. 2001;8:559-66.
 30. Thomas J, Duax W, Addagatta A, Kacich B, Brendt S, Norris W. Structural function aspects of human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;215:73-82.

Article

Molecular Diagnosis of 5 α -Reductase Type II Deficiency in Brazilian Siblings with 46,XY Disorder of Sex Development

Flávia Leme de Calais ^{1,2}, Fernanda Caroline Soardi ^{1,2}, Reginaldo José Petrolí ^{1,2},
Ana Leticia Gori Lusa ^{1,2}, Roberto Benedito de Paiva e Silva ^{1,3}, Andréa Trevas Maciel-Guerra ^{2,4},
Gil Guerra-Júnior ^{1,4} and Maricilda Palandi de Mello ^{1,2,*}

¹ Center of Molecular Biology and Genetic Engineering (CBMEG), State University of Campinas (UNICAMP), Avenida Cândido Rondon 400, 13083-875, Campinas, SP, Brazil; E-Mails: flaleme@unicamp.br (F.L.C.); soardi@unicamp.br (F.C.S.); rpetrol@unicamp.br (R.J.P.); leticia_lusa@yahoo.com.br (A.L.G.L.)

² Interdisciplinary Group of Studies in Sex Determination and Differentiation (GIEDDS), Faculty of Medical Sciences (FCM), State University of Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, SP, Brazil

³ Center of Studies and Researches in Rehabilitation (CEPRE), Faculty of Medical Sciences (FCM), State University of Campinas (UNICAMP), Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 13083-970, Campinas, SP, Brazil; E-Mail: rdepas@fcm.unicamp.br

⁴ Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences (FCM), State University of Campinas (UNICAMP), Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 13083-970, Campinas, SP, Brazil; E-Mail: atmg@fcm.unicamp.br

⁵ Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences (FCM), State University of Campinas (UNICAMP), Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 13083-970, Campinas, SP, Brazil; E-Mail: gilguer@fcm.unicamp.br

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mmello@unicamp.br; Tel.: +55-19-3521-1146; Fax: +55-19-3521-1189.

Received: 2 September 2011; in revised form: 28 November 2011 / Accepted: 13 December 2011 / Published: 19 December 2011

Abstract: The steroid 5 α -reductase type II enzyme catalyzes the conversion of testosterone (T) to dihydrotestosterone (DHT), and its deficiency leads to undervirilization in 46,XY individuals, due to an impairment of this conversion in genital tissues. Molecular analysis in the steroid 5 α -reductase type II gene (*SRD5A2*) was performed in two 46,XY female siblings. *SRD5A2* gene sequencing revealed that the patients were homozygous for

p.Gln126Arg missense mutation, which results from the CGA > CAA nucleotide substitution. The molecular result confirmed clinical diagnosis of 46,XY disorder of sex development (DSD) for the older sister and directed the investigation to other family members. Studies on SRD5A2 protein structure showed severe changes at NADPH binding region indicating that structural modeling analysis can be useful to evaluate the deleterious role of a mutation as causing 5 α -reductase type II enzyme deficiency.

Keywords: SRD5A2 deficiency; SRD5A2 gene mutations; structural analysis

1. Introduction

The conversion of testosterone (T) in 5 α -dihydrotestosterone (DHT) mediated by 5 α -reductase type II enzyme is an essential process for the normal sexual differentiation of male external genitalia during fetal life [1].

The decrease in the DHT synthesis due to mutations in the 5 α -reductase type II gene (*SRD5A2*) results in a disorder of sex development (DSD) in individuals with 46,XY karyotype [2–4]. DHT is the most potent androgen responsible for virilization of the external genitalia in embryonic life as well as for prostate differentiation and virilization at puberty. At birth, 46,XY affected individuals may exhibit genital ambiguity or female genitalia but, generally, normal internal reproductive structures [5–8]. In some cases, affected individuals are reared as females that will present spontaneous virilization at puberty [9].

The *SRD5A2* gene is located at 2p23 and comprises five exons separated by four introns occupying approximately 60 kb of genomic DNA. The coding sequence is translated into a polypeptide of 254 amino acids. The protein presents a testosterone binding domain and also a NADPH cofactor-binding domain in the N-terminal region. Mutations that affect the testosterone binding region are located in either exon 1 or 5, while mutations affecting the NADPH binding are more numerous and generally map within exon 3 and 4 [10,11].

In the present study, we have identified the p.Gln126Arg homozygous mutation in exon 2 of *SRD5A2* gene in two 46,XY affected siblings raised as females. The *SRD5A2* molecular diagnosis was important in this family to ensure an early identification of the enzymatic deficiency in a younger sib and to offer further appropriate medical and psychological support.

2. Results and Discussion

After studying and analyzing the *SRD5A2* gene in case 1, the clinical suspicion of 5 α -reductase type II deficiency was confirmed. The patient was informed about her diagnosis and about the possibility of gender reassignment. She was asked to bring her 10-year-old sister, who had not been diagnosed yet, to be evaluated.

All five *SRD5A2* exons were amplified by PCR for both patients. The molecular analysis revealed that both sisters were homozygous for p.Gln126Arg missense mutation. The mutation resulted from the CAA > CGA nucleotide substitution in the exon 2 (Figure 1). It is considered to completely inactivate the enzyme causing a drastic decrease in its half-life when transfected into mammalian cells

in vitro [10,12]. This mutation had been previously described in Brazilian, Portuguese, French, Spanish, German, Belgium and North American patients and, in all cases, it was associated to severe phenotype of SRD5A2 deficiency [1,8–10,13–18]. Hackel *et al.* [8] described the compound heterozygosity for this mutation in four Brazilian patients.

Figure 1. Electropherogram of part of exon 2: (A) Homozygous CAA > CGA nucleotide change in codon 126 identified in patient 1; (B) Normal CAA sequence in a control individual; (C) Multiple amino acid alignments with: human SRD5A2, human SRD5A1 isoenzyme and enzymes of vertebrate animals' orthologs. The glutamine residue (Q126) is shaded. The UniProt accession numbers for 5 α -reductase protein sequences are: *Homo sapiens* (SRD5A2: P31213 and SRD5A1: P18405), *Macaca fascicularis* (SRD5A2: Q28892 and SRD5A1: Q28891), *Sus scrofa* (SRD5A2: O18765), *Mus musculus* (SRD5A2: Q99N99 and SRD5A1: Q68FF9), *Rattus norvegicus* (SRD5A2: P31214 and SRD5A1: P24008), *Bos taurus* (SRD5A1: A5P752), *Danio rerio* (SRD5A1: A5PMI4), *Oryzias latipes* (SRD5A1: A5HL61), *Xenopus tropicalis* (SRD5A1: Q6DF23).

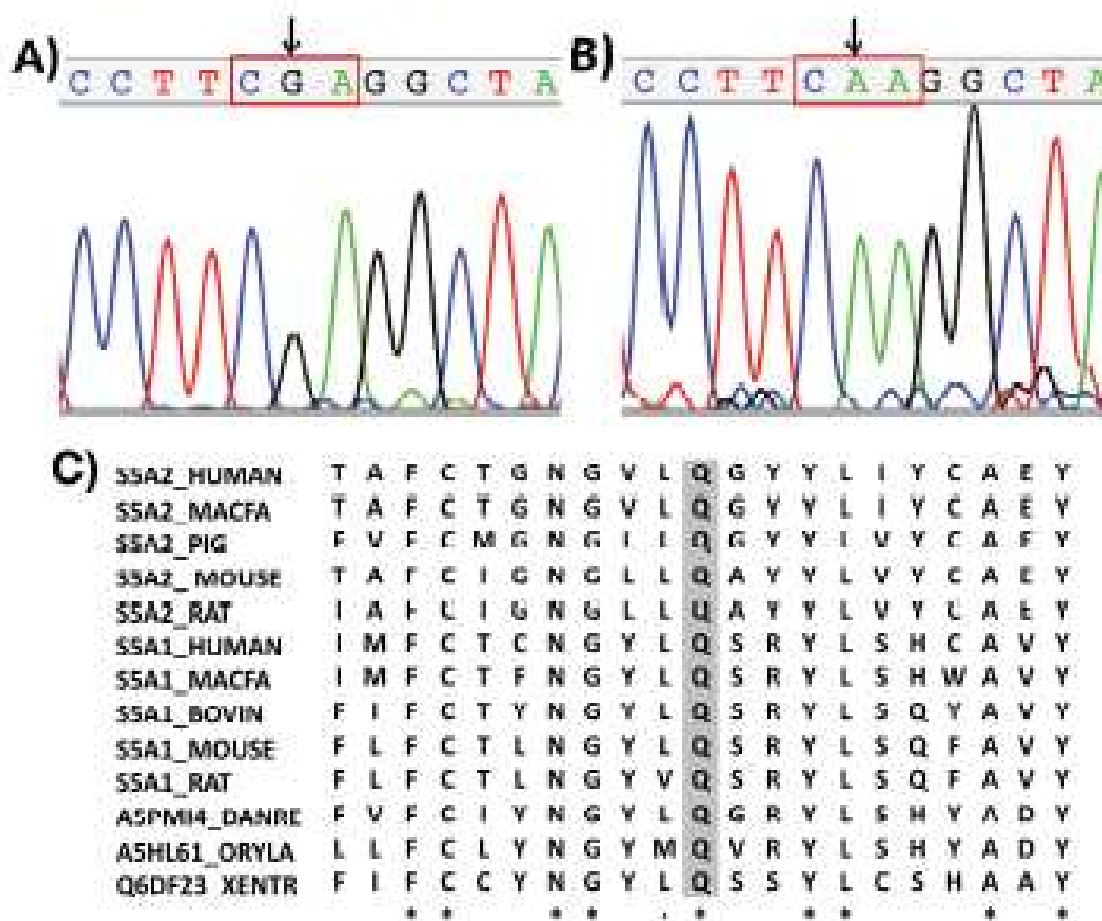


Figure 1(C) shows that Q126 residue is conserved in humans for both SRD5A1 and SRD5A2 isoforms and also for proteins of several vertebrate animal orthologs. Therefore it is located in a very conserved region of the protein suggesting that this residue is very important for enzymatic structure and activity.

The biological importance of p.Gln126Arg change upon the structure of the enzyme was investigated by modeling the mutant enzyme and comparing it to its native form. Because the crystallographic structure of SRD5A2 is not resolved yet we used Blast algorithm to search for a similar structure to be used in modeling analysis [19]. Around 30% similarity is usually required between sequences to obtain a reliable structural model [20], therefore the human liver 5 β -reductase (AKR1D1) (PDB ID: 3G1R-chain A) that presented a similarity of 28.9% was chosen, since there was no other crystallographically resolved protein with higher similarity. The AKR1D1 is a human steroid 5 β -reductase and belongs to the aldo/keto reductase family [21]. It is involved in the bile acid biosynthesis and also participates in the initial step of steroid hormone metabolism. In humans, steroid 5 α -reductases (SRD5A1, SRD5A2) and steroid 5 β -reductase (AKR1D1) act to yield the corresponding 5 α - or 5 β -dihydrosteroids, respectively [1,22]. The modeled structure indicated that p.Gln126Arg is located within an internal region of the protein near the NADPH-binding region (Figure 2(A)). The NADPH-binding domain in SRD5A2 comprises residues R145, R171, P181, G183, N193, G196 and R246 [10]. Observing the structural model, those amino acids are organized as a pocket to receive NADPH (Figure 2(A)). Different interactions were shown for either Q126 native residue or R126 mutant residues when comparing internal contacts (Figures 2(B–E)). Hydrogen bond interactions with Q182 (main chain–side chain) and with both I131 and L130 (main chain–main chain) were maintained in both native and mutant proteins, whereas the aromatic interaction with Y132 was abolished and two different interactions with N122 (one hydrophobic and other hydrogen bond main chain–side chain) were established in the mutant. In addition, the R126 mutant residue demonstrated three different internal interactions: an aromatic stacking with Y129 and two hydrophobic interactions with A134 and C133. Either native or mutant 126 residue in SRD5A2 protein are linked through a hydrogen bond to Q182 residue which is located within the NADPH-binding site region. However, the new hydrogen bond interaction between A134 and R126 mutant residue might affect the structure of NADPH-binding domain by disrupting the native interaction between A134 and Q182 residues (Figures 2(F,G)) and creating novel hydrophobic interaction between Q182 and I180 residues (Figures 2(H,I)).

Figure 2. (A) Modeled structure for the wild-type human 5 α -reductase type II enzyme: Q126 native residue is denoted in red, and NADPH-binding site residues are illustrated in green; (B) Part of the modeled SRD5A2 structure showing internal contacts for Q126 native residue; (C) Graphical representation for internal contacts of Q126 residue; (D) Part of the modeled SRD5A2 structure showing internal contacts for R126 mutant residue; (E) Graphical representation for internal contacts of R126 residue: interactions with different residues (A134, C133) are created, one interaction is suppressed (Y132) and two different interactions are established with N122 residue; (F) Graphical representation for internal contacts for A134 residue in the native protein: interactions with G184, Q182 and P106 are observed; (G) Graphical representation of internal contacts for A134 residue in the mutant protein: the novel interaction with R126 is observed; (H) Graphical representation of internal contacts for Q182 residue in the native protein; (I) Graphical representation of internal contacts for Q182 residue in the mutant protein: A134 interaction is abolished and a new contact with I180 is observed. Colored lines represent different types of interactions: black = main chain–main chain hydrogen bond; blue = side chain–main chain hydrogen bond; red = side chain–side chain hydrogen bond; gray = aromatic stacking; green = hydrophobic interaction.

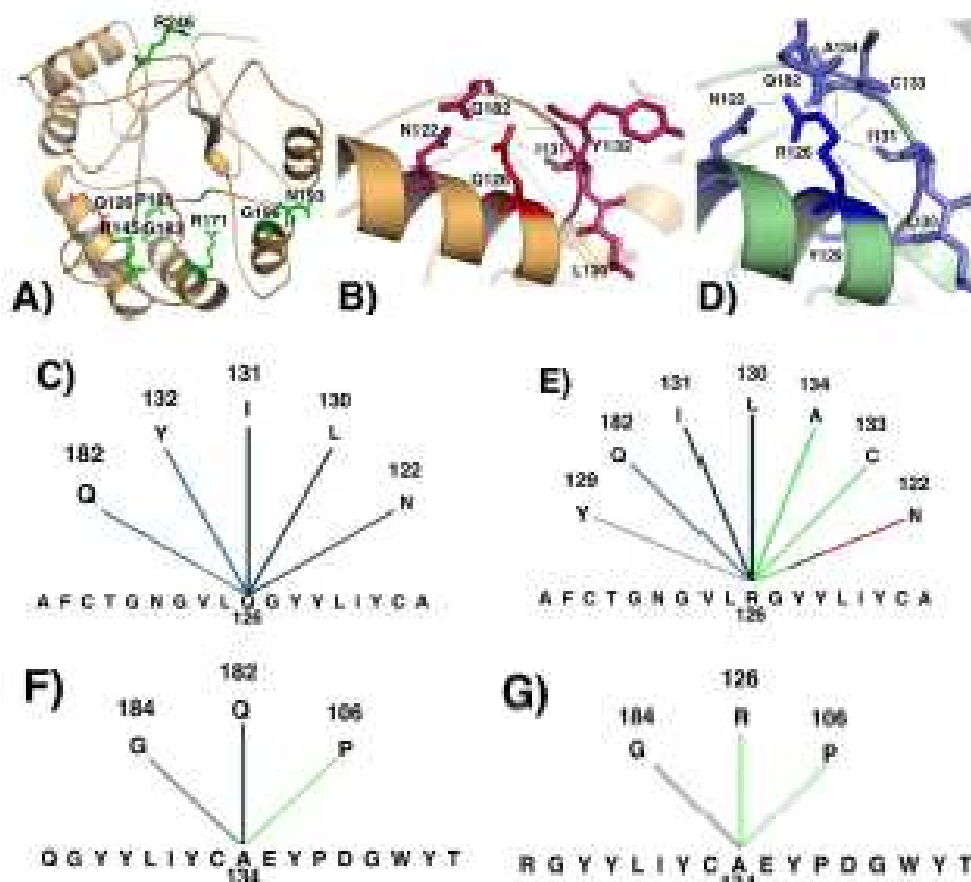
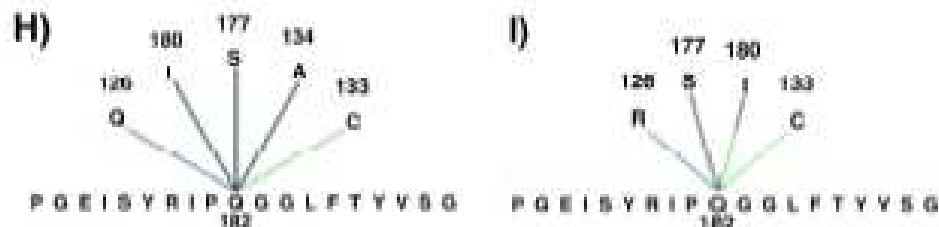


Figure 2. Cont.



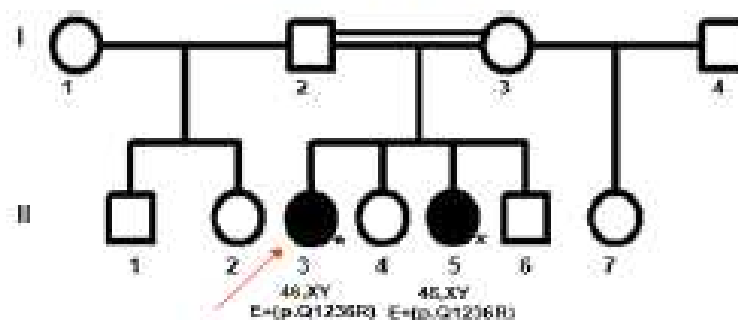
Those results indicate that p.Gln126Arg mutation probably modify or abolish 5 α -reductase type II enzyme activity by preventing NADPH binding.

3. Experimental Section

3.1. Patients

A 17-year-old patient (case 1), reared as a girl, was referred to us to investigate virilization by the time of puberty. She was born at term after an uneventful pregnancy and normal delivery. She was the first child of consanguineous parents (first cousins); there were 3 paternal and 2 maternal half sibs, 2 sisters and a brother. According to the patient, an ultrasound of her 10-year-old sister (case 2) revealed absence of uterus, therefore she was also suspected to have sex ambiguity (Figure 3).

Figure 3. Family pedigree.



On physical examination, her weight was 55 kg and height 175 cm. She exhibited an 8-cm phallus with chordee; a single perineal opening; no vaginal introitus; labioscrotal folds were fused, pigmented and enrugated; and 10 cm³ testis were both palpable—the right was in the inguinal region and the left in the labioscrotal fold. Additionally, she had a male distribution of pubic hair, facial hair was absent and there was no breast development. She demonstrated a male gender behavior and considered herself as homosexual.

The patient karyotype was 46,XY. Upon pelvic ultrasound, uterus was absent and prostate was also not detected. Hormonal evaluation showed elevated FSH (16 IU/L; normal male range (NR) 1.5–12.4), slightly elevated LH (8.7 IU/L; NR 1.7–8.6) and normal total testosterone (13.6 ng/mL; NR 8.8–27.0), and free testosterone (5 pg/mL; NR 2.8–8.1) levels, with low dihydrotestosterone level (0.3 ng/mL;

NR 0.5–2.9), and high testosterone/dihydrotestosterone ratio (45.3; NR < 10). After 15 months of follow-up with psychological support, the patient requested sex reassignment to male.

The patient's sister (case 2) was 11 years old when first examined by us. On physical examination, her weight was 32.3 kg and height 143.6 cm. She exhibited a 2.5-cm phallus with *chordee*, a single perineal opening and no vaginal introitus. Labioscrotal folds were not enrugated or pigmented, and her gonads were not palpable; there were no signs of pubertal development. Her karyotype was 46,XY, and hormonal evaluation revealed prepubertal levels of FSH, LH and testosterone.

When she was 12.5 years old, her phallus measured 4 cm and pubic hair was on Tanner stage 2. A few months later, hormonal evaluation revealed pubertal levels of FSH (7.75 IU/L), LH (5.3 IU/L), and total (9.6 ng/mL) and free testosterone (5.85 pg/mL), low dihydrotestosterone level (0.2 ng/mL), and high testosterone/dihydrotestosterone ratio (48.0). The gonads were not seen upon pelvic ultrasound. When she was last seen by us, at 13.5 years, her phallus measured 5 cm and pubic hair was on Tanner stage 3.

As soon as the diagnosis of 5- α -reductase type 2 deficiency was confirmed, a careful approach was conducted to explain her condition, which was favored by her knowledge about what was going on with her older sister. Since then, she has been followed by a specialized psychologist who has evaluated her periodically for her understanding and adapting to male gender. At the beginning, she revealed interest in situations which are socially viewed as male activities, such as playing soccer with boys and watching action movies, and using clothes which were not typically female, although, at first, she did not see herself as a male. At the present, she exhibits overtly male behavior.

3.2. Methods

Genomic DNA was obtained from peripheral blood by proteinase K/phenol extraction method. *SRD5A2* gene molecular analysis was performed by PCR amplification of the five exons (Table 1). PCR products were directly sequenced using Big Dye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 Ready Reaction (ABI PRISM/PE Biosystems). Sequences were obtained in an ABI 3700 Sequencer (ABI PRISM/PE Biosystems) and were compared to the *SRD5A2* normal sequence (ENSEMBL—ENSG00000049319) using Chromas (reduced version-free software) and CLC Sequence Viewer v.6.0 (free software).

Table 1. Primers used for PCR and sequencing of the *SRD5A2* gene.

Exon	Forward Primer	Reverse Primer	Ta* (°C)	Fragment size (pb)
1	GCAGGGGCCCCACGGGOGAGGAACA	TGGACGCGGGAGCAGGGCAGT	66	369
2	CAGTGAATCCTAACCCTTTCCTCC	TTGTTAGCTGGGAAGTAGGTGGAG	59.5	243
3	AAGCAACCACAATCTGGACACAT	CTCCAGGGAAGAGTGAGAGTCTG	59.5	203
4	CAATGATTGACCTTCCGATTCTTC	GTTTGGAGAAGAAGAAAGCTACGT	63	238
5	TCAGCCACTGCTCCATTATATTTA	TTGACAGTTTTCATCCAGCATTGTG	59.5	171

* Ta = annealing temperatures used in PCRs.

Theoretical structure of human 5 α -reductase type II has been modeled using human liver 5 β -reductase (AKR1D1) (PDB ID: 3G1R- chain A) as template. The models have been created and validated by default settings and parameters of the SWISS MODEL web-served program. The modeled protein structure was produced and analyzed by the web-based program BlueStarSTING [23].

4. Conclusions

The present molecular investigation collaborated in guiding the diagnosis of deficiency in 5 α -reductase type II in a family. The molecular analysis provided additional support for the psychosocial male orientation for both female affected siblings that, in the case of the older sister, had been defined even before the diagnosis. Therefore, the identification *SRD5A2* gene mutations contributed in confirming the diagnosis and provided an early diagnosis of a non-symptomatic affected member in the family. Additionally, the structural analysis of the mutated protein demonstrated to be a useful and inexpensive tool to evaluate the deleterious role of a mutation as a cause of the deficiency of 5 α -reductase type II enzyme.

Acknowledgments

Authors would like to thank Márcio José da Silva from sequencing facility for technical support. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP—grants # 2008/01964-5 and 2009/08320-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES—Brasil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq—Brasil).

References

1. Russell, D.W.; Wilson, J.D. Steroids 5 α -reductase: Two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 25–61.
2. Andersson, S.; Berman, D.M.; Jenkins, E.P.; Russell, D.W. Deletion of steroid 5 α -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* **1991**, *354*, 159–161.
3. Pasterski, V.; Prentice, P.; Hughes, I.A. Consequences of the Chicago consensus on disorders of sex development (DSD): Current practices in Europe. *Arch. Dis. Child.* **2010**, *95*, 618–623.
4. Thippen, A.E.; Davis, D.L.; Milatovich, A.; Mendonça, B.B.; Imperator-McGinley, J.; Griffin, J.E.; Francke, U.; Wilson, J.D.; Russell, D.W. Molecular genetics of 5 α -reductase deficiency. *J. Clin. Invest.* **1992**, *90*, 799–809.
5. Wilson, J.D. Characterization of the testicular abnormality in 5 α -reductase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **1986**, *63*, 1091–1099.
6. Sinnecker, G.H.G.; Hiort, O.; Dibbelt, L.; Albers, N.; Dorr, H.G.; Hauss, H.; Heinrich, U.; Hemminghaus, M.; Hoepffner, W.; Holder, M.; Schnabel, D.; Kruse, K. Phenotypic classification of male pseudo-hermaphroditism due to steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Am. J. Med. Genet.* **1996**, *63*, 223–230.
7. Hughes, I.A. Minireview: Sex differentiation. *Endocrinology* **2001**, *142*, 3281–3287.
8. Hackel, C.; Oliveira, L.E.C.; Tomiles, B.; Silva, D.N.; Tonini, M.M.O.; Ferraz, L.F.C.; Steinmetz, L.; Damiani, D.; Oliveira, L.C.; Maciel-Guerra, A.T.; Stuchi-Perez, E.G.; Guerra-Junior, G. 5 α -reductase type 2 deficiency: Experiences from Campinas (SP) and Salvador (BA). *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **2005**, *49*, 37–47.
9. Wilson, J.D.; Griffin, J.E.; Russell, D.W. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocr. Rev.* **1993**, *14*, 577–593.

10. Wigley, W.C.; Prihoda, J.S.; Mowszowicz, I.; Mendonça, B.B.; New, M.I.; Wilson, J.D.; Russell, D.W. Natural mutagenesis study of the human steroid 5 α -reductase 2 isozyme. *Biochemistry* **1994**, *33*, 1265–1270.
11. Griffin, J.I.; McPhaul, M.J.; Russell, D.W.; Wilson, J.D. The Androgen Resistance Syndromes: Steroid 5 α -Reductase Type 2 Deficiency, Testicular Feminization and Related Disorders. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 2001; pp. 4117–4146.
12. Ferraz, L.F.C.; Baptista, M.T.M.; Maciel-Guerra, A.T.; Guerra-Júnior, G.; Hackel, C. New frameshift mutation in the 5 α -reductase type II gene in a Brazilian patient with 5 α -reductase deficiency. *Am. J. Med. Genet.* **1999**, *87*, 221–225.
13. Forti, G.; Falchetti, A.; Santoro, S.; Davis, D.L.; Wilson, J.D.; Russell, D.W. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency: Virilization in early infancy may be due to partial function of mutant enzyme. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **1996**, *44*, 477–482.
14. Boudon, C.; Lumbroso, S.; Lobaccaro, J.M.; Szarras-Czapnik, M.; Romer, T.E.; Garandeau, P.; Montoya, P.; Sultan, C. Molecular study of the 5 α -reductase type II gene in three European families with 5 α -reductase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **1995**, *80*, 2149–2153.
15. Mendonça, B.B.; Inácio, M.; Costa, E.M.; Amhold, I.J.; Silva, F.A.; Nicolau, W.; Bloise, W.; Russell, D.W.; Wilson, J.D. Male pseudohermaphroditism due to steroid 5 α -reductase 2 deficiency: Diagnosis, psychological evaluation, and management. *Medicine (Baltimore)* **1996**, *75*, 64–76.
16. Hackel, C.; Oliveira, L.E.C.; Ferraz, L.F.C.; Tonini, M.M.O.; Silva, D.N.; Toralles, M.B.; Stuchi-Perez, E.G.; Guerra-Junior, G. New mutations, hotspots and founder effects in Brazilian patients with steroid 5 α -reductase deficiency type II. *J. Mol. Med.* **2005**, *83*, 569–576.
17. Maimoun, L.; Philibert, P.; Cammas, B.; Audran, F.; Bouchard, P.; Fenichel, P.; Cartigny, M.; Pienkowski, C.; Polak, M.; Skordis, N.; *et al.* Phenotypical, biological, and molecular heterogeneity of 5 α -reductase deficiency: An extensive international experience of 55 patients. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **2011**, *96*, 296–307.
18. Fernández-Cancio, M.; Audi, L.; Andahuz, P.; Torán, N.; Piró, C.; Albisa, M.; Gussinyé, M.; Yeste, D.; Clemente, M.; Martínez-Mora, J.; Blanco, A.; Granada, M.L.; Marco, M.; Ferragut, J.; López-Siguero, J.P.; Beneyto, M.; Carles, C.; Carrascosa, A. SRD5A2 gene mutations and polymorphisms in Spanish 46,XY patients with a disorder of sex differentiation. *Int. J. Androl.* **2011**, *34*, e526–e535.
19. Basic Local Alignment Search Tool. Available online: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed on 27 May 2010).
20. Sanchez, R.; Pieper, U.; Melo, F.; Eswar, N.; Marti-Renom, M.A.; Madhusudhan, M.S.; Mirković, N.; Sali, A. Protein structure modeling for structural genomics. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 986–990.
21. Drury, J.E.; Costanzo, L.D.; Penning, T.M.; Christianson, D.W. Inhibition of human steroid 5 β -reductase (AKR1D1) by finasteride and structure of the enzyme-inhibitor complex. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 19786–19790.
22. Russell, D.W. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 137–174.

23. Neshich, G.; Borro, L.C.; Higa, R.H.; Kuser, P.R.; Yamagishi, M.E.; Franco, E.H.; Krauchenco, J.N.; Fileto, R.; Ribeiro, A.A.; Bezerra, G.B.; *et al.* The Diamond STING server. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, W29–W35.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).