Larissa Garcia Gomes

**Estudo da proteína P450 óxido-redutase e dos
citocromos hepáticos 2C19 e 3A4 como possíveis
moduladores do fenótipo da deficiência da
21-hidroxilase**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
Doutor em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia e Metabologia

Orientadora: Profª Drª Tânia Aparecida Sanchez Bachega

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gomes, Larissa Garcia

Estudo da proteína P450 óxido-redutase e dos citocromos hepáticos 2C19 e 3A4 como possíveis moduladores do fenótipo da deficiência da 21-hidroxilase / Larissa Garcia Gomes. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Tânia Aparecida Sartori Sanchez.

Descritores: 1.Glândulas supra-renais 2.Hiperplasia supra-renal congênita
3.Esteróide 21-hidroxilase 4.Polimorfismo genético 5.P450 óxido-redutase
6.Citocromos

USP/FM/SBD-312/09

Dedico esta tese aos meus pais,
Nazareth e Francisco, por terem me
despertado a curiosidade pelo saber,
pelo incentivo a sempre buscar grandes
desafios e pelo suporte incondicional

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Agradeço inicialmente a Deus por esta conquista tão importante na minha carreira acadêmica e por todas as experiências que, com a execução desta tese de doutorado, tive a oportunidade de viver e que tanto contribuíram para meu amadurecimento pessoal e conquista de grandes amigos.

A elaboração de uma tese de doutorado é um produto coletivo e a todos envolvidos neste projeto registro minha imensa gratidão.

À Dr^a Tânia Bachega, que além de ser uma *expert* na área da esteroidogênese e sempre compartilhar esses conhecimentos, foi uma orientadora muito presente, empolgada, inquieta por novos conhecimentos, grande incentivadora e uma grande amiga que conquistei nos últimos quatro anos. Suas dicas foram sempre valiosas e espero que essa dobradinha nos renda ainda muitos frutos.

À Prof^a Berenice Mendonça pelas brilhantes discussões e pelo exemplo de capacidade investigativa que é inerente aos grandes pesquisadores. Quanto maior foi meu convívio no meio acadêmico nacional e internacional, mais eu passei a admirar a Prof^a Berenice e a ter certeza de que ela é uma das pesquisadoras mais importantes do cenário acadêmico mundial.

Ao meu *mentor* Prof Walter Miller, que abriu as portas de seu laboratório na Universidade da Califórnia São Francisco para uma iniciante em pesquisa e me orientou diretamente durante 20 meses, na execução dos estudos funcionais e elaboração dos artigos científicos. Prof Miller é o grande precursor dos estudos em esteroidogênese e, pelo seu laboratório, já passaram mais de dezenas de pós-graduandos de todos os continentes, muitos deles, hoje, grandes nomes no cenário acadêmico. Foi, sem dúvida, uma grande honra fazer parte da história do Miller Lab.

À minha amiga e grande cientista Ningwu Huang por todos os ensinamentos na bancada. Ningwu foi fundamental na execução desta tese, ensinando-me tudo que sei sobre expressão de proteína recombinante e ensaio enzimático. Ningwu é uma pessoa extremamente generosa que

sempre manifestou completa disponibilidade em me ajudar no laboratório e em todo processo de adaptação em São Francisco.

À Izabella Damm que muito me ajudou nos primeiros passos em bancada, mas principalmente pelas conversas agradáveis e pelo carinho maternal. À Vishal Agrawal pelas discussões técnicas valiosas e ensinamentos bioquímicos. Meus sinceros agradecimentos a todos meus amigos de São Francisco que foram minha família por quase 2 anos e que tornaram minha vida feliz mesmo longe dos tantos que amo aqui no Brasil.

Ao Dr Ivo Arnhold pela ajuda no processo da minha extensão no exterior e presença na minha banca de qualificação, com comentários sempre relevantes.

À Ana Elisa Billerbeck e à Vivian Moura pelo trabalho de bancada no sequenciamento da 21-hidroxilase. À Guiomar Madureira, companheira no atendimento dos pacientes e ombro amigo nos cafezinhos após o ambulatório. Ao Ricardo e à Laura, seguidores nos estudos da 21-hidroxilase.

A todos os amigos do LIM 42, pela agradável convivência. Cito o amigo Antônio Lerário pela ajuda na área de bioinformática e a amiga Regina Martin que participou da minha banca de qualificação e forneceu valiosos comentários para aprimoramento desta tese. Agradeço às secretárias do laboratório LIM 42, Nilda, Cristiane e Ana Farah; e às técnicas do laboratório, Cristina, Fran e Cidinha, pelo trabalho na organização do laboratório e zelo por todos os pesquisadores.

Aos meus grandes amigos desde a residência, Diane, pelas conversas sempre bem humoradas e amizade constante, e Bruno, pelas conversas instigantes e assessoria no inglês.

Às “meninas”, amigas de infância e eternas, que são diversão garantida e motivo de boas risadas.

Aos meus irmãos, Thaissa e Renzo, que são meus grandes amigos e incentivadores em todos os momentos. Às minhas avós Alacy e Elaene pelo carinho delicioso de avó.

Aos meus pais, Nazareth e Francisco, que são os meus grandes alicerces, apoiando-me sempre em todos os momentos. Meus pais proporcionaram-me uma formação sólida e sempre estimularam a busca

pelo conhecimento e pelo aperfeiçoamento contínuo. Meu eterno agradecimento pelo incentivo constante e amor incondicional.

Ao Frederico Sarmiento, pela paciência e abdicação do tempo de convívio, em prol da realização desta tese. Fred sempre foi um grande companheiro e esteve muito presente, mesmo morando a algumas milhas de distância. Fred teve, inclusive, participação ativa na execução da tese, ajudando-me na formatação da mesma. Ao Fred, o meu amor, minha admiração e meus sinceros agradecimentos.

Agradecimentos

Às Instituições de apoio financeiro à pesquisa, que viabilizaram a concretização desta tese de doutorado. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio de bolsa individual (processo 05/55364-0) e pelo apoio de bancada através de projeto temático (processo 05/04726-0). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro de bolsa individual de estágio no exterior (processo BEX1516/060).

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

1 Introdução	2
1.1 Hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase – considerações iniciais	2
1.2 Genética molecular	6
1.3 Mutações causando a deficiência da 21-hidroxilase	9
1.4 Correlação do genótipo com o fenótipo	13
1.5 O gene P450 óxido-redutase	15
1.6 Atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal da progesterona e 17-OH progesterona	21
1.7 Citocromos P450 hepáticos com atividade de 21-hidroxilação da progesterona	23
1.8 Fatores moduladores do fenótipo da deficiência da 21-hidroxilase	26
2 Objetivos	29
3 Casuística	31
4 Métodos	36
4.1 Dosagens laboratoriais	36
4.2 Estudo do gene <i>POR</i> através de PCR e sequenciamento	36
4.3 Expressão da proteína <i>POR</i> recombinante	39
4.4 Expressão da proteína P450c21 recombinante	44
4.5 Comparação da 21-hidroxilação da progesterona e da 17OH-progesterona pela P450c21 utilizando-se <i>POR</i> selvagem e a variante <i>POR</i> A503V	46
4.6 Ensaio enzimático da 21-hidroxilação da progesterona e da 17OH-progesterona realizada pelos citocromos CYP2C19 e CYP3A4	48
4.7 Sequenciamento do <i>CYP2C19</i>	50
5 Resultados	54
5.1 Dados clínicos e genéticos dos pacientes estudados	54
5.2 Estudo do efeito modulador do gene <i>POR</i>	58
5.2.1 Frequência de polimorfismos no gene <i>POR</i>	58
5.2.2 Efeito da variante <i>POR</i> A503V na atividade de 21-hidroxilação pela P450c21	58
5.3 Efeito modulador da 21-hidroxilação extra-adrenal	60
5.3.1 Efeito da 21-hidroxilação da progesterona e 17OH-progesterona pelos citocromos hepáticos CYP2C19 e CYP3A4	60
5.3.2 Influência da variante <i>POR</i> A503V na atividade de 21-hidroxilação pelos CYP2C19 e CYP3A4	63
5.3.3 Análise genética do CYP2C19 através da pesquisa de variantes alélicas	63

6 Discussão	66
6.1 Efeito da POR como fator modulador do fenótipo na deficiência da 21-hidroxilase	66
6.2 Efeito modulador da 21-hidroxilação extra-adrenal pelos citocromos CYP2C19 e CYP3A4	68
6.3 Efeito modulador do fenótipo na deficiência da 21-hidroxilase – considerações finais	73
7 Conclusões	76
8 Referências	79
Apêndice	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esteroidogênese adrenal.	2
Figura 2. Localização dos genes <i>CYP21</i>	8
Figura 3. Mecanismo de deleção e de duplicação gênica.....	10
Figura 4. Mecanismo de conversão gênica no <i>locus C4/CYP21</i>	11
Figura 5. Localização das dez mutações de ponto mais frequentes no gene <i>CYP21A2</i> em diversas populações	12
Figura 6. Comparação das sequências do exon 1U e região 5'UTR do <i>POR</i> murino e humano utilizando o <i>BLAST</i> do <i>Ensembl Genome Browser</i>	16
Figura 7. Representação esquemática do funcionamento da <i>POR</i>	18
Figura 8. Gel de poliacrilamida-SDS da <i>POR</i> selvagem purificada.....	42
Figura 9. Quantificação da proteína <i>POR</i>	43
Figura 10. Representação de uma curva de proteína visualizada no espectrofotômetro	45
Figura 11. Gel de poliacrilamida-SDS da <i>P450c21</i> purificada.....	46
Figura 12. Análise da cinética da 21-hidroxilação da progesterona pelas enzimas <i>P450c21</i> , <i>CYP2C19</i> e <i>CYP3A4</i>	61
Figura 13. Análise através de TLC da atividade de 21-hidroxilação da progesterona pelos <i>CYP2C19</i> e <i>CYP3A4</i>	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados clínicos, hormonais e genéticos dos pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase e genótipo incompleto.....	34
Tabela 2 - Dados clínicos, hormonais e genéticos dos pacientes com a deficiência da 21-hidroxilase e genótipo/fenótipo discordantes.....	35
Tabela 3 - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (oligos) para as reações de PCR e de sequenciamento do <i>POR</i>	39
Tabela 4 - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (Oligos) para PCR e sequenciamento do <i>CYP2C19</i>	52
Tabela 5 – Dados clínicos e análise molecular dos genes <i>CYP21A2</i> e <i>POR</i> dos pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase e genótipo incompleto	56
Tabela 6 – Dados clínicos e análise molecular dos genes <i>CYP21A2</i> , <i>POR</i> e <i>CYP2C19</i> dos pacientes com a deficiência da 21-hidroxilase e genótipo/fenótipo discordantes.....	57
Tabela 7 - Comparação dos parâmetros cinéticos da 21-hidroxilação da progesterona pela P450c21 promovidas pela <i>POR</i> selvagem e <i>POR</i> A503.	59
Tabela 8 - Comparação dos parâmetros cinéticos da 21-hidroxilação da 17OH-progesterona pela P450c21 promovidas pela <i>POR</i> selvagem e <i>POR</i> A503V.....	60
Tabela 9 - Comparação dos parâmetros cinéticos da 21-hidroxilação da progesterona pelos <i>CYP2C19</i> e <i>CYP3A4</i> com os da P450c21, promovidos pela <i>POR</i> selvagem e pela variante A503V	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Síndrome de Antley-Bixler
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
δ -ALA	δ -ácido aminolevulínico
APR	atividade de renina plasmática
CAR	receptor constitutivo androstane
Cdna	DNA complementar
CHAPS	3-[3-(colamidopropil)dimethylamonio]-1-propano-sulfonato
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
<i>CYP21A1</i>	gene ativo da 21-hidroxilase
<i>CYP21A2</i>	pseudogene da 21-hidroxilase
<i>CYP2C19</i>	gene do citocromo 2C19
<i>CYP3A4</i>	gene do citocromo 3A4
CYP2C19 ou P450 2C19	Enzima citocromal 2C19
CYP3A4 ou P450 3A4	Enzima citocromal 3A4
Del	Deleção
DHEA	dehidroepiandrosterona
DLPC	1,2-dilaúril-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DO	densidade óptica
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FMN	flavina mononucleotídeo
HLA	antígeno leucocitário humano
HNF4-alpha	fator nuclear hepático 4-alpha
3 β HSD2	3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo II
17 β HSD3	17 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo III
IC	idade cronológica
Ins	inserção
IO	idade óssea
IPTG	isopropil-1- β -D-tiogalactopiranosídeo
Km	constante de Michaelis

NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NC	não clássica
17OHP	17-hidroxiprogesterona
PMSF	fenil-metil-sufonil-fluoreto
PS	perdedor de sal
<i>POR</i>	gene P450 óxido-redutase
POR	proteína P450 óxido-redutase
P450c11	11 β -hidroxilase
P450c17	17 α -hidroxilase e 17,20 liase
P450c21	21-hidroxilase
P450scc	P450 <i>side-chain cleavage</i>
PXR	receptor X pregnano
RNA _m	RNA mensageiro
SDS	dodecil sulfato de sódio
STAR	proteína reguladora da esteroidogênese
TB	<i>terrific broth</i>
TLC	cromatografia de camada delgada
TNF	fator de necrose tumoral
V _{max}	velocidade máxima
VS	virilizante simples

RESUMO

Gomes LG. *Estudo da proteína P450 óxido-redutase e dos citocromos hepáticos 2C19 e 3A4 como possíveis fatores moduladores do fenótipo da deficiência da 21-hidroxilase* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 90p.

A deficiência da 21-hidroxilase é uma doença genética comum, causada por mutações no gene *CYP21A2*, que codifica a enzima 21-hidroxilase (P450c21). A deficiência da 21-hidroxilase afeta a síntese de cortisol e aldosterona e promove acúmulo de precursores, que são desviados para a síntese de andrógenos. Observa-se três principais fenótipos: a forma clássica virilizante simples (VS), na qual as meninas nascem com virilização da genitália externa e ambos os sexos apresentam virilização pós-natal; a forma perdedora de sal (PS), na qual além da virilização, ambos os sexos apresentam crise de perda de sal no período neonatal; e a forma não clássica (NC), na qual os sintomas de hiperandrogenismo iniciam-se mais tardiamente, na infância, adolescência ou idade adulta. Os estudos *in vitro* das mutações do *CYP21A2* demonstram que existe uma boa correlação do grau de comprometimento da atividade enzimática conferido pelo genótipo com o fenótipo. Entretanto, existem algumas divergências como: pacientes que apresentam quadro clínico e hormonal de forma não clássica, nos quais mutações não são identificadas em um ou em ambos os alelos do *CYP21A2*, e pacientes que apresentam o fenótipo mais leve do que o predito pelo genótipo. Essas divergências sugerem a presença de fatores moduladores do fenótipo na deficiência da 21-hidroxilase. A primeira hipótese foi de que houvesse mutações no gene P450 óxido-redutase (*POR*), que codifica uma flavoproteína que doa elétrons para as enzimas microssomais P450, inclusive a P450c21, passo fundamental para a atividade enzimática das mesmas. A segunda hipótese foi de que outras enzimas P450, que não a P450c21, tivessem a capacidade de realizar a 21-hidroxilação extra-adrenal da progesterona e 17OH-progesterona (17OHP), sendo então capazes de modular o fenótipo da perda de sal e/ou virilização. Os citocromos P450 hepáticos *CYP2C19* e *CYP3A4*, responsáveis pelo metabolismo de drogas, são capazes de realizar 21-hidroxilação da progesterona, porém essa atividade nunca foi comparada com a atividade de 21-hidroxilação da P450c21, a fim de que se possa extrapolar a importância dessa atividade extra-adrenal *in vivo*. A casuística desse estudo constou de 11 pacientes com a forma NC e genótipo incompleto, e 6 pacientes com fenótipo discordante do genótipo (5 com genótipo predizendo forma PS e manifestando forma VS, e 1 com genótipo predizendo VS e apresentando forma NC). O gene *POR* foi sequenciado em todos 17 pacientes e 10/30 alelos não relacionados apresentavam o polimorfismo A503V. O estudo funcional foi realizado através da expressão em bactéria do P450c21, do *POR* selvagem (*PORwt*) e da variante do *POR* A503V, e de estudo enzimático *in vitro* comparando a 21-hidroxilação da P450c21 promovida pela *PORwt* e *POR* A503V. Essa comparação foi realizada através de cálculos dos parâmetros que avaliam cinética enzimática (*K_m*, *V_{max}* e *V_{max}/K_m*). Apesar da variante *POR* A503V diminuir significativamente a atividade da P450c17 *in vitro*, nosso estudo demonstrou que ela não altera a capacidade de 21-hidroxilase da P450c21. Portanto, não existem substituições no *POR* que justifiquem as discordâncias de fenótipo/genótipo na deficiência da 21-hidroxilase nesta casuística. Para avaliarmos o papel da 21-hidroxilação extra-adrenal, as enzimas P450c21, as enzimas P450 hepáticas *CYP2C19* e *CYP3A4* e o *POR* foram expressos em bactéria. A capacidade das enzimas P450c21, *CYP2C19* e *CYP3A4* de 21-hidroxilar progesterona e 17OHP foram avaliadas *in vitro* e medidas através dos mesmos parâmetros de cinética enzimática. Comparado com a P450c21, o

Vmax/Km da 21-hidroxilação da progesterona pelos CYP2C19 e CYP3A4 foram 17% e 10%, respectivamente. Os citocromos hepáticos não apresentaram atividade de 21-hidroxilação da 17OHP. Considerando que uma atividade residual mínima de 21-hidroxilação da progesterona é satisfatória para produzir quantidades suficientes de aldosterona para se evitar a perda de sal, este estudo sugere que a atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal do CYP2C19 e CYP3A4 é capaz de melhorar o fenótipo de perda de sal, mas não o da deficiência de glicocorticoide. O gene CYP2C19, ao contrário do CYP3A4, é extremamente polimórfico, e são descritos vários haplótipos com diferentes atividades enzimáticas, os quais explicam as diferenças no metabolismo de várias drogas utilizadas na prática clínica. O único polimorfismo ultra-metabolizador é o CYP2C19*17, representado por duas substituições na região promotora que aumentam a transcrição do gene em 2-4 vezes. Os indivíduos que apresentam o haplótipo ultra-metabolizador podem ter maior atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal da progesterona e, dessa forma, não apresentarem a crise de perda de sal. O gene CYP2C19 foi sequenciado nos cinco pacientes com genótipo de forma perdedora de sal e que não desidrataram como predito, e encontramos o haplótipo ultra-metabolizador em homozigose em 1/5 pacientes e em heterozigose em 1/5 pacientes. Heterozigose para o CYP2C19*17 também foi encontrada no grupo controle (indivíduos perdedores de sal com genótipo/fenótipo concordantes). Portanto, o haplótipo CYP2C19*17 em heterozigose é insuficiente para modular a perda de sal e, provavelmente, em homozigose pode evitar a perda de sal. Em conclusão, pela primeira vez descrevemos o efeito modulador de uma variante alélica dos citocromos hepáticos P450 melhorando o fenótipo da forma perdedora de sal; no entanto, os demais casos permanecem com indefinição do genótipo. Estes resultados sugerem que não apenas uma única enzima, mas múltiplas enzimas extra-adrenais estão possivelmente envolvidas na modulação do fenótipo da deficiência da 21-hidroxilase.

Descritores:

1.Glândulas supra-renais 2.Hiperplasia supra-renal congênita 3.Esteróide 21-hidroxilase
4.Polimorfismo genético 5.P450 óxido-redutase 6.Citocromos

SUMMARY

Gomes LG. *Study of P450 oxidoreductase protein and hepatic cytochromes 2C19 and 3A4 as a potential modulatory factors in 21-hydroxylase deficiency phenotype* [thesis], São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 90p.

Adrenal 21-hydroxylase deficiency is a common genetic disorder, caused by mutations in the *CYP21A2* gene, which encodes the 21-hydroxylase P450c21. The 21-hydroxylase deficiency disrupts cortisol and aldosterone biosynthesis and leads to accumulation of androgen precursors. There are 3 main phenotypes: the simple virilizing (SV) form, in which girls present with virilized external genitalia at birth and both sexes present with precocious pseudopuberty; the salt wasting (SW) form, characterized by additional salt-wasting crisis in the neonatal period in both sexes; and the nonclassic (NC) form, in which the hyperandrogenic signs occur later in life, during childhood, adolescence or adulthood. *In vitro* studies show a good correlation between the degree of enzymatic impairment determined by genotype and phenotype. However, there are some discrepancies as: patients with clinical and hormonal profiles of nonclassic form in whom mutations are not found in one or both alleles, and patients with milder phenotype than the ones predicted by genotyping. These discrepancies suggest the existence of modulatory factors in 21-hydroxylase deficiency phenotype. The first hypothesis was that there were mutations in P450 oxidoreductase (*POR*), a gene which encodes a flavoprotein that donates electrons for all microsomal P450s, including P450c21, an essential step for P450s activity. The second hypothesis was that other enzymes that not P450c21 could perform extra-adrenal 21-hydroxylation of progesterone and 17OH-progesterone (17OHP), modulating salt balance and virilization. Hepatic drug-metabolizing P450 enzymes CYP2C19 and CYP3A4 can 21-hydroxylate progesterone; however, this activity was never compared to 21-hydroxylation performed by P450c21, in order to determine the importance of this extra-adrenal activity *in vivo*. The present cohort consisted of 11 patients with nonclassic form and incomplete genotype and 6 patients with genotype/phenotype discrepancies (genotype-predicted SW form and manifested SV form, n=5; genotyped-predicted SV form and manifested NC form, n=1). The *POR* gene was sequenced in these 17 patients, and 10/30 alleles presented the polymorphism A503V. P450c21, PORwt and POR A503V were expressed in bacteria, assayed *in vitro*, and the kinetics parameters Km, Vmax and Vmax/Km were calculated. Although POR A503V variant decreases the activity of P450c17, our study showed that it does not alter the 21-hydroxylation by P450c21. Therefore, there are no POR variants in this cohort that could explain discrepancies between genotype and phenotype in 21-hydroxylase deficiency. To evaluate the hypothesis of extra-adrenal 21-hydroxylation, P450c21, CYP2C19, CYP3A4, and POR were expressed in bacteria, assayed *in vitro*, and kinetic parameters assessed. Compared to P450c21, the Vmax/Km of 21-hydroxylation of progesterone by CYP2C19 and CYP3A4 was 17% and 10%, respectively. Neither CYP2C19 nor CYP3A4 were able to 21-hydroxylate 17OHP. Considering that little 21-hydroxylation activity is enough to produce sufficient amount of aldosterone to avoid the dehydration, this study suggests that extra-adrenal 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4 may be able to ameliorate the mineralocorticoid, but not the glucocorticoid deficiency. CYP2C19 is very polymorphic, and some haplotypes can modify enzymatic activity. For example, the unique ultrametabolizer allele CYP2C19*17 has two polymorphisms in the promoter region that increase gene transcription in 2-4 times. Thus, patients harboring the CYP2C19 ultra-metabolizer allele could present an increased extra-adrenal 21-hydroxylation of progesterone, and hence be able to avoid salt wasting crisis. CYP2C19 gene was sequenced in the 5 patients who did not present salt

wasting crisis as expected, and 1/5 patients was homozygous and 1/5 patients was heterozygous for the CYP2C19*17 allele. Heterozygosity was also present in the control group (patients with salt wasting form and genotype/phenotype concordance). Therefore, heterozygosity for CYP2C19*17 seems to be insufficient to modulate salt balance but homozygosity might be able to avoid salt wasting crisis. In conclusion, we described for the first time the modulatory effect of an allelic variant of an extra-adrenal P450 enzyme ameliorating the salt wasting phenotype in a patient with 21-hydroxylase deficiency. Taken together with the remaining undefined genotypes, these results suggest that multiple extra-adrenal enzymes, rather than a single one, modulate the phenotypic expression of defects in 21-hydroxylase.

Descriptors:

1.Adrenal glands 2.Congenital adrenal hyperplasia 3.Steroid 21-hydroxylase
4.Polymorphisms, genetic 5.P450-oxidoreductase 6.Cytochromes

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase – considerações iniciais

O córtex da glândula adrenal produz três principais tipos de hormônios esteróides: glicocorticóides, mineralocorticóides e esteróides sexuais. A síntese dos esteróides ocorre a partir de um precursor comum, o colesterol, que sofre sucessivas reações de hidroxilação, mediadas, principalmente, por enzimas da superfamília dos citocromos P450 (Figura 1) (1). A regulação da esteroidogênese é realizada por fatores circulantes que agem à distância do sítio de síntese, como o sistema CRH-ACTH-cortisol, e por fatores intracelulares, como os transportadores de elétrons que estimulam a atividade catalítica das enzimas esteroidogênicas.

Figura 1. Esteroidogênese adrenal. P450scc, P450 *side-chain cleavage* ou 20-22 colesterol desmolase; P450c17, 17 α -hidroxilase e 17,20-liase (dupla atividade catalizada pela mesma enzima); 3 β HSD2, 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo II; 17 β HSD3, 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo III; DHEA, dehidroepiandrosterona; P450c21, 21-hidroxilase; 17OHP, 17-hidroxiprogesterona; P450c11, 11 β -hidroxilase.

O principal hormônio glicocorticóide é o cortisol e para sua síntese são necessárias as enzimas 20-22 colesterol desmolase, 3- β hidroxisteróide desidrogenase, 17 α -hidroxilase, 21-hidroxilase e 11 β -hidroxilase. A deficiência de qualquer uma dessas enzimas leva ao comprometimento da produção de cortisol e, como consequência, origina um grupo de patologias denominado hiperplasia adrenal congênita.

Adicionalmente, a hiperplasia adrenal congênita pode ocorrer também por deficiência da proteína reguladora da esteroidogênese (STAR) e da proteína P450 óxido-redutase (POR). A proteína STAR controla o transporte do colesterol para a membrana mitocondrial interna, o qual é um passo limitante da esteroidogênese (2). A proteína POR é responsável pela transferência de elétrons do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) para todas as enzimas P450 microsossomais (ou P450 tipo II), incluindo as enzimas da esteroidogênese P450c17, P450aro e P450c21, sendo esse passo essencial para atividade dessas enzimas (3).

A hiperplasia adrenal congênita é uma doença genética com herança autossômica recessiva, e a forma mais comum dessa doença, responsável por 90-95% dos casos, é causada por mutações no gene *CYP21A2* que codifica a enzima 21-hidroxilase (4, 5). Esta enzima pertence à família dos citocromos P450 microsossomais, ou seja, localizada no retículo endoplasmático liso. A 21-hidroxilase converte a progesterona em desoxicorticosterona e a 17-hidroxiprogesterona (17OHP) em 11-desoxicortisol, que por sua vez é convertido em cortisol sob ação da 11 β -hidroxilase. A diminuição da atividade da 21-hidroxilase causa diminuição da síntese de cortisol e resulta em estimulação crônica do córtex adrenal pelo hormônio

adrenocorticotrófico (ACTH) e, conseqüentemente, causa hiperplasia adrenal e superprodução dos precursores do cortisol. Estes precursores são desviados para a biossíntese dos andrógenos causando os sinais de virilização característicos desta doença.

A deficiência da 21-hidroxilase é classificada em duas formas clínicas: a forma clássica, que inclui as formas perdedora de sal (PS) e virilizante simples (VS), e a forma não clássica (NC), que inclui as formas sintomática e críptica (6).

Os programas de rastreamentos neonatais sugerem uma frequência da forma clássica em 1:10.000 a 1:18.000 nascimentos na maioria das populações caucasianas, podendo variar de acordo com o grupo étnico (7, 8). Dados de frequência na população do Estado de Goiás mostram uma incidência de 1:10.300 nascimentos (9), e resultados do programa de triagem neonatal realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) sugerem frequência de 1:14.000 nascimentos na região sudeste do Brasil (10). Por outro lado, a forma não clássica apresenta frequência bem mais elevada, ocorrendo em aproximadamente 1:1.000 indivíduos (11).

Na deficiência da 21-hidroxilase existe uma variedade de manifestações fenotípicas, as quais são classificadas em basicamente quatro grupos fenotípicos que serão descritos a seguir. A forma clássica virilizante simples caracteriza-se por virilização pré-natal da genitália externa no sexo feminino. Os níveis elevados dos andrógenos adrenais na vida intra-uterina interagem com o receptor androgênico da pele da genitália e podem impedir a formação separada dos canais vaginal e uretral. Ocorre também

aumento do clitóris e fusão variável das pregas lábio-escrotais. Este grau de virilização da genitália pode ser tão importante a ponto de causar erros na identificação do sexo ao nascimento (12). No sexo masculino não ocorrem malformações da genitália, mas pode ser observado macrogenitosomia ao nascimento. Na vida pós-natal, os sinais de virilização progridem em ambos os sexos, causando aumento do clitóris ou pênis, pubarca precoce, aumento da velocidade de crescimento e fechamento precoce das epífises ósseas, resultando em baixa estatura final. Nos meninos, na maior parte dos casos, a macrogenitosomia chama a atenção dos familiares entre os três e sete anos de idade, porém, nesta faixa etária os pacientes já apresentam importante avanço da idade óssea (13).

A forma perdedora de sal compreende aproximadamente 75% dos casos da forma clássica (14). Caracteriza-se pela hiperprodução androgênica semelhante à que encontramos na forma virilizante simples e por deficiência grave da produção de aldosterona, resultando em desidratação com hiponatremia e hiperpotassemia, que quando não tratada pode levar ao óbito. A crise de perda de sal ocorre geralmente no primeiro mês de vida (15, 16). Comumente observamos, na história familiar de meninas com a forma perdedora de sal, relatos de irmãos que faleceram no período neonatal. A ausência de alteração da genitália externa no sexo masculino ao nascimento contribui para a falta do diagnóstico e morte pela crise de perda de sal.

Na forma não clássica sintomática, as meninas nascem com genitália externa normal. O início das manifestações pode ocorrer na infância, na adolescência ou na vida adulta. Na infância, o quadro se caracteriza por

pubarca precoce e avanço da maturação óssea, podendo resultar em comprometimento da estatura final. Na adolescência ou na vida adulta, o quadro se caracteriza por amenorréia primária ou secundária, irregularidade menstrual, hirsutismo, acne e infertilidade.

A forma críptica apresenta o mesmo perfil hormonal da forma não clássica sintomática, porém sem as manifestações clínicas, sendo geralmente diagnosticada na investigação dos familiares de um paciente afetado (14, 17).

Em resumo, a deficiência da 21-hidroxilase deve sempre ser pesquisada em casos com ambiguidade genital, “meninos” sem gônadas palpáveis, desidratação neonatal com hiponatremia e hiperpotassemia, pubarca precoce, hirsutismo, irregularidade menstrual, infertilidade e até mesmo na presença de incidentaloma adrenal (18). O diagnóstico hormonal é realizado com dosagens séricas da 17OH-progesterona. Na forma clássica, as concentrações basais de 17OH-progesterona estão muito elevadas, geralmente maiores do que 50 ng/mL (19). Na forma não clássica, o critério utilizado é a concentração da 17OH-progesterona maior do que 10 ng/mL após estímulo agudo com ACTH sintético (250 mcg) (20).

1.2 Genética molecular

Existem dois genes codificadores da 21-hidroxilase que se estendem sobre uma região de aproximadamente 30 kb, no braço curto do cromossomo 6, dentro do *locus* dos genes que codificam os elementos do

complexo de histocompatibilidade principal classe III. Ambos os genes contêm 10 exons, apresentam sequências exônicas 98% idênticas e sequências intrônicas 96% idênticas. Eles alternam-se em *tandem* com os genes envolvidos na cascata do complemento *C4A* e *C4B*. O gene da 21-hidroxilase adjacente ao *C4A* é um pseudogene, porque naturalmente apresenta mutações que o impedem que codifique uma proteína, e atualmente é denominado *CYP21A1P*. O gene da 21-hidroxilase adjacente ao *C4B* é o gene ativo e denominado *CYP21A2*, possui 3,4 kb e codifica uma proteína com 494 aminoácidos (21-23).

Apesar do pseudogene não traduzir uma proteína, estudos identificaram transcritos dos exons 1 ao 3 do pseudogene, sendo esta uma evidência da atividade de transcrição de seu promotor (24, 25), porém, aproximadamente cinco vezes menor do que a do promotor do gene ativo. Esta diminuição foi atribuída à substituição de quatro nucleotídeos em torno da posição -166, as quais diminuem a afinidade de ligação dos fatores de transcrição.

Os genes da 21-hidroxilase estão localizados em uma região de genes duplicados denominada módulo *RCCX* (Figura 2). Esta região é composta por parte dos genes *RP*, sequências inteiras dos genes *C4* e *CYP21* e parte dos genes *TNX* (26). Existem dois genes *RP* (*RP1* e *RP2*), o gene *RP1* codifica uma proteína quinase nuclear, enquanto que o *RP2* é truncado e, conseqüentemente, não codificador de proteína (27). Os genes *C4A* e *C4B* codificam o quarto componente do complemento sérico (28). Os genes *TNXA* e *TNXB* são transcritos da cadeia complementar dos genes *CYP21*, o gene *TNXB* codifica uma proteína de matriz extracelular

denominada tenascina-X, enquanto que o gene *TNXA* é truncado e não codificador de proteína (29). Estes genes estão dispostos em *tandem* na ordem *RP1-C4A-CYP21A1P-TNXA-RP2-C4B-CYP21A2-TNXB* e o tamanho da sequência deste *locus* é de aproximadamente 120 kb (Figura 2).

Figura 2. Localização dos genes *CYP21*. Representação dos genes *CYP21* dentro do locus dos genes do complexo de histocompatibilidade principal no cromossomo 6p21.3. Números identificam as distâncias entre genes em quilopares de bases. O *HLA-B* é o gene da Classe I mais próximo do *CYP21A2*, assim como o *HLA-DR* é o gene mais próximo da Classe II. A região entre estas classes de genes é denominada Classe III. *TNF*, fator de necrose tumoral. **Abaixo**, mapa da região ao redor dos genes da 21-hidroxilase (*CYP21*). O pseudogene é identificado como *CYP21A1P* e o gene ativo *CYP21A2*. *C4A* e *C4B*, genes do quarto componente do complemento sérico; *RP1*, gene de uma proteína quinase nuclear; *RP2*, uma cópia truncada deste gene; *TNXB*, gene da tenascina-X; *TNXA*, uma cópia truncada deste gene. Os genes *TNX* estão em fitas cromossômicas opostas. Adaptado de White e Speiser, 2000 (30).

O alto grau de identidade dos nucleotídeos entre esta região de genes duplicados e dispostos em cadeia favorece o emparelhamento desigual dos genes homólogos durante a meiose e gera eventos de recombinação gênica desigual.

1.3 Mutações causando a deficiência da 21-hidroxilase

A maioria das mutações identificadas na deficiência da 21-hidroxilase é resultante de recombinação entre os genes *CYP21*, por mecanismos de *crossing over* desigual, gerando deleções e/ou duplicações, ou por mecanismos de conversão gênica, gerando macro ou microconversões.

No mecanismo da deleção ocorre emparelhamento desigual dos cromossomos homólogos durante a meiose, quebra da dupla fita do DNA e troca de segmentos entre os cromossomos, gerando um alelo com duplicação da unidade *C4B/CYP21A2* e outro com perda de aproximadamente 30 kb desta unidade, resultando na formação da quimera *CYP21A1P/CYP21A2* (Figura 3). Este gene híbrido apresenta, na extremidade 5', sequências do pseudogene que o tornam não funcionante e, na extremidade 3', sequências do gene ativo (31, 32). Os pacientes carreadores desta mutação em homozigose apresentam geralmente a forma perdedora de sal.

Figura 3. Mecanismo de deleção e de duplicação gênica. Ocorre quebra da dupla fita do DNA e troca entre os alelos, gerando um alelo com deleção (I) da unidade *C4/CYP21* e outro com duplicação (II). 21A1, gene *CYP21A1P*; 21A2, gene *CYP21A2*.

A grande conversão gênica também acontece por emparelhamento desigual dos genes homólogos durante a meiose, na qual provavelmente ocorre quebra de apenas uma das fitas do DNA e troca entre os genes ativo e pseudogene (Figura 4). Durante o processo de reparo dessa quebra, a fita do pseudogene é utilizada como molde, e há a incorporação de sequências deletérias do pseudogene no gene ativo, originando também um gene híbrido não funcionante (33). Esta mutação também é mais frequente na forma perdedora de sal.

Figura 4. Mecanismo de conversão gênica no *locus* *C4/CYP21*. Ocorre quebra de uma das fitas dos genes *CYP21* com troca entre eles. O alelo híbrido (I) contém sequências do pseudogene na porção 5' e do gene ativo na porção 3'. 21A1, gene *CYP21A1P*; 21A2, gene *CYP21A2*

Apesar de ambos os eventos mutagênicos apresentarem em comum a formação de genes híbridos *CYP21A1P/CYP21A2*, o ponto de quebra pode variar entre o pseudogene e o gene ativo. Estudo prévio demonstrou que em 88% desses alelos, o ponto de fusão ocorreu após o exon 3, consequentemente, há a incorporação da mutação Del 8 nt (presente no exon 3 do pseudogene) no gene híbrido. Essa mutação altera a rede de leitura e, portanto, o alelo carreador dessa mutação está associado à forma perdedora de sal (34). Em 12% dos alelos, o ponto de quebra ocorreu logo após o término do exon 1 ou do intron 2, o que justificaria a identificação desses alelos em pacientes que apresentam a forma não clássica ou virilizante simples, respectivamente (34, 35).

Deleção do gene ativo e grande conversão gênica ocorrem em 10 a 35% dos alelos na deficiência da 21-hidroxilase em diversos grupos étnicos (30). As mutações mais frequentes na deficiência da 21-hidroxilase são as

microconversões gênicas ou mutações de ponto. Até hoje, mais de 100 mutações de ponto foram descritas (30, 36), e estão distribuídas ao longo de todo o gene. No entanto, dez mutações aparecem com maior frequência nas diversas populações estudadas: P30L (exon 1), IVS2 -13 A/C>G (I2 *splice*), G110Δ8nt (Del 8 nt no exon 3), I172N (exon 4), *cluster* de I236N, V237E, M239K (exon 6), V281L (exon 7), F306+T (exon 7), Q318X (exon 8), R356W (exon 8) e P453S (exon 10) (Figura 5). Essas mutações estão normalmente presentes no pseudogene, o que sugere que foram transferidas através de microconversões para o gene ativo (37, 38). As mutações do tipo *frameshift*, *nonsense* e as que alteram os sítios conservados de *splicing* estão associadas à forma perdedora de sal. As mutações *missense* estão associadas às três formas clínicas e a manifestação dependerá do grau de comprometimento enzimático conferido pelas mutações.

Figura 5. Localização das dez mutações de ponto mais frequentes no gene *CYP21A2* em diversas populações.

Na deficiência da 21-hidroxilase, a inativação do gene *CYP21A2*, por processos envolvendo a recombinação com o pseudogene, é 30 vezes mais comum do que quaisquer outros eventos mutagênicos casuais (39) e mutações novas são identificadas em aproximadamente 5% dos alelos (30).

1.4 Correlação do genótipo com o fenótipo

Os estudos funcionais *in vitro* permitiram quantificar a redução da atividade enzimática conferida por cada mutação, e correlacioná-las com o quadro clínico. Baseando-se nestes estudos, as mutações foram classificadas em três grupos de acordo com a redução da atividade enzimática (39, 40). No grupo A, as mutações apresentam atividade enzimática ausente ou mínima e foram incluídas as seguintes mutações: deleção do *CYP21A2*, grande conversão gênica, I2 *splice*, G110Δ8nt, *cluster*, F306+T, Q318X e R356W. Indivíduos homozigotos para estas mutações apresentam principalmente a forma perdedora de sal. Alguns autores fazem uma segunda subdivisão neste grupo e classificam a mutação I2 *splice* em um subgrupo A2, pois poderia apresentar até 2% de atividade residual por *splicing* alternativo normal (39, 41). O grupo B incluiu a mutação I172N que confere entre 2 a 7% de atividade enzimática residual, e indivíduos homozigotos para esta mutação ou em heterozigose composta com as do grupo A são portadores da forma virilizante simples. O grupo C incluiu as mutações P30L, V281L e P453S, as quais conferem atividade enzimática residual > 18%. Os pacientes homozigotos para as mutações deste grupo ou em heterozigose composta com as dos grupos A ou B

apresentam principalmente a forma não clássica. Conclui-se que, na deficiência da 21-hidroxilase, a forma clínica se correlaciona com o alelo que apresenta maior atividade enzimática.

Os estudos populacionais confirmam que na deficiência da 21-hidroxilase existe uma excelente correlação do grau de comprometimento enzimático conferido pelo genótipo com o fenótipo (42-44). Entretanto, apesar dessa boa correlação, existem casos de divergências como:

a) pacientes com quadro clínico e hormonal compatível com a forma não clássica, porém apresentando genótipo incompleto, ou seja, mutações não são identificadas em um ou ambos os alelos (19, 44-47). Recentemente, nosso grupo elucidou o diagnóstico molecular de 2 destes casos com a identificação de mutações na região promotora proximal do *CYP21A2*, as quais diminuem a atividade transcricional do gene para 52%, sendo compatível com o fenótipo de forma não clássica. (48). Entretanto, mesmo após o sequenciamento das regiões reguladoras proximal e distal (no intron 35 do gene *C4B*) (49), 14 de 125 pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase de nosso Serviço persistem com genótipo não esclarecido, o que sugere a ação de outros genes que interagem com a ação da 21-hidroxilase.

b) pacientes com fenótipo mais brando do que o predito pelo genótipo, por exemplo, pacientes que não perdem sal durante a infância apesar de apresentarem o genótipo com mutações que abolem a atividade enzimática (42, 50, 51). Por exemplo, estudamos um paciente portador de deleção em homozigose do gene ativo, em que ambos os genes híbridos carregavam a mutação Del 8 nt do pseudogene. Este genótipo prediz a forma perdedora de sal, porém o paciente manifestou a forma virilizante simples. O diagnóstico deste paciente foi realizado somente aos 4 anos de idade devido à presença de sinais de pseudopuberdade precoce (52).

Estudos populacionais, que compreenderam significativo número de pacientes, apresentam resultados semelhantes aos nossos em relação ao diagnóstico molecular da deficiência da 21-hidroxilase, assim como na correlação genótipo/fenótipo. Mutações são identificadas em 100% dos alelos na forma clássica, enquanto que, na forma não clássica, apenas em 80-90% dos alelos (42). Adicionalmente, na avaliação da concordância genótipo/fenótipo tem sido observada uma correlação de aproximadamente 90% (42-44).

Os achados acima descritos sugerem a presença de outros fatores moduladores do fenótipo na deficiência da 21-hidroxilase. Hipotetizamos que mutações em genes que diretamente interagem com a ação da 21-hidroxilase, como o gene P450 óxido-redutase, poderiam justificar o fenótipo de alguns pacientes com genótipo incompleto e/ou fenótipos discordantes daquele predito pelo genótipo. A segunda hipótese é de que outras enzimas, diferentemente da P450c21, poderiam apresentar atividade de 21-hidroxilação da progesterona ou 17OH-progesterona e, consequentemente, atenuar o fenótipo dos pacientes.

1.5 O gene P450 óxido-redutase

O gene P450 óxido-redutase (*POR*) sequenciado no Projeto Genoma Humano foi inicialmente descrito contendo 15 exons, com extensão de 32 kb, localizado no cromossomo 7q11.2 (Sequência no GenBank GI: 4508114, GI: 1181841 e GI: 24307876). No entanto, recentemente descrevemos o

intermediária na doação de elétrons do NADPH para todas as enzimas P450 microsossomais (55).

As enzimas P450 microsossomais ou P450 tipo II representam um grande grupo de enzimas localizadas no retículo endoplasmático. Essas enzimas incluem as enzimas P450 hepáticas metabolizadoras de drogas, algumas enzimas relacionadas às vias de síntese de colesterol, ácidos biliares e prostaglandinas e três enzimas envolvidas na esteroidogênese: P450c17, P450aro e P450c21. A P450c17 cataliza a reação de 17 α -hidroxilação importante para síntese de cortisol e a atividade de 17,20 liase importante para síntese de andrógenos. A P450aro é a enzima que converte os andrógenos em estrógenos: androstenediona em estrona, testosterona em estradiol e 16 α -hidroxitestosterona em estriol. A P450c21 é importante na síntese de cortisol e aldosterona (3).

A estrutura da proteína POR apresenta dois domínios distintos aceptores de elétrons do NADPH, o domínio flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e o domínio flavina mononucleotídeo (FMN), e existe uma região que se assemelha a uma haste flexível entre esse dois domínios. Quando o domínio FAD recebe elétrons do NADPH, a haste flexível da proteína modifica sua conformação permitindo o alinhamento entre os dois domínios e a transferência de elétrons do domínio FAD para o domínio FMN. Quando o domínio FMN recebe os elétrons, a haste flete-se novamente permitindo a transferência de elétrons do POR para a região aceptora de elétrons das enzimas P450 microsossomais (Figura 7). O citocromo b₅ é uma proteína que apresenta efeito alostérico, promovendo a melhor interação entre a POR e algumas das enzimas P450 microsossomais (56).

Figura 7. Representação esquemática do funcionamento da POR. Os elétrons doados pelo NADPH viajam através dos domínios FAD e FMN até alcançar a região redox do parceiro P450, permitindo sua atividade catalítica. Algumas enzimas necessitam da ação do citocromo b₅ como facilitador alostérico. FAD, flavina adenina dinucleotídeo; FMN, flavina mononucleotídeo; NADPH, fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo; POR, P450 óxido-redutase. Adaptado de Miller, 2005 (3).

A primeira descrição de caso que levantou a hipótese de deficiência da POR foi em 1985, quando Peterson *et al* descreveram um paciente com ambiguidade genital, com cariótipo 46,XY e perfil bioquímico evidenciando defeito combinado de P450c21 e P450c17 (57). O sequenciamento de ambos os genes que codificam estas enzimas, *CYP21A2* e *CYP17*, não detectou alterações e foi sugerido que a deficiência da POR seria a explicação mais lógica para justificar o perfil bioquímico encontrado neste paciente (58). Porém, publicações subsequentes demonstraram que camundongos *knockout* para o gene *POR* apresentavam morte intra-útero (59, 60), e foi então descartada a possibilidade de que mutações neste gene fossem causa de doença, pois se acreditava que causariam morte no período embrionário.

Entretanto, apesar dos dados em camundongos, Fluck *et al* (61) identificaram mutações no gene *POR* em 3 crianças de ambos os sexos

com ambiguidade genital e mal-formações ósseas compatíveis com a Síndrome de Antley-Bixler (ABS). Esta síndrome consiste num conjunto de mal-formações ósseas que incluem craniossinostose, hipoplasia de face, atresia ou estenose de coanas, sinostose rádio-ulnar e/ou rádio-umeral (62). Na mesma publicação foi descrito um caso com mutação do *POR* e fenótipo mais leve: uma mulher brasileira com amenorréia e ovários policísticos ao ultrassom, sem alterações ósseas compatíveis com ABS. Todos os pacientes apresentavam em comum padrão de esteróides urinários compatíveis com deficiência combinada de P450c17 e P450c21. Novos casos de deficiência da *POR* foram subsequentemente descritos em pacientes com ambiguidade genital e/ou alteração na esteroidogênese, associada ou não à presença de mal-formações ósseas típicas da ABS (53, 63-66).

Até o momento, 24 diferentes mutações no *POR* já foram descritas (56), sendo que a mutação A287P é a mais comum nos caucasianos e a R457H nos japoneses. A capacidade das diversas mutações do *POR* em afetar a atividade das enzimas esteroidogênicas P450s (P450c17, P450c21 e P450aro) foi testada *in vitro* (65, 67, 68) e foi observado que as diversas mutações causam comprometimento enzimático variável dos P450s, ou seja, a mesma mutação pode comprometer mais um P450 do que o outro, e até mesmo, diminuir a atividade de um P450 e aumentar a atividade de outro (69). Portanto, é preciso testar a atividade de cada mutação com as diferentes P450s individualmente, e com cada um de seus substratos. Esse comprometimento enzimático variável pode justificar o espectro fenotípico tão amplo nesta doença.

Além de representarem uma nova forma de hiperplasia adrenal congênita, novas evidências sugerem que as mutações no *POR* também podem modular o fenótipo de outras formas de hiperplasia adrenal congênita. Relatamos um caso de uma menina Franco-Canadense, 46,XX, que apresentou crise de perda de sal no primeiro mês de vida, quadro de virilização pré-natal leve (Prader 2) e concentrações da 17OH-progesterona muito elevadas, fenótipo compatível com a deficiência da 21-hidroxilase (53). A paciente também apresentava craniossinostose, sem outras malformações ósseas. Durante seu seguimento foram observadas concentrações indetectáveis de androstenediona e testosterona e atraso na idade óssea (-3 DP), apesar da utilização de doses baixas de hidrocortisona (6,8 mg/m²/dia). O estudo do gene *CYP21A2* desta paciente identificou a deleção do gene ativo em heterozigose composta com as mutações P30L e I2 *splice*, genótipo que prediz a forma perdedora de sal da deficiência da 21-hidroxilase. O sequenciamento do *POR* encontrou a mutação A287P, em heterozigose, no alelo de origem materna. O quadro de craniossinostose e de virilização leve e não progressiva sugerem o efeito modulador da mutação do *POR* no fenótipo da deficiência da 21-hidroxilase. Esta mutação do *POR* está diminuindo a atividade de 17,20 liase da enzima P450c17, sem causar grande comprometimento na atividade de 17 α -hidroxilase, e consequentemente causando o aumento das concentrações de 17OH-progesterona, mas sem aumento de andrógenos. Os estudos enzimáticos *in vitro* confirmam que a atividade de 17,20 liase é geralmente mais comprometida do que a atividade 17 α -hidroxilase na presença de mutações do *POR* (65, 70).

Com base nestas evidências, sugerimos que mutações no gene *POR* podem modular o fenótipo da deficiência da 21-hidroxilase nas seguintes condições: a) em pacientes com diagnóstico clínico e hormonal de forma não clássica e genótipo *CYP21A2* incompleto, b) em pacientes que apresentam genótipo discordante do fenótipo.

1.6 Atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal da progesterona e 17-OH progesterona

A atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal da progesterona e da 17OH-progesterona é outro provável fator modulador do fenótipo na deficiência da 21-hidroxilase, que foi inicialmente sugerida com a descrição de uma paciente carreadora de mutações graves no gene *CYP21A2*, que abolem a atividade enzimática, e que na vida adulta não desidratou ao parar a terapia de substituição hormonal (71).

A atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal da progesterona foi demonstrada em diversos tecidos fetais extra-adrenais (72). No entanto, a natureza das enzimas responsáveis por esta atividade extra-adrenal ainda é pouco conhecida. Mellon e Miller (73) afastaram a possibilidade de esta atividade ser mediada por P450c21, pois não identificaram o seu RNA mensageiro (RNAm) em vários tecidos fetais extra-adrenais que sabidamente realizam 21-hidroxilação. Estudos *in vitro* demonstraram que citocromos hepáticos P450s, responsáveis pelo metabolismo das diversas drogas que utilizamos na prática clínica, metabolizam a progesterona em diferentes tipos de metabólitos, inclusive 21OH-progesterona e, portanto,

esses citocromos hepáticos poderiam estar relacionados com a 21-hidroxilação extra-adrenal da progesterona (74, 75).

As enzimas P450s representam um grande grupo de enzimas que possuem cerca de 500 aminoácidos, apresentam um único grupamento heme e caracteristicamente têm um pico de absorção no espectrofotômetro no comprimento de 450 nm no seu estado reduzido (3). Foram identificados, no projeto genoma humano, 57 genes codificadores de enzimas P450. Esses genes codificam enzimas que podem ser divididas em duas classes bioquímicas, P450 tipos I e II, de acordo com sua localização dentro da célula e com o sistema que elas utilizam para receber elétrons a partir do NADPH, evento crucial para sua ativação.

As enzimas P450 tipo I são encontradas na mitocôndria e nas bactérias. Para sua ativação recebem os elétrons a partir de um sistema de transferência constituído por duas proteínas: uma flavoproteína denominada ferredoxina redutase e uma proteína com os radicais ferro e sulfato, denominada ferredoxina (3). As enzimas P450 tipo II estão localizadas no retículo endoplasmático e recebem elétrons do NADPH através da flavoproteína denominada POR. As P450 tipo II incluem as enzimas de interesse neste estudo, como a P450c21 e os citocromos P450 hepáticos metabolizadores de drogas (3).

Considerando que os citocromos hepáticos são enzimas com propriedades semelhantes a 21-hidroxilase e existem evidências iniciais de que apresentam atividade de 21-hidroxilação da progesterona *in vitro* (74-76), nossa hipótese é de que essas enzimas seriam responsáveis pela atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal *in vivo* e poderiam amenizar o fenótipo de perda de sal e/ou deficiência de cortisol na deficiência da 21-hidroxilase.

1.7 Citocromos P450 hepáticos com atividade de 21-hidroxilação da progesterona

Os citocromos P450s hepáticos são o maior grupo de enzimas envolvidas na metabolização de drogas, respondendo por mais de 80% dessa atividade (77). Os citocromos com maior atividade na metabolização de drogas são CYP3A4 e CYP2C9 (30% e 20%, respectivamente), pois apresentam grande expressão hepática e possuem grande afinidade a diversos substratos. Os CYP2C19 e CYP2D6 respondem, cada um, por cerca de 5% da atividade de metabolização de drogas realizada pelos P450s (78). Esses citocromos apresentam alta prevalência de polimorfismos, e todos os diferentes haplótipos descritos estão sumarizados na *home page* de Nomenclatura dos Alelos de CYP Humanos (www.cypalleles.ki.se) (79). A maioria das variantes alélicas descritas apresenta desequilíbrio de ligação racial e podem se correlacionar com fenótipos de metabolizador pobre, intermediário, extensivo e ultra-metabolizador para determinado substrato (80). Portanto, a natureza polimórfica dos citocromos hepáticos pode afetar a capacidade individual de resposta a drogas e efeitos adversos. Adicionalmente, é importante ressaltar que na família dos citocromos, uma mesma variante alélica pode apresentar atividade metabólica distinta dependendo do substrato utilizado (77), de forma semelhante ao que é descrito com o P450 óxido-redutase.

Apesar da existência de vários estudos dos citocromos P450 hepáticos como enzimas importantes na metabolização de drogas, a detecção da sua importância na formação de substâncias endógenas, dentre

essas os esteróides, é bastante recente e os dados são ainda escassos. Os principais citocromos hepáticos que demonstraram 21-hidroxilação da progesterona *in vitro* são CYP2C19 e CYP3A4 (74, 75). No entanto, não há estudos que avaliaram a eficiência da atividade de 21-hidroxilação da progesterona pelos CYP2C19 e CYP3A4 comparada a da P450c21, assim como ainda é desconhecido o impacto dessa atividade *in vivo*.

A expressão do CYP2C19 ocorre essencialmente no fígado e aumenta linearmente logo após o nascimento, porém é pouco abundante comparada com outras P450 hepáticas (81). Estudos *in vivo* demonstraram que a enzima pode ser induzida por rifampicina, dexametasona e fenobarbital. O CYP2C19 metaboliza um amplo espectro de drogas como mefenitoína e omeprazol. Seus polimorfismos são atualmente bem conhecidos e muitos deles interferem no metabolismo das drogas. Cerca de oito diferentes alelos estão associados com fenótipo de pobre metabolizador, baseados na utilização de substrato padrão (82); porém, 2 desses alelos pobre metabolizadores (*CYP2C19*2* e *CYP2C19*3*) são responsáveis pela maioria dos casos ocorrendo em até 5% das populações de Caucasianos e Africanos e em até 20% dos Asiáticos (83). O genótipo pobre metabolizador tem se mostrado benéfico no tratamento de doenças gastro-intestinais com inibidor de bomba de prótons, porque a diminuição do metabolismo da droga promove o aumento do nível plasmático da medicação e, conseqüentemente, um aumento da taxa de cicatrização de úlceras gástricas (84) e de resposta ao tratamento de refluxo esôfago-gástrico (85). Um haplótipo ultra-metabolizador (*CYP2C19*17*) também é muito frequente e ocorre em 18%

dos alelos da população geral de Caucasianos e Africanos (86). Esse haplótipo apresenta duas substituições na região promotora (-806C>T e -3402C>T) que aumentam a transcrição do gene *CYP2C19* (86). Estudos *in vivo* confirmaram o aumento da atividade da enzima nos indivíduos com haplótipo *CYP2C19**17, através da demonstração da menor biodisponibilidade de omeprazol e mefenitoína, substratos para essa enzima, em comparação com indivíduos controles que apresentavam o haplótipo selvagem *CYP2C19**1 (86).

O *CYP3A4* é o mais prevalente P450 no fígado e intestino delgado, e apresenta papel determinante no metabolismo das drogas. Também é expresso em tecidos extra-hepáticos: pulmão, estômago, cólon e adrenal (87). Na vida fetal, o *CYP3A4* tem uma expressão muito baixa, aumenta após o nascimento e alcança sua expressão máxima apenas na vida adulta (88). A expressão do gene *CYP3A4* pode ser induzida por uma série de compostos, como barbitúricos, esteróides e macrolídeos, por mecanismo ainda não completamente esclarecido. Fatores de transcrição nuclear como o receptor X pregnano (PXR), o receptor constitutivo androstane (CAR) e o fator nuclear hepático 4-alfa (HNF4-alfa) parecem estar envolvidos nesta modulação. A alteração da atividade ou da expressão do *CYP3A4* parecem ser os principais fatores determinantes da resposta terapêutica e da toxicidade para determinadas drogas (89). Alguns polimorfismos foram identificados no *CYP3A4*; porém, raramente eles alteram a atividade catalítica da enzima.

Apesar das evidências de atividade de 21-hidroxilação da progesterona pelos citocromos P450 2C19 e P450 3A4 *in vitro* (75), este

trabalho utilizou um sistema artificial não humanizado (proteínas de coelho), e não realizou a comparação da atividade de 21-hidroxilação entre os diferentes citocromos hepáticos com a do P450c21. Consequentemente, não é possível extrapolar a importância dessa atividade de 21-hidroxilação da progesterona *in vivo*. Também nunca foi avaliada a capacidade destas enzimas de realizar a 21-hidroxilação da 17OH-progesterona.

1.8 Fatores moduladores do fenótipo da deficiência da 21-hidroxilase

Em suma, a deficiência da 21-hidroxilase é um modelo de doença monogênica com boa correlação genótipo/fenótipo. No entanto, alguns casos não se enquadram neste modelo como: pacientes com forma não clássica e genótipo incompleto (mutações não são encontradas em um ou ambos os alelos do gene *CYP21A2*), e pacientes que apresentam o genótipo e fenótipo não concordantes. Mutações no gene *POR* e a atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal determinada por citocromos hepáticos P450s podem estar envolvidas na modulação do fenótipo na deficiência da 21-hidroxilase. A identificação de fatores moduladores, além de aumentar o nosso conhecimento da fisiopatologia da doença, poderá:

- 1) ser de grande utilidade para a definição diagnóstica e aconselhamento genético das famílias de risco.
- 2) auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, como por exemplo, através do uso de drogas indutoras dos citocromos P450 com

consequente melhora na gravidade da doença. Este fato poderá repercutir na redução das doses da terapia com glicocorticóides e /ou mineralocorticóides e dos seus efeitos colaterais.

OBJETIVOS

2 Objetivos

1a) Estudar o gene *POR* em pacientes com diagnóstico clínico e hormonal de forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase e genótipo incompleto, ou seja, genótipo em que mutações no gene *CYP21A2* não foram identificadas em um ou ambos os alelos.

1b) Estudar o gene *POR* em pacientes com diagnóstico de deficiência da 21-hidroxilase e que apresentam fenótipo discordante do genótipo: forma clínica mais leve do que a predita pelo genótipo.

2) Avaliar se a 21-hidroxilação extra-adrenal pode modular a manifestação fenotípica da deficiência da 21-hidroxilase. Esta análise será realizada através do estudo dos tópicos a seguir:

2a) Avaliação da atividade *in vitro* de 21-hidroxilação da progesterona e 17OH-progesterona dos citocromos recombinantes humanos CYP2C19 e CYP3A4, e comparação com a atividade do P450c21 selvagem.

2b) Pesquisa de variantes alélicas ultra-metabolizadoras do citocromo CYP2C19 em pacientes com fenótipo mais brando do que o predito pelo genótipo, e comparação com as variantes presentes nos indivíduos que apresentam genótipo e fenótipo concordantes.

MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq, da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) (processo número 761/05). Após consentimento informado por escrito, obtivemos amostra de sangue periférico dos pacientes para extração de DNA genômico. As avaliações hormonais e todos os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP. Os estudos funcionais foram realizados na Universidade da Califórnia São Francisco (UCSF), Estados Unidos.

3 Casuística

A casuística selecionada para este estudo consiste em 313 pacientes portadores de deficiência da 21-hidroxilase, sendo que 109 apresentaram a forma perdedora de sal, 79 a forma virilizante simples e 125 a forma não clássica. Na forma virilizante simples, todas as meninas apresentaram ambiguidade genital ao nascimento, e ambos os sexos apresentaram importante virilização na infância, com avanço da idade óssea na ausência de tratamento. Os pacientes com a forma perdedora de sal, além do quadro de virilização, apresentaram crise de perda de sal, caracterizada por desidratação acompanhada de hiponatremia e hipercalemia, ou hiponatremia associada à elevada atividade de renina

plasmática (ARP), nas primeiras semanas de vida. Os pacientes com a forma não clássica sintomática apresentaram pubarca precoce, irregularidade menstrual, acne, hirsutismo ou infertilidade. Na forma clássica, as concentrações de 17OH-progesterona basal foram maiores do que 50 ng/mL. Na forma não clássica, os pacientes foram submetidos ao teste de estímulo agudo com ACTH sintético (250 µg IV) na fase folicular do ciclo menstrual. Neste teste foi adotado como diagnóstico o valor da 17OH-progesterona > 15 ng/mL, 60 min após estímulo. Apesar do critério diagnóstico hormonal estabelecido na literatura ser 17OH-progesterona >10 mg/mL (20), optamos pelo valor da 17OH-progesterona pós-estímulo > 15 ng/mL, porque o estudo que avaliou heterozigotos obrigatórios na nossa população mostrou que esses indivíduos podem ter concentrações de 17OH-progesterona pós-estímulo entre 10 e 15 ng/mL (90).

Amostras de DNA dos pacientes foram submetidas previamente a estudo molecular do gene *CYP21A2* através de técnicas de *Southern blotting* e PCR alelo-específico; o sequenciamento foi realizado nas amostras dos casos em que o genótipo não foi resolvido com a utilização das duas metodologias iniciais (42, 52, 91).

Foram selecionados 11 pacientes com quadro clínico de hiperandrogenismo tardio, diagnóstico hormonal de forma não clássica, e que permaneceram com genótipo incompleto, ou seja, pelo menos um alelo sem mutação identificada, após sequenciamento de todo gene *CYP21A2* (Tabela 1). Sete pacientes apresentaram ao diagnóstico história de

irregularidade menstrual, acne e/ou hirsutismo, e quatro casos (3 meninas e 1 menino) história de pubarca precoce.

Foram selecionados 6 pacientes com deficiência da 21-hidroxilase, nos quais após o estudo molecular do gene *CYP21A2*, permaneceram com genótipo/fenótipo discordantes. Cinco pacientes apresentaram genótipo que predizia a forma perdedora de sal e fenótipo de forma virilizante simples e 1 paciente apresentava genótipo que predizia a forma virilizante simples e fenótipo de forma não clássica (Tabela 2).

Os pacientes que carregavam a mutação *I2 splice* foram excluídos do estudo, porque essa mutação está associada à variabilidade fenotípica, devido à presença de splicing alternativo (41).

Tabela 1 - Dados clínicos, hormonais e genéticos dos pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase e genótipo incompleto

<i>Paciente</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade ao Diagnóstico (anos)</i>	<i>Quadro Clínico</i>	<i>17OHP Basal e Pós-ACTH (ng/mL)</i>	<i>Genótipo CYP21A2</i>
1	F	34	H, A, IM	3,3 / 32	I172N / -
2	F	12	H, IM	3,2 / 26	- / -
3	M	8	Pubarca Precoce	5,7 / 36	V281L / -
4	F	20	H, IM	3,5 / 44	V281L / -
5	F	20	H	11 / 147	I2 / -
6	F	63	H, A, IM	1,1 / 30	- / -
7 ^a	F	8	Pubarca Precoce	50 / 83	V281L / -
8 ^a	F	8	Pubarca Precoce	59 / 84	V281L / -
9 ^b	F	25	H, A	17 / 27	V281L / -
10 ^b	F	22	H, A	18 / 22	V281L / -
11	F	6	Pubarca Precoce	6,9 / 65	V281L / -

- Mutação não identificada

^a irmandade 1; ^b irmandade 2.

F, feminino; M, masculino; H, hirsutismo; A, acne; IM, irregularidade menstrual;

Tabela 2 - Dados clínicos, hormonais e genéticos dos pacientes com a deficiência da 21-hidroxilase e genótipo/fenótipo discordantes

<i>Pacientes</i>	<i>Sexo Social/ Genético</i>	<i>IC / IO ao Diagnóstico (anos)</i>	<i>Quadro Clínico</i>	<i>17OHP Basal (ng/mL)</i>	<i>Testosterona (ng/dL)/ $\Delta 4$ (ng/mL)</i>	<i>ARP Basal (ng/mL/h)</i>	<i>Genótipo CYP21A2</i>	<i>Fenótipo: Predito/ Observado</i>
1	F / 46,XX	35	Infertilidade, Clitoromegalia (2 cm)	82,8	86 / 13,7	-	Grande Conversão [#] / IVS2-2A>G	VS / NC
2	M / 46,XX	4,5 / 11	Aumento peniano	305	720* / 19,9*	-	R356W / R356W	PS / VS
3	M / 46,XY	4,5 / 12,5	Aumento peniano, Pubarca Precoce	54,5	735 / 7,4	6,5	Del 21A2** / Q318X	PS / VS
4	M / 46,XY	5,3 / 11	Aumento peniano, Pubarca Precoce	193,9	510 / 3,7	2,8	Del 21A2** / Del 21A2**	PS / VS
5	M / 46,XY	1 / -	Aumento peniano	240 / 153,3*	1.167* / 36,1*	>25	R356W / Ins T, V281L	PS / VS
6	M / 46,XY	5 / 11,5	Aumento peniano, Pubarca Precoce	141,3	170 / 10	18	Q318X / R408C	PS / VS

*Dados hormonais dos pacientes n°s 2 e 5 foram obtidos aos 34 anos e 13 anos, respectivamente, sem tratamento de reposição hormonal. ** O ponto de quebra do gene híbrido foi estudado por PCR alelo-específico, e o gene híbrido apresenta a mutação Del 8nt do pseudogene, que abole a atividade enzimática e prediz a forma perdedora de sal. # Grande Conversão: o gene híbrido apresenta a região promotora e o exon 1 do pseudogene contendo a mutação P30L. F, feminino; M, masculino; IC, idade cronológica; IO, idade óssea; APR, atividade de renina plasmática; VS, virilizante simples; NC, não clássica; PS, perdedor de sal; Ins, inserção; Del, deleção; -, dado não disponível.

4 Métodos

4.1 Dosagens laboratoriais

As dosagens hormonais de 17OH-progesterona e atividade de renina plasmática foram realizadas pelo método de radioimunoensaio. As dosagens de Δ_4 -androstenediona e testosterona foram realizadas pelo método imunofluorimétrico. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram menores do que 18% para todos os ensaios. Os resultados dos exames foram comparados aos valores de indivíduos normais estudados no mesmo laboratório. As dosagens de sódio e potássio no soro foram realizadas em fotômetro de chama.

4.2 Estudo do gene *POR* através de PCR e sequenciamento

As amostras de DNA foram extraídas de leucócitos periféricos pela técnica de digestão com proteinase-K com sal (*salting out*). A concentração do DNA foi obtida através de leitura em espectrofotômetro (Amersham, Pharmacia, Uppsala, Suécia) no comprimento de onda 260 nm (1,0 unidade DO 260 = 50 μ g/mL). Utilizamos a razão 260/280 >1,8 como ideal de pureza do DNA. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificar sua integridade e estocadas a 4 °C até a sua utilização.

Os 15 exons codificadores do gene *POR* e o exon 1U foram sequenciados nos 11 pacientes com forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase e genótipo incompleto e nos 6 pacientes com genótipo discordante do fenótipo. Oligonucleotídeos iniciadores específicos complementares às regiões flanqueadoras exon-intron foram desenhados usando *University of California Santa Cruz Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu>) e usando *Primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Tabela 3). O PCR foi realizado utilizando uma mistura de 20:1 de *Taq DNA polimerase* (Promega, Madison, WI, USA) e *Pfu DNA polimerase* (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) 0,5:0,025 U/reacção. A reacção de amplificação foi realizada em termociclador automático com protocolo de ciclagem em *touchdown*: 95 °C por 4 min, seguidos de 15 ciclos em *touchdown* de 95 °C por 30", 67 °C por 30" (decrecendo 0,5 °C a cada ciclo), e 72 °C por 45", seguidos por 35 ciclos de 95 °C por 30", 60 °C por 30", e 72 °C por 45". A reacção de amplificação do exon 1U foi realizada nas mesmas condições descritas para os demais exons do *POR*, exceto que a temperatura de *annealing* inicial nos 15 ciclos do *touchdown* foi de 64 °C, e nos demais 35 ciclos foi de 57 °C. A extensão final foi realizada a 72 °C por 7 min. Todas as amplificações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes exceto o DNA) e um controle positivo (DNA genômico de um indivíduo normal) para confirmação da especificidade e eficiência da reacção. As amostras amplificadas foram verificadas em gel de agarose 1%.

Os produtos de PCR foram purificados através de pré-tratamento enzimático com a enzima *Exo SAP IT* (USB Corporation, Cleveland, OH, USA). Todos os produtos de PCR foram então submetidos à reação de sequenciamento automático, utilizando o *kit ABI Prism BigDye™ terminator* versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as mesmas sequências de oligonucleotídeos iniciadores referidos na Tabela 3. Os produtos foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático de DNA e analisados através do *software ABI PRISM 3730 x 1 DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e do *software DNA Sequencher 5.2* (Gene Codes, Ann Harbor, MI, USA). Os resultados foram comparados com a respectiva sequência selvagem depositada no GeneBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000007.12).

Tabela 3 - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (oligos) para as reações de PCR e de sequenciamento do *POR*

Nome dos Oligos	Localização Genbank	Sequências dos Oligos	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>POR_x1UF</i>	chr7: 75382062-75382081	5'-ACAGCCACAGTTCTGCAGTG-3'	478
<i>POR_x1UR</i>	chr7: 75382629-75382649	5'-GAGATCAGCTCTAGGGGAAGG-3'	
<i>POR_x1F</i>	chr7:75227759-75227780	5'-GTCTGTTATGTCAGCCCCAGTC-3'	
<i>POR_x1R</i>	chr7:75228286-75228307	5'-GAGCTCAAGCACAACTAGCAA-3'	549
<i>POR_x2F</i>	chr7:75246143-75246164	5'-TTACTGTAGGGGAAATGGGAAG-3'	
<i>POR_x2R</i>	chr7:75246683-75246704	5'-GGGAGAAGCTTCGTGAGTTAGA-3'	
<i>POR_x3F</i>	chr7:75253267-75253288	5'-GCAAGTCCCAGAGGAACCTAGA-3'	568
<i>POR_x3R</i>	chr7:75253815-75253834	5'-GTTTGTTTGGGAGATGTGG-3'	
<i>POR_x4F</i>	chr7:75254152-75254173	5'-CCCTCCGTGTTGTTACTTCTCT-3'	
<i>POR_x4R</i>	chr7:75254680-75254701	5'-CCTTTCTTGCCTTTAGTCTCCA-3'	550
<i>POR_x5F</i>	chr7:75254828-75254849	5'-AGGTCAACCAGATGAAGCCTCT-3'	
<i>POR_x5R</i>	chr7:75255297-75255316	5'-CAAGCCGAAAAGCAAACTG-3'	
<i>POR_x6F</i>	chr7:75255333-75255354	5'-CTTCCTGATGCTCTGGGTTTAT-3'	496
<i>POR_x6R</i>	chr7:75255807-75255828	5'-CAAAGTTGAACCTAGCCACAGA-3'	
<i>POR_x7F</i>	chr7:75255926-75255947	5'-GCTTCCTTACCTTCTCCAGAT-3'	
<i>POR_x7R</i>	chr7:75256487-75256508	5'-TGCAGAGTAAGGTGGCTAAGTG-3'	583
<i>POR_x8F</i>	chr7:75257359-75257380	5'-GTAACCGGTGAGATTCCTCAT-3'	
<i>POR_x9R</i>	chr7:75258029-75258050	5'-ACTATGACAGTGACGGGGTAGG-3'	
<i>POR_x10F</i>	chr7:75258592-75258613	5'-AGGGAGGCATCAGAGAGCATAG-3'	781
<i>POR_x11R</i>	chr7:75259353-75259372	5'-GGCTGGACAGATGCTGAGAA-3'	
<i>POR_x12F</i>	chr7:75259407-75259426	5'-GAGGGGGCCTCTGAGGTTTG-3'	
<i>POR_x13R</i>	chr7:75260149-75260170	5'-ACAGGTGCTCTCGGTCTTGCTT-3'	764
<i>POR_x14F</i>	chr7:75259904-75259924	5'-GGGAGACGCTGCTGTACTACG-3'	
<i>POR_x15R</i>	chr7:75260563-75260584	5'-GCCCAGAGGAGTCTTTGTCACT-3'	

Pb, pares de bases

4.3 Expressão da proteína *POR* recombinante

O DNA complementar (cDNA) do *POR* selvagem (*POR*wt) foi inicialmente modificado a fim de aumentar a sua expressão através da remoção de 27 aminoácidos (resíduos hidrofóbicos) da porção N-terminal, e

posteriormente foi clonado em plasmídios pET22b para expressão em bactéria *Escherichia coli* C41(DE3)pLysS (Lucigen Corporation, Middleton, WI, USA). O vetor com o cDNA contendo a variante POR-A503V foi gerado por mutagênese sítio dirigida (65). As bactérias transformadas cresceram em meio de cultura *terrific broth* (TB), suplementado com *buffer* de fosfato de potássio (pH 7,4), oligoelementos, ampicilina 50 mg/L, cloranfenicol 1 mg/L, em temperatura 37 °C, até densidade óptica (DO) de 0,4, no comprimento de onda 600 nm. Posteriormente as células transformadas foram induzidas com 0,4 mM de isopropil-1-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e cultivadas por 24 h, a fim de aumentar a expressão da proteína de interesse.

O meio de cultura foi centrifugado por 10 minutos, a 5.000 g, para formação de um *pellet*. Para preparação dos esferoplastos, esse primeiro *pellet* foi ressuspenso em *buffer* composto com 100 mM de Acetato de Tris (pH 7,6), 0,5 M de sucrose e 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Sequencialmente foram adicionados lentamente 1 mL de lisozima (0,5 mg/mL), 100 mL de EDTA (0,1 mM, pH 8,0) e homogeneizados durante 20 a 30 minutos a 4 °C. Os esferoplastos formados foram centrifugados a 5.000 g, por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e um segundo *pellet* contendo somente os esferoplastos foi isolado (65).

Para o isolamento das membranas do retículo endoplasmático, o *pellet* de esferoplasto foi ressuspenso em 100 mM de fosfato de potássio (pH 7,6), 6 mM de acetato de magnésio, 0,1 mM de ditioneitol (DTT), 20% (v/v) de glicerol, 0,2 mM de fenil-metil-sufonil fluoreto (PMSF), 50 µL do coquetel de inibidor de protease completo (Roche, Indianápolis, IN, USA), e

0,1 mM de enzima *DNase I*. Após ressuspensão, as membranas dos esferoplastos foram rompidas por sonicação e o lisado sofreu nova centrifugação a 12.000 g, para eliminação dos debris. O sobrenadante foi submetido à ultracentrifugação a 150.000 g, e este novo *pellet* obtido contém as membranas de retículo endoplasmático albergando a proteína POR (65). Este *pellet* foi ressuspenso em *buffer* com 50 mM de fosfato de potássio (pH 7,4) e 20% de glicerol.

A proteína POR nas membranas, tanto a selvagem quanto a variante POR-A503V, foram quantificadas por *Western blotting*, comparando-as a uma curva padrão de PORwt purificada (69). Para purificação da proteína PORwt, as membranas de *E. coli* contendo PORwt foram solubilizadas em 0,2% de colato de sódio e 0,2% de Triton X-100 através de agitação em homogeneizador orbital por 2-3 hs a 4 °C. As membranas foram centrifugadas a 100.000 g por 90 min, o *pellet* foi descartado, e o sobrenadante contendo as proteínas foi aplicado a uma coluna de 2',5'-ADP-sepharose (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Essa coluna foi pré-equilibrada com *buffer* contendo 2 mM de adenosina, e as proteínas PORwt de interesse ficaram aderidas à coluna. Essa coluna foi submetida a três lavagens com o mesmo *buffer* de equilíbrio. A eluição do PORwt purificado foi realizada com 20 mM de *buffer* fosfato (pH 7,4) contendo 20% de glicerol, 0,2% de colato de sódio, 0,1 mM de EDTA e 5 mM de 2'-AMP (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Finalmente a proteína PORwt purificada no eluente foi submetida à diálise com 20 mmol/L de *buffer* fosfato contendo 20% de glicerol.

O alto grau de pureza da proteína PORwt foi confirmada através da coloração *Coomasie-blue* de um gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (Figura 8).

Figura 8. Gel de poliacrilamida-SDS da POR selvagem purificada. O gel confirma a pureza de 80-85% da proteína. SN, sobrenadante para descarte após aplicação dos microssomos em coluna 2',5'-ADP-sepharose; 1L / 2L / 3L, sobrenadante para descarte após 1ª, 2ª e 3ª lavagens da coluna, sucessivamente. 1E/2E e mix, produto da 1ª, 2ª e mix das eluições da proteína PORwt purificada. PORwt, POR selvagem; kDa, kilodaltons.

A proteína PORwt purificada foi quantificada pelo método colorimétrico de Bradford. Foi construída uma curva com diferentes concentrações de PORwt purificada que foi utilizada como curva padrão para quantificar a concentração de PORwt e de POR A503V presente nas membranas através de *Western blotting* (Figura 9).

Tanto a proteína PORwt purificada utilizada como curva padrão quanto as proteínas PORwt e POR A503V de membranas foram separadas através de gel de poliacrilamida-SDS e transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno denominada Immobilon-FL (Millipore, Bedford, MA,

USA). A membrana foi bloqueada com o uso de leite desnatado 10% em *buffer* salino, por 1 hora, e incubada com anticorpo policlonal de coelho anti-POR murino (Stressgen, Ann Arbor, MI, USA) na diluição de 1:2.000, *overnight*. Na manhã seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes, durante 10 minutos, com *buffer* TBST (50 mL de Tris-HCl (pH 7,5); 43,8 g de cloreto de sódio e 5 mL de *Tween* 20), e após lavagem, foi incubada com um segundo anticorpo anti-IgG de coelho, que apresenta marcador infravermelho (LI-COR Bioscience Lincoln, NE, USA). Após 1 hora de incubação, seguiu-se nova lavagem e a membrana foi escaneada e revelada através de um sistema de detecção infravermelho *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Bioscience, NE, USA). A análise quantitativa foi realizada através de um *software* da Odyssey que compara a quantidade de proteína presente na membrana *versus* a intensidade da banda detectada usando o *software* de análise de *Western blotting* (Figura 9) (69).

Figura 9. Quantificação da proteína POR. Western blot da proteína PORwt purificada, a detecção do sinal e sua quantificação realizada através do programa Odyssey Infrared Imaging System (A). Construção da curva padrão da proteína PORwt purificada, em que a quantidade de proteína foi comparada com a intensidade da banda (B). kDa, kilodaltons.

4.4 Expressão da proteína P450c21 recombinante

A fim de aumentar a expressão da P450c21 em bactéria, o cDNA *CYP21A2* foi modificado na região N-terminal para codificação MALLLAVFL, através de mutagênese sítio dirigida e, para facilitar a purificação da proteína, foi incorporado 6-His tag na região C-terminal. O cDNA *CYP21A2* modificado foi clonado em vetor pCWori (plasmídio foi gentilmente concedido por Dra C. Fluck) e foi transfectado em bactérias competentes *Escherichia coli* C41(DE3)pLysS (Lucigen Corporation, Middleton, WI, USA). As células transformadas cresceram em meio de cultura *terrific broth* (TB), suplementado da mesma forma que o descrito acima para a POR, porém ainda acrescido de 1 mM de tiamina e 1mM de δ -ácido-aminolevulínico (δ -ALA). Posteriormente as células transformadas também foram induzidas com IPTG e cultivadas por 48 horas, a fim de aumentar a expressão da proteína de interesse. O processo de múltiplas centrifugações para o isolamento dos esferoplastos e, subsequentemente, separação das membranas de retículo endoplasmático contendo o P450c21, ocorreu de forma idêntica ao descrito para a POR (92).

O conteúdo total de proteínas foi quantificado pelo método colorimétrico de Bradford e o conteúdo de P450 foi mensurado por espectroscopia (93) (Figura 10).

Figura 10. Representação de uma curva de proteína visualizada no espectrofotômetro. A curva mostra um pico no comprimento de onda 450 nm quando avaliamos a proteína P450c21. DO, densidade óptica.

O *pellet* de microssomas foi ressuspensão em 4 mL de *buffer* contendo 20 mM de fosfato de potássio (pH 7,4), 20% de glicerol e 0,25 mM de EDTA, 1% de colato de sódio e 1% de *Tween* 20, foi agitado no misturador orbital por 2 horas e centrifugado a 150.000 g por 90 minutos. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna Ni-NTA agarose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) equilibrada com 0,3 M de cloreto de sódio, 20% glicerol, 0,1 mM de DTT, 0,1 mM EDTA, 1% de colato de sódio, 1% de *Tween* 20 e 50 mM de *buffer* fosfato (pH 8,0). A coluna foi lavada com o mesmo *buffer* contendo 5 mM de imidazol e eluída com o mesmo tampão contendo 250 mM de imidazol. O produto da eluição foi aplicado à coluna de *DEAE-Sepharose* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e, sequencialmente, à coluna *SP-Sepharose* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), conforme protocolo do fabricante. A proteína purificada foi concentrada através de concentrador Amicon Ultra-15

(Millipore, Billerica, MA, USA). A pureza foi avaliada através da coloração *Coomassie-blue* de um gel de poliacrilamida-SDS (Figura 11) e confirmada por *immunoblotting* utilizando anticorpo de coelho contra P450c21 humana (produzido por Dr W.L. Miller).

Figura 11. Gel de poliacrilamida-SDS da P450c21 purificada. O gel confirma a pureza de 80% da P450c21. kDa, kilodaltons.

4.5 Comparação da 21-hidroxilação da progesterona e da 17OH-progesterona pela P450c21 utilizando-se POR selvagem e a variante POR A503V

A proteína P450c21 purificada (5 pmol) foi incubada com membranas de bactérias contendo 10 pmol de POR selvagem e POR A503V, separadamente, em ambiente lipídico artificial contendo 10 μ g de 1,2-dilaúril-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DLPC), 10 μ g do detergente

biológico 3-[3-(colamidopropil)dimethylamonio]-1-propano-sulfonato (CHAPS), 50 mM de *buffer* fosfato de potássio (pH 7,4), 10 mM de cloreto de magnésio (MgCl_2), 6 mM de acetato de potássio, 1 mM de glutathione reduzida e substrato radiomarcado [^{14}C]-progesterona ou [^3H]-17OH-progesterona, em um volume total de reação de 200 μL . As reações foram realizadas com os substratos nas concentrações 0,3, 1, 3 e 5 μM , e foram iniciadas após a adição de 2 mM de NADPH. O período de incubação foi de 60 minutos, a 37 °C, e as reações foram finalizadas após adição de 450 μL dos solventes orgânicos acetato de etila/isooctana 1:1. Os esteróides foram extraídos, depositados em placas de cromatografia de camada delgada (TLC) e as corridas foram realizadas em dois sistemas de solventes distintos: clorofórmio/acetato de etila 3:1 e cloreto de metila/metanol/ H_2O 300:20:1 (94). Todas as reações foram realizadas em duplicata e repetidas no mínimo 3 vezes. A revelação das reações foi realizada pelo Storm (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) e a quantificação de conversão de [^{14}C]-progesterona para desoxicorticosterona e de [^3H]-17OH-progesterona para 11-desoxicortisol foi realizada pelo programa de *phosphorimaging* *ImageQuant* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). A partir do cálculo do percentual de conversão dos substratos nos produtos foi calculada a velocidade dessa conversão (percentual de conversão/minutos/pmol de proteína). O cálculo da velocidade de conversão da enzima P450c21, para as diferentes concentrações de substratos, permite o cálculo de parâmetros de cinética enzimática como a constante de Michaelis (K_m), a velocidade máxima (V_{max}) e a razão V_{max}/K_m (que é uma estimativa da eficiência da

reação). Esses parâmetros foram calculados através de equações de Lineweaver-Burk utilizando o *GraphPad Prism 3 software* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Foi admitido como 100% de atividade enzimática, as reações que usaram as variantes selvagens.

4.6 Ensaio enzimático da 21-hidroxilação da progesterona e da 17OH-progesterona realizada pelos citocromos CYP2C19 e CYP3A4

Os citocromos P450 humanos CYP2C19 e CYP3A4 expressos em bactérias e purificados são comercialmente disponíveis e foram obtidos da Invitrogen (Madison, WI, USA).

Nos ensaios do CYP2C19, 5 pmol de CYP2C19 purificados foram incubados com 10 pmol de POR selvagem ou POR A503V, separadamente, e com 10 pmol de citocromos b_5 purificados (produzido por Dra Huang) (65), em ambiente lipídico artificial contendo 10 μ g de DLPC, 10 μ g de CHAPS, 50 mM de *buffer* HEPES/KOH (pH 7,4), 3 mM de glutatona reduzida e 30 mM de $MgCl_2$. Os ensaios foram realizados utilizando os substratos [^{14}C]-progesterona ou [3H]-17OH-progesterona nas concentrações de 3, 8, 15 e 30 μ M, em um volume final de reação de 200 μ L.

Nos ensaios do CYP3A4, 5 pmol de CYP3A4 purificados foram incubados com 10 pmol de POR selvagem ou POR A503V, separadamente, e com 10 pmol de citocromos b_5 purificados, em ambiente lipídico artificial contendo 10 μ g de um *mix* lipídico de três fosfolípidos [DLPC, 1,2-dioleoil-

sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DOPC), e 1,2-dilaúril-sn-glicero-3-fosfatidilserina (PS)] na razão 1:1:1, 10 μg de CHAPS e o mesmo *buffer* HEPES utilizado para o CYP2C19. Os ensaios foram realizados utilizando [^{14}C]-progesterona ou [^3H]-17OH-progesterona nas concentrações de 30, 60, 90 e 150 μM , em um volume total de reação de 200 μL .

As reações foram iniciadas após adição de 2 mM de NADPH, o período de incubação foi de 60 minutos a 37 °C, e as reações foram finalizadas após adição de 450 μL de acetato de etila/isooctana 1:1. Os esteróides foram extraídos e depositados em placas de TLC. A identificação dos esteróides produtos das reações foi realizada através da corrida concomitante de esteróides padrões marcados [^{14}C]-progesterona e [^3H]-17OH-progesterona, que foram identificados através de radiografias, e de esteróides não marcados como desoxicorticosterona, 11-desoxicortisol, 6 β -hidroxiprogesterona e 16 α -hidroxiprogesterona, que foram identificados através de luz ultra-violeta. As corridas de TLC sempre foram realizadas nos dois sistemas de solvente descritos para o P450c21, para confirmação da identidade dos esteróides. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos no mínimo três vezes. A conversão de [^{14}C]-progesterona para desoxicorticosterona e de [^3H]-17OH-progesterona para 11-desoxicortisol foi realizada pelo programa *phosphorimaging*.

O comportamento cinético de cada enzima, avaliado através dos cálculos do K_m , V_{max} e V_{max}/K_m , foram obtidos através de equações de Lineweaver-Burk utilizando-se *GraphPad Prism 3 software* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados dos citocromos

hepáticos foram comparados com os da P450c21, a fim de estimar a importância da atividade de 21-hidroxilação que esses citocromos podem exercer *in vivo*. Foram admitidos como 100% de atividade enzimática os resultados obtidos com a P450c21.

4.7 Sequenciamento do *CYP2C19*

Os 9 exons codificadores do gene *CYP2C19* e 3,8 kb da região reguladora proximal foram sequenciados nos 5 pacientes com genótipo de forma perdedora de sal e fenótipo de forma virilizante, e os polimorfismos encontrados foram comparados com os do grupo controle constituído por 40 indivíduos portadores da forma perdedora de sal com genótipo e fenótipo concordantes. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores flanqueando a região reguladora proximal e os exons 1 ao 9, incluindo pelo menos 50 pb das junções exon-intron, foram desenhados usando *University of California Santa Cruz Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu>) e usando o programa *Primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Tabela 4).

O PCR foi realizado utilizando uma mistura de 20:1 de *Taq DNA polimerase* (Promega, Madison, WI, USA) e *Pfu DNA polimerase* (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) 0,5:0,025 U/reação. A reação de amplificação das regiões reguladoras proximais P1, P2 e P4 (Tabela 4) foi realizada com protocolo de ciclagem em *touchdown*: 95 °C por 4 min, seguidos de 15 ciclos em *touchdown* de 95 °C por 30", 62 °C por 30" (decrecendo 0,5 °C a cada ciclo), e 72 °C por 45", seguidos por 35 ciclos de 95 °C por 30", 60 °C por 30",

e 72 °C por 45". A extensão final foi realizada a 72 °C por 7 min. As amplificações das regiões reguladoras proximais P3, P5 (Tabela 4) e dos exons 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9 foram realizadas conforme descrito acima, exceto que a temperatura de *annealing* começou a 60 °C, terminou a 53 °C após os 15 ciclos de *touchdown*, e persistiu a 53 °C nos 35 ciclos restantes. A amplificação da região reguladora P6 associada ao exon 1 (Tabela 4) foi realizada conforme as reações anteriores, exceto que a temperatura de *annealing* inicial do *touchdown* foi de 59 °C e final foi de 51 °C que persistiu nos demais ciclos, e para o exon 8 a temperatura de *annealing* começou com 64 °C e terminou a 57 °C. Todos os ciclos de PCR foram realizados em termociclador *Bio-Rad MyCycler* e *i-Cycler* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia). As amostras amplificadas foram verificadas em gel de agarose 1%.

Os produtos de PCR foram purificados através de pré-tratamento enzimático com *Exo SAP IT* (USB Corporation, Cleveland, OH, USA). Todos os produtos de PCR foram então submetidos à reação de sequenciamento automático, utilizando o *kit ABI Prism BigDye™ terminator* versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e os mesmos oligonucleotídeos iniciadores referidos na Tabela 4. Os produtos foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático de DNA e analisados através do *software ABI PRISM 3730 x 1 DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e do *software DNA Sequencer 5.2* (Gene Codes, Ann Harbor, MI, USA). Os resultados foram comparados com a respectiva sequência selvagem depositada no *UCSC Genome Browser* (http://genome.ucsc.edu_uc001k jy.1).

Tabela 4 - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (Oligos) para PCR e sequenciamento do *CYP2C19*

Nome dos Oligos	Tamanho do produto amplificado (pb)	Sequências de Oligos sense (5'-3')	Sequência de Oligos antissense (5'-3')
Promotor1 (P1)	866	GACCTTGATCTGGCAATGGT	TGCAGTGTTGGCATAGTTTTG
Promotor2 (P2)	847	CACACAAAAATCTGCACATGG	TGAGCAATTGTTGACTCAGTG
Promotor3 (P3)	723	TGTGGAGGGCTTAATGTTGA	TGCTGGTGCTAGAGCTGAGA
Promotor4 (P4)	755	CCTTCAAGATGCAGGGCTTA	AGGAAAACAGCCCCAGAGAT
Promotor5 (P5)	804	TCAAGCCCTTAGCACCAAAT	CCAATGCACCGTCATAATTG
Promotor6 / Exon1 (P6-E1)	1038	TGGCCATTTCCGTAAATCA	CTAAACCCACAGCTGCTTCC
Exon2 / Exon3 (E2-E3)	833	TTGTCTGACCATTGCCTTGA	TCTCAGCTTCAAACCCTGCT
Exon4 (E4)	641	AAGACAAATAGGCCGGGAAT	TCAGGGAGCTAATGGGCTTA
Exon5 (E5)	664	TCAGGTTGTGCAAACCTCTTTT	CAAGCATTACTCCTTGACCTG
Exon6 (E6)	616	TGACAAACCCACAGCCAATA	TCCTAGCCTCAATGGTCCAC
Exon7 (E7)	604	TTCATTTCTTCTGCCTTCC	CCCAAACCTGGAATCAACAGAA
Exon8 (E8)	602	GTCCCCGAAGTGTGATGTTC	TCTCCAAAACCCACTAATCTGG
Exon9 (E9)	615	TTGCCTATCCATCCATTCATC	TCAGCATTATGTGGCACTCA

Pb, pares de bases.

RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Dados clínicos e genéticos dos pacientes estudados

Dentre os 11 pacientes selecionados com genótipo *CYP21A2* incompleto, todos manifestaram sinais de hiperandrogenismo: pacientes 3, 7, 8, 11 apresentaram pubarca precoce e 7/11 são mulheres que manifestaram hirsutismo, acne e/ou irregularidade menstrual. As concentrações de 17OH-progesterona após estímulo com ACTH sintético foram bastante elevadas. Em nove pacientes, mutações no *CYP21A2* não foram identificadas em apenas 1 alelo e, em dois pacientes, mutações não foram identificadas em ambos os alelos (Tabela 5). Os pacientes 13/14 e 15/16 pertencem à mesma irmandade; portanto, no cálculo da frequência alélica, em cada par de irmandades foram considerados apenas 2 alelos.

Dentre os pacientes selecionados com genótipo/fenótipo discordantes, todos apresentaram fenótipo mais brando do que o predito pelo genótipo (Tabela 6). A Paciente nº 1, do grupo genótipo/fenótipo discordante, apresentava infertilidade, discreta clitoromegalia (2 cms) e foi diagnosticada por ser tia de pacientes com a forma virilizante simples e com genótipo I172N / IVS2 -2 A>G. Ela apresenta conversão de sequências do promotor proximal do pseudogene *in cis* com a mutação P30L (alelo associado à forma virilizante simples) em heterozigose composta com a mutação IVS2 -2 A>G, mutação que abole a atividade enzimática. Portanto, a paciente apresenta o fenótipo de forma não clássica, mas o seu genótipo prediz a forma virilizante simples.

O paciente n° 2, registrado no sexo masculino ao nascimento, possui cariótipo 46,XX e grau de virilização da genitália externa Prader V. Os pacientes n°s 3-6 possuem cariótipo 46,XY, iniciaram sinais de pseudopuberdade precoce (aumento peniano associado ou não à pubarca precoce), e nunca apresentaram crise de perda de sal. As concentrações de testosterona e androstenediona basais eram muito elevadas, e a ARP era normal ou elevada (Tabela 6). As concentrações de sódio e potássio sempre foram normais durante todo o tratamento. Portanto, esses pacientes apresentam fenótipo de forma virilizante simples, mas o genótipo prediz a forma perdedora de sal. As mutações presentes nestes cinco pacientes consistem em três deleções do gene ativo, uma mutação *frameshift* (F306 +1nt) e duas mutações *nonsense* (Q318X). Todas essas mutações codificam uma proteína truncada, sem atividade enzimática e estão associadas à forma perdedora de sal (40). Três alelos carregam a mutação *missense* R356W e um alelo a mutação R408C, ambas se associam clinicamente com a forma perdedora de sal (30). Estudos funcionais *in vitro* demonstram que ambas as mutações abolem a atividade de 21-hidroxilação tanto da progesterona quanto da 17OH-progesterona (41, 95, 96).

Tabela 5 – Dados clínicos e análise molecular dos genes *CYP21A2* e *POR* dos pacientes com a forma não clássica da deficiência da 21-hidroxilase e genótipo incompleto

<i>Paciente</i>	<i>Sexo</i>	<i>Quadro Clínico</i>	<i>17OHP Basal e Pós-ACTH (ng/mL)</i>	<i>Genótipo CYP21A2</i>	<i>Polimorfismo POR A503V</i>
1	F	H, A, IM	3,3 / 32	I172N / -	- / -
2	F	H, IM	3,2 / 26	- / -	A503V / -
3	M	Pubarca Precoce	5,7 / 36	V281L / -	- / -
4	F	H, IM	3,5 / 44	V281L / -	- / -
5	F	H	11 / 147	I2 / -	A503V / -
6	F	H, A, IM	1,1 / 30	- / -	- / -
7 ^a	F	Pubarca Precoce	50 / 83	V281L / -	A503V / A503V
8 ^a	F	Pubarca Precoce	59 / 84	V281L / -	A503V / A503V
9 ^b	F	H, A	17 / 27	V281L / -	A503V / -
10 ^b	F	H, A	18 / 22	V281L / -	A503V / -
11	F	Pubarca Precoce	6,9 / 65	V281L / -	- / -

- Mutação não identificada

^a irmandade 1; ^b irmandade 2.

F, feminino; M, masculino; H, hirsutismo; A, acne; IM, irregularidade menstrual;

Tabela 6 – Dados clínicos e análise molecular dos genes *CYP21A2*, *POR* e *CYP2C19* dos pacientes com a deficiência da 21-hidroxilase e genótipo/fenótipo discordantes

<i>Pacientes</i>	<i>Sexo Social/ Genético</i>	<i>IC / IO ao Diagnóstico (anos)</i>	<i>Fenótipo Predito/ Observado</i>	<i>17OHP Basal (ng/mL)</i>	<i>Testosterona (ng/dL)/ $\Delta 4$ (ng/mL)</i>	<i>Genótipo CYP21A2</i>	<i>Polimorfismo POR A503V</i>	<i>Haplótipo CYP2C19</i>
1	F / 46,XX	35	VS / NC	82,8	86 / 13,7	Grande Conversão / IVS2-2A>G	- / -	Não avaliada
2	M / 46,XX	4,5 / 11	PS / VS	305	720* / 19,9*	R356W / R356W	A503V / -	2C19*1 / 2C19*1
3	M / 46,XY	4,5 / 12,5	PS / VS	54,5	735 / 7,4	Del 21A2 / Q318X	A503V / -	2C19*1 / 2C19*1
4	M / 46,XY	5,3 / 11	PS / VS	193,9	510 / 3,7	Del 21A2 / Del 21A2	A503V / -	2C19*17 / 2C19*1
5	M / 46,XY	1 / -	PS / VS	240 / 153,3*	1.167* / 36,1*	R356W / Ins T, V281L	A503V / -	2C19*17 / 2C19*17
6	M / 46,XY	5 / 11,5	PS / VS	141,3	170 / 10	Q318X / R408C	A503V / -	2C19*1 / 2C19*1

*Dados hormonais dos pacientes n°s 2 e 5 foram obtidos aos 34 anos e 13 anos, respectivamente, sem tratamento de reposição hormonal.

F, feminino; M, masculino; IC, idade cronológica; IO, idade óssea; VS, virilizante simples; NC, não clássica; PS, perdedor de sal; Ins, inserção; Del, deleção; -, dado não disponível ou mutação não identificada.

5.2 Estudo do efeito modulador do gene *POR*

5.2.1 Frequência de polimorfismos no gene *POR*

O sequenciamento do gene *POR* nos 11 pacientes com genótipo incompleto e nos 6 pacientes com o fenótipo mais leve do que o predito pelo genótipo revelou um polimorfismo no exon 1U -47 A>C, e quatro polimorfismos sinônimos na região codificadora: 15 A>G (G5G) (rs10262966), 387 A>G (P129P) (rs1135612), 1455 C>T (A485A) (rs2228104), e 1716 G>A (S572S) (rs1057870). Esses polimorfismos já foram descritos nas populações Caucasiana e Afro-Americana (97), e o impacto desses polimorfismos sobre a esteroidogênese é desconhecido.

O único polimorfismo do *POR* que causa substituição de aminoácido é a variante A503V, que foi encontrada em 10 dos 30 alelos não relacionados analisados. Nos pacientes de genótipo incompleto, os pacientes n°s 2, 5 e a irmandade 9/10 são heterozigotos para a variante A503V e a irmandade 7/8 é homozigota (Tabela 5). A variante A503V foi identificada em heterozigose em todos os pacientes com genótipo/fenótipo discordantes, exceto no Paciente n° 1 (Tabela 6). Não houve diferença clínica, hormonal ou genética capaz de predizer os pacientes carreadores da *POR* selvagem ou com a variante A503V.

5.2.2 Efeito da variante *POR* A503V na atividade de 21-hidroilação pela P450c21

O efeito da variante *POR* A503V foi determinado através de ensaios enzimáticos *in vitro* que compararam a habilidade dessa variante *versus* da

POR selvagem em promover a atividade de 21-hidroxilação pela P450c21. Para esses ensaios foram reconstituídos a P450c21 humana com a POR selvagem e com a variante A503V, em ambiente lipídico artificial, e foi avaliada a conversão de [^{14}C]-progesterona em desoxicorticosterona e de [^3H]-17OH-progesterona em 11-desoxicortisol. O K_m da reação de 21-hidroxilação pela P450c21 recombinante humana com a POR selvagem para o substrato progesterona foi 2,7 μM , e para 17OH-progesterona foi 1,4 μM . Estes valores estão de acordo com os valores de 2,8 μM para progesterona e de 1,2 μM para 17OH-progesterona obtidos previamente em células COS1 expressando P450c21 (98), validando os dados bioquímicos do nosso estudo *in vitro*. Os parâmetros de cinética enzimática com o POR selvagem e com a variante A503V são essencialmente os mesmos: o V_{max}/K_m da 21-hidroxilação da progesterona e 17OH-progesterona obtidos com a variante A503V é de 80 e 95%, respectivamente, em relação aos do POR selvagem (Tabelas 7 e 8). Não existiu diferença na eficiência da 21-hidroxilação promovida pela POR selvagem ou POR A503V ($p = 0,873$ para ensaios com progesterona e $p = 0,836$ para ensaios com 17OH-progesterona) (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 - Comparação dos parâmetros cinéticos da 21-hidroxilação da progesterona pela P450c21 promovidas pela POR selvagem e POR A503V

Substrato: Progesterona			
	POR selvagem	POR A503V	Valor p
K_m (μM)	2,65 $\pm$ 0,37	2,47 $\pm$ 0,49	0,814
V_{max} (pmol/min/pmol P450)	0,26 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,07	0,330
V_{max}/K_m	0,1 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,01	0,873
V_{max}/K_m (% selvagem)	100%	80%	

Dados são a média $\pm$ 1 DP de no mínimo três experimentos independentes, realizados em duplicata. K_m , constante de Michaelis; V_{max} , velocidade máxima.

Tabela 8 - Comparação dos parâmetros cinéticos da 21-hidroxição da 17OH-progesterona pela P450c21 promovidas pela POR selvagem e POR A503V

Substrato: 17OHP			
	POR selvagem	POR A503V	Valor p
Km (μM)	1,43 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,17	0,836
Vmax (pmol/min/pmol P450)	0,28 $\pm$ 0,08	0,28 $\pm$ 0,09	0,965
Vmax/Km	0,2 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,05	0,836
Vmax/Km (% selvagem)	100%	95%	

Dados são a média $\pm$ 1 DP de no mínimo três experimentos independentes, realizados em duplicata. Km, constante de Michaelis; Vmax, velocidade máxima.

5.3 Efeito modulador da 21-hidroxição extra-adrenal

5.3.1 Efeito da 21-hidroxição da progesterona e 17OH-progesterona pelos citocromos hepáticos CYP2C19 e CYP3A4

A fim de determinar se a 21-hidroxição extra-adrenal realizada por citocromos hepáticos P450 pode ser um fator modulador do fenótipo na deficiência da 21-hidroxilase, a atividade de 21-hidroxição da progesterona e da 17OH-progesterona pelos CYP2C19 e CYP3A4 foi avaliada utilizando o mesmo sistema *in vitro* que o utilizado para as reações da P450c21, para que os resultados de parâmetros de cinética enzimática (Km, Vmax e Vmax/Km) pudessem ser comparáveis. Para esses ensaios foram reconstituídos a CYP2C19 e a CYP3A4 com a POR selvagem e com a variante POR A503V, em ambiente lipídico artificial, e foi avaliada a conversão de [^{14}C]-progesterona em desoxicorticosterona e de [^3H]-17OH-progesterona em 11-desoxicortisol. O Km e Vmax da 21-hidroxição da progesterona e 17OH-progesterona foram determinados para o CYP2C19 e CYP3A4, e comparados com os valores obtidos com a P450c21. O padrão

cinético dessas enzimas mostra um comportamento linear típico, mostrando que seguem a equação de Michaelis-Menten (Figura 12).

Figura 12. Análise da cinética da 21-hidroxilação da progesterona pelas enzimas P450c21, CYP2C19 e CYP3A4. Os painéis demonstram a curva de Lineweaver-Burk da atividade de conversão de progesterona em desoxicorticosterona pelas três enzimas P450c21 (A), CYP2C19 (B) e CYP3A4 (C), promovida pela POR selvagem e POR A503V. Os dados representam a média $\pm$ 1 DP de no mínimo três experimentos, cada um repetido em duplicata. Wt; selvagem.

O K_m do CYP2C19 para a progesterona foi de $10,8 \mu M$, e a desoxicorticosterona foi o único produto da reação enzimática observado por TLC (Figura 13). Entretanto, o K_m do CYP3A4 para a progesterona foi de $112 \mu M$, e os produtos predominantes da conversão foram 6β -hidroxiprogesterona e 16α -hidroxiprogesterona, ao invés de desoxicorticosterona (Figura 13). Comparados com a P450c21, a eficiência (V_{max}/K_m) da 21-hidroxilação da progesterona pelos CYP2C19 foi de 17% e pelo CYP3A4 foi de 10% (Tabela 9).

A atividade de 21-hidroxilação da $17OH$ -progesterona pelos citocromos CYP2C19 e CYP3A4 foi ausente. O estudo foi realizado em duplicata, e em no mínimo 3 experimentos independentes.

Figura 13. Análise através de TLC da atividade de 21-hidroxição da progesterona pelos CYP2C19 e CYP3A4. Quatro diferentes concentrações de [^{14}C] progesterona (Prog) foram utilizadas como substratos para cada enzima hepática. As identidades dos *spots* radioativos correspondentes à desoxicorticosterona (DOC) e aos outros metabólitos foram determinados por co-cromatografia com progesterona radiomarcada e com DOC, 6 β -OHProg e 16 α -OHProg não marcadas e localizadas por luz ultravioleta. DOC é o único produto resultante do metabolismo da Prog pelo CYP2C19. Os principais produtos resultantes do metabolismo da Prog pelo CYP3A4 são 6 β -OHProg e 16 α -OHProg, sendo DOC um produto menor. Prog, progesterona; Doc, desoxicorticosterona; 6 β -OHProg, 6 β -hidroxiprogesterona; 16 α -OHProg, 16 α -hidroxiprogesterona.

Tabela 9 - Comparação dos parâmetros cinéticos da 21-hidroxição da progesterona pelos CYP2C19 e CYP3A4 com os da P450c21, promovidos pela POR selvagem e pela variante A503V

	<i>POR selvagem</i>			<i>POR A503V</i>		
	Km (μM)	Vmax*	Vmax/Km (% P450c21)	Km (μM)	Vmax*	Vmax/Km (% PORwt)
P450c21	$2,65 \pm 0,37$	$0,26 \pm 0,06$	$0,1 \pm 0,03$ (100%)	$2,47 \pm 0,49$	$0,21 \pm 0,07$	$0,08 \pm 0,02$ (80%)
CYP2C19	$10,4 \pm 1,1$	$0,18 \pm 0,02$	$0,017 \pm 0,002$ (17%)	$15,4 \pm 3,5$	$0,21 \pm 0,06$	$0,013 \pm 0,003$ (76%)**
CYP3A4	$111,8 \pm 8,3$	$1,16 \pm 0,1$	$0,01 \pm 0,001$ (10%)	$107,6 \pm 5,5$	$1,25 \pm 0,4$	$0,012 \pm 0,004$ (120%)**

* Vmax em pmol/min/pmol P450. Km, constante de Michaelis; Vmax, velocidade máxima; wt; selvagem. ** Percentual de 76% e 120% são referentes a 21-hidroxição pelo CYP2C19 e CYP3A4, respectivamente, promovida pela POR A503V comparado com a atividade dos mesmos citocromos promovida pela POR selvagem, admitindo a atividade da POR selvagem como 100%.

5.3.2 Influência da variante POR A503V na atividade de 21-hidroxilação pelos CYP2C19 e CYP3A4

Como a variante A503V é muito comum, presente em aproximadamente 28% dos alelos normais da população Americana (avaliados caucasianos, negros, hispânicos e asiáticos) (97), o impacto dessa variante na 21-hidroxilação da progesterona pelos CYP2C19 e CYP3A4 também foi avaliado. Não houve diferença na atividade de 21-hidroxilação exercida por ambos citocromos, promovida pela POR selvagem ou com a variante A503V (Tabela 9).

5.3.3 Análise genética do CYP2C19 através da pesquisa de variantes alélicas

Considerando que uma atividade pequena de 21-hidroxilação da progesterona é suficiente para produzir quantidade de aldosterona que possa evitar perda de sal, hipotetizamos que a atividade do CYP2C19 poderia modular a produção de mineralocorticoide, especialmente nos pacientes que apresentam expressão aumentada dessa enzima.

O sequenciamento do CYP2C19 nos cinco pacientes de nossa casuística que nunca desidrataram, apesar de carregarem genótipo compatível com a forma perdedora de sal, revelou que o paciente 4 é heterozigoto e o paciente 5 é homozigoto para o haplótipo ultra-metabolizador CYP2C19*17 (Tabela 6). Este haplótipo consiste em duas substituições, -806 C>T e -3402 C>T na região promotora do gene, que aumentam a transcrição do mesmo em 2-4 vezes (86). A presença do

haplótipo CYP2C19*17 foi também avaliada em um grupo controle de pacientes portadores da forma perdedora de sal e com concordância genótipo/fenótipo. Observamos que 6 destes 40 pacientes são heterozigotos para esse haplótipo. Os 6 pacientes apresentaram crise de perda de sal no período neonatal e necessitaram de reposição de glicocorticóide e mineralocorticóide até a adolescência (idade que se encontram atualmente) ou idade adulta. Nenhum destes 40 pacientes controles apresentou homozigose para o alelo ultra-metabolizador CYP2C19*17.

DISCUSSÃO

6 Discussão

A boa correlação do genótipo com fenótipo na deficiência da 21-hidroxilase em nossa população, em torno de 95%, está de acordo com os dados de diversas populações (43, 44, 50, 51, 99). Encontramos apenas 17 pacientes com discordância genótipo/fenótipo dentre os 313 pacientes avaliados pelo estudo molecular: 11 pacientes com forma não clássica e genótipo *CYP21A2* incompleto, 5 pacientes com fenótipo de forma virilizante simples e genótipo predizendo a forma perdedora de sal e 1 paciente com fenótipo da forma não clássica e genótipo predizendo a forma virilizante simples. Nestes casos esporádicos de discordância genótipo/fenótipo especula-se a presença de fatores genéticos moduladores do fenótipo (71), no entanto, até iniciarmos o presente estudo não existiam evidências de quais fatores estariam implicados nesta modulação.

6.1 Efeito da POR como fator modulador do fenótipo na deficiência da 21-hidroxilase

A flavoproteína POR é um co-fator importante para atividade das enzimas P450s tipo II envolvidas na esteroidogênese, inclusive a P450c21, e foi demonstrado *in vitro* que mutações no gene *POR* podem tanto aumentar quanto reduzir a atividade das proteínas P450 tipo II (65, 69). Em 2007, descrevemos uma paciente com a forma perdedora de sal da deficiência da

21-hidroxilase que manifestava apenas pequena virilização da genitália externa e concentrações baixas de andrógenos. Essa paciente era carreadora da mutação A287P em heterozigose no gene *POR*, o que sugere um efeito modulador do *POR*, amenizando o fenótipo de virilização (53).

A análise do gene *POR*, na nossa população de pacientes com deficiência da 21-hidroxilase e genótipo e fenótipo discordantes, encontrou apenas a variante não sinônima A503V, presente em 10 dos 30 alelos não relacionados estudados. A variante do *POR* A503V é uma variante comum em diversos grupos étnicos, encontrada em 26,4% dos alelos nos Caucasianos, 19,1% dos alelos nos Afro-Americanos, 36,7% dos alelos nos Asiáticos e 31% dos alelos nos Hispânicos (97). Estudos *in vitro* demonstraram que a *POR* A503V diminui de forma significativa a atividade de 17 α -hidroxilação e de 17,20-liase do P450c17, para 68% e 58%, respectivamente (65). No entanto, no presente estudo não encontramos diferença na atividade de 21-hidroxilação da progesterona e 17OH-progesterona promovida pela *POR* selvagem ou pela *POR* A503V.

Essa capacidade de uma mesma mutação no *POR* alterar de forma diferente os diversos P450s, como diminuir a atividade da P450c17 e não alterar a atividade de P450c21, já foi descrita (67-69). A mutação A287P, a principal causa de deficiência da *POR* em Caucasianos, também diminui a eficiência catalítica da P450c17, enquanto mantém a eficiência da P450c21 próxima ao normal (67). Uma análise extensa das 35 variantes da *POR* descritas, incluindo mutações e polimorfismos, revela que algumas mutações apresentam diferenças dramáticas na sua capacidade de

promover a atividade catalítica da P450c17 e dos citocromos P450 hepáticos CYP1A2 e CYP2C19 (69). Essas diferenças na atividade das mutações no POR devem-se principalmente a alterações conformacionais na proteína, que geram efeito diverso na interação POR com as diferentes P450s (68). Essas observações podem explicar a variabilidade fenotípica encontrada na deficiência da POR, e indicam que cada mutação da POR deve ser testada separadamente *in vitro* com cada P450 de interesse.

Embora nosso estudo não tenha encontrado mutações no gene *POR* que possam explicar discordâncias entre genótipo e fenótipo, nossa casuística de casos discordantes é pequena, e consiste de uma população específica. O gene *POR* é substancialmente mais polimórfico do que a maioria dos outros genes humanos, e algumas das variantes são mais comuns em determinados grupos étnicos (97). Portanto, não podemos excluir que outras variantes do gene *POR* possam modular o fenótipo da deficiência da 21-hidroxilase em outras populações.

6.2 Efeito modulador da 21-hidroxilação extra-adrenal pelos citocromos CYP2C19 e CYP3A4

A atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal da progesterona foi bem documentada em vários tecidos fetais humanos *in vitro* (72). Adicionalmente, a 21-hidroxilação extra-adrenal *in vivo* foi demonstrada principalmente no período gestacional (100). O aumento dramático da

produção de desoxicorticosterona na gestação, mesmo em mulheres adrenalectomizadas, sugere a conversão das elevadas concentrações de progesterona de origem placentária em desoxicorticosterona nos tecidos extra-adrenais (100). Entretanto, essa 21-hidroxição extra-adrenal não é catalizada pela 21-hidroxilase adrenal, P450c21, uma vez que seu RNAm não foi detectado nos tecidos extra-adrenais que sabidamente realizam a 21-hidroxição (73). Portanto, outras enzimas estão envolvidas nesta atividade extra-adrenal, provavelmente, as enzimas P450 hepáticas.

O fígado contém cerca de 15 enzimas P450 metabolizadoras da maioria das drogas que utilizamos na prática clínica, sendo que já foi demonstrado que os citocromos CYP2C19 e CYP3A4 também metabolizam progesterona *in vitro* (75), e um dos produtos finais desse metabolismo é a desoxicorticosterona. Entretanto, esta atividade nunca foi avaliada em comparação com a atividade da P450c21 adrenal. Além disso, existe uma grande diferença interindividual na expressão e na atividade desses citocromos P450 hepáticos (77), por conseguinte, se a 21-hidroxição extra-adrenal for catalizada por esses citocromos, é possível que essas diferenças interindividuais justifiquem as variações no metabolismo de aldosterona e cortisol, encontradas em alguns pacientes com deficiência de 21-hidroxilase.

O nosso estudo avaliou a capacidade de 21-hidroxição dos citocromos CYP2C19 e CYP3A4 comparada com a P450c21, em um mesmo sistema *in vitro*, e encontramos que esses citocromos CYP2C19 e CYP3A4 são capazes de realizar a 21-hidroxição da progesterona com uma eficiência catalítica de 17% e 10%, respectivamente, da eficiência da

P450c21. Adicionalmente, o único produto da 21-hidroxilação da progesterona pelo CYP2C19 foi a desoxicorticosterona, enquanto que pelo CYP3A4, embora tenha se notado produção de desoxicorticosterona em menor quantidade, também foram formados outros produtos. Ambos os citocromos hepáticos não foram capazes de 21-hidroxilar a 17OH-progesterona. Como a adrenal secreta 100-1.000 vezes menor quantidade de aldosterona em relação ao cortisol (37), mesmo baixas taxas de 21-hidroxilação da progesterona podem ser suficientes para manter o balanço de sal. O maior exemplo desta hipótese está nas mutações amplamente conhecidas do gene *CYP21A2*: a variante I172N é uma das mutações mais frequentemente encontradas na forma virilizante simples da deficiência da 21-hidroxilase, e apresenta uma atividade de 21-hidroxilação residual de apenas 2-7% (95), logo, apenas uma pequena capacidade de 21-hidroxilação da progesterona é suficiente para se evitar a perda de sal.

Concluimos, com os nossos estudos funcionais, que a 21-hidroxilação extra-adrenal da progesterona pelos CYP2C19 e CYP3A4 podem melhorar a deficiência de mineralocorticóide em pacientes com a deficiência da 21-hidroxilase, mas não a de glicocorticóide.

É importante ressaltar que a expressão do CYP2C19 geralmente é pequena ao nascimento (cerca de 15% da expressão máxima) e aumenta progressivamente até os 10 anos de idade, quando alcança a expressão máxima (81). Por sua vez, a expressão do CYP3A4 também é baixa ao nascimento e aumenta progressivamente, só atingindo níveis máximos na idade adulta (88). Porém, ambos citocromos apresentam grande variabilidade

interindividual na sua expressão na vida pós-natal (81, 88), a qual pode ser explicada pela presença de variantes alélicas. Dessa forma, a 21-hidroxição extra-adrenal pelos CYP2C19 e CYP3A4 normalmente não devem prevenir a típica crise de perda de sal dos recém-nascidos com a forma perdedora de sal, porém considerando que a expressão destes aumenta ao longo da vida poderiam explicar a redução da dose diária de mineralocorticóide com o avançar da idade frequentemente observada no tratamento da deficiência da 21-hidroxilase. Além disso, hipotetizamos que a presença de variantes alélicas ultra-metabolizadoras poderia causar hiperexpressão desses citocromos e prevenir a crise de desidratação neonatal em pacientes portadores de mutações que abolem a atividade enzimática.

O *CYP2C19* é extremamente polimórfico, e seus haplótipos estão relacionados ao aumento e diminuição do metabolismo de várias drogas utilizadas na prática clínica. Avaliamos se os pacientes que apresentam genótipo de perda de sal e não perderam sal carregam haplótipos do CYP2C19 ultra-metabolizadores, ou seja, que tenham maior atividade de 21-hidroxição de progesterona em desoxicorticosterona. Encontramos entre os nossos cinco pacientes, 1 paciente heterozigoto e 1 paciente homozigoto para o haplótipo ultra-metabolizador CYP2C19*17. Esse haplótipo caracteriza-se por duas substituições na região promotora (-806 C>T e -3402 C>T) que aumentam a afinidade com os fatores de transcrição, e levam ao aumento da expressão gênica (86). A frequência desse alelo avaliada na população normal de Caucasianos e de Etíopes é de 18% (86). Estudos *in vivo* que avaliaram o metabolismo de omeprazol e mefenitoína em ambas as

populações, demonstraram que indivíduos homozigotos para o alelo CYP2C19*17 têm um aumento da metabolização dessas drogas em 2-4 vezes, quando comparados com os homozigotos para o alelo selvagem CYP2C19 *1 (86). Os heterozigotos apresentaram um ganho de função intermediário. No nosso estudo, encontramos 6 indivíduos heterozigotos para o alelo CYP2C19*17 entre os 40 pacientes controles, perdedores de sal com genótipo e fenótipo concordantes, indicando que a heterozigose para o CYP2C19*17 é insuficiente para modular a perda de sal em pacientes com deficiência da 21-hidroxilase. Uma vez que não encontramos indivíduos homozigotos para este haplótipo em nossa casuística de pacientes controles, sugerimos que apenas o alelo CYP2C19*17 em homozigose possa ter efeito modulador no fenótipo da perda de sal. No entanto, é necessário ampliar a casuística empregando-se estudos multicêntricos.

O CYP3A4 é o citocromo P450 mais abundante do fígado e metaboliza 40-45% das drogas utilizadas atualmente (79). Os ensaios de atividade de 21-hidroxilação demonstraram que o CYP3A4 tem uma baixa afinidade pela progesterona ($K_m \sim 110 \mu M$), mas tem o V_{max} mais alto do que a P450c21, então a sua eficiência catalítica (V_{max}/K_m) foi aproximadamente 10% da P450c21. Portanto, a mais abundante de todas as P450s hepáticas aparentemente também pode contribuir para 21-hidroxilação extra-adrenal. Embora o CYP3A4 não apresente polimorfismos que alterem sua atividade catalítica (101), existe uma substancial variação na sua expressão (102). Essa variação pode estar associada à modulação

por polimorfismos nos seus fatores de transcrição como *PXR*, *CAR* e *HNF4-alfa*, ou às variações em seu principal co-fator, a *POR*.

As variações na *POR* podem afetar diferentemente a atividade enzimática dos citocromos P450 hepáticos (69). Nosso estudo mostrou que a variante A503V não altera a capacidade de 21-hidroxilação da progesterona pelos citocromos CYP2C19 e CYP3A4, não representando um fator modulador da atividade de 21-hidroxilação dos citocromos hepáticos.

6.3 Efeito modulador do fenótipo na deficiência da 21-hidroxilase – considerações finais

Este é um estudo pioneiro que avaliou o papel da proteína P450 óxido-redutase e dos principais citocromos hepáticos P450s tipo II como fatores moduladores do fenótipo na deficiência da 21-hidroxilase. Descartamos que o polimorfismo mais frequente do *POR*, a variante A503V, tenha papel na modulação do fenótipo na deficiência da 21-hidroxilase. No entanto, esse achado não exclui a possibilidade de que outras variantes do *POR*, em diferentes grupos étnicos, tenham um papel relevante como fator modulador.

Demonstramos pela primeira vez na literatura que os CYP2C19 e CYP3A4 apresentam importante atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal da progesterona, e conseqüentemente podem modular o fenótipo de perda de sal da deficiência da 21-hidroxilase *in vivo*. Identificamos o

provável efeito modulador da variante alélica CYP2C19*17 em homozigose melhorando o fenótipo da forma perdedora de sal. No entanto, alguns casos ainda permanecem com indefinição do genótipo, sugerindo a presença de outras enzimas modulando o fenótipo desses pacientes.

Provavelmente, a atividade de 21-hidroxilação extra-adrenal não representa a atividade de apenas uma enzima, mas provavelmente a interação de múltiplas enzimas com expressões variáveis. A identificação desses fatores genéticos nos ajudará a compreender melhor a fisiopatologia da doença e a otimizar o tratamento.

CONCLUSÕES

7 Conclusões

Após avaliação da nossa casuística de pacientes com a deficiência da 21-hidroxilase que apresentaram discordância na correlação genótipo/fenótipo, e da realização de estudos funcionais *in vitro* buscando identificar fatores moduladores capazes de justificar essa discordância, concluímos que:

- A única variação presente no gene *POR* foi o polimorfismo A503V, com prevalência de 33% dos alelos não relacionados, compatível com a incidência mundial de 28%.
- Apesar do polimorfismo A503V do gene *POR* diminuir a atividade da P450c17 *in vitro*, não observamos que este altera a atividade de 21-hidroxilação da P450c21.
- Não encontramos variações no *POR* que justifiquem a discordância genótipo/fenótipo na deficiência da 21-hidroxilase na nossa casuística de pacientes com as formas clássica e não clássica.
- Os citocromos P450 hepáticos CYP2C19 e CYP3A4 são capazes de realizar significativa 21-hidroxilação da progesterona *in vitro* em comparação com a P450c21, mas não realizam 21-hidroxilação da 17OH-progesterona.
- A variante A503V do gene *POR* não altera a capacidade de 21-hidroxilação da progesterona realizada pelos citocromos CYP2C19 e CYP3A4.

- Heterozigose para o haplótipo ultra-metabolizador do CYP2C19 não é suficiente para modular o fenótipo da perda de sal em pacientes com deficiência da 21-hidroxilase.
- Relatamos o primeiro caso de paciente com genótipo de forma perdedora de sal e com fenótipo de forma virilizante simples que apresenta o haplótipo ultra-metabolizador do CYP2C19 em homozigose, com potencial efeito modulador do fenótipo da perda de sal.

REFERÊNCIAS

8 Referências

1. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 1988;9(3):295-318.
2. Bose HS, Sugawara T, Strauss JF, 3rd, Miller WL. The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia. *International Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia Consortium. N Engl J Med* 1996;335(25):1870-8.
3. Miller WL. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* 2005;146(6):2544-50.
4. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2003;349(8):776-88.
5. Bongiovanni AM, Root AW. The adrenogenital syndrome. *N Engl J Med* 1963;268:1283-9 contd.
6. New MI, White PC, Pang S, Dupont B, Speiser PW. The adrenal hyperplasia. 6th ed. New York: Mc Graw-Hill; 1989.
7. Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 1988;81(6):866-74.
8. Therrell BL, Jr., Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmank J, Korman K, Prentice L, et al. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* 1998;101(4 Pt 1):583-90.
9. Silveira EL, dos SE, Bachega TA, van der Linden Nader I, Gross JL, Elnecave RH. The actual incidence of congenital adrenal hyperplasia in Brazil may not be as high as inferred--an estimate based on a public neonatal screening program in the state of Goias. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2008;21(5):455-60.
10. D'Alva CB, Nakamura IT, Mazi CR, Tomas E, Moreira M, Abrão M, et al. Valores de TSH, T4 e 17OHP neonatais determinados por método

fluorométrico em recém-nascidos brasileiros normais. *Rev Med Minas Gerais* 2003;13:77.

11. New MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(11):4205-14.
12. Grumbach MM, Ducharme JR. The effects of androgens on fetal sexual development: androgen-induced female pseudohermaphrodism. *Fertil Steril* 1960;11:157-80.
13. Miller WL. Clinical review 54: Genetics, diagnosis, and management of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(2):241-6.
14. White PC, New MI, Dupont B. Congenital adrenal hyperplasia. (1). *N Engl J Med* 1987;316(24):1519-24.
15. Whitehead FJ, Couper RT, Moore L, Bourne AJ, Byard RW. Dehydration deaths in infants and young children. *Am J Forensic Med Pathol* 1996;17(1):73-8.
16. Bachega TA, Madureira G, Brenilha EML, Ueti RC, Inácio M, Denis FT, et al. Tratamento da hiperplasia supra-renal congênita por deficiência da 21-hidroxilase. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2001;45:64-72.
17. Miller WL, Levine LS. Molecular and clinical advances in congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr* 1987;111(1):1-17.
18. Giacaglia LR, Mendonca BB, Madureira G, Melo KF, Suslik CA, Arnhold IJ, et al. Adrenal nodules in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: regression after adequate hormonal control. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14(4):415-9.
19. Bachega TA, Billerbeck AE, Parente EB, Lemos-Marini SH, Baptista MT, Mello MP, et al. [Multicentric study of Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency: a genotype-phenotype correlation]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004;48(5):697-704.

20. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, et al. Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57(2):320-6.
21. Rodrigues NR, Dunham I, Yu CY, Carroll MC, Porter RR, Campbell RD. Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *Embo J* 1987;6(6):1653-61.
22. 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 U S A* 1986;83(9):2841-5.
23. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(14):5111-5.
24. Bristow J, Gitelman SE, Tee MK, Staels B, Miller WL. Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A "pseudogene". *J Biol Chem* 1993;268(17):12919-24.
25. Chang SF, Chung BC. Difference in transcriptional activity of two homologous CYP21A genes. *Mol Endocrinol* 1995;9(10):1330-6.
26. Gitelman SE, Bristow J, Miller WL. Mechanism and consequences of the duplication of the human C4/P450c21/gene X locus. *Mol Cell Biol* 1992;12(5):2124-34.
27. Shen L, Wu LC, Sanlioglu S, Chen R, Mendoza AR, Dangel AW, et al. Structure and genetics of the partially duplicated gene RP located immediately upstream of the complement C4A and the C4B genes in the HLA class III region. Molecular cloning, exon-intron structure, composite retroposon, and breakpoint of gene duplication. *J Biol Chem* 1994;269(11):8466-76.
28. Yu CY. The complete exon-intron structure of a human complement component C4A gene. DNA sequences, polymorphism, and linkage to the 21-hydroxylase gene. *J Immunol* 1991;146(3):1057-66.

29. Bristow J, Tee MK, Gitelman SE, Mellon SH, Miller WL. Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *J Cell Biol* 1993;122(1):265-78.
30. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000;21(3):245-91.
31. White PC, New MI, Dupont B. HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(23):7505-9.
32. White PC, Vitek A, Dupont B, New MI. Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(12):4436-40.
33. Donohoue PA, van Dop C, McLean RH, White PC, Jospe N, Migeon CJ. Gene conversion in salt-losing congenital adrenal hyperplasia with absent complement C4B protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62(5):995-1002.
34. Araujo RS, Billerbeck AE, Madureira G, Mendonca BB, Bachega TASS. Substitutions in the CYP21A2 promoter explain the simple-virilizing form of 21-hydroxylase deficiency in patients harbouring a P30L mutation. *Clin Endocrinol* 2005;62(2):132-6.
35. L'Allemand D, Tardy V, Gruters A, Schnabel D, Krude H, Morel Y. How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP 21 genomic region can have a nonclassic form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(12):4562-7.
36. Forest MG. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Reprod Update* 2004;10(6):469-85.
37. Morel Y, Miller WL. Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Adv Hum Genet* 1991;20:1-68.
38. Miller WL. Gene conversions, deletions, and polymorphisms in congenital adrenal hyperplasia. *Am J Hum Genet* 1988;42(1):4-7.

39. Wedell A, Thilen A, Ritzen 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(5):1145-52.
40. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1992;90(2):584-95.
41. Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T, et al. Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biochem* 1991;109(4):638-44.
42. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, et al. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(12):4416-9.
43. Jaaskelainen J, Levo A, Voutilainen R, Partanen J. Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency: good correlation in a well defined population. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(10):3293-7.
44. 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(3):1059-65.
45. Balsamo A, Cacciari E, Baldazzi L, Tartaglia L, Cassio A, Mantovani V, et al. CYP21 analysis and phenotype/genotype relationship in the screened population of the Italian Emilia-Romagna region. *Clin Endocrinol* 2000;53(1):117-25.
46. Friaes A, Rego AT, Aragues JM, Moura LF, Mirante A, Mascarenhas MR, et al. CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and

- characterization of four different partial gene conversions. *Mol Genet Metab* 2006;88(1):58-65.
47. Loidi L, Quinteiro C, Parajes S, Barreiro J, Leston DG, Cabezas-Agricola JM, et al. High variability in CYP21A2 mutated alleles in Spanish 21-hydroxylase deficiency patients, six novel mutations and a founder effect. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64(3):330-6.
 48. Araujo RS, Mendonca BB, Barbosa AS, Lin CJ, Marcondes JA, Billerbeck AE, et al. Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(10):4028-34.
 49. Wijesuriya SD, Zhang G, Dardis A, Miller WL. Transcriptional regulatory elements of the human gene for cytochrome P450c21 (steroid 21-hydroxylase) lie within intron 35 of the linked C4B gene. *J Biol Chem* 1999;274(53):38097-106.
 50. Dolzan V, Solyom J, Fekete G, Kovacs J, Rakosnikova V, Votava F, et al. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2005;153(1):99-106.
 51. Stikkelbroeck NM, Hoefsloot LH, de Wijs IJ, Otten BJ, Hermus AR, Siskerman EA. CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(8):3852-9.
 52. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Arnhold IJ, Medeiros MA, Marcondes JA, et al. Low frequency of CYP2B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Hered* 1999;49(1):9-14.
 53. Scott RR, Gomes LG, Huang N, Van Vliet G, Miller WL. Apparent manifesting heterozygosity in P450 oxidoreductase deficiency and its effect on coexisting 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(6):2318-22.

54. O'Leary KA, Beck TW, Kasper CB. NADPH cytochrome P-450 oxidoreductase gene: identification and characterization of the promoter region. *Arch Biochem Biophys* 1994;310(2):452-9.
55. Miller WL, Huang N, Pandey AV, Fluck CE, Agrawal V. P450 oxidoreductase deficiency: a new disorder of steroidogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1061:100-8.
56. Scott RR, Miller WL. Genetic and clinical features of p450 oxidoreductase deficiency. *Horm Res* 2008;69(5):266-75.
57. Peterson RE, Imperato-McGinley J, Gautier T, Shackleton C. Male pseudohermaphroditism due to multiple defects in steroid-biosynthetic microsomal mixed-function oxidases. A new variant of congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 1985;313(19):1182-91.
58. Miller WL. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 1987;317(22):1413-5.
59. Otto DM, Henderson CJ, Carrie D, Davey M, Gundersen TE, Blomhoff R, et al. Identification of novel roles of the cytochrome p450 system in early embryogenesis: effects on vasculogenesis and retinoic Acid homeostasis. *Mol Cell Biol* 2003;23(17):6103-16.
60. Shen AL, O'Leary KA, Kasper CB. Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *J Biol Chem* 2002;277(8):6536-41.
61. Fluck CE, Tajima T, Pandey AV, Arlt W, Okuhara K, Verge CF, et al. Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. *Nat Genet* 2004;36(3):228-30.
62. Antley R, Bixler D. Trapezoidocephaly, midfacial hypoplasia and cartilage abnormalities with multiple synostoses and skeletal fractures. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1975;11(2):397-401.
63. Arlt W, Walker EA, Draper N, Ivison HE, Ride JP, Hammer F, et al. Congenital adrenal hyperplasia caused by mutant P450 oxidoreductase and human androgen synthesis: analytical study. *Lancet* 2004;363(9427):2128-35.

64. Adachi M, Tachibana K, Asakura Y, Yamamoto T, Hanaki K, Oka A. Compound heterozygous mutations of cytochrome P450 oxidoreductase gene (POR) in two patients with Antley-Bixler syndrome. *Am J Med Genet A* 2004;128(4):333-9.
65. Huang N, Pandey AV, Agrawal V, Reardon W, Lapunzina PD, Mowat D, et al. Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *Am J Hum Genet* 2005;76(5):729-49.
66. Fukami M, Hasegawa T, Horikawa R, Ohashi T, Nishimura G, Homma K, et al. Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in three patients initially regarded as having 21-hydroxylase deficiency and/or aromatase deficiency: diagnostic value of urine steroid hormone analysis. *Pediatr Res* 2006;59(2):276-80.
67. Dhir V, Ivison HE, Krone N, Shackleton CH, Doherty AJ, Stewart PM, et al. Differential inhibition of CYP17A1 and CYP21A2 activities by the P450 oxidoreductase mutant A287P. *Mol Endocrinol* 2007;21(8):1958-68.
68. Pandey AV, Kempna P, Hofer G, Mullis PE, Fluck CE. Modulation of human CYP19A1 activity by mutant NADPH P450 oxidoreductase. *Mol Endocrinol* 2007;21(10):2579-95.
69. Agrawal V, Huang N, Miller WL. Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: effect of sequence variants on activities of CYP11A2 and CYP21A2. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18(7):569-76.
70. HersHKovitz E, Parvari R, Wudy SA, Hartmann MF, Gomes LG, Loewental N, et al. Homozygous Mutation G539R in the Gene for P450 Oxidoreductase in a Family Previously Diagnosed as Having 17,20-Lyase Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(9):3584-8.
71. Speiser PW, Agdere L, Ueshiba H, White PC, New MI. Aldosterone synthesis in salt-wasting congenital adrenal hyperplasia with complete absence of adrenal 21-hydroxylase. *N Engl J Med* 1991;324(3):145-9.

72. Casey ML, Winkel CA, MacDonald PC. Conversion of progesterone to deoxycorticosterone in the human fetus: steroid 21-hydroxylase activity in fetal tissues. *J Steroid Biochem* 1983;18(4):449-52.
73. Mellon SH, Miller WL. Extraadrenal steroid 21-hydroxylation is not mediated by P450c21. *J Clin Invest* 1989;84(5):1497-502.
74. Kishimoto W, Hiroi T, Shiraishi M, Osada M, Imaoka S, Kominami S, et al. Cytochrome P450 2D catalyze steroid 21-hydroxylation in the brain. *Endocrinology* 2004;145(2):699-705.
75. Yamazaki H, Shimada T. Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1997;346(1):161-9.
76. Niwa T, Hiroi T, Tsuzuki D, Yamamoto S, Narimatsu S, Fukuda T, et al. Effect of genetic polymorphism on the metabolism of endogenous neuroactive substances, progesterone and p-tyramine, catalyzed by CYP2D6. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;129(1-2):117-23.
77. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2007;116(3):496-526.
78. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002;360(9340):1155-62.
79. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(4):193-200.
80. Xie HG, Kim RB, Wood AJ, Stein CM. Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:815-50.
81. Koukouritaki SB, Manro JR, Marsh SA, Stevens JC, Rettie AE, McCarver DG, et al. Developmental expression of human hepatic CYP2C9 and CYP2C19. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308(3):965-74.

82. Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* 2002;41(12):913-58.
83. Nakamura K, Goto F, Ray WA, McAllister CB, Jacqz E, Wilkinson GR, et al. Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin Pharmacol Ther* 1985;38(4):402-8.
84. Klotz U. Clinical impact of CYP2C19 polymorphism on the action of proton pump inhibitors: a review of a special problem. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2006;44(7):297-302.
85. Furuta T, Sagehashi Y, Shirai N, Sugimoto M, Nakamura A, Kodaira M, et al. Influence of CYP2C19 polymorphism and *Helicobacter pylori* genotype determined from gastric tissue samples on response to triple therapy for *H pylori* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3(6):564-73.
86. Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther* 2006;79(1):103-13.
87. Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmoller J, Hustert E, Burk O, et al. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos* 2002;30(10):1108-14.
88. Stevens JC, Hines RN, Gu C, Koukouritaki SB, Manro JR, Tandler PJ, et al. Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307(2):573-82.
89. Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:389-430.
90. Bachega TA, Brenha EM, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ, et al. Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(2):786-90.

91. Billerbeck AE, Bachega TASS, Frazatto ET, Nishi MY, Goldberg AC, Marin ML, et al. A novel missense mutation, GLY424SER, in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(8):2870-2.
92. Pandey AV, Miller WL. Regulation of 17,20 lyase activity by cytochrome b5 and by serine phosphorylation of P450c17. *J Biol Chem* 2005;280(14):13265-71.
93. Omura T, Sato R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment Of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, And Properties. *J Biol Chem* 1964;239:2379-85.
94. Dardis A, Miller WL. Dexamethasone does not exert direct intracellular feedback on steroidogenesis in human adrenal NCI-H295A cells. *J Endocrinol* 2003;179(1):131-42.
95. 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(6):3549-52.
96. Soardi FC, Barbaro M, Lau IF, Lemos-Marini SH, Baptista MT, Guerra-Junior G, et al. Inhibition of CYP21A2 enzyme activity caused by novel missense mutations identified in Brazilian and Scandinavian patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(6):2416-20.
97. Huang N, Agrawal V, Giacomini K, Miller WL. Genetics of P450 oxidoreductase: Sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:1733-1738.
98. 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(34):20916-22.
99. Wilson RC, Nimkarn S, Domic M, Obeid J, Azar M, Najmabadi H, et al. Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 2007;90(4):414-21.

100. Winkel CA, Milewich L, Parker CR, Jr., Gant NF, Simpson ER, MacDonald PC. Conversion of plasma progesterone to deoxycorticosterone in men, nonpregnant and pregnant women, and adrenalectomized subjects. *J Clin Invest* 1980;66(4):803-12.
101. Mizutani T. PM frequencies of major CYPs in Asians and Caucasians. *Drug Metab Rev* 2003;35(2-3):99-106.
102. Hirth J, Watkins PB, Strawderman M, Schott A, Bruno R, Baker LH. The effect of an individual's cytochrome CYP3A4 activity on docetaxel clearance. *Clin Cancer Res* 2000;6(4):1255-8.

APÊNDICE

Apparent Manifesting Heterozygosity in P450 Oxidoreductase Deficiency and Its Effect on Coexisting 21-Hydroxylase Deficiency

Rachel R. Scott,* Larissa G. Gomes,* Ningwu Huang, Guy Van Vliet, and Walter L. Miller

Division of Endocrinology (R.R.S., L.G.G., N.H., W.L.M.), Department of Pediatrics, University of California, San Francisco, San Francisco, California 94143; and Endocrinology Service and Research Center (R.R.S., G.V.V.), Sainte-Justine Hospital, and Department of Pediatrics, University of Montreal, Montreal, Canada H3T 1C5

Context: P450 oxidoreductase (POR) deficiency is a disorder of steroidogenesis affecting the microsomal P450 enzymes that use POR as an electron donor. The clinical presentation is variable; patients can be asymptomatic or can present with genital anomalies and the Antley-Bixler syndrome, characterized by craniosynostosis and other bony anomalies. Obligately heterozygous parents are normal. Combined POR and 21-hydroxylase deficiencies have not been reported.

Objective: The aim was to explore the manifestations of combined deficiencies of 21-hydroxylase and POR and to search for lesions in apparent manifesting POR heterozygotes.

Patients and Methods: A newborn female had craniosynostosis, severe salt wasting, minimal virilization, grossly elevated 17OH-progesterone, and minimally elevated androgens. DNA encoding 21-hydroxylase, POR, and fibroblast growth factor receptor 2 was sequenced. For POR, the first untranslated exon (exon 1U), 5' flanking

DNA, and most introns were sequenced in five apparent manifesting POR heterozygotes.

Results: CYP21B mutations were found on both alleles, proving classical 21-hydroxylase deficiency. Fibroblast growth factor receptor 2 exons 8 and 10 were normal. A POR mutation, A287P, was found only on the maternal allele. Five previously reported patients had POR mutations found on only one allele, but their clinical characteristics were indistinguishable from patients with mutations on both alleles. Sequencing of exon 1U, 274 bp of POR 5' flanking DNA, and 12 of the 15 POR introns did not identify additional mutations affecting gene expression or splicing.

Conclusion: Manifesting heterozygosity is a possible feature of POR deficiency and may ameliorate the findings in coexisting 21-hydroxylase deficiency. (*J Clin Endocrinol Metab* 92: 2318–2322, 2007)

P450 OXIDOREDUCTASE (POR) deficiency is a newly described autosomal recessive disorder of steroidogenesis (1–3). POR is the flavoprotein that transfers electrons from nicotinamide adenine dinucleotide phosphate to all 50 microsomal cytochrome P450 enzymes (4). A disorder of steroidogenesis that resembled combined deficiencies of 17 α -hydroxylase, 17,20 lyase, and 21-hydroxylase was first reported in 1985 (5), and similar patients were reported subsequently (reviewed in Refs. 3 and 6). Despite the early suggestion that this disorder might be caused by mutations in POR (7), the lethality of POR gene ablation in mice (8, 9) implied that human POR mutations would be disastrous. Nevertheless, Flück *et al.* (1) reported four patients with POR mutations in early 2004, and subsequent reports have documented at least 41 such patients (1, 2, 6, 10–12). The rapid discovery of so many patients and the observation that POR mutations may cause mild disease without skeletal anomalies (1, 6) suggest that POR deficiency may not be rare, but its diagnosis remains difficult because of the complex pattern

of disordered plasma steroids and their urinary metabolites resulting from incomplete interruption of several steps in steroidogenesis.

POR deficiency manifests with and without skeletal anomalies. Most patients described to date have had a congenital malformation disorder termed Antley-Bixler syndrome (ABS), which is characterized by craniosynostosis, radio-ulnar or radio-humeral synostosis, bowed femora, and other skeletal anomalies (13, 14). The craniosynostosis of ABS resembles that of Apert, Crouzon, Pfeiffer, and Jackson-Weiss syndromes. Work in the mid-1990s showed that these craniosynostosis syndromes were caused by dominant, gain-of-function mutations in exons 8 and 10 of the gene for fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) (reviewed in Refs. 3 and 6). Initial work identified similar (or identical) FGFR2 mutations in some patients with ABS (15), but other patients with ABS had no mutations in FGFR2 (15). ABS patients harboring FGFR2 mutations have normal genitalia, whereas those who also have genital anomalies and/or an abnormal pattern of urinary steroids lack FGFR2 mutations (15). Analysis of the FGFR2 and POR genes in a large group of ABS patients established that the same skeletal malformation syndrome may result from either dominant FGFR2 mutations or recessive POR mutations, and that all ABS patients with genital anomalies or disordered steroidogenesis had POR mutations (6).

POR is required for the activity of three steroidogenic enzymes: P450c17, which catalyzes 17 α -hydroxylase and

First Published Online March 27, 2007

* R.R.S. and L.G.G. contributed equally to this work.

Abbreviations: ABS, Antley-Bixler syndrome; DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEAS, DHEA sulfate; FGFR2, fibroblast growth factor receptor 2; 17OHP, 17OH-progesterone; POR, P450 oxidoreductase; SNP, single nucleotide polymorphism.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

17,20 lyase activities; P450c21, the adrenal 21-hydroxylase; and P450aro, which aromatizes androgens to estrogens. Thus, POR deficiency affects multiple steps in steroidogenesis (Fig. 1). Furthermore, most POR lesions retain partial activity, so that these enzymatic steps may be incompletely blocked. Therefore, the array of disordered steroids seen in blood and urine can be variable, making the diagnosis difficult. POR deficiency can lead to genital ambiguity in both sexes; impairment of testicular P450c17 in severely affected male fetuses leads to incomplete masculinization, whereas impairment of placental aromatase and/or activation of the “backdoor pathway” of androgen biosynthesis (2, 16, 17) leads to partial virilization of female fetuses. The impairment in 17,20 lyase activity is greater than the impairment in 17 α -hydroxylase activity, consistent with the established enzymology of P450c17 (18–20); hence, affected individuals typically have moderately elevated concentrations of 17OH-progesterone (17OHP) with an exaggerated response to acute stimulation with ACTH. The values are generally comparable to those seen in nonclassic 21-hydroxylase deficiency (1, 6, 11, 12). Maternal urinary estriol is very low due to impaired fetoplacental steroidogenesis (21), and 21-deoxycortisol has been elevated in all patients in whom it has been measured. Basal cortisol is typically normal but poorly responsive to ACTH, indicating compensated adrenal insufficiency, and dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate (DHEAS), and androstenedione are typically low. Thus, the hormonal data may suggest POR deficiency but may not provide an unambiguous diagnosis; hence DNA sequencing has assumed a more important role in this disease than in other forms of adrenal hyperplasia.

Among the 41 patients described with POR deficiency (1, 2, 6, 10–12), the mutations on both parental alleles were identified in most cases, and the heterozygous parents are unaffected, indicating autosomal recessive inheritance. However, in five cases a mutation was only found on one

FIG. 1. Simplified steroid biosynthetic pathway indicating the steps affected in POR deficiency. POR supports the activities of P450c17, P450c21, and P450aro. Because the 17,20 lyase activity of human P450c17 does not effectively convert 17OHP to androstenedione, 17OHP accumulates when 21-hydroxylase activity is impaired. The combined partial impairment of 17 α -hydroxylase activity and 21-hydroxylase activity may compromise cortisol synthesis. Because the 17,20 lyase activity of P450c17 is more sensitive to perturbations in electron transfer than is its 17 α -hydroxylase activity, the synthesis of DHEA, androstenedione, testosterone, and estradiol is more severely affected, so that the typical patient with POR deficiency will have a mildly elevated 17OHP and low C19 steroids.

allele (1, 6). We report a girl with adrenal insufficiency presenting as severe neonatal salt wasting contrasting with mild virilization; the grossly elevated 17OHP suggested 21-hydroxylase deficiency, which was confirmed by CYP21 sequencing. However, the mild and nonprogressive virilization, the presence of craniosynostosis, and the plasma steroid pattern suggested a defect in POR; sequencing identified a mutation on one POR allele. Because our patient's clinical presentation and course were typical of POR deficiency, we identified and sequenced exon 1U, the 5' flanking DNA, and introns of POR to search for a mutation on the other allele. No cryptic mutations were found in our patient or in the five other previously reported affected heterozygotes, suggesting that these patients may be an example of manifesting heterozygosity leading to clinically apparent disease.

Subject and Methods

DNA sequencing

DNA was collected in accordance with local institutional review board guidelines. CYP21B genetic analysis was done at the Alberta Children's Hospital molecular diagnostic laboratory. The 15 coding exons of POR, including at least 100 bp of the flanking introns, were sequenced as described (6). We characterized POR exon 1U and the 5' flanking DNA by identifying a region of high homology with the known rat sequence using BLAST from the Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>). Primers flanking exon 1U, 274 bp of the 5' flanking DNA, and introns 3, 4, 5, 6, 7, 9, and 11 were designed using the University of California, Santa Cruz genome browser (<http://genome.ucsc.edu>; accession no. NM_000941) and using Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Table 1). Regions containing known single nucleotide polymorphisms (SNPs) were not used for primers. We performed PCR with a 20:1 mix of Taq (Promega, Madison, WI) and pfu DNA polymerases (Stratagene, Cedar Creek, TX) (22). We amplified introns 3, 4, 5, 6, and 7 (downstream fragment) under touchdown cycling conditions: 95 C for 4 min, then 15 touchdown cycles of 95 C for 30 sec, 62 C for 30 sec (decreasing by 0.5 C with each cycle), and 72 C for 1 min, followed by 25 cycles of 95 C for 30 sec, 55 C for 30 sec, and 72 C for 1 min. The final extension was held at 72 C for 7 min, and then the reaction was stopped at 4 C. We amplified introns 7 (upstream fragment), 9, and 11 as described above, except that the annealing temperature started at 63 C and finished at 56 C after the 15 touchdown cycles and then continued at 56 C for the remaining 25 cycles. Amplification of exon 1U and the 5' flanking DNA was performed under the same conditions except that annealing started at 64 C for 15 touchdown cycles and then continued at 57 C for the remaining 25 cycles. All cycling for PCR was performed on the Bio-Rad MyCycler and i-Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA); PCR for sequencing was performed on the ABI GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Automated direct sequencing of PCR products employed the primers in Table 1 and ABI BigDye terminator, version 3.1 (Applied Biosystems). Data were displayed with ABI 3730#1 DNA Analyzer and analyzed using Sequencer demo version 4.5 (<http://www.genecodes.com>).

Case Report

A 4150-g girl was born to nonconsanguineous French-Canadian parents after an uneventful pregnancy during which the mother did not develop acne or hirsutism. She fed poorly and at 12 d of age weighed 3700 g; hyperkalemia (8.5 mmol/liter) and hyponatremia (116 mmol/liter) suggested adrenal insufficiency. She had clitoromegaly, labial fusion (Prader stage 2) and craniosynostosis but no other skeletal abnormalities. At 18 d of age, plasma 17OHP was 56,230 ng/dl (1,687 nmol/liter; normal, 1–7.3 nmol/liter), and the karyotype was 46,XX, suggesting 21-hydroxylase deficiency; glucocorticoid and mineralocorticoid replacement was begun. Androstenedione was 395 ng/dl (13.8 nmol/liter; normal, 1.08 $\pm$ 0.26 nmol/liter), DHEAS was 29.4 μ g/dl (0.8 μ mol/liter; normal 1.1 $\pm$ 0.48 μ mol/liter), and testosterone was 49 μ g/dl (1.7 nmol/

TABLE 1. Oligonucleotide primers for PCR and sequencing

Sequence name	Product size (bp)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Intron 3	733	CAGATGGAGGCAGTGGGTAG	TGCAGAAACAGGGACAGGAC
Intron 4	600	TCTCTCTGGGGTCAAGTTCG	TGTTCCCAAGACCAACACC
Intron 5	495	GGCAAGTACGTGGACAAGC	CTTCCACCCCAAGTGTTC
Intron 6	628	GAGGAGTCCAGGTGAGCAAG	CTGGAAAGGGGAGACCAAG
Intron 7a	668	AGAACCAGAAGCCGTGAGTG	TGGCCCCATAAAGAAGTGTG
Intron 7b	745	AGCTGCCCTGCTTCTGTAG	GGGGAGGAGAGAAGCACAGT
Intron 9	873	GGGTTGAGCTTCTGCTTAGG	GGGTGCTTCTTGTGGACTC
Intron 11	451	TACTCCATCGCCTCATCCTC	GCCTTGGTCTCGTACTCCAC
Exon 1U and 5' flanking DNA	478	ACAGCCACAGTTCGTGCAGTG	GAGATCAGCTCTAGGGGAAGG

Intron 7a, Upstream fragment of intron 7; Intron 7b, downstream fragment of intron 7.

liter; normal, 0.7–2.2 nmol/liter). Despite relatively low doses of hydrocortisone (6.8 mg/m²·d), her bone age remains markedly delayed (–3 sd at 10 yr 11 months), and her plasma C19 steroids during follow-up were rarely detectable, although 17OHP remained moderately elevated.

Results

DNA sequencing

Sequencing of the CYP21B gene from the patient and her parents identified a deletion of the paternal allele and two mutations on the maternal allele: the severe IVS2–13A/C>G splice site mutation and the mild P30L mutation. Because of the mild, nonprogressive virilization, the craniosynostosis, and the unusual steroid pattern, we also sequenced the POR gene, revealing the common A287P mutation on the maternal allele. No lesions were found on the paternal allele. No mutations were found in exons 8 and 10 of FGFR2, a common genetic cause of craniosynostosis.

Characterization of exon 1U

All previous analyses of the POR gene in patients with apparent POR deficiency have described the POR gene as containing 15 exons and 14 introns (1–3, 6, 10–12). However the NCBI Entrez Nucleotide database entry for the human POR cDNA and mRNA included 5' untranslated sequences not found in “exon 1” (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide; accession no. NM_000941.2), and previous studies showed that the rat POR gene contains an untranslated exon 30.5 kb upstream from the first coding exon (23–25). To determine whether the human gene is organized similarly, we probed the human genome database with the 56-nucleotide sequence of the rat upstream untranslated exon and identified a similar human DNA region about 38.8 kb upstream from what has previously been called exon 1; we term this exon “1U” so as to preserve the numbering from previous studies (1–3, 6, 10–12). The 3' end of exon 1U is defined by the mRNA/cDNA sequence (accession no. NM_000941.2) and is immediately followed by a canonical GTGAG splice donor site. The 5' end of the exon has not been defined experimentally, but a putative transcriptional start site has been chosen by analogy with the rat gene, whose transcriptional start site has been identified experimentally (23). Putative promoter regions important for transcription of the rat gene lie immediately upstream and are highly conserved in the human sequence (Fig. 2).

Sequence variants in the patients

Our previous reports included five patients in whom we had found only one POR mutation; these included subject 2 (1) and subjects CF1, 259, 337, and 14683 (6). We sought cryptic mutations in our present patient and in those five previous patients by sequencing a 478-bp fragment encompassing exon 1U and 274 bp of 5' flanking, putative promoter DNA, as well as sequencing all of introns 3, 4, 5, 6, 7, 9, and 11. The introns between exons 1U and 1 (38,809 bp), exons 1 and 2 (18,231 bp) and exons 2 and 3 (6,988 bp) were too large for PCR amplification, so that only 100 bp at each end, adjacent to the exons, was sequenced.

Patients 259 and 337 (6) were homozygous for known SNP rs3823884 in the 5' untranslated region of exon 1U in position –47A>C. Our patient had two POR intronic substitutions: IVS6 + 499C>G and IVS11 + 31C>T. Patient CF1 (6) had substitutions IVS6 + 418G>A and IVS11 + 32G>A; no other intronic sequence variants and no promoter sequence variants were found. These intronic nucleotide substitutions are not known SNPs, but we have observed the same intron 11 substitutions in our sequence analysis of 851 normal controls (Huang, N., V. Agrawal, K. M. Giacomini, and W. L. Miller, unpublished data). The location of the intron 6 substitutions was not covered by the sequencing strategy used for normal controls, so we do not know whether these SNPs are present in healthy individuals. Analysis of these nucleotides with NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>) indicates that these changes would not disrupt or create a cryptic splice acceptor or donor site.

Discussion

To our knowledge, this is the first report of combined deficiencies of CYP21 and POR. A lesion in CYP21 was initially suggested by the high 17OHP and confirmed by DNA sequencing. When combined with a gene deletion, the CYP21 IVS2–13A/C>G splice site mutation is associated with severe salt-wasting congenital adrenal hyperplasia (26, 27). The genotype-phenotype correlation in 21-hydroxylase deficiency is excellent (26, 27), and the degree of elevation in 17OHP tends to correlate with disease severity (28). Our patient's 17OHP levels at diagnosis were high, but her concentrations of C19 steroids were disproportionately low for the elevation in 17OHP: when her 17OHP was 56,230 ng/dl (1,687 nmol/liter), DHEAS was 29.4 µg/dl (0.8 µmol/liter), androstenedione was 395 ng/dl (13.8 nmol/liter), and testosterone was 49 ng/dl (1.7 nmol/liter). In contrast, from

```

H: ACA--GCCACAGTTCTGCAGTGATC--CCCGGGAAGGTGGGCAGC--CGGCCCGGTGACCTGCAGGGTCCGAGCTGTAGAAGCCGAGCCGCCGCTC : 90
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
R: GCGTGGCC--CAGAA-T-CGGTGCTAGGCTTGGGGGCG--GGGCTTCTCTGA--GGAGAGAAG--AGGGGCGTGCGC--TAGAAACTG--AGCATCTGA- : 85

H: TCCAGGCGACTCCGCCACCCC--CGGAACCACGCACTTT--CATTTCTC---TGCCGGGCG--ACCCAG--CC---GAGCCG--CGAGGGGGCGTG : 170
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
R: ACTGGGCG---CCGCCGGGCTGCG--AGGCGTGC--CTTTTCGTGGAGCGGATGAAGGGCGTGACCTAGGAAGTGAAGAGCTGGGCTTAGGGGCGGG : 175

H: GCCGGGCC--GGCCGTACCAAGAGC-GCAAATTTGCAGGGG-G---AAGCGCG--GGGC-T-CCGGGAATGCACGCGCGGCTCGAGTGGGCGGG-- : 254
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
R: GCC--ACGAGGGCTGTACCAACAGCAGGGATTAGAAAGGGAGCAAAAGAAAGAGGGCCGTCCTCAAGAGCGCGCGCGGCTTTTGTGGGCGGACC : 268
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
  .....

H: GCGGCGGCCAATGGCCAGCGCCCCACCCCGCGGCGGGGGAAGGCGGTGGTAGCGCCTCAGTGGTGTGGGCTGAGCCCTGCCAGGTGCCCGC : 349
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
R: TCGGCGG--TGTTAGCCAGCGCTC-ACCCCGCGCAGCCTTC-TGGTCGGTGGTAGCGCCTCAGTGGTGTGGGCTTGGCTCCGGCCCCACTGCC-TC : 358
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
  .....

H: AGAGAGCAGCCGGGCTGCCAGCGGTGAGTG--CTA-TCT-TTCGCGGCGA-CGGCGGGGTGGGTGAGG--TCGG-GCCC-CAAG--A-CTCGGGG : 432
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
R: AGAGACCTACAGGACCGCGGGCCGTGGGTGATCTGGTCGGTAC-CGGAGAGCG-CAGGGTAAGTGAGGAATGGGAGAGCTCAGGGGAGCTCCGCG : 451
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
  .....

H: TTTGCCGGG-CGCCTCAGTTACCGCGGCGCGCTGGCTCTCTG-CGTCCGGGTGGGCGCTCGGGCCTGGGCACTGCGCGTCTGGCCGACGCTCG : 525
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
R: ATA-CCGGGTCACCTCTTGTGCTAAGACTATCCGG-TTTGTGACTCCCGGGAGGGTTTTTGGGCC-GATCTCCGCGCGACT--CAC--C-CTTG : 538
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

H: GCGGGAAGGCATGGCTCC-CACCCCGGCCCTCCTCCGCGT-----CG---CCCTTC-C--CCTAGAGCTGATCTC : 588
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
R: --CGGAAGGCGAGACTTCGCACCTCGGCCCTTCTCC-CGTGGTGGCGTTTCCACCACGACCTA-ACCTG-TCGC : 608
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

```

FIG. 2. Sequences of human (H) and rat (R). P450 oxidoreductase untranslated exon 1 and 5' flanking DNA, assembled by Ensembl Blast analysis. The vertical lines show identical nucleotide sequences between rat and human. The boxes show human and rat untranslated exon 1. The underscore in the rat sequence represents previously defined regulatory regions, and the dots represent the bases essential for the activity of these regions in the rat promoter.

reported serum values in nine newborn females with untreated 21-hydroxylase deficiency (29), we calculated mean values for 17OHP of 12,350 ng/dl (370 nmol/liter), DHEAS of 168 μ g/dl (4.6 μ mol/liter), androstenedione of 2,458 ng/dl (86 nmol/liter), and testosterone of 195 ng/dl (6.8 nmol/liter). Also, the degree of virilization seen in girls with salt-wasting 21-hydroxylase deficiency is usually more severe, yet our patient was only mildly virilized, and her virilization did not progress over 10 yr of follow-up. This is explained by the associated POR deficiency, which affects the 17,20 lyase activity of P450c17 to a much greater degree than its 17 α -hydroxylase activity (1, 3, 4, 6), so that 17OHP accumulates, but androgens do not.

POR impairs both the 17 α -hydroxylase and 17,20 lyase activities of CYP17, partially blocking the formation of androgen via the classical pathway. Virilization in females with POR deficiency appears to arise both from impaired placental aromatase activity and activation of the backdoor pathway to dihydrotestosterone (16, 17, 30). The role of the backdoor pathway is supported by finding increased amounts of androsterone in the urine of a woman carrying a POR-deficient fetus (30) and the observation that CYP17 has greater affinity for 5 α reduced C21 steroids than for 17OHP or 17OH-pregnenelone (31). However, the kinetics of the other enzymes in the backdoor pathway are unknown, and the contribution of this pathway to human androgen production is not yet defined. The lack of severe virilization and low C19 steroids both suggest a relative deficiency of androgen synthesis at the level of 17,20 lyase activity secondary to POR deficiency.

A role for POR in our patient was initially suggested by her craniosynostosis in the presence of impaired 17,20 lyase activity and normal FGFR2 gene sequences. Craniosynostosis can be an isolated anomaly or part of a craniosynostosis

syndrome, most of which are caused by FGFR mutations. The incidence of craniosynostosis is about 3–5 per 10,000 births, of which 86% is nonsyndromic (32, 33); most syndromic craniosynostosis is caused by gain-of-function mutations in exons 8 or 10 of FGFR2. Craniosynostosis has not been linked to defects of steroidogenesis other than POR deficiency.

POR deficiency is autosomal recessive (1–3, 6, 10–12). However, we were only able to find one mutation, A287P, in our patient. Consistent with recessive inheritance, the unaffected mother also carried A287P on one allele. Six of the 41 reported patients (15%) with POR deficiency have only one identified mutation, despite being clinically indistinguishable from patients with two identified mutations (1, 6). This is an unusually high percentage for an autosomal recessive disease. Therefore, we extended the search for POR mutations to include 12 of the 15 introns, exon 1U and the 5' flanking region, but were unable to identify nucleotide variations that appeared to cause abnormal splicing of the transcription product or abnormal regulation of gene expression. A recent brief report mentions that only one mutation was found in two of five patients, but, because clinical descriptions of all of these patients had been reported previously, it is not clear how many additional patients are described (34). Nevertheless, this report strengthens the observation that apparent manifesting heterozygotes of POR are common.

Manifesting heterozygosity occurs frequently in X-linked disorders such as Duchenne muscular dystrophy due to skewed X inactivation (35), but is also described in autosomal recessive disorders; for example, about 17% of thyroid peroxidase deficiency represents manifesting heterozygosity in which only the mutant allele is transcribed into RNA (36). Our six patients may represent a new example of manifesting heterozygosity in an autosomal recessive disease. Because RNA was not available for study from our patients, we

cannot be certain whether they represent true manifesting heterozygosity or only apparent heterozygosity, with unidentified mutations or gene silencing via abnormal methylation on the seemingly unaffected allele. Thus, these patients have apparent, but unproven, manifesting heterozygosity.

Acknowledgments

We thank Dr. Maria New (Mt. Sinai Medical Center, New York, NY) for helpful discussions and Dr. Peter Bridges (Alberta Children's Hospital Molecular Diagnostic Laboratory, Calgary, Alberta) for performing the CYP21 sequencing.

Received October 26, 2006. Accepted March 19, 2007.

Address all correspondence and requests for reprints to: Prof. Walter L. Miller, Pediatric Endocrinology, 672-S, University of California, San Francisco, San Francisco, California 94143-0434. E-mail: wmlab@ucsf.edu.

This work was supported by National Institutes of Health Grant GM 073020 (to W.L.M.).

Author Disclosure Summary: All authors have nothing to declare.

References

- Flück CE, Tajima T, Pandey AV, Arlt W, Okuhara K, Verge CF, Jabs EW, Mendonça BB, Fujieda K, Miller WL 2004 Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. *Nat Genet* 36:228–230
- Arlt W, Walker EA, Draper N, Ivison HE, Ridle JP, Hammer F, Chalder SM, Borucka-Mankiewicz M, Hauffa BP, Malunowicz EM, Stewart PM, Shackleton CH 2004 Congenital adrenal hyperplasia caused by mutant P450 oxidoreductase and human androgen synthesis: analytical study. *Lancet* 363:2128–2135
- Miller WL 2004 P450 oxidoreductase deficiency. A new disorder of steroidogenesis with multiple clinical manifestations. *Trends Endocrinol Metab* 15:311–315
- Miller WL 2005 Regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* 146:2544–2550
- Peterson RE, Imperato-McGinley J, Gautier T, Shackleton CHL 1985 Male pseudohermaphroditism due to multiple defects in steroid-biosynthetic microsomal mixed-function oxidases: a new variant of congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 313:1182–1191
- Huang N, Pandey AV, Agrawal V, Reardon W, Lapunzina PD, Mowat D, Jabs EW, Van Vliet G, Sack J, Flück CE, Miller WL 2005 Diversity and function of mutations in P450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *Am J Hum Genet* 76:729–749
- Miller WL 1986 Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 314:1321–1322
- Shen AL, O'Leary KA, Kasper CB 2002 Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *J Biol Chem* 277:6536–6541
- Otto DM, Henderson CJ, Carrie D, Davey M, Gundersen TE, Blomhoff R, Adams RH, Tickle C, Wolf CR 2003 Identification of novel roles of the P450 system in early embryogenesis: effects on vasculogenesis and retinoic acid homeostasis. *Mol Cell Biol* 23:6103–6116
- Adachi M, Tachibana K, Asakura Y, Yamamoto T, Hanaki K, Oka A 2004 Compound heterozygous mutation of cytochrome P450 oxidoreductase gene (POR) in two patients with Antley-Bixler syndrome. *Am J Med Genet* 128A:333–339
- Fukami M, Horikawa R, Nagai T, Tanaka T, Naiki Y, Sato N, Okuyama T, Nakai H, Soneda S, Tachibana K, Matsuo N, Sato S, Homma K, Nishimura G, Hasegawa T, Ogata T 2005 Cytochrome P450 oxidoreductase gene mutations and Antley-Bixler syndrome with abnormal genitalia and/or impaired steroidogenesis: molecular and clinical studies in 10 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 90:414–426
- Fukami M, Hasegawa T, Horikawa R, Ohashi T, Nishimura G, Homma K, Ogata T 2006 Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in three patients initially regarded as having 21-hydroxylase deficiency and/or aromatase deficiency: diagnostic value of urine steroid hormone analysis. *Pediatr Res* 59:276–280
- DeLozier CD, Antley RM, Williams R, Green N, Heller RM, Bixler D, Engel E 1980 The syndrome of multisystemic osteodysgenesis with long-bone fractures. *Am J Med Genet* 7:391–403
- Crisponi G, Porcu C, Piu ME 1997 Antley-Bixler syndrome: case report and review of the literature. *Clin Dysmorphol* 6:61–68
- Reardon W, Smith A, Honour JW, Hindmarsh P, Das D, Rumsby G, Nelson I, Malcolm S, Ades L, Sillence D, Kumar D, DeLozier-Blanchet C, McKee S, Kelly T, McKeehan WL, Baraister M, Winter RM 2000 Evidence for digenic inheritance in some cases of Antley-Bixler syndrome? *J Med Genet* 37:26–32
- Auchus RJ 2004 The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends Endocrinol Metab* 15:432–438
- Homma K, Hasegawa T, Nagai T, Adachi M, Horikawa R, Fujiwara I, Tajima T, Takeda R, Fukami M, Ogata T 2006 Urine steroid hormone profile analysis in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: implication for the backdoor pathway to dihydrotestosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2643–2649
- Geller DH, Auchus RJ, Mendonça BB, Miller WL 1997 The genetic and functional basis of isolated 17,20 lyase deficiency. *Nat Genet* 17:201–205
- Auchus RJ, Lee TC, Miller WL 1998 Cytochrome b₅ augments the 17,20 lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *J Biol Chem* 273:3158–3165
- Auchus RJ, Miller WL 1999 Molecular modeling of human P450c17 (17 α -hydroxylase/17,20-lyase): insights into reaction mechanisms and effects of mutations. *Mol Endocrinol* 13:1169–1182
- Cragun DL, Trumpy SK, Shackleton CHL, Kelley RI, Leslie ND, Mulrooney NP, Hopkin RJ 2004 Undetectable maternal serum uE3 and postnatal abnormal steroid and steroid metabolism in Antley-Bixler syndrome. *Am J Med Genet* 129A:1–7
- Wang JT, Lin CJ, BurrIDGE SM, Fu GK, Labuda M, Portale AA, Miller WL 1998 Genetics of vitamin D 1 α -hydroxylase deficiency in 17 families. *Am J Hum Genet* 63:1694–1702
- O'Leary KA, Beck TW, Kasper CB 1994 NADPH cytochrome P-450 oxidoreductase gene: identification and characterization of the promoter region. *Arch Biochem Biophys* 310:452–459
- O'Leary KA, McQuiddy P, Kasper CB 1996 Transcriptional regulation of the TATA-less NADPH cytochrome P-450 oxidoreductase gene. *Arch Biochem Biophys* 330:271–280
- O'Leary KA, Kasper CB 2000 Molecular basis for cell-specific regulation of the NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase gene. *Arch Biochem Biophys* 379:97–108
- Pinto G, Tardy V, Trivin C, Thalassinou C, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fékété C, Morel Y, Brauner R 2003 Follow-up of 68 children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: relevance of genotype for management. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2624–2633
- Stikkelbroeck NM, Hoefsloot LH, de Wijs IJ, Otten BJ, Hermus AR, Sisktermans EA 2003 CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3852–3859
- New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield S, Pollack M, Dupont B, Stoner E, Levy DJ, Pang S, Levine L 1983 Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 57:320–326
- de Peretti E, Forest MG 1982 Pitfalls in the etiologic diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in the early neonatal period. *Horm Res* 16:10–22
- Shackleton C, Marcos J, Arlt W, Hauffa BP 2004 Prenatal diagnosis of P450 oxidoreductase deficiency (ORD): a disorder causing low pregnancy estriol, maternal and fetal virilization, and the Antley-Bixler syndrome phenotype. *Am J Med Genet* 129A:105–112
- Gupta MK, Guryev OL, Auchus RJ 2003 5 α -Reduced C₂₁ steroids are substrates for human cytochrome P450c17. *Arch Biochem Biophys* 418:151–160
- Alderman BW, Fernbach SK, Greene C, Mangione EJ, Ferguson SW 1997 Diagnostic practice and the estimated prevalence of craniosynostosis in Colorado. *Arch Ped Adolescent Med* 151:159–164
- Singer S, Bower C, Southall P, Goldblatt J 1999 Craniosynostosis in Western Australia, 1980–1994: a population-based study. *Am J Med Genet* 83:382–387
- Adachi M, Asakura Y, Matsuo M, Yamamoto T, Hanaki K, Arlt W 2006 POR R457H is a global founder mutation causing Antley-Bixler syndrome with autosomal recessive trait. *Am J Med Genet A* 140:633–635
- Richards CS, Watkins SC, Hoffman EP, Schneider NR, Millsark IW, Katz KS, Cook JD, Kunkel LM, Cortada JM 1990 Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 46:672–681
- Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Fallini C, Persani L, Beck-Peccoz P 2003 Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidase allele causing total iodide organification defect. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3264–3271

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

The Common P450 Oxidoreductase Variant A503V Is Not a Modifier Gene for 21-Hydroxylase Deficiency

Larissa G. Gomes, Ningwu Huang, Vishal Agrawal, Berenice B. Mendonça, Tania A. S. S. Bachega, and Walter L. Miller

Department of Pediatrics (L.G.G., N.H., V.A., W.L.M.), University of California San Francisco, San Francisco, California 94143-0978; and Department of Endocrinology (L.G.G., B.B.M., T.A.S.S.B.), Hospital das Clinicas da Universidade de Sao Paulo, 05403-000 Sao Paulo, Brazil

Context: 21-hydroxylase deficiency (21OHD) is a common genetic disorder caused by mutations in the CYP21A2 gene, which encodes the adrenal 21-hydroxylase, microsomal P450c21. CYP21A2 gene mutations generally correlate well with impaired P450c21 enzymatic activity and the clinical findings in 21OHD, but occasional discrepancies between genotype and phenotype suggest the effects of modifier genes. Mutations in P450 oxidoreductase (POR), the protein that transfers electrons from reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate to all microsomal P450s, can ameliorate the 21OHD phenotype and, therefore, could be a modifier gene.

Objectives: We sought to identify POR variants in patients with 21OHD having discordant phenotype and genotype, and to evaluate their effect on 21-hydroxylase activity.

Patients and Methods: We determined the CYP21A2 genotypes of 313 Brazilian patients with 21OHD and correlated the genotype and phenotype. The POR gene was sequenced in 17 patients with discordant genotype and phenotype. Wild-type and A503V POR, and P450c21 were expressed in bacteria and reconstituted *in vitro*. Activities were assayed by conversion of [¹⁴C]progesterone to deoxycorticosterone and [³H]17-hydroxyprogesterone to 11-deoxycortisol, and assessed by thin layer chromatography and phosphorimaging.

Results: The A503V POR variant was found in 10 of 30 alleles, the same ratio as in the normal population. There were no significant differences in Michaelis constant, maximum velocity and maximum velocity/Michaelis constant of 21-hydroxylase activity supported by wild-type and A503V POR.

Conclusion: The only POR missense polymorphism found in atypical 21OHD patients was A503V. Although A503V reduces P450c17 enzymatic activity, it does not influence P450c21 activity, indicating that POR A503V does not modify the 21OHD phenotype. (*J Clin Endocrinol Metab* 93: 2913–2916, 2008)

21-hydroxylase deficiency (21OHD) is caused by mutations in the CYP21A2 gene encoding microsomal P450c21, which converts progesterone to deoxycorticosterone (DOC) and 17-hydroxyprogesterone (17OHP) to 11-deoxycortisol (1, 2). The resulting low concentrations of cortisol in 21OHD stimulates the pituitary to increase ACTH secretion, which stimulates synthesis of adrenal androgen precursors. Thus, the clinical manifestations in 21OHD are related to the inability to synthesize cortisol and aldosterone efficiently, and the excessive androgen synthesis.

The degree to which CYP21A2 gene mutations compromise enzymatic activity correlates well with clinical manifestations (3–5). In salt wasting (SW) 21OHD, the impairment in 21-hydroxylation is severe, affecting both cortisol and aldosterone synthesis. In simple virilizing (SV) 21OHD, aldosterone is minimally affected. In both of these forms, the increased production of adrenal androgen precursors results in genital virilization in newborn females. In non-classical (NC) 21OHD, patients can be asymptomatic or have mild virilization in adolescence (3–5). However, discrepancies between genotype and phenotype have been described (3–6). In some pa-

0021-972X/08/\$15.00/0

Printed in U.S.A.

Copyright © 2008 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2008-0304 Received February 7, 2008. Accepted April 2, 2008.

First Published Online April 15, 2008

Abbreviations: DOC, Deoxycorticosterone; 21OHD, 21-hydroxylase deficiency; 17OHP, 17-hydroxyprogesterone; Km, Michaelis constant; NC, nonclassical; POR, P450 oxidoreductase; SV, simple virilizing; SW, salt wasting; V_{max}, maximum velocity.

tients with 21OHD, mutations were not found in one or both alleles after complete CYP21A2 sequencing (3–5, 7). These apparent discrepancies between genotype and phenotype suggest the presence of other genetic factors.

P450 oxidoreductase (POR) can modify the phenotype of 21OHD (8). POR is a flavoprotein that transfers electrons from reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) to all microsomal P450s, including P450c21 (9). Congenital adrenal hyperplasia due to POR gene mutations can cause apparent deficiencies of both P450c21 and P450c17. However, since the first description of POR deficiency (10), a wide spectrum of phenotypes has been reported. Most reported cases have a skeletal dysplasia called Antley-Bixler syndrome and also have ambiguous genitalia in both sexes (11); some less severely affected patients only have mildly disordered steroidogenesis (10, 12). Because POR is the only protein that can donate electrons to P450c21, we sought to determine whether POR sequence variants were found in 21OHD patients with discordant genotype/phenotype correlations, and to test the activity of such POR variants *in vitro*.

Subjects and Methods

Subjects

A group of 313 Brazilian patients with 21OHD, 130 of whom were previously reported (4), was diagnosed by clinical history, hormonal data, and genetic analysis. The study protocol was approved by the Ethical Committee of São Paulo University and informed consent obtained from the patients or caretakers. SV 21OHD was characterized by ambiguous genitalia in girls and signs of early postnatal virilization in both sexes. SW 21OHD was characterized by adrenal crisis or hyponatremia with high renin activities in the first month of life. NC 21OHD was diagnosed in adolescents and adults with signs of hyperandrogenism, and 17OHP levels greater than 51 nmol/liter after an ACTH test. This cutoff for 17OHP level is higher than that found in obligate heterozygotes for severe 21OHD (13).

Hormonal assays

RIA for 17OHP was performed using commercial reagents (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX); the intraassay and interassay coefficients of variation were 12 and 18%, respectively.

Genetic analysis

The CYP21A2 gene was characterized by Southern blotting studies to determine large rearrangements (14) and by allele-specific PCR to determine 10 common micro-conversions (4) in all 313 patients. Direct sequencing of the entire CYP21A2 gene was performed in patients with discordant genotype/phenotype or in whom PCR detected no mutations, or mutations on only one allele. The 16 exons of the POR gene were sequenced as described (15).

Expression of P450c21

To facilitate expression in bacteria, the N-terminal region of human P450c21 cDNA was changed to MALLAVFL by site-direct mutagenesis, and a 6-His tag was added to the C terminus to facilitate purification. This construct (built by Dr. Christa E. Flück) was subcloned in pCWori and expressed in *Escherichia coli* C41(DE3)pLysS as described (16), except that 34 µg/ml chloramphenicol and 1 mM thiamine were added to the media. The culture was shaken at 28°C for 36 h, bacterial membranes were prepared as described (16), resuspended in 4 ml 20 mM potassium phosphate (pH 7.4), 20% glycerol, 0.25 mM EDTA, 1% sodium cholate and 1% Tween 20, shaken for 2 h, and centrifuged at 150,000 *g* for 90 min. The supernatant was applied to a Ni-NTA agarose column (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO) equilibrated with 0.3 M NaCl, 20% glycerol, 0.1 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 1% sodium cholate, and 1% Tween 20 in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0). The column was washed with the same buffer containing 5 mM imidazole and eluted with the same buffer containing 250 mM imidazole. The eluate was sequentially applied to DEAE-Sepharose and to SP-Sepharose columns (Sigma-Aldrich). The purified protein was concentrated by Amicon Ultra-15 (Millipore, Billerica, MA). Purity was assessed by Coomassie blue staining of an SDS-PAGE gel and confirmed by immunoblotting.

Expression of POR

Wild-type and A503V human POR cDNA lacking codons for 27 N-terminal residues were subcloned in pET22b, expressed in *E. coli* C41(DE3)pLysS, and membranes were prepared, as described (11). POR proteins were quantified by Western blotting in comparison to a standard curve of purified wild-type POR (17). POR proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride membrane, incubated with rabbit polyclonal antibody against rat POR (Stressgen, Ann Arbor, MI), and assessed with the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Lincoln, NE).

Enzyme assays

Purified P450c21 (5 pmol) was incubated with bacterial membranes containing 10 pmol POR, 10 µg 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC), 10 µg 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 50 mM potassium phosphate (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 6 mM KOAc, 1 mM reduced glutathione, and radiolabeled substrates ([¹⁴C]progesterone or [³H]17OHP), in a total volume of 200 µl. The reactions, performed with substrates at concentrations of 0.3, 1, 3, and 5 µM, were started by adding 2 mM reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). After 1 h at 37°C, reactions were stopped with 1:1 ethyl-acetate/isooctane. Steroids were analyzed by thin layer chromatography using two different solvent systems (18). The conversion of [¹⁴C]progesterone to DOC and [³H]17OHP to 11-deoxycortisol was quantified by phosphorimaging. Maximum velocity (*V*_{max}), Michaelis constant (*K*_m), and the *V*_{max}/*K*_m (an estimative of enzymatic efficiency) were calculated by Lineweaver-Burk plots using GraphPad Prism 3 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Results

Patients

From 313 Brazilian patients with 21OHD, we selected 17 who had discordances between genotype and phenotype (Table 1). Patients 1–6 had a phenotype milder than predicted by the genotype. We found no CYP21A2 mutations on either allele in patients 8 and 12, and we found mutations on only one allele in the other nine patients. Patients 1 and 3–6 had CYP21A2 mutations that completely abolish 21-hydroxylase activity; all had high plasma rennin activities but were not salt wasters as newborns and did not require mineralocorticoid replacement therapy. Patient 2, an asymptomatic woman without virilization, was investigated because she is a member of a consanguineous family with SV 21OHD; she had P30L on one allele and IVS2 -2 A>G on the other allele. Patients 9, 13, 14, and 17 had precocious pubarche and very high levels of 17OHP after ACTH stimulation. Patients 7, 8–12, 15, and 16 are women with hirsutism, menstrual irregularities, and grossly elevated 17OHP after ACTH stimulation. Patients 13/14 and 15/16 are pairs of siblings who had mutations on only one allele. In calculating allele frequencies, each sibling pair is counted as two alleles.

TABLE 1. Clinical, hormonal, and genetic data in 21OHD patients studied

Patient No.	Sex	Age at diagnosis (yr)	Basal/stimulated 17OHP (nmol/liter)	21OHD genotype ^c	21OHD phenotype predicted/observed	POR genotype ^d
1	F ^a	4.5	915.1	R356W/R356W, I2	SW/SV	AV
2	F	35	248.5	Conv + P30L/IVS2 – 2 A>G	SV/NC	AA
3	M	4.5	163.6	Del/Q318X	SW/SV	AV
4	M	5.3	581.8	Del/Del	SW/SV	AV
5	M	1	721.1	R356W/Ins T, V281L	SW/SV	AV
6	M	5	>61	Q318X/R408C	SW/SV	AV
7	F	34	9.9/96	I172N/–		AA
8	F	12	9.3/78	–/–		AV
9	M	8	17.1/108	V281L/–		AA
10	F	20	10.5/132	V281L/–		AA
11	F	20	33.3/445	I2/–		AV
12	F	63	3.3/90	–/–		AA
13 ^b	F	8	151.2/251	V281L/–		VV
14 ^b	F	8	176.7/249	V281L/–		VV
15 ^b	F	25	51/81	V281L/–		AV
16 ^b	F	22	54/66	V281L/–		AV
17	F	6	20.7/195	V281L/–		AA

F, female; M, male.

^a Raised as a male.^b Siblings (13 and 14; 15 and 16).^c Del, CYP21A2 deletion; I2, IV2-13 A/C>G.^d AA, Wild type; AV heterozygous for A503V; VV homozygous for A503V.

Genetic variations in POR

Sequencing the POR gene in the 17 patients revealed one polymorphism in exon 1U at position –47A>C and four polymorphisms that do not change the POR amino acid sequence: 15 A>G (G5G) (rs10262966), 387 A>G (P129P) (rs1135612), 1455 C>T (A485A) (rs2228104), and 1716 G>A (S572S) (rs1057870). These polymorphisms are found in the Caucasian and African-American populations (15), and have no known impact in steroidogenesis. The only POR amino acid sequence variant found was A503V, present in 10 of 30 alleles analyzed. There were no clinical, hormonal, or CYP21A2 genetic data that differentiate the patients with the wild-type or A503V POR.

Effect of POR A503V on P450c21 activity

To determine whether A503V POR affects 21-hydroxylation, we assayed its ability to support catalysis by P450c21 *in vitro*. Bacterially expressed wild-type and A503V POR were combined with purified, bacterially-expressed P450c21. The assays mea-

sured conversion of [¹⁴C]progesterone to DOC and [H³]17OHP to 11-deoxycortisol (Table 2). The enzymatic parameters with A503V and wild-type POR were essentially the same: V_{max}/K_m for 21-hydroxylation of progesterone and 17OHP supported by A503V POR was 80 and 95%, respectively, of control POR. There was no difference in the efficiency of 21-hydroxylase supported by wild-type or A503V POR ($P = 0.873$ for progesterone assays; $P = 0.836$ for 17OHP assays).

Discussion

We found discordance between genotype and phenotype in 17 of 313 Brazilian patients, suggesting the action of other factors modifying the 21OHD phenotype. Because severe POR mutations may ameliorate the phenotype of 21OHD, we examined POR as a potential modifier gene in our 17 patients who had a discordance between their 21OHD genotype and phenotype.

TABLE 2. Kinetics of 21-hydroxylation supported by wild-type and A503V POR

	Wild type	A503V	P value
Substrate: progesterone			
K _m (μM)	2.65 ± 0.37	2.47 ± 0.49	0.814
V _{max} (pmol/min/pmol P450)	0.26 ± 0.06	0.21 ± 0.07	0.330
V _{max} /K _m	0.1 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.873
V _{max} /K _m (% wild type)	100	80	
Substrate: 17OHP			
K _m (μM)	1.43 ± 0.4	1.5 ± 0.17	0.836
V _{max} (pmol/min/pmol P450)	0.28 ± 0.08	0.28 ± 0.09	0.965
V _{max} /K _m	0.2 ± 0.06	0.19 ± 0.05	0.836
V _{max} /K _m (% wild type)	100	95	

Unless stated, data are mean ± SD of four independent experiments, each performed in duplicate.

The only POR amino acid sequence variant found was A503V, present in 10 of 30 alleles. A503V is common, found in 26.4% of Caucasian alleles, 19.1% of African-American alleles, 36.7% of Asian alleles, and 31% of Mexican-American alleles (15). A503V POR diminishes the reduction of cytochrome *c* to 67% of the wild-type POR (11, 15), and reduces the 17 α -hydroxylase and 17,20 lyase activities of P450c17 to 68 and 58%, respectively (11). However, we found that wild-type and A503V POR have equivalent abilities to support the 21-hydroxylation of progesterone and 17OHP by P450c21. Therefore, A503V POR does not appear to be a factor that modulates the phenotype on 21OHD.

We have shown that the activity of a POR variant with one electron recipient may not predict its activity with another recipient (10, 11, 15, 17), therefore, the normal activity of A503V POR with P450c21, whereas it has reduced activity with P450c17, is consistent with other studies. The disease-causing POR mutant A287P has different activities to support the activities of P450c17 and P450c21 (19), and an extensive analysis of 35 POR sequence variants revealed that some mutants had dramatic differences in their abilities to support catalysis by P450c17 and by hepatic, drug-metabolizing CYP1A2 and CYP2C19 (17). Modeling studies indicate that such variation primarily occurs with POR mutants located in the domain that interacts with the P450 enzyme (20). These observations help to explain the phenotypic variability in patients with POR deficiency and indicate that each particular POR mutation must be tested separately with each particular P450s of interest.

Although our study did not find POR variations that could explain discordances between the 21OHD phenotype and genotype, our study consisted of a small, specific population; we cannot exclude POR variants as a factor modulating the 21OHD phenotype in other populations. The POR gene is substantially more polymorphic than most human genes, and some variants are more common in particular ethnic groups (15). Other genes involved in androgen sensitivity, salt balance, or extra-adrenal 21-hydroxylase activity may account for variations in the 21OHD phenotype.

Acknowledgments

We thank Ms. Izabella Damm for excellent technical assistance.

Address all correspondence and requests for reprints to: Professor Walter L. Miller, Department of Pediatrics, HSE-1401, 513 Parnassus Avenue, University of California, San Francisco, San Francisco, California 94143-0978. E-mail: wlmilab@ucsf.edu.

This work was supported by Companhia de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Grant BEX1516/060 (to L.G.G.), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Grant 05/04726-0 (to B.B.M.), and National Institutes of Health Grant R01 GM073020 (to W.L.M.).

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

References

1. Miller WL, Morel Y 1989 Molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Ann Rev Genet* 23:371–393
2. Speiser PW, White PC 2003 Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 349:776–788
3. Jaaskelainen J, Levo A, Voutilainen R, Partanen J 1997 Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency: good correlation in a well defined population. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3293–3297
4. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, Arnhold IJ, Mendonça BB 1998 Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4416–4419
5. Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwartz HP 2000 Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1059–1065
6. Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI 1995 Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2322–2329
7. Nimkarn S, Cerame BI, Wei JQ, Dumic M, Zunec R, Brkljacic L, Skrabic V, New MI, Wilson RC 1999 Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) without demonstrable genetic mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 84:378–381
8. Scott RR, Gomes LG, Huang N, Van Vliet G, Miller WL 2007 Apparent manifesting heterozygosity in P450 oxidoreductase deficiency and its effect on coexisting 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2318–2322
9. Miller WL 2005 Regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* 146:2544–2550
10. Flück CE, Tajima T, Pandey AV, Arlt W, Okuhara K, Verge CF, Jabs EW, Mendonça BB, Fujieda K, Miller WL 2004 Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. *Nat Genet* 36:228–230
11. Huang N, Pandey AV, Agrawal V, Reardon W, Lapunzina PD, Mowat D, Jabs EW, Van Vliet G, Sack J, Flück CE, Miller WL 2005 Diversity and function of mutations in P450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *Am J Hum Genet* 76:729–749
12. Fukami M, Hasegawa T, Horikawa R, Ohashi T, Nishimura G, Homma K, Ogata T 2006 Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in three patients initially regarded as having 21-hydroxylase deficiency and/or aromatase deficiency: diagnostic value of urine steroid hormone analysis. *Pediatr Res* 59:276–280
13. Bachega TA, Brenha EM, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ, Mendonça BB 2002 Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 87:786–790
14. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Arnhold IJ, Medeiros MA, Marcondes JA, Longui CA, Nicolau W, Bloise W, Mendonça BB 1999 Low frequency of CYP2B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Hered* 49:9–14
15. Huang N, Agrawal V, Giacomini KM, Miller WL 2008 Genetics of P450 oxidoreductase. Sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1733–1738
16. Pandey AV, Miller WL 2005 Regulation of 17,20 lyase activity by cytochrome *b₅* and by serine phosphorylation of P450c17. *J Biol Chem* 280:13265–13271
17. Agrawal V, Huang N, Miller WL 2008 Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: Effect of sequence variants on activities of CYP1A2 and CYP2C19. *Pharmacogenet Genomics* 18:569–576
18. Dardis A, Miller WL 2003 Dexamethasone does not exert direct intracellular feedback on steroidogenesis, in human adrenal NCI-H295A cells. *J Endocrinol* 179:131–142
19. Dhir V, Ivson HE, Krone N, Shackleton CHL, Doherty AJ, Stewart PM, Arlt W 2007 Differential inhibition of CYP17A1 and CYP21A2 activities by the P450 oxidoreductase mutant A287P. *Mol Endocrinol* 21:1958–1968
20. Pandey AV, Kempna P, Hofer G, Mullis PE, Flück CE 2007 Modulation of human CYP19A1 activity by mutant NADPH P450 oxidoreductase. *Mol Endocrinol* 21:2579–2595

Extraadrenal 21-Hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4: Effect on 21-Hydroxylase Deficiency

Larissa G. Gomes, Ningwu Huang, Vishal Agrawal, Berenice B. Mendonça, Tania A. S. S. Bachega, and Walter L. Miller

Department of Pediatrics (L.G.G., N.H., V.A., W.L.M.), University of California San Francisco, San Francisco, California 94143-0978; and Department of Endocrinology-LIM42 (L.G.G., B.B.M., T.A.S.S.B.), Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, 05403-900 São Paulo, Brazil

Context: 21-Hydroxylase deficiency (21OHD) is caused by CYP21A2 gene mutations disrupting the adrenal 21-hydroxylase, P450c21. CYP21A2 mutations generally correlate well with the 21OHD phenotype, but some children with severe CYP21A2 mutations have residual 21-hydroxylase activity. Some hepatic P450 enzymes can 21-hydroxylate progesterone, but their physiological relevance in modifying 21OHD is not known.

Objective: We determined the ability of CYP2C19 and CYP3A4 to 21-hydroxylate progesterone and 17-hydroxyprogesterone (17OHP), determined the impact of the common P450 oxidoreductase (POR) variant A503V on these activities, and examined correlations between CYP2C19 variants and phenotype in patients with 21OHD.

Methods: Bacterially expressed, N-terminally modified, C-His-tagged human P450c21, CYP2C19, and CYP3A4 were combined with bacterially expressed wild-type and A503V POR. The 21-hydroxylation of radiolabeled progesterone and 17OHP was assessed, and the Michaelis constant (Km) and maximum velocity (Vmax) of the reactions were measured. CYP2C19 was genotyped in 21OHD patients with genotypes predicting severe congenital adrenal hyperplasia.

Results: Compared to P450c21, the Vmax/Km for 21-hydroxylation of progesterone by CYP2C19 and CYP3A4 were 17 and 10%, respectively. With both forms of POR, the Km for P450c21 was approximately 2.6 μM , the Km for CYP2C19 was approximately 11 μM , and the Km for CYP3A4 was approximately 110 μM . Neither CYP2C19 nor CYP3A4 could 21-hydroxylate 17OHP. The CYP2C19 ultrametabolizer allele CYP2C19*17 was homozygous in one of five patients with a 21OHD phenotype that was milder than predicted by the CYP21A2 genotype.

Conclusions: CYP2C19 and CYP3A4 can 21-hydroxylate progesterone but not 17OHP, possibly ameliorating mineralocorticoid deficiency, but not glucocorticoid deficiency. Multiple enzymes probably contribute to extraadrenal 21-hydroxylation. (*J Clin Endocrinol Metab* 94: 89–95, 2009)

Steroid 21-hydroxylase deficiency (21OHD) has an incidence of approximately 1 in 15,000 newborns (1) and accounts for 90–95% of cases of congenital adrenal hyperplasia (CAH). 21OHD is caused by mutations in the CYP21A2 gene, which encodes the adrenal 21-hydroxylase, P450c21 (2, 3). P450c21 converts progesterone to deoxycorticosterone (DOC) and converts 17-hydroxyprogesterone (17OHP) to 11-deoxycortisol in

the biosynthesis of aldosterone and cortisol. Patients with 21OHD have impaired synthesis of aldosterone and cortisol; the compensatory overproduction of ACTH leads to accumulation of androgen precursors.

In severe salt-wasting (SW) 21OHD, both sexes can experience a SW crisis in the first month of life, and girls are born with virilized external genitalia (2, 3). Patients with SW-21OHD typ-

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.

Copyright © 2009 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2008-1174 Received May 30, 2008. Accepted October 22, 2008.

First Published Online October 28, 2008

Abbreviations: CAH, Congenital adrenal hyperplasia; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; DLPC, 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DOC, deoxycorticosterone; Km, Michaelis constant; 17OHP, 17-hydroxyprogesterone; 21OHD, 21-hydroxylase deficiency; POR, P450 oxidoreductase; PRA, plasma renin activity; SV, simple virilizing; SW, salt-wasting; TLC, thin layer chromatography; Vmax, maximum velocity.

ically have severe CYP21A2 mutations that abolish P450c21 activity, so that they cannot synthesize aldosterone. However, some patients with severe mutations do not have clinically significant salt loss (4–6), and other patients appear to regain their ability to retain salt over time (7). Such recovery from salt loss may reflect increased dietary sodium, increased mineralocorticoid sensitivity, and increased activity of other enzymes that can 21-hydroxylate progesterone.

Many human extraadrenal tissues can 21-hydroxylate progesterone (8), but this activity is not due to P450c21 because its mRNA is not detected in these tissues (9). Hepatic P450 enzymes of the 2C subfamily can catalyze 21-hydroxylation of progesterone in rats, rabbits, and sheep (10–12). Recombinant human CYP3A4 and CYP2C19, which are hepatic, drug-metabolizing P450s enzymes, could 21-hydroxylate progesterone *in vitro* (13), but that study did not determine whether CYP3A4 and CYP2C19 could 21-hydroxylate 17OHP (13).

The enzymatic activities of CYP3A4 and CYP2C19 can vary enormously between individuals, depending on polymorphic variants that affect gene expression, classified as poor, intermediate, extensive, and ultra-metabolizers (14–16). We hypothesized that genetic variations in CYP3A4 and CYP2C19 might account for some of the differences in the 21-hydroxylation of progesterone and 17OHP, accounting for some of the phenotypic variation in 21OHD.

All microsomal P450 enzymes, including P450c21 and hepatic CYP3A4 and CYP2C19, receive electrons from nicotinamide adenine dinucleotide phosphate via the electron-transport flavoprotein, P450 oxidoreductase (POR) (17). The gene for human POR is also very polymorphic (18), and POR variants might also cause interindividual variability in steroid metabolism.

To determine whether hepatic CYP2C19 and CYP3A4 influence the 21OHD phenotype, we characterized their capacity to 21-hydroxylate progesterone and 17OHP using either wild-type POR or its common variant A503V as an electron donor; and we determined whether CYP2C19 polymorphisms modulate salt balance in patients with genotypes predicting severe 21OHD.

Subjects and Methods

Cytochrome P450 enzymes

Purified, bacterially expressed human CYP2C19 and CYP3A4 were obtained from Invitrogen (Madison, WI). P450c21 was expressed in bacteria and purified as described (19). Human P450c21 cDNA, with the N-terminal region replaced by the sequence MALLAVFL (20) and with a C-terminal 6-His-tag, was cloned in pCWori (construct built by Dr. Christa E. Flück). This construct was expressed in *Escherichia coli* C41(DE3)pLysS, and bacterial membranes were prepared as described (21). For protein purification, membranes were applied to an Ni-NTA agarose column (Sigma, St. Louis, MO), then to a DEAE-Sepharose column (Sigma), and finally to an Sp-Sepharose column (Sigma) (22). The purification was assessed by Coomassie Blue-staining of an SDS-PAGE gel and confirmed by Western blotting using our rabbit antiserum against bacterially expressed human P450c21.

Expression of POR and cytochrome b₅

POR lacking 27 N-terminal residues was cloned in pET22b, and the A503V POR variant was generated by site-directed mutagenesis (23).

Expression vectors for wild-type and A503V POR were expressed in *E. coli* C41(DE3)pLysS, and the bacterial membranes were prepared as described (23). Wild-type and A503V POR were quantified by Western blotting, with comparison to a standard curve of purified wild-type POR (24). The POR proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to Immobilon-FL transfer membrane (Millipore, Bedford, MA), and incubated with rabbit polyclonal antibody against rat POR (Stressgene, Ann Arbor, MI). The blot was analyzed on an Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Bioscience, Lincoln, NE) (24). Human cytochrome b₅ was expressed in *E. coli* and purified as described (23).

Enzyme assays

For CYP2C19 assays, 5 pmol of purified CYP2C19 was incubated with bacterial membranes containing 10 pmol of wild-type or A503V POR, 10 pmol of cytochrome b₅, 10 μ g of 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC), and 10 μ g of 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) in a buffer mix containing 50 mM HEPES/KOH (pH 7.4), 3 mM reduced glutathione, and 30 mM MgCl₂. The assays were performed with 3.0, 8.0, 15, and 30 μ M [¹⁴C]progesterone and [³H]17OHP as substrates in a total volume of 200 μ l.

For CYP3A4 assays, 5 pmol of purified CYP3A4 was incubated with bacterial membranes containing 10 pmol POR, 10 pmol cytochrome b₅, 10 μ g of a lipid mixture containing three synthetic phospholipids [DLPC, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), and 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoserine (PS)] at a ratio of 1:1:1, 10 μ g CHAPS, and the same HEPES buffer mix used for CYP2C19. The assays were performed with 30, 60, 90, and 150 μ M [¹⁴C]progesterone and [³H]17OHP as substrates, in a total volume of 200 μ l.

For P450c21 assays, 5 pmol of purified P450c21 was incubated with bacterial membranes containing 10 pmol POR, 10 μ g DLPC, 10 μ g CHAPS, 50 mM potassium phosphate (pH 7.4), 6 mM potassium acetate, 1 mM reduced glutathione, and 10 mM MgCl₂. The assays were performed with 0.3, 1, 3, and 5 μ M [¹⁴C]progesterone and [³H]17OHP as substrates, in a total volume of 200 μ l.

The reactions were started by adding 2 mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and were stopped after 1 h of incubation at 37 C, by adding 450 μ l ethylacetate/isooctane 1:1. Steroids were analyzed by thin layer chromatography (TLC), and steroids were identified by cochromatography, with the labeled progesterone and 17OHP located by autoradiography, and with unlabeled DOC, 11-deoxycortisol, 6 β -hydroxyprogesterone, and 16 α -hydroxyprogesterone located by UV light. TLC was also run in two different solvent systems—chloroform/ethylacetate 3:1, and methylene chloride/methanol/H₂O 200:20:1—to confirm the steroidal identities (25). The 21-hydroxylation of [¹⁴C]progesterone to DOC and [³H]17OHP to 11-deoxycortisol was quantified by phosphorimaging. All experiments were performed three times, each in duplicate. The Michaelis constant (K_m), maximum velocity (V_{max}), and the V_{max}/K_m (an estimate of enzymatic efficiency) were calculated by Lineweaver-Burk plots using GraphPad Prism 3 software (GraphPad Software, San Diego, CA).

CYP2C19 sequencing

The nine coding exons of the CYP2C19 gene, including at least 50 bp of the flanking introns, were sequenced in the five patients, and 3.8 kb of the 5' flanking DNA (promoter region) was sequenced in the five patients (Table 1) and 40 controls. Primers flanking 3.8 kb of the promoter region and exons 1 to 9, including the exon-intron junctions, were designed using the University of California, Santa Cruz genome browser (<http://genome.ucsc.edu/index.html>), and Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Table 2). Regions containing known single nucleotide polymorphisms were not used for primers.

The amplification of the 5' flanking DNA segments P1, P2, and P4 (Table 2) was performed under touchdown cycling conditions: 95 C for 4 min, then 15 touchdown cycles of 95 C for 30 sec, 62 C for 30 sec (decreasing by 0.5 C with each cycle), and 72 C for 45 sec, followed by 35 cycles of 95 C for 30 sec, 55 C for 30 sec, and 72 C for 45 sec. The

TABLE 1. Clinical, hormonal, and genetic data

Patient no.	Sex (social/genetic)	Age (chron/bone) at diagnosis (yr)	Clinical findings	Basal 17OHP (nmol/liter)	Basal $\Delta 4$ and T (nmol/liter)	Basal PRA (ng/ml · h)	Genotype	21OHD phenotype (predicted/observed)
1	M/F	4.5/11	Phallic enlargement	915.1	59 ^a /25 ^a	5.6	R365W/R365W	SW/SV
2	M/M	4.5/12.5	Phallic enlargement, pubarche	163.6	25.8/25.5	6.5	Del 21A2 ^b /Q318X	SW/SV
3	M/M	5.3/11	Phallic enlargement, pubarche	581.8	12.9/17.7	2.8	Del 21A2 ^b /Del 21A2 ^b	SW/SV
4	M/M	1/—	Phallic enlargement	721.1/469 ^c	126 ^c /40.5 ^c	>25	R365W/Ins T, V281L	SW/SV
5	M/M	5/11.5	Phallic enlargement, pubarche	424	34.9/5.9	18	Q318X/R408C	SW/SV

M, Male; F, female; chron, chronological; $\Delta 4$, androstenedione; T, testosterone.

^a Patient 1 hormonal data at 34 yr without treatment.

^b The breakpoint of the CYP21A2 hybrid gene was analyzed by allele-specific PCR. Alleles present the following point mutations: P30L, I2 splice, Del 8nt, I172N and Cluster. Parents of Patient 3 are first cousins.

^c Patient 4 hormonal data before re-starting treatment at 13 yr.

final extension was held at 72 C for 7 min, and then the reaction was stopped at 4 C. The amplifications of the 5' flanking DNA segments P3, P5 (Table 2) and exons 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 9 was performed as described above, except that the annealing temperature started at 60 C and finished at 53 C after the 15 touchdown cycles, and then continued at 53 C for the remaining 35 cycles. The amplifications of 5' flanking DNA segment P6 plus exon 1 (Table 2) were performed as described, except that the annealing started at 59 C and finished at 51 C, and for exon 8 the annealing temperature started at 64 C and finished at 57 C. All cycles for PCR were performed on Bio-Rad MyCycler and i-Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The sequencing was done with ABI BigDye terminator version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and displayed on ABI 3730 X 1 DNA Analyzer. Sequence variations were analyzed with DNA Sequencer 5.2 (Gene Codes, Ann Arbor, MI). All sequence variations were confirmed by repeating the PCR amplification and sequencing the opposite strand.

Subjects and genetic analysis

Under a study protocol approved by the Ethical Committee of São Paulo University, informed consent was obtained from the patients or caretakers. We selected 109 Brazilian patients with classical 21OHD bearing severe CYP21A2 gene mutations on both alleles that completely abolish enzyme activity (5, 19). These patients were classified

clinically as having simple virilizing (SV) CAH, characterized by ambiguous genitalia in girls and signs of early postnatal virilization in both sexes, or SW CAH, characterized by adrenal crisis or hyponatremia with high plasma renin activity (PRA) in the first month of life.

The CYP21A2 genes of all 109 patients were previously analyzed by Southern blotting to determine large rearrangements (26), and by allele-specific PCR to determine 15 common microconversions resembling point mutations (27, 28). To rule out the presence of additional rare mutations, the entire CYP21A2 gene, including approximately 700 bp of 5' flanking DNA, was sequenced in patients who had a phenotype that was discordant with that predicted by the genotype. After the complete CYP21A2 genetic analysis, five patients remained who had a discordance between phenotype and genotype (Table 1). None of these patients experienced SW or needed mineralocorticoid replacement; all were treated with cortisone acetate ≤ 18 mg/m² · d (see *Case reports*).

We sequenced the CYP21C19 gene in these five patients and in a control group of 40 21OHD patients having severe CYP21A2 mutations on both alleles, but who experienced the expected SW crisis. We excluded 64 21OHD patients bearing the common intronic mutation IVS2-13 (A/C to G) from the study because this mutation is associated with phenotypic variability, possibly due to variations in RNA splicing (29).

TABLE 2. Oligonucleotide primers for PCR and sequencing of CYP21C19

Sequence name	Product size (bp)	Location UCSC Genome Browser	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Promoter 1 (P1)	866	96508784–96509649	GACCTTGATCTGGCAATGGT	TGCAGTGTGGCATAGTTTTG
Promoter 2 (P2)	847	96509374–96510220	CACACAAAATCTGCACATGG	TGAGCAATTGTTGACTCAGTG
Promoter 3 (P3)	723	96510057–96510779	TGTGGAGGGCTTAATGTTGA	TGCTGGTGCTAGAGCTGAGA
Promoter 4 (P4)	755	96510730–96511484	CCTTCAAGATGCAGGGCTTA	AGGAAAACAGCCCCAGAGAT
Promoter 5 (P5)	804	96511356–96512159	TCAAGCCCTTAGCACCAAAT	CCAATGCACCGTCATAATTG
Promoter 6/exon 1 (P6-E1)	1038	96512038–96513075	TGGCCATTTCCGTTAAATCA	CTAAACCCACAGCTGCTTCC
Exon 2/exon 3 (E2-E3)	833	96524597–96525429	TTGCTGACCATTCGCTTGA	TCTCAGCTTCAAACCCTGCT
Exon 4 (E4)	641	96529991–96530631	AAGACAAATAGGCCGGGAAT	TCAGGGAGCTAATGGGCTTA
Exon 5 (E5)	664	96531188–96531851	TCAGGTTGTGCAAACTCTTTT	CAAGCATTACTCCTTGACCTG
Exon 6 (E6)	616	96570009–96570624	TGACAAACCCACAGCCAATA	TCCTAGCCTCAATGGTCCAC
Exon 7 (E7)	604	96592319–96592922	TTCATTTCTTCTGCCTTCC	CCCAACTGGAATCAACAGAA
Exon 8 (E8)	602	96599397–96599998	GTCCCCGAAGTGTGATGTTT	TCTCCAAAACCCACTAATCTGG
Exon 9 (E9)	615	96602271–96602885	TGCTTATCCATCCATTCATC	TCAGCATTATGTGGCACTCA

Case reports

Patient 1, a 46-yr-old individual, had Prader V external genitalia at birth and was raised as a male. At 4 $\frac{1}{2}$ yr the diagnosis of 21OHD was made based on phallic enlargement, sexual precocity (Tanner III), tall stature, and advanced bone age (11 yr). The patient has abandoned follow-up, takes no medication, is married, and lives as a male.

Patient 2 was diagnosed at 4 $\frac{1}{2}$ yr with penile enlargement (11×2.0 cm), sexual precocity (Tanner III), tall stature (+2.5 SD), and advanced bone age (12.5 yr old). At diagnosis, his sodium was 141 mEq/liter, potassium 5.2 mEq/liter, 17OHP 163.6 nmol/liter, androstenedione 25.8 nmol/liter, testosterone 25.5 nmol/liter, and PRA 6.5 ng/ml $\cdot$ h (elevated), with normal blood pressure. He abandoned follow-up at age 11 yr.

Patient 3 was diagnosed at 5 $\frac{1}{2}$ yr with penile enlargement (9.0×2.7 cm), sexual precocity (Tanner III), tall stature (+2.8 SD), advanced bone age (11 yr old), and normal blood pressure. At diagnosis, his sodium was 136 mEq/liter, potassium 4.3 mEq/liter, 17OHP 581.8 nmol/liter, androstenedione 12.9 nmol/liter, testosterone 17.7 nmol/liter, and PRA 2.8 ng/ml $\cdot$ h.

Patient 4 was diagnosed at 1 yr with penile enlargement, but his parents delayed treatment with cortisone acetate until he was 2 $\frac{1}{2}$ yr old. His bone age was advanced (5 yr), and his 17OHP was 721.1 nmol/ml. Treatment was started elsewhere without baseline steroid measurements. He came to our clinic at 4 $\frac{1}{2}$ yr with sexual precocity (Tanner II), penile enlargement (10.5×2.5 cm), normal height (+0.5 SD), and advanced bone age (11 yr). He stopped cortisone acetate intake from 11 to 13 yr of age, and did not have SW crisis. At age 13, he had 17OHP 469 nmol/liter, androstenedione 126 nmol/liter, testosterone 40.5 nmol/liter, and PRA above 25 ng/ml $\cdot$ h, but his blood pressure was normal, with sodium 136 mEq/liter and potassium 4.1 mEq/liter.

Patient 5 was diagnosed at 5 yr with penile enlargement (6.0×2.0 cm), sexual precocity (Tanner II), tall stature (+2 SD), and advanced bone age (11.5 yr). His 17OHP was 424 nmol/liter, androstenedione 34.9 nmol/liter, and testosterone 5.9 nmol/liter. He had normal blood pressure, normal sodium of 137 mEq/liter, and potassium 4.7 mEq/liter, and high PRA level of 18 ng/ml $\cdot$ h.

Results

21-Hydroxylation of progesterone

To determine whether extraadrenal 21-hydroxylation performed by hepatic P450 enzymes modulates mineralocorticoid deficiency in 21OHD, we evaluated the ability of CYP2C19 and CYP3A4 to 21-hydroxylate progesterone, compared with P450c21. We reconstituted bacterially expressed P450s and bacterially expressed wild-type and A503V POR in a synthetic lipid environment, and we measured the conversion of radiolabeled progesterone to DOC by TLC (Fig. 1). We determined the K_m and V_{max} of CYP2C19, CYP3A4, and P450c21. The data are linear, showing noncooperative kinetics (Fig. 2). The K_m of human P450c21 with progesterone was 2.7 μM . This value is in very good agreement with the value of 2.8 μM obtained in microsomes of COS-1 cells expressing human P450c21 (30), validating the biochemistry of our *in vitro* system. The K_m for CYP2C19 with progesterone was 10.8 μM , and DOC was the only product detected by TLC (Fig. 1). By contrast, the K_m for CYP3A4 with progesterone was 112 μM , and the products were predominantly 6 β -hydroxyprogesterone and 16 α -hydroxyprogesterone, rather than DOC (Fig. 1). Compared with P450c21, the efficiency (V_{max}/K_m) of 21-hydroxylation of progesterone by CYP2C19 was 17%, and the efficiency of 21-hydroxylation by 3A4 was 10% (Table 3).

FIG. 1. TLC analysis of the steroid 21-hydroxylase activities of CYP2C19 and CYP3A4. The four indicated concentrations of [^{14}C]progesterone (Prog) were used as substrate for each enzyme supported by wild-type POR. The identities of the radioactive spots corresponding to DOC and other metabolites were determined by cochromatography with labeled progesterone and with unlabeled DOC, 6 β -OHProg, and 16 α -OHProg, located by UV light. DOC is the only product resulting from metabolism of Prog by CYP2C19. The major products resulting from metabolism of Prog by 3A4 are 6 β -OHProg and 16 α -OHProg; DOC is a minor product.

21-Hydroxylation of 17OHP

To determine whether extraadrenal 21-hydroxylation of 17OHP performed by hepatic P450 enzymes modulates glucocorticoid deficiency in 21OHD, we evaluate the ability of CYP2C19 and CYP3A4 to catalyze the 21-hydroxylation of 17OHP. We reconstituted bacterially expressed P450s and POR as described for progesterone. The K_m for the 21-hydroxylation of 17OHP by P450c21 was 1.4 μM , and the V_{max} was 0.28 ± 0.08 pmol/min $\cdot$ pmol P450, consistent with previous data (30). Neither CYP2C19 nor CYP3A4 was able to 21-hydroxylate 17OHP.

Influence of the A503V POR variant

All catalysis by P450c21, CYP2C19, and CYP3A4 requires electron donation from POR. Because 28% of normal human POR alleles express the variant A503V (18), and because A503V reduces the 17 α -hydroxylase and 17,20 lyase activities (V_{max}/K_m) of P450c17 to approximately 60% compared with wild-type POR (23), we assessed the potential impact of A503V POR on the 21-hydroxylation of progesterone by P450c21, CYP2C19, and CYP3A4. Compared with wild-type POR, there were no differences in the enzymatic parameters of any of these enzymes using A503V POR (Table 3).

Patients studied

To determine the effect of extraadrenal 21-hydroxylation *in vivo*, we selected five patients who had a phenotype discordant for their genotype. All patients first showed clinical signs of hyperandrogenism at 2–5 yr of age (Table 1), and none had salt loss; thus, they presented clinically as SV 21OHD. However, their genotypes predicted SW 21OHD. Of the 10 CYP21A2 alleles in these five patients, three are deleted, one carries a frameshift (F306 + 1nt), and two carry a nonsense mutation (Q318X). None of these mutations encodes a full-length protein, and all are associated with SW 21OHD (31). Three of the remaining four alleles carry the missense mutation R356W and one carries R408C. Both mutations are associated with SW 21OHD (31),

FIG. 2. Kinetics of progesterone 21-hydroxylation by P450c21 (A), CYP2C19 (B), and CYP3A4 (C), as supported by wild-type (WT) or A503V POR. In each panel, the conversion of progesterone to DOC was quantitated by phosphorimage analysis of thin layer chromatograms, such as that in Fig 1, and displayed as Lineweaver-Burk plots. Data are mean $\pm$ SEM of three experiments, each performed in duplicate.

and, when assayed *in vitro*, both lack 21-hydroxylase activity using either progesterone or 17OHP as substrates (29, 32). However, some cases of SV 21OHD have been associated with the R356W mutation (5).

CYP2C19 Genetic analysis

Relatively little 21-hydroxylase activity is needed to produce adequate amounts of aldosterone, as evidenced by patients with SV CAH. Hence, 21-hydroxylation of progesterone by CYP2C19 may be sufficient to modulate mineralocorticoid production *in vivo*, especially in individuals who overexpress this enzyme (33). Therefore, we sequenced the CYP2C19 gene in five 21OHD patients with discordant genotype/phenotype (Table 1) and found polymorphisms only in the 5' flanking DNA. This region was compared with 40 control CAH patients who had a good correlation between genotype and phenotype. Among these five individuals, patient 3 was heterozygous and patient 4 was homozygous for the 2C19 polymorphisms –807C>T and –3402C>T, which characterize the CYP2C19*17 ultrametabolizer allele (34). Among the 40 SW CAH controls, six were heterozygous for CYP2C19*17. As expected from their severe CYP21A2 genotypes, these six individuals required mineralocorticoid replacement beginning in the neonatal period, and all are now adolescents or adults.

Discussion

Extraadrenal 21-hydroxylation is well described (8) and may modify the clinical picture of CAH (7), but is not catalyzed by the adrenal 21-hydroxylase, P450c21 (9). If extraadrenal 21-hydroxylation is catalyzed by one or more of the hepatic, drug-metabolizing enzymes, it might be possible to induce such an

enzyme pharmacologically, thus ameliorating the clinical severity and possibly reducing the amount of hormonal replacement therapy needed. Thus we have focused on hepatic enzymes. Previous studies suggested that hepatic P450 enzymes of the 2C and 3A families may be involved (10–13). Using a baculovirus system coexpressing human P450 and rabbit POR, Yamazaki and Shimada (13) showed that CYP2C19 and CYP3A4 can 21-hydroxylate progesterone *in vitro*, but they did not compare these data with 21-hydroxylation by P450c21 or assess 17OHP as a substrate. Our data show that CYP2C19 and CYP3A4 can, respectively, 21-hydroxylate progesterone to DOC with about 17% and 10% of the efficiency of P450c21, but that neither CYP2C19 nor CYP3A4 could 21-hydroxylate 17OHP. Because the adrenal normally produces much less aldosterone than cortisol, low rates of progesterone 21-hydroxylation can suffice for salt balance. For example, the CYP21A2 mutation I172N is a common cause of SV 21OHD that retains only 2–5% of wild-type activity; thus very little progesterone 21-hydroxylase activity is needed to prevent salt loss (29, 32). Therefore, extraadrenal 21-hydroxylation of progesterone by these two hepatic enzymes may be able to ameliorate the mineralocorticoid deficiency, but not the glucocorticoid deficiency of CAH. However, there is little hepatic expression of CYP2C19 before 5 months of age (35), and CYP3A4 expression is low throughout childhood (36). Hence, extraadrenal 21-hydroxylation by these enzymes does not normally prevent the typical SW syndrome seen in newborns with SW 21OHD.

The CYP2C19 gene is highly polymorphic, and some promoter polymorphisms can increase enzyme expression. Among five CAH patients whose phenotypes were less severe than predicted by their CYP21A2 genotypes, one was homozygous for the CYP2C19*17 ultrametabolizer allele. This allele carries two changes (–806C>T and –3402C>T) in the 5'-flanking region

TABLE 3. 21-Hydroxylation of progesterone by CYP2C19 and CYP3A4 supported by wild-type or A503 POR

	Wild type			A503V		
	Km (μ M)	Vmax	Vmax/Km (% P450c21)	Km (μ M)	Vmax	Vmax/Km (% PORwt)
P450c21	2.65 $\pm$ 0.37	0.26 $\pm$ 0.06	0.1 $\pm$ 0.03 (100%)	2.47 $\pm$ 0.49	0.21 $\pm$ 0.07	0.08 $\pm$ 0.02 (80%)
CYP2C19	10.4 $\pm$ 1.1	0.18 $\pm$ 0.02	0.017 $\pm$ 0.002 (17%)	15.4 $\pm$ 3.5	0.21 $\pm$ 0.06	0.013 $\pm$ 0.003 (76%)
CYP3A4	111.8 $\pm$ 8.3	1.16 $\pm$ 0.1	0.01 $\pm$ 0.001 (10%)	107.6 $\pm$ 5.5	1.25 $\pm$ 0.4	0.012 $\pm$ 0.004 (120%)

Vmax is measured in picomoles per minute per picomoles P450.

that create binding sites for hepatic transcription factors and increase gene expression; the net result is an increased amount of enzyme with the same K_m and V_{max} , so that this variant increases metabolism by CYP2C19 about 2- to 4-fold (34). Thus the CYP2C19*17 allele might increase the 21-hydroxylation of progesterone and synthesis of aldosterone. Because CYP2C19*17 represents a gain-of-function, one would expect it to exert a dominant effect. However, we found heterozygosity for this allele in six of 80 CYP2C19 alleles among 40 patients with salt-losing CAH whose phenotypes and genotypes were concordant, indicating that heterozygosity for CYP2C19*17 is insufficient to modulate the salt loss of CAH. Thus, if CYP2C19*17 is clinically important in CAH, it probably must be homozygous.

CYP3A4 is the most abundant P450 in the liver and metabolizes 40–45% of currently used drugs (15). In assaying the activity of CYP3A4 as a 21-hydroxylase, we found that CYP3A4 has a low affinity for progesterone ($K_m \sim 110 \mu M$), but a higher V_{max} than P450c21, so that the efficiency of its 21-hydroxylation of progesterone (V_{max}/K_m) was approximately 10% of that for P450c21. Thus, this most abundant of all hepatic P450 enzymes may also contribute to extraadrenal 21-hydroxylation. Although CYP3A4 does not have common polymorphisms (37), there is substantial genetic variation in the metabolic clearance of its substrates (38). Therefore, we considered whether variations in POR might affect its 21-hydroxylase activity, but the common A503V variant of POR did not affect the 21-hydroxylase activity of CYP3A4.

The POR gene is very polymorphic, with the A503V variant polymorphism found in 28% of normal alleles (18). Although A503V decreases the activity of 17 α -hydroxylase and 17,20-lyase activities of P450c17 (23), it does not affect 21-hydroxylation by P450c21 (19), and we now show that POR A503V does not affect 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4. This variability is consistent with other studies showing that the activity of a POR variant with one P450 enzyme will not predict its activity with another P450 (24, 39).

Thus, CYP2C19 and CYP3A4 can 21-hydroxylate progesterone *in vitro* and thus may modulate mineralocorticoid deficiency *in vivo*. However, we found a homozygous CYP2C19 ultrametabolizer allele in only one of five CAH patients whose phenotype was inappropriately mild for the CYP21 genotype. We propose that multiple enzymes, not necessarily confined to the liver, may exert clinically significant extraadrenal 21-hydroxylation in different individuals, depending on that individual's array of polymorphic variants of several genes. Thus, extraadrenal 21-hydroxylation should not be viewed as the activity of only one or two enzymes, but instead as a genetic quantitative trait influenced by multiple genetic loci. The identification of these additional loci encoding factors that modify the 21OHD phenotype will contribute to a better understanding of this disease and its treatment.

Acknowledgments

We thank Ms. Izabella Damm for excellent technical assistance.

Address all correspondence and requests for reprints to: Prof. Walter L. Miller, Department of Pediatrics, HSE-1401, 513 Parnassus Avenue,

University of California, San Francisco, San Francisco, California 94143-0978. E-mail: wmlab@ucsf.edu.

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Grant BEX1516/060 (to L.G.G.), by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo Grants 05/55364-0 (to L.G.G.) and 05/04726-0 (to B.B.M.), and by National Institutes of Health Grant R01 GM073020 (to W.L.M.).

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

References

1. Therrell Jr BL, Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmank J, Korman K, Prentice L, Gonzalez J, Gunn S 1998 Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* 101:583–590
2. Miller WL, Morel Y 1989 Molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. *Ann Rev Genet* 23:371–393
3. White PC, Speiser PW 2000 Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 21:245–291
4. Dolzan V, Solyom J, Fekete G, Kovacs J, Rakosnikova V, Votava F, Lebl J, Pribilincova Z, Baumgartner-Parzer SM, Riedl S, Waldhauser F, Frisch H, Stopar-Obreza M, Krzisnik C, Battelino T 2005 Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 153: 99–106
5. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, Arnhold IJ, Mendonça BB 1998 Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4416–4419
6. Stikkelbroeck NM, Hoefsloot LH, de Wijs IJ, Otten BJ, Hermus AR, Sistermans EA 2003 CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3852–3859
7. Speiser PW, Agdere L, Veshiba H, White PC, New MI 1991 Aldosterone synthesis in patients with salt-wasting congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) and complete absence of adrenal 21-hydroxylase (P450c21). *N Engl J Med* 321:145–149
8. Casey ML, Winkel CA, MacDonald PC 1983 Conversion of progesterone to deoxycorticosterone in the human fetus: steroid 21-hydroxylase activity in fetal tissues. *J Steroid Biochem* 18:449–452
9. Mellon SH, Miller WL 1989 Extra-adrenal steroid 21-hydroxylation is not mediated by P450c21. *J Clin Invest* 84:1497–1502
10. Swinney DC, Ryan DE, Thomas PE, Levin W 1987 Regioselective progesterone hydroxylation catalyzed by eleven rat hepatic cytochrome P-450 isozymes. *Biochemistry* 26:7073–7083
11. Murray M 1992 Participation of a cytochrome P450 enzyme from the 2C subfamily in progesterone 21-hydroxylation in sheep liver. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:591–593
12. Johnson EF, Griffin KJ 1985 Variations in hepatic progesterone 21-hydroxylase activity reflect differences in the microsomal concentration of rabbit cytochrome P-450 1. *Arch Biochem Biophys* 237:55–64
13. Yamazaki H, Shimada T 1997 Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9 and 3A4. *Arch Biochem Biophys* 346:161–169
14. Xie HG, Kim RB, Wood AJ, Stein CM 2001 Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:815–850
15. Ingelman-Sundberg M 2004 Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci* 25:193–200
16. Nebert DW, Russell DW 2002 Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360:1155–1162
17. Miller WL 2005 Regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* 146:2544–2550
18. Huang N, Agrawal V, Giacomini KM, Miller WL 2008 Genetics of P450 oxidoreductase. Sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1733–1738
19. Gomes LG, Huang N, Agrawal V, Mendonça BB, Bachega TASS, Miller WL 2008 The common P450 oxidoreductase variant A503V is not a modifier gene for 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2913–2916
20. Fisher CW, Caudle DL, Martin-Wixtrom CA, Quattrochi LC, Tukey RH, Waterman MR, Estabrook RW 1992 High-level expression of functional human cytochrome P450 1A2 in *Escherichia coli*. *FASEB J* 6:759–764

21. Pandey AV, Miller WL 2005 Regulation of 17,20 lyase activity by cytochrome b₅ and by serine phosphorylation of P450c17. *J Biol Chem* 280:13265–13271
22. Arase M, Waterman MR, Kagawa N 2006 Purification and characterization of bovine steroid 21-hydroxylase (P450c21) efficiently expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 344:400–405
23. Huang N, Pandey AV, Agrawal V, Reardon W, Lapunzina PD, Mowat D, Jabs EW, van Vliet G, Sack J, Flück CE, Miller WL 2005 Diversity and function of mutations in P450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *Am J Hum Genet* 76:729–749
24. Agrawal V, Huang N, Miller WL 2008 Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: effect of sequence variants on activities of CYP1A2 and CYP2C19. *Pharmacogenet Genomics* 18:569–575
25. Dardis A, Miller WL 2003 Dexamethasone does not exert direct intracellular feedback on steroidogenesis, in human adrenal NCI-H295A cells. *J Endocrinol* 179:131–137
26. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Arnhold IJ, Medeiros MA, Marcondes JA, Longui CA, Nicolau W, Bloise W, Mendonça BB 1999 Low frequency of CYP2B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Hered* 49:9–14
27. Wedell A, Luthman H 1993 Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Hum Mol Genet* 2:499–504
28. Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI 1995 Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2322–2329
29. Higashi Y, Hiromasa T, Tanai A, Miki T, Nakura J, Kondo T, Ohura T, Ogawa E, Nagayama K, Fujii-Kuriyama Y 1991 Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on P-450(C21) activity and their distribution in patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biochem* 109:638–644
30. Tusie-Luna MT, Traktman P, White PC 1990 Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem* 265:20916–20922
31. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna M, Lesser M, New MI, White PC 1992 Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 90:584–595
32. Chiou SH, Hu MC, Chung B-C 1990 A missense mutation of Ile¹⁷²→Asn or Arg³⁵⁶→Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem* 265:3549–3552
33. Kishimoto W, Hiroi T, Shiraishi M, Osada M, Imaoka S, Kominami S, Igarashi T, Funae Y 2004 Cytochrome P450 2D catalyze steroid 21-hydroxylation in the brain. *Endocrinology* 145:699–705
34. Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M 2006 A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Therapeut* 79:103–113
35. Koukouritaki SB, Manro JR, Marsh SA, Stevens JC, Rettie AE, McCarver DG, Hines RN 2004 Developmental expression of human hepatic CYP2C9 and CYP2C19. *J Pharmacol Exper Ther* 308:965–974
36. Stevens JC, Hines GA, Gu C, Koukouritaki SB, Manro JR, Tandler PJ, Zaya MJ 2003 Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* 307:573–582
37. Mizutani T 2003 PM frequencies of major CYPs in Asians and Caucasians. *Drug Metab Rev* 35:99–106
38. Hirth J, Watkins PB, Strawderman M, Schott A, Bruno R, Baker LH 2000 The effect of an individual's cytochrome CYP3A4 activity on docetaxel clearance. *Clin Cancer Res* 6:1255–1258
39. Pandey AV, Kempna P, Hofer G, Mullis PE, Flück CE 2007 Modulation of human CYP19A1 activity by mutant NADPH P450 oxidoreductase. *Mol Endocrinol* 21:2579–2593