

EL *SPLICING* ALTERNATIVO DEL EXON 5 DE LA CITOCROMO P450
AROMATASA PODRIA SER UN MECANISMO DE REGULACION
DE LA PRODUCCION DE ESTROGENOS EN HUMANOS*

CAROLINA M. PEPE, NORA I. SARACO, MARIA SONIA BAQUEDANO,
GABRIELA GUERCIO, ELISA VAIANI, ESPERANZA BERENSZTEIN,
MARCO A. RIVAROLA, ALICIA BELGOROSKY

Laboratorio de Investigación, Hospital Garrahan, Buenos Aires, Argentina

Resumen La enzima P450 aromatasa (P450Aro) participa en la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos. La mutación c655G>A, descrita en forma heterocigota en una niña y en forma homocigota en un hombre adulto, ambos con déficit de aromatasa, genera la disrupción del sitio dador de *splicing* exón5-intrón5. Se ha postulado que la retención del intrón5 y la generación de una proteína truncada inactiva serían las consecuencias de esta mutación. Sorpresivamente, la paciente presentó desarrollo espontáneo de mamas y niveles puberales de estradiol, sugiriendo una actividad aromatasa (AA) residual. En principio postulamos que la mutación c655G>A generaría la pérdida del exón5 con conservación del marco de lectura, generándose una proteína con menor actividad que podría explicar el déficit parcial. La expresión del ARNm sin exón5 (ARNm-E5) en linfocitos de la paciente sugiere una asociación entre la pérdida del exón y la presencia de la mutación; posteriormente confirmada realizando ensayos de *splicing* en células Y1. Sin embargo, la expresión del cDNA-E5 en células Y1 presentó una AA nula que no explicaría un déficit parcial. La expresión del ARNm-E5 fue detectada en placenta, testículo y adrenal humanos como una variante de *splicing* normal. Estos resultados indicarían la ocurrencia de *splicing* alternativo (SA) en la zona codificante de P450Aro como un posible mecanismo regulador de la producción de estrógenos en tejidos esteroideogénicos humanos. La mutación c655G>A podría alterar los mecanismos fisiológicos reguladores del SA del exón5 favoreciendo su exclusión. De esta forma, bajos niveles de ARNm+E5 podrían expresarse aun en presencia de la mutación explicando el fenotipo de déficit parcial observado en la paciente.

Palabras clave: deficiencia parcial de aromatasa, *splicing* alternativo, mutaciones del gen CYP19

Abstract: *Exon 5 alternative splicing of the cytochrome P450 aromatase could be a regulatory mechanism for estrogen production in humans.* P450 aromatase (P450Aro), involved in androgen to estrogen conversion, is encoded by the CYP19 gene. P450Aro c655G>A mutation described in heterozygous form in a girl and in homozygous form in an adult male with P450Aro deficiency results in an aberrant splicing due to disruption of a donor splice site. A truncated inactive protein would be expected if intron5 is retained. Surprisingly, the girl described with this mutation showed spontaneous breast development and pubertal estradiol (E2) levels suggesting residual P450Aro activity (AA). Formerly, we postulate the in frame E5 skipping as a consequence of this mutation generating a protein with some degree of activity. When P450Aro mRNA expression was analysed from patient's lymphocytes, an aberrant spliced mRNA lacking E5 (-E5mRNA) was detected, suggesting an association between E5 skipping and the presence of the mutation. Splicing assays in Y1 cells confirmed this association. -Ex5 cDNA expression in Y1 cells resulted in an inactive protein that could not explain patient's phenotype. Exon 5 might be predicted as a poorly defined exon suggesting a susceptibility to splicing mutations and physiological alternative splicing (AS) events. Therefore, -Ex5mRNA was assessed as a natural occurring alternative transcript in normal human steroidogenic tissues. As P450Aro -E5mRNA expression was detected in human term placenta, prepubertal testis and prepubertal adrenal, we might speculate that AS of P450Aro coding region would occur in humans and would be involved in the complex AA regulation. Furthermore, tissue specific regulation of AS might suggest low expression of +E5mRNA from the c655G>A allele explaining residual AA evidenced in the affected girl.

Key words: partial aromatase deficiency, CYP19 mutations, CYP19 alternative splicing

*Este trabajo mereció el Premio Cossio otorgado por la Sociedad Argentina de Investigación Clínica en Mar del Plata, noviembre 2006.

La enzima P450 aromatasa (P450Aro) está codificada por el gen CYP19 y junto con la NADPH citocromo P450 reductasa forman el complejo enzimático responsable de la biosíntesis de estrógenos a partir de andrógenos¹. En la mayoría de los vertebrados la expresión de esta enzima ocurre en gónadas y en cerebro. Sin embargo, en humanos y en algunos primates superiores la expresión de la P450Aro es aún más amplia, incluyendo el sinciotrofoblasto placentario, gónadas, tejido adiposo, hueso, músculo liso vascular, cerebro, hipocampo, hipotálamo, amígdala y varios tejidos fetales incluyendo hígado, piel, intestino, testículo y ovario².

Se han descrito 12 familias con deficiencia completa de la enzima P450Aro^{3,4} y dos familias con déficit parcial como consecuencia de mutaciones en el gen CYP19⁵.

Las alteraciones moleculares del gen CYP19 descritas en asociación con una deficiencia completa de actividad de la enzima P450Aro, han contribuido al conocimiento de la relevancia de esta enzima durante la embriogénesis y vida postnatal en humanos³.

Recientemente hemos descrito el caso de una niña con características clínicas de deficiencia de la enzima P450Aro, heterocigota compuesto para las mutaciones Δ AGLU412X (alelo materno) y c655G>A (alelo paterno)⁶. La mutación Δ AGLU412X genera la delección de un residuo de adenina en el exón 9, un corrimiento del marco de lectura y la aparición de un codón *stop* prematuro 33 codones corriente abajo del sitio de la mutación. Podría esperarse una actividad aromatasa (AA) nula si consideramos que la proteína que se expresaría a partir del alelo portador de la mutación Δ AGLU412X carecería del sitio de unión al grupo hemo, esencial para la actividad de la P450Aro.

La mutación c655G>A ocurre en el último nucleótido del exón 5, postulándose dos consecuencias posibles: el cambio de aminoácido Glu210Lys o la ocurrencia de un *splicing* aberrante debido a la disrupción del sitio dador de *splicing* exón5-intrón5. Esta misma mutación ha sido descrita en forma homocigota en un hombre adulto con características clínicas de deficiencia de aromatasa⁴. En dicho estudio se ha demostrado que el cambio de aminoácido Glu210Lys no altera la actividad aromatasa (AA). Utilizando la metodología *exon-trapping system* se ha evidenciado que la mutación c655G>A genera la disrupción del sitio dador de *splicing*. Finalmente, se ha propuesto que la retención del intrón 5 ocurriría como consecuencia de la mutación, generándose una proteína truncada, completamente inactiva, debido a la generación de un codón *stop* prematuro⁴. Sin embargo y sorpresivamente, la paciente heterocigota compuesto para esta mutación⁶ presentó a los 8 años de edad cronológica desarrollo espontáneo de mamas junto con niveles séricos de estradiol (E2) compatibles con inicio puberal, lo cual sugeriría una actividad aromatasa residual.

De acuerdo al "modelo de definición exónica"⁷, la pérdida del exón constituiría el fenotipo prevalente asociado a mutaciones en los sitios 5' dadores de *splicing*, fundamentalmente cuando los intrones involucrados son largos. Debido a que los intrones del gen CYP19 son largos, la pérdida del exón 5, con conservación del marco de lectura, no debería descartarse como un posible fenotipo asociado a la mutación c655G>A.

Eventos de *splicing* alternativo en la zona codificante de la P450Aro han sido descriptos en varias especies, incluyendo primates superiores⁸⁻¹⁴. Se ha propuesto que estos eventos de *splicing* alternativo podrían constituir un mecanismo regulador de la actividad aromatasa (AA).

En humanos, sin embargo, eventos de *splicing* alternativo de la P450Aro han sido descriptos sólo asociados a la expresión tejido específica de los diferentes exones 1 no codificantes¹⁵.

Los sitios de *splicing* dador y aceptor que flanquean al E5 fueron analizados utilizando varios programas de predicción de sitios de *splicing*. Este análisis reveló una baja homología de ambos sitios con las secuencias consenso dadoras yceptoras respectivamente, siendo reconocidos por dichos programas como sitios débiles o de bajo *score*. De esta forma el E5 se convertiría, en términos del "modelo de definición exónica", en un exón pobremente definido que podría estar involucrado en eventos de *splicing* alternativo.

En este estudio se evaluaron las posibles consecuencias moleculares de la mutación c655G>A a fin de explicar las características clínicas observadas en la paciente heterocigota compuesto para dicha mutación. La expresión del ARNm-E5 como una variante de *splicing* normal en tejidos esteroideogénicos humanos fue también analizada como parte del presente trabajo.

Material clínico: se aislaron linfocitos por el método de Ficoll a partir de sangre entera de la paciente, sus padres y 10 controles normales. Las muestras de tejido testicular (n=10) fueron obtenidas de necropsias de pacientes entre 1 día y 3 meses de edad, sin enfermedades endocrinometabólicas y con menos de 6 horas postmortem. Las muestras de tejido adrenal (n=10) se obtuvieron de donantes de órganos entre 10 días y 20 años de edad, con menos de 24 horas de diagnóstico de muerte cerebral y sin enfermedades endocrinometabólicas. Las muestras de tejido placentario (n=3) se obtuvieron de partos a término. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Garrahan.

Construcción de los minigenes WT, Mut y de los vectores p-Aro y p-Aro Δ E5: el minigen salvaje (WT) fue construido clonando en forma secuencial cuatro fragmentos de PCR correspondientes a parte de los exones 4 y 7, los exones 5 y 6 completos y las regiones intrónicas flanqueantes, en el vector de expresión *pTarget™ mammalian expression vector system* (Promega, Buenos Aires).

características que pudieran influenciar las decisiones de *splicing*, como por ejemplo la longitud de los intrones, fueron tenidas en cuenta en la construcción del minigen. El minigen mutado (Mut) fue construido reemplazando el fragmento 2 en el minigen WT por el fragmento conteniendo la mutación amplificado a partir de ADN aislado de linfocitos de la paciente. La secuencia de los minigenes fue verificada por secuenciación directa.

Se construyó p-Aro clonando en el vector de expresión pcDNA3 el cDNA de la P450Aro humana. Por mutagénesis dirigida del vector p-Aro y usando una estrategia previamente descrita¹⁶, se eliminó el E5 obteniéndose p-AroΔEx5. Fueron transfectadas células Y1 (línea adrenal tumoral murina) utilizando lipofecta-mina 2000 (*Invitrogen*, Buenos Aires) con los minigenes WT y Mut a fin de evaluar el procesamiento del ARNm expresado y con los vectores de expresión p-Aro y p-AroΔE5 a fin de evaluar la AA asociada a su expresión.

Análisis de ARN: Se aisló ARN total a partir de linfocitos, de células Y1 transfectadas con los minigenes WT y Mut y de los 3 tejidos esteroidogénicos en estudio usando TRIZOL (*Invitrogen*, Buenos Aires).

Se amplificó el fragmento E4-E7 del cDNA de la P450Aro humana. En el caso de los tejidos la amplificación se realizó utilizando uno de los *primers* específicos marcado con ³²P. El ARN total aislado de células transfectadas con p-Aro y p-AroΔE5 fue analizado por *Northern Blot*.

Determinación de la actividad aromatasa: La AA en células transfectadas con p-Aro y p-AroΔE5 se expresó como la cantidad de estradiol (E2) producida en 24 horas por μ g de ARN a partir del sustrato testosterona (T) agregado al medio de cultivo. La concentración de E2 en el medio de cultivo se determinó por radioinmunoanálisis (*coat-A-count kit*, *Diagnostic Products Corporation*).

A fin de evaluar la consecuencia *in vivo* de la mutación c655G>A, analizamos por RT-PCR la expresión del ARNm de la P450Aro en linfocitos de la paciente, sus padres y un pool de 10 controles normales. Se utilizó el par de *primers* diseñado para amplificar el fragmento E4-E7 del cDNA de la P450Aro humana. El fragmento de tamaño esperado (491 pb) fue detectado en todas las muestras analizadas. Además de este fragmento, uno adicional de 312 pb cuyo análisis por secuenciación reveló la falta del E5, fue detectado en las muestras de la paciente y de su padre (portador de la mutación c655G>A) (Fig 1A). La ausencia del fragmento de 312 pb en la muestra de la madre y en el pool de controles normales sugiere una asociación entre la ocurrencia de este *splicing* aberrante y la presencia de la mutación. Esta asociación fue posteriormente confirmada realizando ensayos de *splicing* en células Y1 (línea celular de tumor adrenal murino) transfectadas con el minigen WT o con el minigen Mut, portador de la mutación c655G>A. Por RT-PCR se analizó la expresión de ambos minigenes en células Y1 amplificando el fragmento E4-E7 del cDNA de la P450Aro humana. El fragmento esperado de 491 pb fue amplificado a partir de células transfectadas con el minigen WT, mientras que en las células transfectadas con el minigen Mut, se amplificaron dos fragmentos de menor tamaño: un fragmento de 312 pb y un fragmento de 194 pb cuyo análisis de secuencia reveló la ausencia del E5 y de los E5 y E6 respectivamente (Fig 1B).

A fin de evaluar si la expresión del ARNm-E5 se asocia con una AA disminuida o nula, se transfectaron células Y1 con los vectores p-Aro y p-AroΔE5 y se evaluó la AA a través de la producción de E2 a partir de T. Se detectó producción de E2 en células transfectadas con p-Aro (175.5 ± 10.5 pg/ μ g de ARN, 24 horas), mientras que no se evidenció producción de E2 en células transfectadas con p-AroΔEx5 ni en las células control sin

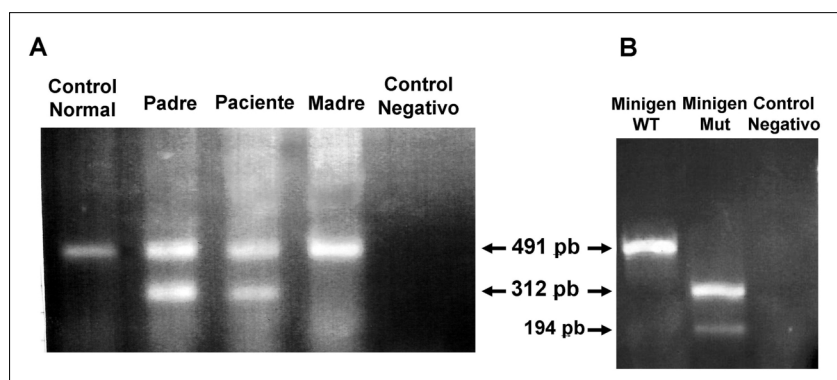


Fig. 1.— Amplificación por RT-PCR del fragmento E4-E7 del cDNA de la P450Aro humana a partir de ARN total aislado de linfocitos de sangre periférica (A) y de células Y1 transfectadas con los minigenes salvaje (WT, y mutado (Mut) (B).

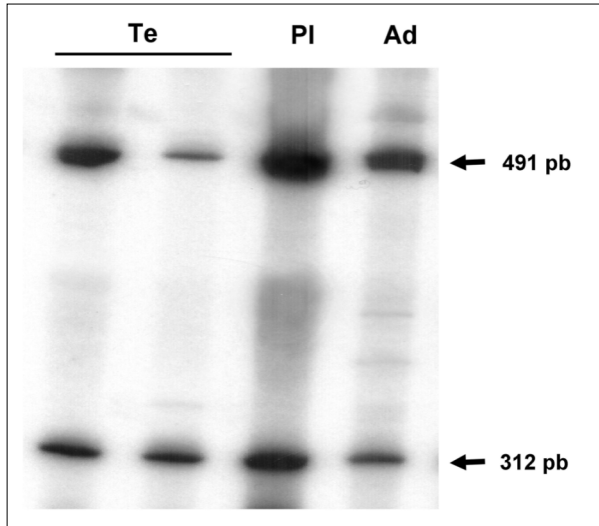


Fig. 2.- Amplificación por RT-PCR del fragmento E4-E7 del cDNA de la P450Aro humana a partir de un pool de cDNA de tejido testicular prepuberal (Te), tejido adrenal prepuberal y puberal (Ad) y placenta a término (PI).

transfectar. Similares niveles de expresión del ARNm de la enzima P450Aro fueron evidenciados por *Northern Blot* en células transfectadas con ambos vectores de expresión (p-Aro y p-Aro Δ Ex5) indicando que las diferencias observadas en la actividad aromatasa no se deberían a diferencias en la eficiencia de transfección y/o transcripción entre ambos vectores de expresión. De esta forma, la expresión del ARNm-E5 se asoció a una actividad aromatasa nula y no permitiría explicar la actividad aromatasa residual observada en la paciente heterocigota compuesta para la mutación c655G>A.

Por RT-PCR se analizó la expresión de la P450Aro en tejido testicular prepuberal, tejido adrenal prepuberal y puberal y placenta a término, evidenciándose que el ARNm-E5 se expresa en estos tejidos esteroideogénicos humanos como una variante de *splicing* normal (Fig. 2).

Estos resultados nos permiten describir por primera vez la ocurrencia de *splicing* alternativo en la zona codificante de la P450Aro humana y nos permiten postular al *splicing* alternativo del E5 como un nuevo mecanismo involucrado en la compleja regulación de la AA en tejidos esteroideogénicos humanos.

La importancia fisiológica y los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión del transcrito -E5 requieren de estudios posteriores a fin de ser dilucidados. Se ha descrito que mutaciones que afectan secuencias reguladoras de *splicing* pueden asociarse a la expresión de ambos transcritos, normal y aberrante. A fin de explicar el fenotipo de déficit parcial de P450Aro observado en la paciente, podría postularse la expresión

de ciertos niveles de ARNm+E5 a partir del alelo portador de la mutación c655G>A, originando una proteína, que a pesar de portar el cambio de aminoácido Glu210Lys, tendría una actividad aromatasa normal, según ha sido descrito previamente por Maffei y col ⁴.

Concluyendo, nuestros resultados permiten postular que el *splicing* alternativo del exón 5 ocurriría como un evento normal regulador de la producción de estrógenos en tejidos esteroideogénicos humanos. La presencia de la mutación c655G>A podría alterar la regulación del *splicing* alternativo del exón 5 favoreciendo una prevalencia en la expresión de la proteína -E5 sobre la proteína completa. Esto último podría constituir un mecanismo capaz de explicar la AA residual observada en la paciente portadora de la mutación c655G>A.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado con subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT), por la Fundación F. Fiorini, y por *Pfizer Endocrine Care*. Los autores agradecen la colaboración de Mercedes Maceiras, Eduardo Chaler, Roxana Marino y Diego Chirico.

Bibliografía

1. Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86: 225-30.
2. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 1994; 15: 342-55.
3. Belgorosky A, Rivarola MA. Physiology and pathophysiology of estrogens: lessons from pediatric patients with complete aromatase deficiency. *The Endocrinologist* 2004; 14: 93-100.
4. Maffei L, Murata, Y, Rochira V, et al. Dysmetabolic syndrome in a man with a novel mutation of the aromatase gene: effects of testosterone, alendronate, and estradiol treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 61-70.
5. Lin L, Ercan O, Raza J, et al. Variable phenotypes associated with aromatase (CYP19) insufficiency in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; Epub ahead of print.
6. Belgorosky A, Pepe C, Marino R, et al. Hypothalamic-pituitary-ovarian axis during infancy, early and late prepuberty in an aromatase-deficient girl who is a compound heterozygote for two new point mutations of the CYP19 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5127-31.
7. Robberson BL, Cote GJ, Bergert SM. Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 84-94.
8. Yamada-Mouri N, Hirata S, Kato J, Hoshi K. Expression and distribution of cortical type aromatase mRNA variant in the adult rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 60: 325-9.
9. Levallet J, Mittre H, Delarue B, Carreau S. Alternative splicing events in the coding region of the cytochrome P450 aromatase gene in male rat germ cells. *J Mol Endocrinol* 1998; 20: 305-12.

10. Pezzi V, Panno ML, Sirianni R, et al. Effects of triiodothyronine on alternative splicing events in the coding region of cytochrome P450 aromatase in immature rat Sertoli cells. *J Endocrinol* 2001; 170: 381-93.
11. Delarue B, Breard E, Mitre H, Leymarie P. Expression of two aromatase cDNAs in various rabbit tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 64: 113-9.
12. Hanoux V, Bouraima H, Mitre H, Feral C, Benhaim A. Differential regulation of two 3' end variants of P450 aromatase transcripts and of a new truncated aromatase protein in rabbit preovulatory granulosa cells. *Endocrinology* 2003; 144: 4790-8.
13. Abdelgadir SE, Roselli CE, Choate JV, Resko JA. Distribution of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in adult rhesus monkey brains. *Biol Reprod* 1997; 57: 772-7.
14. Pereyra-Martinez AC, Roselli CE, Stadelman HL, Resko JA. Cytochrome P450 aromatase in testis and epididymis of male rhesus monkeys. *Endocrine* 2001; 6: 15-9.
15. Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86: 219-24.
16. Imai Y, Matsushima Y, Sugimura T, Terada M. A simple and rapid method for generating a deletion by PCR. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 2785.

How does one get started as a writer?... I think it is important to set up a disciplined schedule. If you write only when the muse sits on your shoulder, it is unlikely that your project will ever get completed. I work five or six days a week from ten in the morning to six in the evening, with a short break for lunch. I live with my characters, as they live with me [...]. If your readers do not empathize with your characters, your story, no matter how clever, must surely fail. Make them love your characters or hate them. Let the reader be envious of them or repelled or fascinated; but make the reader believe. There is only one way to do that: You must believe. And when you have created that magic world, with characters that move and breathe and feel joy and sorrow, as you feel joy and sorrow, then, ah, then, you will have come as close as any mortal can to reaching out and touching the stars.

¿Cómo empieza uno a escribir? Creo que es importante tener un esquema disciplinado. Si escribe sólo cuando la musa se asome sobre su hombro, es poco probable que su proyecto llegue a término. Yo trabajo cinco o seis días a la semana de diez de la mañana a seis de la tarde con un corto intervalo para almorzar. Vivo con mis personajes como ellos viven conmigo [...]. Si los lectores no simpatizan con sus personajes, su cuento por mas inteligente que sea, fracasará. Haga que quieran a sus personajes o que los odien. Deje que el lector los envidie, que le repelan o que le fascinen; pero consiga que el lector *lo crea*. Hay una sola manera de conseguirlo: *Usted* debe creer. Y cuando haya creado este mundo mágico, con personajes que se mueven y respiran y sienten alegría y pesar, al igual que Ud siente alegría y pesar, entonces, ah, entonces, Ud habrá llegado tan cerca como le es posible a cualquier mortal, a proyectarse y alcanzar las estrellas.

Sidney Sheldon (1917-2007)

The magical world of the novelist. In: *The writer's handbook.* Sylvia K. Burak (ed), Boston: The Writer Inc., 1983, p 73