

PIERRE-GILLES BLANCHARD

**CARACTÉRISATION DE LA 17 β -
HYDROXYSTÉROÏDE DÉSHYDROGÉNASE DE
TYPE 12 CHEZ LA SOURIS ET CAENORHABDITIS
ELEGANS**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en physiologie-endocrinologie
pour l'obtention du grade de maîtrise ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

AOÛT 2007

Résumé

L'utilisation de la biologie moléculaire pour la caractérisation des enzymes impliquées dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes a fait progresser de manière importante les connaissances en endocrinologie. L'étude de la stéroïdogénèse a mené à d'importantes découvertes, notamment en ce qui a trait au traitement du cancer de la prostate et à diverses avenues thérapeutiques pour lutter contre le cancer du sein. Récemment, notre laboratoire a décrit la 17 β -HSD de type 12, une enzyme impliquée dans la formation de l'estradiol chez l'humain. Ce mémoire poursuit les analyses amorcées en caractérisant l'orthologue murin de cette enzyme tout en identifiant un ancêtre commun chez *C. elegans*. La faible taille de la chaîne latérale de l'acide aminé en position 234 (alanine et méthionine) chez ces deux homologues comparativement à l'enzyme humaine (phénylalanine) permet l'entrée de substrats plus gros au site actif, ce qui affecte la spécificité. Je démontrerai donc que la 17 β -HSD de type 12 chez la souris et chez *C. elegans* catalyse aussi bien la formation des androgènes que des estrogènes.

Abstract

The use of molecular biology in the characterisation of enzymes involved in steroid hormone biosynthesis has led to great advances in endocrinology. Prostate cancer treatment and breast cancer therapies are some examples of tremendous discoveries which took place due to our understanding of steroidogenesis. Recently, our research group described type 12 17β -HSD which activates estrone by transforming it into estradiol, a powerful estrogen in human. This thesis focuses on the characterisation of its mouse and *C. elegans* homologs. The smaller size of amino acid 234 permits the entry of a wider variety of substrates into the active site of those two homologs compared to the human enzyme, thus affecting the specificity. In this work, I will prove that mouse and *C. elegans* type 12 17β -HSD catalyzes the formation of both androgens and estrogens.

Avant-propos

Depuis maintenant quatre ans, j'ai eu la chance d'être dirigé par le professeur Van Luu-The. Pour moi, il a été un véritable mentor en me transmettant sa passion contagieuse de la recherche, en me conseillant quant à ma progression ainsi qu'en m'offrant sa pleine confiance. Il demeurera un exemple à suivre quant à sa détermination ainsi que ses connaissances étendues. À titre d'étudiant, ce fut à la fois un plaisir et une fierté de faire partie d'un organisme tel que le Centre de Recherche 'du CHUL où des chercheurs de renommée mondiale s'impliquent dans la formation académique des scientifiques de demain en élaborant des cours magistraux de grande qualité.

Mon laboratoire d'accueil était doté d'un personnel fantastique. Les liens que j'ai tissés avec cette équipe se rapprochent beaucoup plus de l'amitié que d'un simple rapport avec des collègues. J'ai bénéficié de l'appui et des connaissances de Nathalie Paquet, Véronique Bellemare, Guillaume Ruel, Cam-Linh Ngo-Duy, Mélanie Robitaille, Lucille Lacoste, Peimin Rong, Guy Reimnitz, Mélanie Samson, Ahmed Youcef-Hammou et Shufang Zheng. Tous ces gens ont contribué à ma réussite académique à un moment ou à un autre de ma formation et pour cela, je les remercie.

J'aimerais rendre hommage à mes parents, à leurs valeurs et leurs sacrifices qui ont fait en sorte que la seule limite dans la vie de leurs enfants soit la volonté de réussir. Je salue également ma grande sœur qui se préoccupe toujours de moi en période de grand stress et qui fera sans aucun doute la meilleure des mamans.

Je m'en voudrais de témoigner de la présence de tous ces amis sans mentionner mon âme sœur, Geneviève, avec qui la vie s'embellit de jour en jour. Son amour, son soutien et son approbation inconditionnelle se sont avérés être d'un grand réconfort.

En terminant, je souhaite dédier ce travail à la mémoire de Françoise Laberge qui croyait tellement en ma capacité. À jamais, cet événement tragique demeurera une invitation au dépassement et à la réussite pour honorer à ma manière son souvenir.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-propos.....	iii
Table des matières	iv
Liste des abréviations	vi
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii

Partie A

La stéroïdogénèse

1 Introduction.....	1
2 Hormones stéroïdiennes	3
3 Enzymes de la stéroïdogénèse	7
3.1 Les P450	7
3.1.1 CYP11A.....	8
3.1.2 CYP17.....	9
3.1.3 CYP19.....	11
3.1.4 CYP21.....	12
3.1.5 CYP11B1 et 11B2	12
3.2 Déshydrogénases/réductases à courte chaîne	13
3.2.1 3 β -HSD	15
3.2.2 17 β -HSD1	15
3.2.3 17 β -HSD2	16
3.2.4 17 β -HSD3	16
3.2.5 17 β -HSD4	17
3.2.6 17 β -HSD6	17
3.2.7 17 β -HSD7	18
3.2.8 17 β -HSD8	19
3.2.9 17 β -HSD9	19
3.2.10 17 β -HSD10	20
3.2.11 17 β -HSD11	20
3.2.12 17 β -HSD12	21
3.2.13 17 β -HSD13	22
3.2.14 17 β -HSD14	22
3.3 Aldo-céto réductases.....	23
3.3.1 17 β -HSD5	23

3.4	5 α -réductases	24
4	Évolution des enzymes de la stéroïdogénèse.....	25
5	But du projet	28

Partie B

Caractérisation de la 17 β -HSD de type 12 chez la souris

Avant-propos.....	29
Résumé.....	29
Article.....	31

Partie C

Étude de la spécificité de l'homologue de la 17 β -HSD de type 12 chez *C. elegans*

Avant-propos.....	54
Résumé.....	54
Article.....	56

Partie D

Conclusion

Bibliographie	82
---------------------	----

Liste des abréviations

a.a. ou aa	acide aminé
17 β -HSD	17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
3 α -diol	5 α -androstane-3 α -17 β -diol
3 α -HSD	3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase
4-dione	4-androstène-3,17-dione
5-diol	5-androstène-3 β ,17 β -diol
acyl-CoA	acyl coenzyme A
A-dione	5 α -androstane-3,17-dione
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADT	androstérone
AKR	aldo-céto réductase
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Da	Dalton
DHEA	déhydroépiandrostérone
DHEA-S	DHEA-sulfate
DHP	5 α -dihydroprogestérone
DHT	5 α -dihydrotestostérone
E1	estrone
E2	estradiol
Gly	glycine
GST	glutathione S-transférase
HEK-293	cellules embryonnaires de rein humain
HRE	élément de réponse à une hormone
HSP90	heat-shock protein 90
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
Lys	lysine
NAD ⁺	β -nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NADH	β -nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NADP ⁺	β -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH	β -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
PAPS	3'-phospho-adénosine 5'-phosphosulfate
P450	cytochrome P450
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
Preg	prégnénolone
Prog	progestérone
SDR	déshydrogénases/réductases à courte chaîne
Tyr	tyrosine
UGT	UDP-glucuronosyltransférase
X	n'importe quel acide aminé

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les nombreuses activités de la 17β -HSD de type 9.....	20
Tableau 2 : Propriétés de paires d'orthologues des 17β -HSD.....	27

Liste des figures

Figure 1 : Première conférence mentionnant le terme hormone.....	2
Figure 2 : Numérotation des 27 atomes de carbone du cholestérol	3
Figure 3 : Représentation des types de communication hormonale	4
Figure 4 : Représentation de l'action génomique des stéroïdes	6
Figure 5 : Aperçu de la stéroïdogénèse chez l'humain.....	7
Figure 6 : Transformation de l'androstenedione en estrone catalysée par le CYP19.....	11
Figure 7 : Homologie entre les différents types de 17 β -HSD.....	14
Figure 8 : Alignement de la région critique à la spécificité des homologues de la 17 β -HSD de type 12.....	22
Figure 9 : Évolution des enzymes stéroïdogéniques (Baker 2004)	25

Partie A

La stéroïdogénèse

1 Introduction

Alors qu'il était professeur au University College de Londres au début du siècle précédent, Ernest Starling étudia le péristaltisme intestinal avec son collègue et beau-frère William Bayliss (Bayliss *et al.* 1899; Bayliss *et al.* 1900; Bayliss *et al.* 1901). Leur étude exhaustive de l'innervation et du mouvement de l'intestin les amena à recréer une expérience qui avait valu à Ivan Petrovitch Pavlov le prix Nobel de médecine en 1904. Selon ce dernier, la sécrétion pancréatique était sous le contrôle du nerf vague. Le relâchement du « jus pancréatique » dans le duodénum était en quelque sorte une rétroaction au message transmis au cerveau par ce nerf lors de la présence d'acide dans l'environnement immédiat. Remettant en doute cette théorie, Bayliss et Starling disséquèrent les nerfs desservant le pancréas et le duodénum pour s'apercevoir que la sécrétion pancréatique n'était pas affectée par une telle intervention (Bayliss *et al.* 1902). Leur nouvelle hypothèse était donc qu'un composé inconnu, probablement sécrété par le duodénum, contrôlait la réponse du pancréas. Avec ingéniosité, ils parvinrent à isoler cette molécule et induire une sécrétion pancréatique rapide en l'injectant dans un chien anesthésié. Soucieux de décrire la réalité d'une molécule relâchée dans la circulation sanguine pour déclencher une activité quelconque ailleurs dans le corps, Starling se tourna vers son collègue W T Vesey, spécialiste du poète grec Pindar. Ce dernier créa alors un nouveau mot, « hormone », issu du verbe grec ὀρμή qui signifie « exciter » (figure 1).

Même si plus d'un siècle s'est écoulé depuis cette découverte, les hormones constituent toujours un fantastique champ d'étude pour de nombreux scientifiques. De nos jours, nous classons ces dernières dans trois groupes distincts : les hormones constituées d'une forme dérivée d'un acide aminé comme la tyrosine ou le tryptophane (ayant comme membres connus les catécholamines et la thyroxine), les hormones peptidiques issues d'une chaîne d'acides aminés (l'insuline et l'hormone de croissance appartiennent à ce groupe) et les

hormones dérivées des lipides et des phospholipides. Le présent mémoire se concentrera uniquement sur un sous-groupe de cette dernière catégorie, soit les hormones stéroïdiennes.

The Croonian Lectures

ON

THE CHEMICAL CORRELATION OF THE FUNCTIONS OF THE BODY.

*Delivered before the Royal College of Physicians of London
on June 20th, 22nd, 27th, and 29th, 1905,*

By ERNEST HENRY STARLING, M.D. LOND.,
F.R.S.,

FELLOW OF THE COLLEGE; JODBELL PROFESSOR OF PHYSIOLOGY,
UNIVERSITY COLLEGE, LONDON.

LECTURE I.

Delivered on June 20th.

THE CHEMICAL CONTROL OF THE FUNCTIONS OF THE BODY.

MR. PRESIDENT AND GENTLEMEN,—From the remotest ages the existence of a profession of medicine, the practice of its art and its acceptance as a necessary part of every community have been founded on a tacit assumption that the functions of the body, whether of growth or activity of organs, can be controlled by chemical means; and research by observation of accident or by experiment for such means has resulted in the huge array of drugs which form the pharmacopœias of various civilised countries and the common armamentarium of the medical profession throughout the world.

These chemical messengers, however, or "hormones" (from ὁρμῶν, I excite or arouse), as we might call them, have to be carried from the organ where they are produced to the organ which they affect by means of the blood stream and the continually recurring physiological needs of the organism must determine their repeated production and circulation through the body.

Figure 1 : Première conférence mentionnant le terme hormone (Henderson 2005)

2 Hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes dérivent d'un précurseur commun : le cholestérol. De ce fait, leur squelette s'articule autour d'un cyclopentanoperhydrophénantrène qui est un assemblage de trois cycles de six carbones et un cycle de cinq carbones (figure 2).

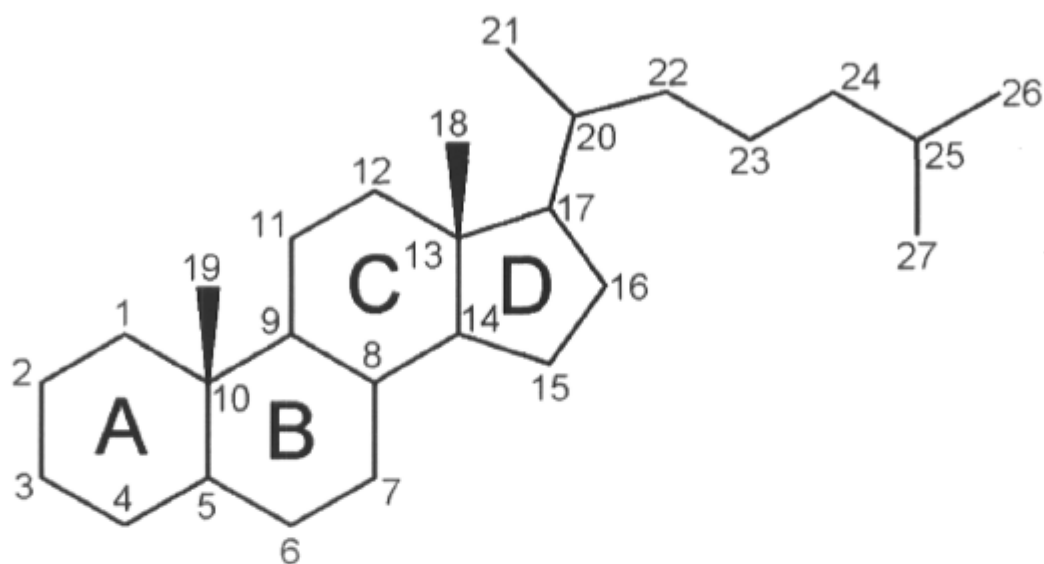


Figure 2 : Numérotation des 27 atomes de carbone du cholestérol

Le nombre d'atomes de carbone est une caractéristique qui permet la classification des stéroïdes sexuels. Le cortisol est un stéroïde de type pregnane comptant 21 carbones et appartenant à la famille des glucocorticoïdes. Pour sa part, l'aldostérone fait partie des minéralocorticoïdes tout en étant également de type pregnane. Les androgènes à 19 carbones, telle la testostérone, sont de type androstane. Certaines molécules sécrétées par les surrénales chez l'humain comme le DHEA, en forme sulfatée ou non, sont également des stéroïdes à 19 carbones. L'estradiol, qui est le principal représentant des estrogènes, illustre le fait que ce regroupement possède 18 carbones.

Ces hormones stéroïdiennes peuvent participer à de nombreux programmes de développement tels la différenciation sexuelle, la maturation, le cycle menstruel ou la grossesse. Elles se comportent alors comme des messagers chimiques transmettant un signal intercellulaire. Les traités classiques d'endocrinologie recensent trois modèles

généraux pour décrire le mode d'action des hormones alors qu'un quatrième, spécifique aux récepteurs nucléaires, a été décrit au tournant des années 1990 (Labrie 1991) (figure 3). Les hormones dites autocrines agissent au niveau même de la cellule qui les libère en se liant à des récepteurs localisés à sa surface. Les hormones paracrines ou encore médiateurs locaux auront un effet localisé dans le voisinage de la cellule émettrice. L'activité endocrine classique propose un mécanisme utilisant le transport par la circulation sanguine. Dans ce mode d'action, une cellule relâchera préalablement une hormone qui sera transportée par le réseau sanguin avant de rencontrer son récepteur situé sur une cellule cible distante dans l'organisme concerné. Alors que l'endocrinologie classique nécessite une grande quantité d'hormone pour avoir un effet quelconque en raison de la dégradation et du délai inhérent au transport par la circulation sanguine, la voie intracrine permet un effet maximal à partir d'un minimum de précurseur. En effet, un stéroïde inactif pénétrant dans une cellule pourra être transformé et effectuer son action au sein même de la cellule l'ayant synthétisé sans que la sécrétion dans l'espace extra-cellulaire ne soit nécessaire. Chez l'humain, une large proportion des estrogènes et des androgènes est synthétisée localement à leur site d'action dans les tissus périphériques cibles à partir de précurseurs circulants. Par exemple, chez l'homme adulte, environ 50% des androgènes sont générés localement par le système intracrine (Labrie *et al.* 2000).

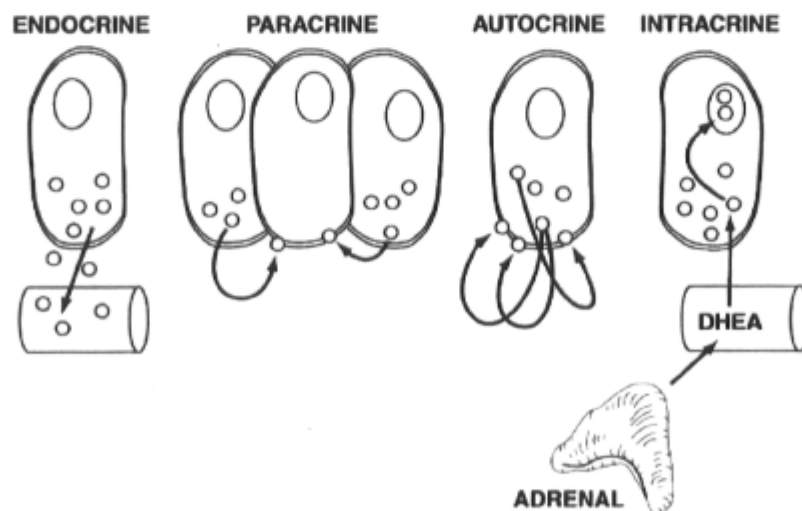


Figure 3 : Représentation des types de communication hormonale (Labrie *et al.* 2003)

Les hormones stéroïdiennes, qu'elles soient synthétisées à même la cellule réceptrice ou bien encore captées dans la circulation sanguine où elles sont rattachées à des protéines de transport, possèdent une nature lipophile. Cette propriété leur permet de pénétrer la membrane cellulaire par simple diffusion. Une fois dans la cellule, ces molécules s'attachent à leur récepteur hormonal qui est généralement complexé à des chaperonnes moléculaires comme la Hsp90 (Carson-Jurica *et al.* 1990; Landers *et al.* 1992; Laudet 1997; McKenna *et al.* 2002). Ces récepteurs d'hormones stéroïdiennes sont des facteurs de transcription intracellulaires qui peuvent être activés lors de la liaison de leur(s) substrat(s) pour exercer un effet positif ou négatif sur l'expression des gènes cibles. Effectivement, un récepteur lié à son substrat se dissociera de ses chaperonnes avant de se dimériser (Deslypere *et al.* 1992; Lin *et al.* 1997). Le complexe ainsi formé se liera à des séquences d'ADN cibles appelées « hormone response elements » (HRE) situées dans le voisinage des gènes sous leur contrôle. L'interaction des éléments de réponse et du dimère de récepteurs porteurs de leur substrat spécifique initiera finalement un remodelage de la chromatine pour activer ou réprimer la transcription (figure 4).

Chez les mammifères, ces hormones stéroïdiennes peuvent être regroupées dans cinq groupes distincts selon le type de récepteur auquel elles se lient et les réponses physiologiques qu'elles induisent. Le cortisol est le principal glucocorticoïde humain tandis que la corticostérone assure ce rôle chez les rongeurs tels le rat et la souris. Les glucocorticoïdes modifient le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides. Ils possèdent un pouvoir anti-inflammatoire et sont régulièrement utilisés pour traiter l'arthrite ainsi que certaines maladies auto-immunes. Pour leur part, les minéralocorticoïdes influencent l'excrétion des sels et la réabsorption de l'eau au niveau rénal. L'aldostérone est le minéralocorticoïde endogène primaire. Quant à eux, les androgènes et les estrogènes sont bien connus pour leurs rôles variés dans le développement et la différenciation sexuelle. Le DHT et l'estradiol sont respectivement impliqués dans l'expression des caractères sexuels secondaires chez l'homme et la femme. Les estrogènes peuvent à la fois favoriser la croissance tumorale (Lewison 1965) tout en démontrant une activité protectrice au niveau des systèmes vasculaire et nerveux (Wise 2002). Finalement, le cinquième et dernier groupe comprend les progestatifs. La progestérone, qui est le progestatif naturel

d'importance majeure chez l'humain (Finn *et al.* 1974), régule le cycle menstruel, la grossesse ainsi que le développement de l'embryon.

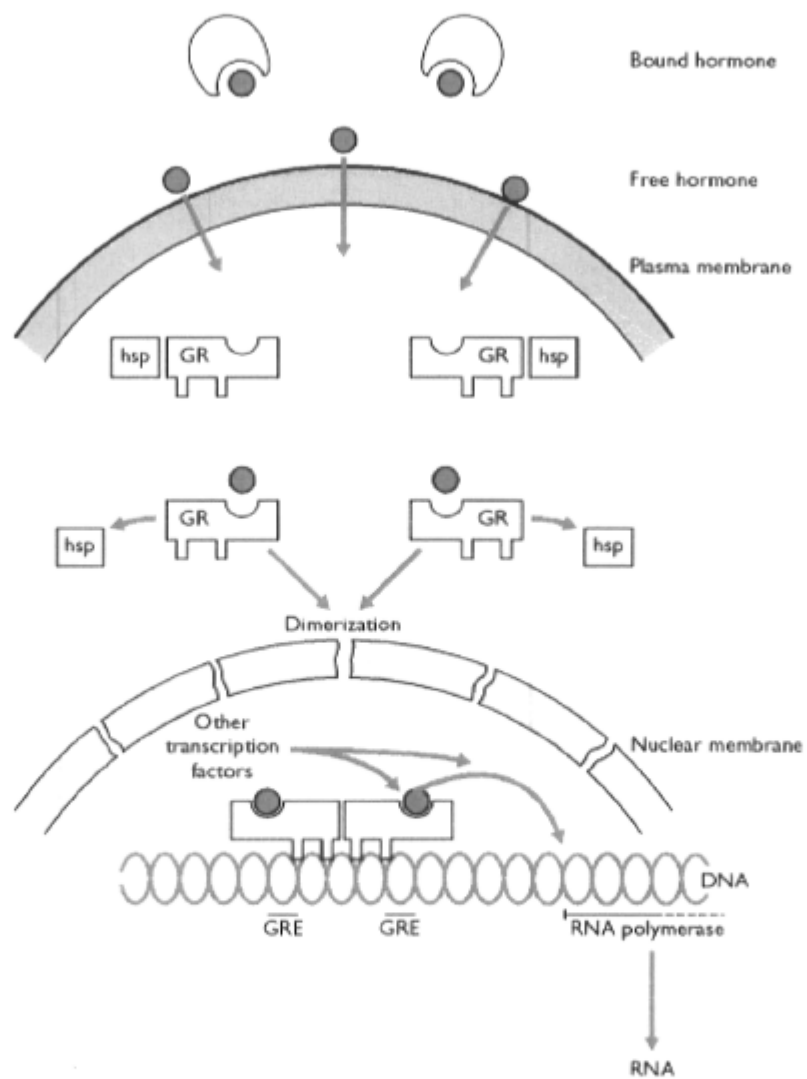


Figure 4 : Représentation de l'action génomique des stéroïdes (Nussey *et al.* 2001)

3 Enzymes de la stéroïdogénèse

Les hormones stéroïdiennes contrôlent des fonctions physiologiques vitales comme l'homéostasie en sels et la différenciation sexuelle. Le déséquilibre stéroïdien est impliqué dans des pathologies allant des cancers hormonaux-dépendants jusqu'au syndrome métabolique (Bélanger *et al.* 2002). Tous ces stéroïdes, qu'ils appartiennent à la classe des minéralocorticoïdes, des glucocorticoïdes, des hormones sexuelles ou bien encore des neurostéroïdes, sont issus d'un précurseur commun soit le cholestérol. Il importe donc de bien comprendre la voie métabolique responsable de leur synthèse : la stéroïdogénèse (figure 5).

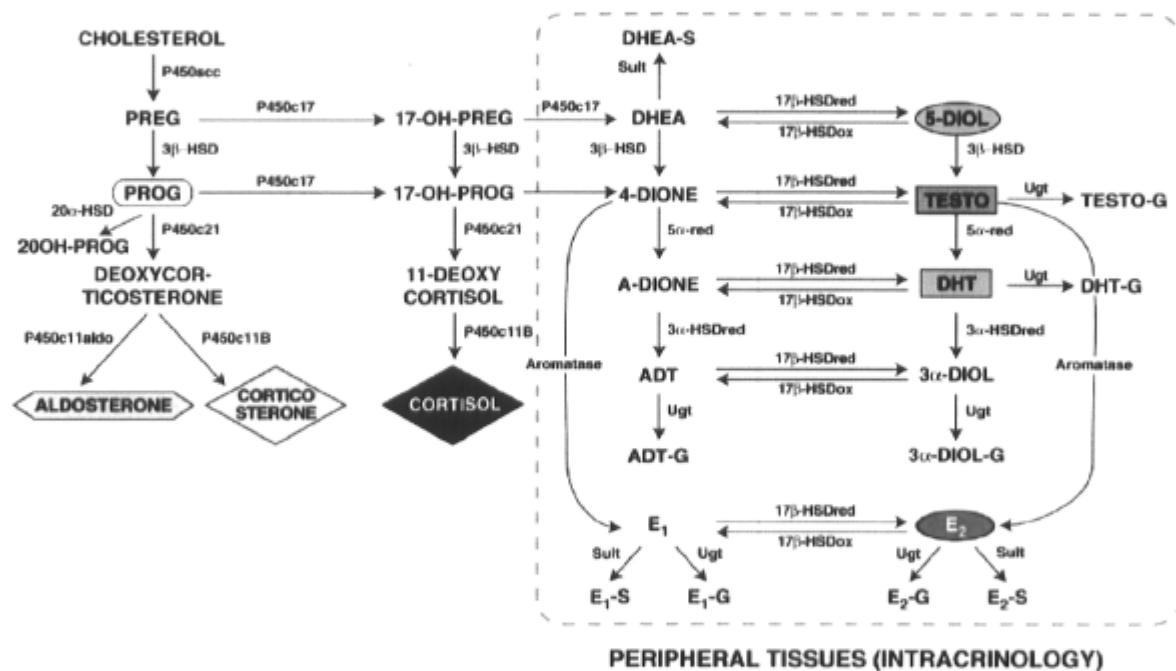


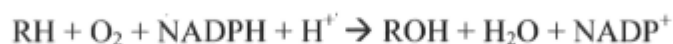
Figure 5 : Aperçu de la stéroïdogénèse chez l'humain (Luu-The *et al.* 2005)

3.1 Les P450

La nomenclature classique pour identifier les gènes cytochrome P450 débute par CYP pour les gènes humains et est suivie d'un nombre arabe pour représenter la famille et une lettre pour la sous-famille. Si deux gènes ou plus existent dans cette sous-famille, un deuxième nombre s'ajoute au nom (Nelson *et al.* 1996). Les enzymes P450 impliquées dans la stéroïdogénèse sont associées à des membranes comme celles de la mitochondrie

(CYP11A, CYP11B1, CYP11B2) ou bien encore du réticulum endoplasmique (CYP17, CYP19, CYP21). Les P450 sont des membres à part entière de la superfamille des protéines contenant un hème. On les retrouve tant chez les bactéries que chez les plantes et les animaux. Elles ont la caractéristique d'absorber la lumière (maximum d'absorption à 450 nm) lorsque complexées avec une molécule de monoxyde de carbone à l'état réduit.

Au niveau de la formation des stéroïdes actifs, les P450 fonctionnent comme des mono oxygénases utilisant le NADPH réduit comme donneur d'électron lors de la réduction de l'oxygène. Le transfert des électrons du NADPH s'effectue par le biais de deux mécanismes de transfert distincts. Cette classe d'enzyme peut donc hydroxyler ou bien encore cliver des substrats stéroïdiens selon la réaction générale suivante :



Comme les P450 sont des joueurs essentiels à la conversion du précurseur commun, le cholestérol, en hormone stéroïdienne active, nous allons nous attarder à la description des membres de ce groupe.

3.1.1 CYP11A

Avant la synthèse de tout stéroïde, une protéine nommée StAR pour « steroidogenic acute regulatory protein » se charge de transférer le cholestérol vers la membrane intérieure de la mitochondrie (Privalle *et al.* 1983). Cette étape déterminante fournit le substrat nécessaire au CYP11A, aussi connu sous le nom de P450 cholesterol side-chain cleavage. Le CYP11A catalyse alors la formation de la prégnénolone à partir du cholestérol en fonction de sa disponibilité (Burstein *et al.* 1976). L'enzyme dirige trois oxydations successives du cholestérol, chaque réaction nécessitant une molécule de O₂ ainsi qu'une autre de NADPH. La première est l'hydroxylation à la position C22 suivie d'une seconde en position C20 pour finalement mener au bris de la liaison entre les carbones 20 et 22. Cette cascade libère finalement un stéroïde à 21 carbones, la prégnénolone (Burstein *et al.* 1976). De manière étonnante, les études sur la protéine purifiée ont démontré qu'une seule enzyme catalyse ces trois réactions à un seul et même site actif (Shikita *et al.* 1973; Watanuki *et al.* 1978).

L'ADNc fut initialement isolé à partir de glandes surrénales de boeuf (Morohashi *et al.* 1984). Depuis, l'ADNc de CYP11A a été cloné chez l'humain, le rat et la souris (Chung *et al.* 1986; Oonk *et al.* 1989; Arensburg *et al.* 1999). Le gène situé sur le chromosome 15q23-q24 code pour une protéine humaine constituée de 521 acides aminés. Cette séquence en acides aminés est très homologue entre les espèces, partageant une identité égale ou supérieure à 71%. La structure primaire de la protéine humaine est élucidée (Morohashi *et al.* 1987).

Chez l'humain, les sites d'expression majeurs de la protéine sont la glande surrénale, l'ovaire, le testicule et le placenta. Dans les surrénales, CYP11A est exprimé dans les trois zones connues : la zone fasciculée, la zone réticulée et la zone glomérulée (Ishimura *et al.* 1997; Pelletier *et al.* 2001). Il est intéressant de noter que l'expression de CYP11A est nécessaire à la survie (Luo *et al.* 1994; Hu *et al.* 2002).

3.1.2 CYP17

Le P450c17 ou CYP17 catalyse deux réactions utilisant la fonction oxydoréductase du P450 et le système de transfert d'électrons du micrososome. Premièrement, l'enzyme catalyse une 17 α -hydroxylation des stéroïdes C21 prégénolone ou progestérone suivie d'un clivage du lien C17-20 pour produire respectivement le DHEA et le 4-dione. Chaque réaction requiert une molécule de NADPH et une molécule de O₂. Entre les deux étapes catalysées, un intermédiaire tel le 17 α -hydroxyprégénolone ou le 17 α -hydroxyprogestérone est formé selon le stéroïde C21 de départ. Même si initialement il était suggéré que chacune des réactions était sous la gouverne d'enzymes distinctes, il est maintenant prouvé que le CYP17 peut bel et bien se charger tant de la 17 α -hydroxylation que de l'activité lyase (Nakajin *et al.* 1981a; Nakajin *et al.* 1981b). Cette constatation fut confirmée ultérieurement par le clonage de l'enzyme bovine (Zuber *et al.* 1986). Les protéines humaines et bovines préfèrent le substrat prégénolone pour former le DHEA alors que leurs homologues chez les rongeurs favorisent la transformation de la progestérone en 4-dione (Swart *et al.* 1993; Katagiri *et al.* 1995; Brock *et al.* 1999). Cette divergence quant au biais de substrat s'explique en partie par le fait que la protéine accessoire cytochrome B5 doit nécessairement être présente pour transformer le 17 α -hydroxyprégénolone chez

l'humain et le boeuf (Auchus *et al.* 1998). La présence du cytochrome B5 permet d'augmenter la V_{\max} de l'activité lyase. Également, de nombreux travaux dans littérature démontrent que des changements dans la structure primaire des enzymes de l'ordre d'un seul acide aminé chez les rongeurs sont suffisants à leur conférer une spécificité de substrat autre que le CYP17 humain (Lin *et al.* 1991; Lin *et al.* 1993; Lin *et al.* 1994).

L'importance du CYP17 chez l'humain réside dans le fait qu'il catalyse la transformation de la prégnénolone en 17 α -hydroxyprégnénolone. Cette dernière peut par la suite être transformée en glucocorticoïdes ou bien encore en DHEA, le précurseur des stéroïdes sexuels. Certaines études effectuées sur des enzymes purifiées et partiellement purifiées démontrent que la transformation de la prégnénolone en DHEA s'effectue en une seule étape. Cependant, cette constatation ne peut être juste en conditions physiologiques puisqu'il serait alors ardu d'expliquer la présence de substrats 17 α -hydroxylés menant aux glucocorticoïdes tel le cortisol. La solution à cette interrogation fut apportée par une expérimentation avec des cellules transfectées surexprimant le CYP17 qui était plus représentative des conditions *in vivo*. En culture cellulaire, il est clair que la réaction s'effectue en deux étapes avec le relâchement et l'accumulation mesurable de la 17 α -hydroxyprégnénolone suite à une incubation avec de la prégnénolone (Soucy *et al.* 2000). Le facteur qui déterminera si les intermédiaires 17 α -hydroxylés seront transformés en précurseurs de stéroïdes sexuels ou bien encore en glucocorticoïdes est simplement la présence du CYP17 ou de la 3 β -HSD prêts à accueillir l'intermédiaire relâché. L'expression et la compétition de ces deux enzymes déterminent la direction de la réaction finale.

Chez l'humain, la souris et le rat, un seul gène encode le CYP17 (Picado-Leonard *et al.* 1987; Fevold *et al.* 1989; Kagimoto *et al.* 1989; Youngblood *et al.* 1991). La séquence génomique s'étend sur 6 kb et est située sur le chromosome 10q24.3 (Matteson *et al.* 1986; Fan *et al.* 1992; Youngblood *et al.* 1992). La protéine humaine ainsi codée possède 508 acides aminés pour une masse moléculaire prédite de 56 kDa (Chung *et al.* 1987).

L'expression tissulaire couvre tous les tissus stéroïdogéniques classiques. CYP17 n'est cependant pas exprimé dans la zone glomérulée des glandes surrénales chez l'humain, le boeuf et le singe même si elle est présente dans les zones fasciculées et réticulées (Hyatt *et*

al. 1983a; Hyatt *et al.* 1983b; Endoh *et al.* 1996). De même, l'ARNm est absent du placenta humain. Chez les rongeurs, le CYP17 n'est pas exprimé dans les surrénales, ce qui explique qu'elles produisent du corticostérone plutôt que du cortisol comme c'est le cas chez l'humain (Brock *et al.* 1999; Pelletier *et al.* 2001).

3.1.3 CYP19

Le cytochrome P450 CYP19 est souvent appelé aromatase. L'enzyme codée par ce gène catalyse la conversion des androgènes C19, 4-dione et testostérone, en leur estrogène C18 correspondant, soit respectivement l'estrone et l'estradiol (Simpson *et al.* 1994). La réaction nécessite trois molécules d'oxygène et trois NADPH et implique tant le système de transfert des électrons du micrososome que la fonction réductase du cytochrome P450. Il se produit d'abord une oxydation du groupe méthyl en C19 suivie d'une attaque finale pour le déloger (Graham-Lorence *et al.* 1991; Simpson *et al.* 1994) (figure 6).

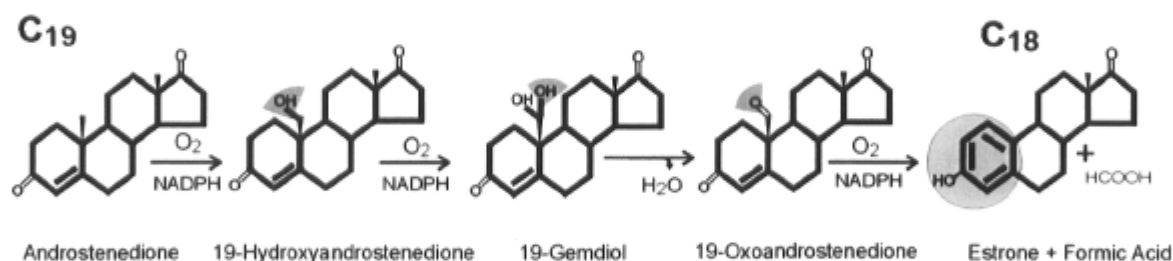


Figure 6 : Transformation de l'androstenedione en estrone catalysée par le CYP19
(Payne *et al.* 2004)

La production d'un anticorps spécifique (Mendelson *et al.* 1985) et la purification de l'enzyme provenant du placenta humain (Evans *et al.* 1986) ont permis le clonage de l'ADNc du CYP19. Le gène humain de 10 exons contenus dans une région de 30 kb a été identifié sur le chromosome 15q21.1 (Chen *et al.* 1988). La traduction de cette séquence produit une protéine de 503 acides aminés ayant une masse moléculaire de 58 kDa.

Des promoteurs tissulaires spécifiques se chargent de contrôler la distribution de l'aromatase dans l'ovaire, le placenta et les tissus adipeux. Une grande proportion des estrogènes circulant chez l'humain sont en fait des androgènes ayant été aromatisés au niveau des tissus périphériques.

3.1.4 CYP21

L'hydroxylation de la position C21 de la progestérone et du 17 α -hydroxyprogestérone est catalysée par le cytochrome P450c21. La réaction s'opérant dans le réticulum endoplasmique requiert à la fois le système de transfert des électrons du microsome, une molécule de NADPH et une molécule d'oxygène.

Chez l'humain, bien que deux gènes puissent encoder un ARNm, soit CYP21A et CYP21B, seul le gène CYP21B encode une protéine active (Higashi *et al.* 1986; White *et al.* 1986). Cela s'explique probablement par une délétion de huit bases et une insertion d'une base qui termine prématurément la traduction de l'ARNm du gène CYP21A (Rodrigues *et al.* 1987). Les deux gènes sont localisés sur le chromosome 6p21.3 et encodent des protéines de 56 kDa.

Le CYP21 est exprimé uniquement dans les glandes surrénales et est essentiel à la synthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes. Il est exprimé dans les trois zones fonctionnelles des surrénales. Aucune expression mesurable n'a été observée dans des tissus comme le rein, le foie, le testicule ou l'ovaire (Parker *et al.* 1985). Au point de vue clinique, cette étape enzymatique est critique puisqu'une déficience mènera à une hypersécrétion des stéroïdes C19 et une baisse de production de cortisol et d'aldostérone. Sans un diagnostic efficace, cette maladie peut s'avérer fatale dès les premiers moments suivant la naissance (White *et al.* 2000).

3.1.5 CYP11B1 et 11B2

La production des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes fait intervenir les protéines CYP11B1 et CYP11B2 qui sont respectivement localisées dans la zone fasciculée et dans la zone glomérulée. CYP11B1 catalyse la 11 β -hydroxylation de la 11-désoxycorticostérone et de la 11-désoxycortisol pour générer la corticostérone ou encore la cortisone, dépendamment du substrat de la réaction. Le CYP11B2, aussi connu sous le nom d'aldostérone synthase, catalyse trois réactions séquentielles utilisant toutes une molécule de NADPH, une molécule d'oxygène et le système de transfert des électrons de la mitochondrie. Il se produit premièrement une 11 β -hydroxylation de la 11-désoxycorticostérone suivie d'une hydroxylation en position C18. La réaction se termine

par l'oxydation du groupement hydroxyl pour former la cétone caractéristique de l'aldostérone. Il semblerait que cette cascade de réactions s'effectue sans le relâchement d'un intermédiaire (White *et al.* 1994).

Les deux gènes en question se situent dans la même région du chromosome 8 (8q21-22), étant séparés d'environ 40 kb (Lifton *et al.* 1992). L'homologie entre les séquences d'acides aminés de CYP11B1 et CYP11B2 est très forte, avoisinant les 93% d'identité. Les protéines se situent dans la membrane interne de la mitochondrie et incluent donc une séquence de localisation de 24 acides aminés qui est clivée une fois dans la mitochondrie.

L'expression tissulaire se trouve limitée aux glandes surrénales pour les deux homologues. Le sous-type B2 se retrouve exclusivement dans la zone glomérulée alors que B1 occupe une zone fasciculée (Ogishima *et al.* 1991).

3.2 Déshydrogénases/réductases à courte chaîne

Les hydroxystéroïdes déshydrogénases comme les 3S α -HSD et les 17 β -HSD appartiennent pratiquement toutes au même groupe phylogénique de protéines soit la superfamille des déshydrogénases/réductases à courte chaîne (SDR) (Penning 1997). Seule la 17 β -HSD de type 5 est une aldo-céto réductase (AKR). Les enzymes SDR possèdent en général environ 250 résidus et catalysent des réactions d'oxydation et de réduction dépendantes du cofacteur NAD(P)(H). Elles possèdent un site de liaison au cofacteur en N-terminal et un site catalytique en C-terminal (Kallberg *et al.* 2002). Ce groupe est vaste et regroupe plus de 3000 membres ayant des substrats tels les alcools, les sucres, les composés aromatiques et les stéroïdes.

Puisque la structure de ces substrats varie énormément, la région située à l'extrémité C-terminale de ces enzymes est également très variable. En effet, l'homologie peut être aussi basse que 15% à 30% entre les membres de ce groupe (Baker 1994; Jornvall *et al.* 1995). Typiquement, l'homologie de la séquence primaire est la plus forte dans la région couvrant les 200 premiers acides aminés des SDR (Jornvall *et al.* 1995). Malgré la variabilité des résidus composant ces protéines, les analyses cristallographiques confirment que la structure secondaire, formée d'une alternance d'hélices α et de feuillets β , ainsi que les

motifs de la structure tertiaire sont conservés (Ghosh *et al.* 1991; Ghosh *et al.* 1994; Ghosh *et al.* 1995). Cette propriété intrinsèque facilite donc la modélisation par homologie. Certains des motifs conservés s'avèrent essentiels pour l'activité enzymatique des SDR. C'est le cas de la séquence Tyr-X-X-X-Lys qui constitue le site actif. De même, le motif Gly-X-X-X-Gly-X-Gly forme le Rossmann fold associé au site de liaison au cofacteur (Baker 1994; Jornvall *et al.* 1995). Ces patrons sont conservés chez les SDR, incluant les 17 β -HSD, puisque la fonction catalytique de ces enzymes dépend directement de leur intégrité.

Type	1	2	3	4	5	7	8	10	11	12	13	14
1		21	18	15	18	21	21	23	23	16	21	25
2	36		21	15	15	17	20	18	22	21	20	22
3	37	38		14	17	17	20	18	24	41	24	22
4	22	25	24		15	17	14	13	14	14	13	13
5	36	30	37	23		18	18	19	15	17	17	18
7	41	36	37	26	32		18	20	19	17	21	21
8	38	34	36	20	34	33		30	22	19	22	27
10	38	30	37	19	35	35	52		22	21	22	29
11	41	36	43	22	35	39	38	39		26	63	19
12	39	39	59	21	35	34	39	36	47		25	20
13	39	35	46	22	38	38	40	39	79	46		18
14	41	36	37	20	35	35	47	45	38	38	40	

Figure 7 : Homologie entre les différents types de 17 β -HSD (le triangle supérieur en gris représente l'identité alors l'inférieur indique la similarité entre deux protéines données)

3.2.1 3 β -HSD

Plusieurs isoformes de la 3 β -HSD ont été isolées et caractérisées chez l'humain (Luu The *et al.* 1989b; Lachance *et al.* 1990; Lachance *et al.* 1991; Rheaume *et al.* 1991; Simard *et al.* 1996) et la souris (Payne *et al.* 1997). Les rongeurs possèdent jusqu'à six isoformes actives tandis que l'humain exprime deux isoformes distinctes. Chez ce dernier, la 3 β -HSD de type 1 se retrouve dans de nombreux tissus périphériques alors que la 3 β -HSD de type 2 est spécifique aux glandes surrénales et aux gonades. L'action enzymatique de la 3 β -HSD est essentielle chez l'humain pour produire les hormones stéroïdiennes actives. Son action irréversible transforme les 5-ène-3 β -hydroxystéroïdes (prégnénolone, 17 α -hydroxyprégnénolone, DHEA, 5-diol) en leur 4-ène-3-cétostéroïde correspondant (progestérone, 17 α -hydroxyprogestérone, 4-dione, testostérone). Pour ce faire, une première oxydation de l'hydroxyle en position 3 dépendante du cofacteur NAD⁺ est suivie d'une isomérisation réutilisant le NADH formé lors de la première étape (Thomas *et al.* 1989; Thomas *et al.* 1995; Thomas *et al.* 2003). Il est à noter que le NADP⁺ est reconnu comme étant un cofacteur inefficace pour les activités de ces protéines (Clarke *et al.* 1993). La suite de réactions (oxydation et isomérisation) est catalysée par une seule et même enzyme sans relâchement du cofacteur ou de l'intermédiaire. En effet, il a clairement été démontré que la 3 β -HSD possédait deux sites catalytiques distincts dans un même site actif (Luu-The *et al.* 1991).

Une particularité des isoformes de la 3 β -HSD est qu'elles sont exprimées d'une manière spécifique au tissu. Par exemple, le type 1 se retrouve dans le placenta, la peau et la glande mammaire alors que le type 2 est présent dans les tissus stéroïdogéniques comme les surrénales, l'ovaire et le testicule (Rheaume *et al.* 1991). Une mutation génétique dans la 3 β -HSD de type 2 abolissant l'activité de la protéine entraîne une hausse des niveaux de DHEA circulant tout en inhibant gravement la synthèse des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes (Rheaume *et al.* 1991; Moisan *et al.* 1999; Simard *et al.* 2002).

3.2.2 17 β -HSD1

La 17 β -HSD de type 1 fut la première enzyme de cette famille à être clonée (Peltoketo *et al.* 1988). Le gène humain a été assigné à la région chromosomique 17q11-q21 et encode

une protéine de 327 acides aminés (Luu The *et al.* 1989a). L'enzyme forme un homodimère soluble qui utilise le cofacteur NADPH pour catalyser la transformation de l'estrone en un estrogène encore plus actif, l'estradiol (Dumont *et al.* 1992; Lin *et al.* 1992). Bien que le clonage original ait été effectué à partir d'une librairie de placenta humain, on retrouve la 17 β -HSD de type 1 exprimée dans divers tissus tels les ovaires et la glande mammaire (Pittaway *et al.* 1983; Martel *et al.* 1992). La structure de la protéine a été déterminée pour de nombreux complexes avec différents substrats, ce qui permet une compréhension détaillée des mécanismes de recrutement du substrat et de catalyse (Ghosh *et al.* 1995; Breton *et al.* 1996; Lin *et al.* 1996; Ghosh *et al.* 2001). Par exemple, nous savons maintenant que la spécificité pour les substrats estrogéniques est due à l'acide aminé leucine en position 149.

3.2.3 17 β -HSD2

La deuxième isoforme de la famille des 17 β -HSD est une enzyme possédant une extrémité N-terminale lui permettant de se localiser dans le réticulum endoplasmique. Le gène fut isolé et cloné grâce à une librairie d'ADNc de prostate humaine (Wu *et al.* 1993). En raison de son caractère hautement hydrophobe, la structure n'est toujours pas élucidée même si des déléments solubles ont pu être obtenus (Puranen *et al.* 1999). La protéine de 387 acides aminés catalyse la conversion de l'estradiol en estrone, de la testostérone en 4-dione et du 5-diol en DHEA. Cette enzyme, qui utilise le NAD(H) comme cofacteur, est moins spécifique que la 17 β -HSD de type 1 puisqu'elle agit aussi efficacement sur des substrats de type androgène qu'estrogène. Son expression qui est étendue à des tissus tels le placenta, le foie, le petit intestin, l'endomètre, le rein, le pancréas et sa fonction de dégradation des stéroïdes actifs suggèrent qu'elle assure une protection contre des niveaux trop élevés d'hormones stéroïdiennes actives (Casey *et al.* 1994). Il est à noter que la 17 β -HSD de type 2 possède également la capacité d'oxyder la position 20 α des stéroïdes à 21 carbones (Wu *et al.* 1993).

3.2.4 17 β -HSD3

La troisième 17 β -HSD caractérisée encode une protéine prédite de 310 acides aminés possédant une masse moléculaire de 34,5 kDa. Comme son expression semblait spécifique

au testicule, la fonction prédite était la production de testostérone au niveau de la gonade. Cette hypothèse fut confirmée par la découverte de mutations dans ce gène chez des patients souffrant de pseudohermaphrodisme mâle (Geissler *et al.* 1994; Boehmer *et al.* 1999). Ces individus affectés par une déficience en 17β -HSD de type 3 sont caractérisés par une absence de structures reproductives mâles internes. L'enzyme sauvage catalyse la réduction du 4-dione en testostérone, de l'A-dione en DHT et de l'estrone en estradiol. Elle est donc critique dans la synthèse d'hormones sexuelles actives. Ultérieurement, la 17β -HSD de type 3 fut détectée dans des tissus non-gonadiques, tels la glande sébacée et le tissu osseux, mais à des niveaux beaucoup plus faible que dans le testicule (Janssen *et al.* 1999).

3.2.5 17β -HSD4

La 17β -HSD de type 4 humaine est une protéine contenant 736 acides aminés et qui transforme l'estradiol en estrone et le 5-diol en DHEA (Adamski *et al.* 1995). Les ARN messagers encodant cette enzyme se retrouvent pratiquement dans tous les tissus humains dont le foie, le cœur, la prostate, le testicule, le poumon, le muscle squelettique, le rein, le pancréas et même dans certaines lignées cellulaires de cancer du sein. Même si son importance physiologique reste à déterminer en raison de son activité faible, cette enzyme a probablement un rôle d'inactivation des estrogènes dans de nombreux tissus périphériques. Il est à noter que la 17β -HSD de type 4 est un membre unique de la famille des 17β -HSD. En effet, cette dernière possède trois domaines distincts lui conférant des fonctions additionnelles. Le domaine N-terminal est celui responsable de son action sur les stéroïdes qui nécessite le cofacteur NAD^+ . Un second domaine lui confère une activité hydratase et le dernier permet de lier certains substrats lipidiques. Des mutations dans ce gène sont connues pour causer un syndrome fatal similaire à celui de Zellweger caractérisé par une déformation crâno-faciale, une hypotonie, une macrocéphalie, un thorax de faible taille, des convulsions et un retard psychomoteur (Leenders *et al.* 1998; Moller *et al.* 2001; Mindnich *et al.* 2004). L'espérance de vie chez ces sujets varie de cinq à douze mois.

3.2.6 17β -HSD6

La sixième isoforme de la famille des 17β -HSD n'a toujours pas été décrite chez l'humain à ce jour. Cependant, en utilisant une collection d'ADNc provenant de la prostate de rat, des

clones métabolisant le 3 α -diol ont été générés (Biswas *et al.* 1997). Bien que son activité prédominante soit l'oxydation du 3 α -diol en ADT, cette enzyme peut transformer certains stéroïdes à 19 carbones comme le DHT et la testostérone, mais à un niveau de 50 à 100 fois moindre. Puisque la 17 β -HSD de type 6 possède une homologie à 65% avec le rétinol déshydrogénase de type 1 du rat, elle est généralement classée parmi la sous-famille des rétinol déshydrogénases.

3.2.7 17 β -HSD7

La 17 β -HSD de type 7 fut initialement clonée à partir d'ADNc issu du corps lutéal du rat. À l'époque, on l'identifia comme la « prolactin receptor associated protein » (PRAP) (Duan *et al.* 1996). Suite à la transfection de ce gène dans des cellules HEK-293, la preuve fut faite que PRAP était en mesure de transformer l'estrone en estradiol en présence de NADPH tout en ayant une action négligeable sur les stéroïdes C19 (Nokelainen *et al.* 1998; Torn *et al.* 2003). L'orthologue de cette enzyme chez l'humain encode une protéine de 341 acides aminés et serait exprimé dans l'ovaire, le placenta, le testicule, la prostate et le foie (Krazeisen *et al.* 1999). En plus de la fonction d'activation des estrogènes, l'enzyme humaine est dotée d'une activité 3-céto-réductase lui permettant d'inactiver le DHT. Il est prévu que la 17 β -HSD de type 7 joue un rôle majeur dans les tissus sensibles aux estrogènes puisqu'elle active l'estradiol tout en dégradant l'androgène DHT qui contrecarre l'action des estrogènes dans ces tissus. Le clonage d'un gène humain très similaire (plus de 96% d'homologie) codant pour une enzyme ayant les mêmes activités enzymatiques, mais situé sur le chromosome 1q23 plutôt que 10p11.2, vient d'être rapporté (Liu *et al.* 2005). De même, la 17 β -HSD de type 7 a récemment été associée à la biosynthèse du cholestérol postsqualène. Ce rôle étant très important lors du développement embryonnaire, il est probable qu'une déficience en 17 β -HSD de type 7 mène à des maladies similaires à la chondrodysplasie ponctuée dominante liée au chromosome X ou bien encore le syndrome CHILD, comme c'est le cas pour d'autres partenaires de la biosynthèse du cholestérol (Marijanovic *et al.* 2003). À ce jour, l'obtention de la structure tridimensionnelle demeure problématique puisque l'enzyme, liée au réticulum endoplasmique par un segment hélicoïdale transmembranaire à son extrémité N-terminale, est difficilement isolable.

3.2.8 17 β -HSD8

La 17 β -HSD de type 8 est également connue sous le nom de Ke6 et se retrouve dans la région génomique HLA bien connue pour contenir des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (Kikuti *et al.* 1997). Chez la souris, deux modèles différents d'expression aberrante sont associés à la maladie polycystique du rein (Aziz *et al.* 1993). Lorsque la protéine se trouve surexprimée en fusion avec GST, elle est apte à catalyser la transformation de l'estradiol en estrone ainsi que la dégradation de la testostérone en 4-diol mais à un niveau moindre (Fomitcheva *et al.* 1998). Ce résultat fut confirmé en isolant le fragment d'ADNc correspondant à la région codante de Ke6 avant de le transférer dans des cellules HEK-293 (Luu-The 2001). Pour cette raison, il a été suggéré d'utiliser le nom 17 β -HSD de type 8 pour décrire le gène plutôt que Ke6 (Peltoketo *et al.* 1999). Le gène en question encode une enzyme constituée de 274 acides aminés qui se trouve exprimée dans le foie et dans les tissus gonadiques. Des études de modélisation récentes soulignent encore une fois la relation entre les 17 β -HSD et les enzymes du métabolisme des acides gras en exposant le fait que certains thioesters pourraient être des substrats de la protéine (Pletnev *et al.* 2005).

3.2.9 17 β -HSD9

À partir d'une banque d'ADNc de foie de souris, un nouveau membre de la famille des SDR baptisé 17 β -HSD de type 9 fut caractérisé (Su *et al.* 1999). Le gène encode une protéine de 317 acides aminés et l'ARNm n'a pas été détecté dans d'autres tissus lors d'analyses de type Northern (Su *et al.* 1999). La caractéristique marquante de cette enzyme est, sans aucun doute, sa grande polyvalence. En effet, la protéine est dotée d'activités de type 17 β -HSD, 3 α -HSD et rétinol déshydrogénase. Même si elles possèdent une homologie en acides aminés de 88%, la 17 β -HSD de type 6 du rat et la 17 β -HSD de type 9 de la souris ne sont généralement pas considérées comme des homologues puisque seule la 17 β -HSD de type 6 peut efficacement transformer le 3 α -diol en ADT (Napoli 2001).

Tableau 1 : Les nombreuses activités de la 17 β -HSD de type 9 (Su *et al.* 1999)

Substrate	Product	Activity	pmol assay	
			200 μ g	10 μ g
All- <i>trans</i> -retinol	All- <i>trans</i> -retinal	RoDH	793 \pm 81	170 \pm 25
11- <i>cis</i> -retinol	11- <i>cis</i> -retinal	RoDH	325 \pm 52	54 \pm 12
13- <i>cis</i> -retinol	13- <i>cis</i> -retinal	RoDH	111 \pm 11	ND*
9- <i>cis</i> -retinol	9- <i>cis</i> -retinal	RoDH	66 \pm 1	ND
3 α -Adiol	Total	17 β /3 α HSD	1104 \pm 33	693 \pm 43
	Dihydrotestosterone	3 α HSD	277 \pm 9	319 \pm 25
	Androsterone	17 β HSD	6 \pm 10	350 \pm 21
	Androstandione	17 β /3 α HSD	821 \pm 16	24 \pm 4
Estradiol	Estrone	17 β HSD	1297 \pm 47	469 \pm 32
	Androstenedione	3 α HSD	899 \pm 16	227 \pm 13
Dihydrotestosterone	Androstenedione	17 β HSD	321 \pm 26	33 \pm 3
Testosterone	Androstenedione	17 β HSD	187 \pm 9	ND
Corticosterone	11-Deoxycorticosterone	11 β HSD	ND	ND

3.2.10 17 β -HSD10

L'isolement de la 17 β -HSD de type 10 montra que cette enzyme pouvait se lier aux peptides β -amyloïdes qui sont très exprimés dans les lésions du système nerveux central chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Yan *et al.* 1997; He *et al.* 1998). Initialement identifiée comme une enzyme possédant une activité hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, elle est maintenant reconnue comme étant apte à oxyder les estrogènes et les androgènes aux positions C3 et C17 à l'aide du cofacteur NAD⁺. Le gène est localisé sur le chromosome X et code pour une protéine formant un homotétramère de 108 kDa. Tout comme la 17 β -HSD de type 4, l'enzyme de type 10 peut convertir l'estradiol actif en estrone (Yan *et al.* 1999). Comme les estrogènes exercent un effet protecteur au niveau des neurones, il est suggéré que l'effet catalytique d'une forte concentration de cette enzyme dans le cerveau puisse être un facteur de risque important pour la maladie d'Alzheimer (He *et al.* 1999). Contrairement aux estrogènes qu'elle dégrade, la 17 β -HSD de type 10 active les androgènes par le biais d'une activité 3 α -HSD; elle catalyse la conversion du 3 α -diol en DHT au niveau de la prostate (He *et al.* 2000).

3.2.11 17 β -HSD11

Lors d'essais enzymatiques menés en cellules intactes, il a été démontré que la 17 β -HSD de type 11 ne convertissait que le 3 α -diol en ADT (Chai *et al.* 2003). Chez les rongeurs, le stéroïde ADT joue probablement un rôle au niveau de la parturition, une fonction qui reste à être confirmée chez l'humain (Chai *et al.* 2003). La présence d'une hélice amphiphile à son extrémité N-terminale laisse croire que cette protéine est liée à la membrane du

réticulum endoplasmique. Cette prédiction semble confirmée par le fait que des délétants amputés de ce domaine transmembranaire peuvent être cristallisés même s'ils perdent leur activité catalytique (Lukacik *et al.* 2006). La 17 β -HSD de type 11 ne possède pas d'activité de type 3 α -HSD ou bien encore rétinol déshydrogénase (Brereton *et al.* 2001). Par contre, de récentes études lui confèrent un rôle dans la β -oxydation des acides gras tout comme pour les 17 β -HSD de type 4 et 10 (Motojima 2004).

3.2.12 17 β -HSD12

La première fonction déterminée pour cette protéine de 312 acides aminés codée par un gène localisé sur le chromosome 11 était une implication dans la synthèse des acides gras ainsi que dans l'extension de la longue chaîne des acyl-CoA (Moon *et al.* 2003). Cependant, il a été démontré depuis que des cellules HEK-293 exprimant ce gène de manière stable catalysent la conversion de l'estrone en estradiol en se servant du cofacteur NADP(H) (Luu-The *et al.* 2006). Une analyse de type PCR quantitatif en temps réel montre une forte présence du transcrit dans les tissus estrogéno-sensibles comme la glande mammaire et l'ovaire. L'expression de la 17 β -HSD de type 12 est également remarquable dans des tissus comme le cerveau, le cœur, le foie, le rein, le pancréas, la prostate et le testicule. L'élément intéressant de la caractérisation de ce gène est que, malgré sa forte homologie (41% d'identité en acides aminée) avec la 17 β -HSD de type 3, son rôle est d'activer les estrogènes plutôt que les androgènes. La seule substitution d'un acide aminé en position 234 suffit à inverser la spécificité de substrat de cette enzyme. Effectivement, un acide aminé de forte taille semble suffisant pour prévenir l'entrée des androgènes dans le site actif. Dernièrement, il a été démontré que la 17 β -HSD de type 12 pourrait jouer un rôle lors de la différenciation des adipocytes comme en témoigne le changement de son expression lors de la maturation (Bellemare *et al.* en cours de publication).

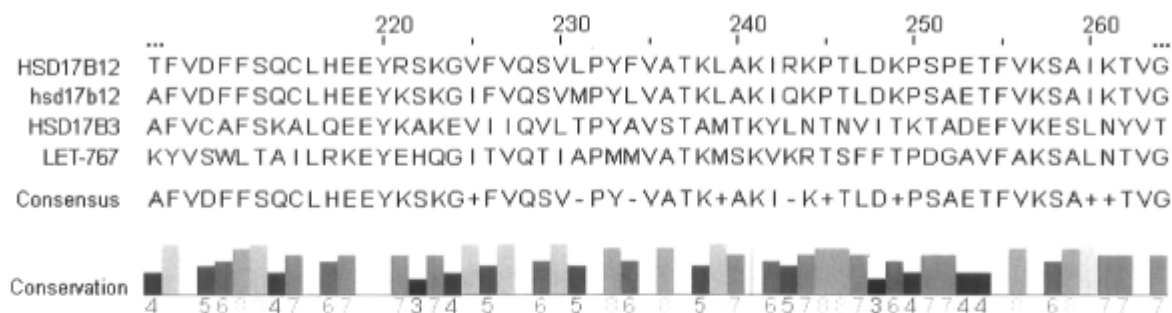


Figure 8 : Alignement de la région critique à la spécificité des homologues de la 17β-HSD de type 12 (HSD17B12 humaine, hsd17b12 de souris, HSD17B3 humaine et LET-767 de *C. elegans*)

3.2.13 17β-HSD13

Récemment, un gène nommé SCDR9 (short-chain dehydrogenase/reductase) a été cloné à partir d'ADNc de foie humain (Liu *et al.* 2007). La protéine encodée contient 300 acides aminés avec un poids moléculaire prédit de 33,6 kDa. Le gène contenant sept exons est localisé sur le chromosome 4q22.1. La séquence protéique possède une homologie de 78% avec celle de la 17β-HSD de type 11. Les analyses phylogénétiques montrent que le gène SCDR9 peut être classé parmi les 17β-HSD faisant partie de la grande famille des SDR. L'amplification des ADNc par PCR permet de savoir que l'ARNm de la 17β-HSD de type 12 est exprimé dans l'ovaire, la moelle osseuse, le rein, le cerveau, le poumon, le muscle squelettique, l'estomac et le testicule, mais à un niveau moindre que dans le foie. La protéine est exprimée dans le cytoplasme et non dans le réticulum endoplasmique. À ce jour, la fonction précise de l'enzyme n'a toujours pas été élucidée.

3.2.14 17β-HSD14

De nouvelles recherches ont démontré que le produit du gène DHRS10 était pourvu d'une activité 17β-HSD. Effectivement, des cellules transfectées avec l'ADNc du gène sont aptes à oxyder l'estradiol et la testostérone en présence de NAD⁺ (Lukacik *et al.* 2007). Comme l'isolement de l'ADNc fut d'abord réalisé à partir d'une banque issue de la rétine, il est suggéré que l'enzyme joue également un rôle dans le métabolisme du rétinol, comme c'est le cas pour d'autres 17β-HSD (Haeseleer *et al.* 2000). En raison de sa forte expression dans

le placenta et dans le système nerveux central, il est possible que la 17 β -HSD de type 14 soit impliquée dans l'inactivation des stéroïdes actifs dans ces systèmes.

3.3 Aldo-céto réductases

Les aldo-céto réductases (AKR) englobent une large famille d'oxydoréductases dépendantes du NAD(P)(H). Ces enzymes possèdent toutes un motif baril- β « triose phosphate isomerase » (TIM) et contiennent environ 320 acides aminés par monomère. Elles sont aptes à catalyser la réduction d'aldéhydes et de cétones chez les stéroïdes ainsi que l'oxydation des hydroxystéroïdes ce qui leur confère une importance dans la stéroïdogénèse (Hyndman *et al.* 2003). Avec plus de 114 membres répartis en 14 familles, les AKR sont présentes chez les levures, les plantes, les amphibiens et les mammifères. La famille la plus vaste est sans contredit ARK1 qui regroupe plusieurs hydroxystéroïdes déshydrogénases dont les 3 α -HSD, la 20 α -HSD, la 17 α -HSD et la 17 β -HSD de type 5. Puisque ce mémoire porte majoritairement sur la famille des 17 β -HSD, seul le membre AKR1C3 sera présenté en détail.

3.3.1 17 β -HSD5

La 17 β -HSD de type 5 est le seul membre des 17 β -HSD chez l'humain qui appartienne à la famille des AKR, l'autre étant toutes des SDR. De ce fait, selon la nomenclature officielle, le gène devrait être annoté comme étant AKR1C3 (Jez *et al.* 1997a; Jez *et al.* 1997b). Alors que la 17 β -HSD de type 3 produit les androgènes au niveau des gonades avant de les exporter via la circulation sanguine, la 17 β -HSD de type 5 catalyse la même réaction au niveau des tissus périphériques et de l'ovaire (Dufort *et al.* 1999). L'enzyme possède également une activité 3 α -HSD ce qui explique son identification première comme la 3 α -HSD de type 2 (Khanna *et al.* 1995). Cependant, il semble que son activité 17 β -HSD soit la fonction prédominante dans des cellules intactes. Comme la 17 β -HSD de type 3 est exprimée presque exclusivement dans le testicule, il est intéressant de noter que la 17 β -HSD de type 5 est l'enzyme responsable de la synthèse d'androgènes actifs chez la femme ainsi que chez les sujets souffrant d'un déficit en 17 β -HSD de type 3 qui se virilisent à l'âge adulte (Andersson *et al.* 1996). La structure de cette enzyme a été déterminée en complexe avec différents substrats et inhibiteurs ce qui en fait une plate-forme intéressante

dans le développement futur d'inhibiteurs spécifiques (Penning *et al.* 2001; Lovering *et al.* 2004; Qiu *et al.* 2004).

3.4 5 α -réductases

Les 5 α -réductases permettent de transformer la testostérone en un androgène encore plus actif, le DHT. Pour cette raison, ces enzymes sont déterminantes dans le contrôle local des androgènes actifs (Russell *et al.* 1994). La 5 α -réductase est également apte à métaboliser la progestérone en 5 α -DHP et joue un rôle important dans la régulation des actions de la progestérone (Russell *et al.* 1994). À ce jour, deux isoformes ont été caractérisées et clonées chez l'humain. Le gène codant pour le type 1 est présent sur le chromosome 5 et la protéine est exprimée dans le foie et la peau (Jin *et al.* 2001). Pour sa part, le type 2 est localisé sur la bande p23 du chromosome 2 et son ARNm peut être détecté dans le foie, la prostate, la vésicule séminale et l'épididyme. Ces deux isoformes possèdent une homologie de l'ordre de 50%.

Le syndrome, connu sous le nom de déficience en 5 α -réductase et menant à un problème de différenciation sexuelle chez le mâle (pseudohermaphrodisme), est causé par des mutations dans le gène encodant la 5 α -réductase de type 2. L'impossibilité du fœtus à générer du DHT à partir de la testostérone empêche le bon développement des organes sexuels mâles. La maladie est associée à l'isoforme de type 2 puisque le type 1 n'est pas exprimé de manière significative avant la puberté. À ce moment, les individus atteints subiront une virilisation marquée (Wilson *et al.* 1993; Wilson 1999). Aussi, il semble que le type 1 soit le principal responsable de l'activité 5 α -réductase qui se trouve renforcée dans les tumeurs de cancer du sein (Suzuki *et al.* 2001; Lewis *et al.* 2004). L'expression de la 5 α -réductase de type 1 est corrélée positivement avec celle du récepteur des androgènes et négativement avec le grade histologique et la taille de la tumeur.

4 Évolution des enzymes de la stéroïdogénèse

Même si les 17β -HSD appartiennent, pour la plupart, à la famille des SDR, leur identité en acide aminé demeure faible. Cela s'explique par le fait que l'activité 17β -HSD est apparue indépendamment à partir de nombreux ancêtres communs qui, initialement, ne pouvaient pas transformer les hormones stéroïdiennes (Baker 1996) (figure 7). Une façon plutôt imagée pour comprendre l'évolution convergente est de penser au développement des ailes des oiseaux et des chauves-souris. Même si ces deux organismes sont d'une classe différente, ils ont acquis la même caractéristique. Au niveau moléculaire, plusieurs exemples existent dans la stéroïdogénèse. Les 17β -HSD de type 3 et 5 peuvent toutes deux synthétiser de la testostérone même s'ils proviennent d'ancêtres distincts, l'un faisant respectivement partie de la famille des SDR et l'autre des AKR (Baker 2001).

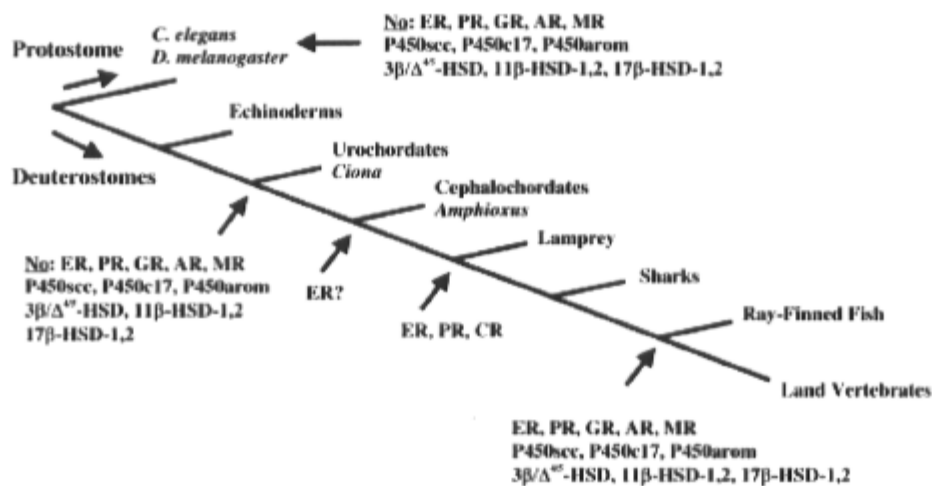


Figure 9 : Évolution des enzymes stéroïdogéniques (Baker 2004)

L'étude de *Caenorhabditis elegans* s'avère un fantastique banc d'essai pour comprendre ces ancêtres. En effet, le nématode ne contient pas les différents récepteurs d'androgènes, d'estrogènes, de progestatifs, de glucocorticoïdes et de minéralocorticoïdes (Baker 2004). De tels récepteurs sont apparus il y a 540 millions d'années, ce qui concorde également avec la divergence des 17β -HSD de type 2, 6 et 9 (Baker 2001). Bref, le gène LET-767 code pour un homologue de la 17β -HSD de type 12 qui n'est pas soumis à la pression sélective exercée par la présence d'un récepteur aux estrogènes. En mesurant les différentes

activités de cet ancêtre, nous sommes en mesure d'apprécier l'évolution qui a transformé une enzyme possédant une faible spécificité en une autre hautement spécialisée dans le métabolisme des hormones sexuelles chez les organismes vertébrés.

Pour sa part, la souris est un mammifère évolutivement beaucoup plus près de l'homme que *C. elegans*. À ce jour, toutes les 17 β -HSD humaines possèdent un orthologue correspondant chez la souris, ce qui confirme leur proximité évolutive (Mindnich *et al.* 2004; Lukacik *et al.* 2006). La souris représente donc un excellent modèle animal pour mener à terme des expériences de caractérisation ou bien encore pour étudier des mutants n'exprimant pas une enzyme particulière. Cependant, pour être plus précis, il faut mentionner que les types 6 et 9 sont retrouvés uniquement chez les rongeurs et ne possèdent pas d'équivalent chez l'homme. L'apparition de ces sous-types est donc probablement postérieure à la séparation entre les mammifères supérieurs et les rongeurs.

La souris est l'animal le plus souvent utilisé comme modèle pour comprendre le fonctionnement des enzymes humaines lors d'expériences *in vivo*. La connaissance des différences et des ressemblances entre les gènes humains et murins est donc essentielle à une interprétation appropriée des expériences menées sur la souris. Par contre, il faut se rappeler que la forte ressemblance entre deux enzymes de type 17 β -HSD n'est pas garante de la métabolisation des mêmes stéroïdes. Il est bien connu que les 17 β -HSD peuvent parfois catalyser des réactions différentes malgré une homologie respectable entre membres de la famille. L'exemple classique de cette constatation est sans contredit la caractérisation de la 17 β -HSD de type 12 qui fut d'abord identifiée comme un isoforme de la 17 β -HSD de type 3 (Luu-The *et al.* 2006) en raison de sa structure génique et d'une identité de 41% de leurs résidus. Malgré une forte homologie, il s'avère que, chez l'humain, une de ces enzymes est impliquée dans la synthèse de l'estrone alors que l'autre catalyse la formation de la testostérone.

De façon encore plus surprenante, les homologues murins possèdent parfois une activité catalytique différente à celle des enzymes humaines (Mindnich *et al.* 2004). Par exemple, la 17 β -HSD de type 1 humaine est spécifique à la synthèse de l'estradiol (Luu The *et al.* 1989a) alors qu'elle peut également produire de la testostérone chez la souris (Nokelainen *et al.* 1996). Dans ce mémoire, les résultats présentés abondent dans la même direction. Par

exemple, la 17 β -HSD de type 12 humaine est spécifique à la production d'estrogènes actifs alors que celle de souris peut également se charger de la synthèse d'androgènes comme la testostérone.

Ces données semblent indiquer que les enzymes de la stéroïdogénèse humaines possèdent un niveau de spécialisation supérieur. Alors que certaines 17 β -HSD de la souris exhibent une vaste gamme de rôles, les protéines humaines acceptent des substrats très spécifiques. En raison de l'utilisation massive du modèle murin, il incombe de bien caractériser les enzymes de façon à avoir une idée juste des chemins métaboliques pouvant mener à la production d'hormones stéroïdiennes actives chez cet animal.

Tableau 2 : Propriétés de paires d'orthologues des 17 β -HSD

Gène	Fonction	
	Humain	Souris
HSD17B1	Synthèse de l'estradiol	Synthèse de l'estradiol Synthèse de la testostérone
HSD17B12	Synthèse l'estradiol	Synthèse de l'estradiol Synthèse de la testostérone Synthèse du 5-diol Synthèse du 3 α -diol

5 But du projet

Les résultats présentés dans ce mémoire font suite à l'étude étendue de la 17β -HSD de type 12 chez la souris et *C. elegans*. Puisque l'enzyme humaine, récemment caractérisée dans notre laboratoire, partage une homologie génique très forte avec la 17β -HSD de type 3, nous croyons qu'elle joue un rôle déterminant dans la synthèse des stéroïdes sexuels. Cependant, plutôt que de catalyser la conversion du 4-dione en testostérone, elle transforme l'estrone en estradiol. Il est important de noter qu'un patient exprimant une forme inactive de la 17β -HSD de type 3 sera incapable de produire un niveau satisfaisant de testostérone testiculaire et souffrira, par le fait même, de pseudohermaphrodisme mâle. Cette importance capitale de la 17β -HSD de type 3 suggère un rôle équivalent à sa plus grande homologue, la 17β -HSD de type 12. Mon travail personnel vise donc à caractériser l'enzyme chez le modèle animal qu'est la souris tout en élucidant les mécanismes permettant la spécificité des 17β -HSD. De plus, l'étude d'un organisme inférieur comme *C. elegans* permet d'apprécier la sophistication accrue de la stéroïdogénèse des organismes évolutivement supérieurs.

Partie B

Caractérisation de la 17 β -HSD de type 12 chez la souris

Avant-propos

De manière à faire suite à la récente caractérisation de la 17 β -HSD de type 12 chez l'homme, notre groupe de recherche s'est intéressé à la fonction de son orthologue murin. L'étude structure-fonction de l'enzyme humaine ayant été très informative dans le passé, nous avons poursuivi cette dernière en y intégrant des modèles issus de mutagenèses dirigées effectuées sur l'enzyme murine correspondante. Mon implication dans ce projet s'est soldée par la construction des transfectants stables, l'élaboration des stratégies de mutagenèses dirigées et la réalisation des différents essais enzymatiques effectués dans des cellules HEK-293. Suite à ces travaux expérimentaux, j'ai compilé les résultats, analysé les données, généré les figures et tableaux et participé à la rédaction du manuscrit.

Résumé

Récemment, nous avons montré que la 17 β -HSD de type 12 humaine et de singe sont des enzymes spécifiques aux estrogènes et catalysent la transformation de l'estrone en estradiol. Pour caractériser de manière étendue cette enzyme dans un autre modèle animal, nous avons isolé un fragment d'ADNc encodant la 17 β -HSD de type 12 de souris et caractérisé son activité enzymatique. Grâce à des cellules HEK-293 exprimant de manière stable la 17 β -HSD de type 12 de souris, nous avons constaté que l'enzyme catalyse la transformation du 4-dione en testostérone, du DHEA en 5-diol et de l'ADT en 3 α -diol en plus de la conversion de l'estrone remarqué chez ses homologues issus des primates. Précédemment, nous avons prouvé que la spécificité de l'enzyme humaine et de singe envers les stéroïdes à 18 carbones était due à la présence d'un résidu phénylalanine en position 234 qui génère un encombrement stérique prévenant l'entrée de stéroïdes à 19 carbones dans le site actif. Afin de déterminer si la taille plus faible de la chaîne latérale de

l'acide aminé leucine, qui est l'acide aminé retrouvé à cette position chez l'enzyme de la souris, était responsable de la métabolisation des substrats androgéniques, nous avons procédé à des mutagenèses dirigées pour remplacer ce résidu par un phénylalanine. En accord avec notre hypothèse de départ, l'enzyme mutée possède une habilité beaucoup moindre à transformer les androgènes. Une analyse subséquente de la distribution des ARNm par PCR quantitatif en temps réel a démontré que la 17 β -HSD de type 12 est fortement exprimée dans la glande clitoridienne de la femelle, dans la glande préputiale du mâle et dans la graisse rétropéritonéale et dans les glandes surrénales chez les deux sexes. Chez la souris, la 17 β -HSD de type 12 peut donc participer à la biosynthèse de l'estradiol à titre de partenaire de l'aromatase tout en étant impliquée dans la formation des androgènes.

Statut de l'article au moment du dépôt final :

Publié dans le Journal of Endocrinology en 2007, numéro 194 pages 449-455.

Article

Differential androgen and estrogen substrates specificity in the mouse and primates type 12 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase.

Pierre-Gilles Blanchard and Van Luu-The

Oncology and Molecular Endocrinology Research Centre, Laval University Hospital Research Center (CRCHUL), Quebec, G1V 4G2, Canada.

Corresponding author:

Pr. Van Luu-The

Oncology and Molecular Endocrinology Research Center,

Laval University Hospital Research Center (CRCHUL) and Laval University

2705 Laurier Boulevard

Quebec, Quebec, Canada G1V 4G2

Tel: (418) 654-2296

Fax: (418) 654-2761

ABSTRACT

Recently, we have shown that human and monkey type 12 17β -HSDs (17β -HSD12) are estrogen-specific enzymes catalyzing the transformation of estrone (E1) into estradiol (E2). To further characterize this novel steroidogenic enzyme in an animal model, we have isolated a cDNA fragment encoding mouse 17β -HSD12 and characterized its enzymatic activity. Using HEK-293 cells stably expressing mouse 17β -HSD12, we found that in contrast with the human and monkey enzymes, which are specific for the transformation of estrone (E1) to estradiol (E2), mouse 17β -HSD12 catalyzes also the transformation of 4-androstenedione (4-dione) into testosterone (T), dehydroepiandrosterone (DHEA) into 5-androstene- $3\beta,17\beta$ -diol (5-diol) as well as androsterone (ADT) into 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol (3α -diol). Previously, we have shown that the specificity of human and monkey 17β -HSD12s for C18-steroid is due to the presence of a bulky phenylalanine (F) at position 234 creating steric hindrance preventing the entrance of C19-steroids into the active site. To determine whether the smaller size of the corresponding leucine (L) in the mouse sequence is responsible for the entrance of androgenic substrates, we performed site-directed mutagenesis to substitute Leu 234 for Phe in the mouse enzyme. In agreement with our hypothesis, the mutated enzyme has a highly reduced ability to metabolize androgens. mRNA quantification in several mouse tissues using RealTime PCR shows that mouse 17β -HSD12 mRNA is highly expressed in the female clitoral gland, male preputial gland as well as in retroperitoneal fat and adrenal of both sexes. The differential androgenic/estrogenic substrate specificity of type 12 17β -HSD in the mouse and primates seems to agree with the observation that androgen and estrogen in the mouse are provided almost exclusively by gonads, while in primates an important part of these steroid hormones are produced locally from adrenal precursors.

INTRODUCTION

Active sex steroids (testosterone, dihydrotestosterone and estradiol) are characterized by the presence of a hydroxyl group at position 17 β - on the steroid nucleus. The formation of the 17 β -hydroxy group is catalyzed by 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs). To date, 14 types of 17 β -HSDs have been identified (Luu-The Van, 2001, Mindnich et al., 2004, Peltoketo et al., 1999). In the human, a clear substrate specificity pattern for estrogen and androgen substrates has been observed. Types 1, 7 and 12 17 β -HSDs (17 β -HSD1, 7 and 12) catalyze the transformation of estrone (E1) into estradiol (E2) while 17 β -HSD3 and 5 are able to catalyse the transformation of 4-androstenedione (4-dione) into testosterone (T). Others catalyze mostly the transformation of 5 α -reduced C19- steroids. In rodents, the enzymatic characteristics of steroidogenic enzymes are somehow different from their human counterparts. For example, rodent 17 β -HSD1 catalyzes, in addition to the formation of E2 from E1, the transformation of 4-dione into T while human 17 β -HSD1 catalyzes selectively the transformation of E1 into E2. In the human, the enzyme is abundantly expressed in the placenta where it exerts its function as a partner of aromatase, which is also abundantly expressed, to produce estradiol. In the rodent, 17 β -HSD1 and aromatase are absent from placenta and thus rodent placenta does not produce E2 (Gibori et al., 1988). The production of E2 in rodents is provided by granulosa cells (Mustonen et al., 1997, Nokelainen et al., 1998). Indeed, 17 β -HSD1 is expressed in granulosa and cumulus cells in both the human (Sawetawan et al., 1994) and rodents (Ghersevich et al., 1994a, Ghersevich et al., 1994b, Nokelainen et al., 1998).

It is noteworthy that human type 7 17 β -HSD, in addition to its ability to catalyze the transformation of E1 into E2, also possesses 3-ketoreductase activity able to transform DHT into 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol (3 β -diol) (Liu et al., 2005, Torn et al., 2003) and zymosterone into zymozterol, an important step in the cholesterol biosynthetic pathway (Marijanovic et al., 2003).

Recently, we have characterized primate and human 17 β -HSD12 (Luu-The V. et al., 2006) (Liu et al., 2007) that share high homology with 17 β -HSD3 and found that both 17 β -HSD12s catalyze selectively the transformation of E1 into E2, thus suggesting that this enzyme is most probably an important partner of aromatase in the biosynthesis of E2.

Indeed, the two steps that are specific for E2 biosynthesis are the aromatization of 4-dione precursor into E1 (a weak estrogen) followed by the transformation of E1 into E2, the most potent natural estrogen, by estrogenic 17 β -HSD. The isolation of cDNAs encoding enzymes that are specific for the conversion of E1 into E2 (human 17 β -HSD1, 7 and 12) seems to agree with this model, suggesting strongly that the step of reduction by 17 β -HSD follows the step of aromatization (Luu-The V. et al., 2006). It is noteworthy that data of Moon and Horton (Moon & Horton, 2003) also suggest that 17 β -HSD12 could be involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade.

In this report, we describe the characterization of mouse 17 β -HSD12. We show that, similarly to 17 β -HSD1, mouse 17 β -HSD12 is also able to catalyze the transformation of C19-steroids, which is in contrast with the corresponding human enzymes that are selective for estrogenic substrates. The role of the amino acid at position 234 of 17 β -HSD12 in substrate selectivity and the mRNA expression levels in different mouse tissues are also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Tissue collection and RNA preparation

C57BL6 mice at 12–15 weeks of age were obtained from Charles River Inc. (Saint-Constant, Que., Canada) and housed individually in vinyl cages where the photoperiods were 12 h of light and 12 h of darkness. The mice were provided certified rodent food (Lab Rodent Diet) and tap water ad libitum. The experiment was conducted in an animal facility approved by the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) and performed in accordance with the CCAC Guide for Care and Use of Experimental Animals. During the tissue collection, organs were rapidly trimmed, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Total RNA was isolated by Trizol (Invitrogen, Burlington, Ont., Canada). Using oligo-d(T)₂₄ as primer in a reaction buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT and 0.5 mM dNTPs, twenty micrograms of RNA was then converted to cDNA by incubation at 42 °C for 1 h with 400 U SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen).

Isolation of mouse 17 β -HSD12 and construction of pCMVneo-HSD17B12 vector

To amplify by RT-PCR a cDNA fragment containing the entire coding region of mouse 17 β -HSD12, we used the oligonucleotide primers (5'-ggg-gaa-ttc-gcc-atg-gag-tgc-gct-ccc-ccg-gcg-3') and (5'-ggg-tct-aga-tta-gtt-ctt-ctt-cct-ttt-ctt-cag-gta-g-3') derived from the GenBank sequence having accession number NM_019657. The resulting cDNA fragment was then subcloned into a pCMVneo vector, downstream of a CMV promoter. To verify the integrity of the new construct, namely pCMVneo-mHSD17B12, we sequenced it before stably transfecting into HEK-293 cells as described (Huang & Luu-The, 2000).

Assay of enzymatic activity in intact HEK-293 cells stably expressing mouse 17 β -HSD12

Enzymatic activities measurements were performed in intact cells as previously described (Dufort et al., 2001). Cells were plated in 6-well plates to approximately 5×10^5 /well in MEM. Briefly, 0.1 μ M of the (14C)-labeled steroids (Dupont Inc., Mississauga, Ont., Canada) was added to freshly changed culture medium. After incubation, steroids were

extracted with 2 ml of ether and evaporated to dryness. The steroids were then dissolved in 50 μ L of dichloromethane, applied to silica gel 60 thin layer chromatography (TLC) plates (Merck, Darmstadt, Germany), before separation by migration in the toluene/acetone (4:1) solvent system. Substrates and metabolites were identified by comparison with reference steroids, revealed by autoradiography and quantified using the PhosphorImager System (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA, USA).

Site-directed mutagenesis

In order to replace the L at amino acid position 234 in the mouse 17 β -HSD12 with a A or F residue, we performed site-directed mutagenesis using the Quick Change Site-directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) as described (Dufort et al., 1999) and the following oligonucleotide primers: 5'-agt-gtc-atg-cca-tac-gct-gta-gct-aca-aaa-ctg-3' and its complementary sequence for L234A substitution and 5'-agt-gtc-atg-cca-tac-ttt-gta-gct-aca-aaa-ctg-3' and its complementary sequence for L234F substitution. Those oligonucleotide primers were synthesized by an ABI-394 DNA synthesizer (Perkin-Elmer-Cetus, Emerville, CA, USA). The integrity of the constructs was verified by sequencing the inserted DNA fragment. Plasmid DNA was prepared with the help of the Qiagen Mega Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA).

mRNA expression measurement by Quantitative Realtime PCR (Q-RT-PCR)

A fragment of 225 base pairs from mouse 17 β -HSD12 was amplified with the gene-specific primers 5'-tgg-cac-tga-tgg-aat-tgg-aaa-agc-3' and 5'-ttc-act-aaa-acg-cca-ata-tca-aga-c-3'. Using cDNA corresponding to 30 ng of the initial total RNA, a fluorescent-based Real-time PCR quantification was performed with the LightCycler Realtime PCR apparatus (Hoffman-La Roche Inc., Nutley, NJ, USA) as described (Luu The Van et al., 2005). Reagents were obtained from the same supplier and were used as described by the manufacturer. The conditions for the PCR reactions were: denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 10 sec, annealing at 54 $^{\circ}$ C for 5 sec and elongation at 72 $^{\circ}$ C for 10 sec. To normalize the data, we used the expression levels of the Mus musculus housekeeping gene ATP synthase. The mRNA expression levels are expressed as numbers of copies per microgram total RNA using a standard curve of Cp versus logarithm of the quantity as described (Luu The Van et

al., 2005). The standard curve was established using known cDNA amounts of 0, 102, 103, 104, 105 and 106 copies of cDNA from ATP synthase (primers: 5'-tac-tct-gct-gca-tct-aag-gag-aag-3' and 5'-gtc-att-tag-gct-ttt-cac-ttt-gac-3') and a LightCycler 3.5 software provided by the manufacturer. Samples were run in triplicate and the results are expressed as mean \pm SEM.

RESULTS

Sequence Homology between human and mouse 17 β -HSD12

Using the sequences available in GenBank, we first compared the amino acid sequence of human and mouse 17 β -HSD12. The alignment shows that these proteins share 81% amino acid identity. They also exhibit the conserved signatures seen in SDR family members, namely the putative YXXXK active center and the GXXXGXXG consensus sequence of the cofactor binding motif of the NADPH-preferring SDR proteins (Mazza et al., 1998). Previously, we determined that the amino acid F234 in the human enzyme plays a critical role in substrate specificity as its substitution for a smaller amino acid leads to an enzyme able to convert 4-dione into T. It is noteworthy that the amino acid in the mouse sequence corresponding to this F234 is a L residue (figure 1).

Substrate specificity of mouse 17 β -HSD12

HEK-293 cells stably expressing 17 β -HSD12 were used to characterize the substrate specificity of the enzyme in cultured intact cells without addition of exogenous cofactor. As illustrated in figure 2, mouse 17 β -HSD12 catalyzes preferentially the transformation of ADT into 3 α -diol (38% transformation) while the transformation of 4-dione to T (22%), E1 to E2 (25%) and DHEA to 5-diol (22%) are also at similar level after 24h incubation. Similar conclusions can be observed during a longer-term (48h) incubation with the same labeled steroids. Under comparable experimental conditions, human and monkey 17 β -HSD12 mainly catalyzes the transformation of E1 into E2. The ability to process both androgen and estrogen steroids makes the mouse 17 β -HSD12 different from its primate homologs.

L234 role in substrate preference

We have previously shown that amino acid F234 in human 17 β -HSD12 is responsible for the selectivity of this enzyme for estrogen (Luu-The V. et al., 2006). Indeed, due to its large size, this amino acid prevents, by steric hindrance, C19-steroids from entering the active site. It is interesting to note that in the homolog 17 β -HSD3 that catalyzes specifically the transformation of androgen, the corresponding amino acid is A, the second smallest natural

amino acid. Since the corresponding amino acid in the mouse sequence is a L residue that has much smaller size than the F found in human 17 β -HSD12, we investigated whether the loss of estrogenic specificity in the mouse enzyme compare to human is due to this amino acid. We thus performed site-directed mutagenesis to substitute the L residue for A and F found in 17 β -HSD3 and 12, respectively. As illustrated in Figure 3, the ability of the L234F substitution to transform 4-dione is much lower than the one observed with the wild type enzyme or with the L234A substitution.

Tissue distribution of mouse 17 β -HSD12

We then examined the tissue distribution of 17 β -HSD12 mRNA in 23 mouse tissues, namely the adrenal, liver, colon, kidney, stomach, lung (bronchi), pituitary gland, thymus, spleen, heart, gastrocnemius, preputial gland, epididymis, testis, prostate, seminal vesicle, clitoral gland, fat (retroperitoneal), mammary gland, uterus, vagina, ovary and oviduct using quantitative RealTime PCR. As illustrated in figure 4, mouse 17 β -HSD12 mRNA is ubiquitously expressed in all those tissues. In the male, the highest level of expression of 17 β -HSD12 mRNA is seen in the preputial gland, retroperitoneal fat and adrenal. In the female, mouse 17 β -HSD12 is highly expressed in the clitoral gland, retroperitoneal fat and mammary gland. Moreover, it is interesting to note that the expression level of this enzyme in the male preputial gland, retroperitoneal fat and adrenal is much higher than in the female clitoral gland, retroperitoneal fat and adrenal.

DISCUSSION

In this report, we show that mouse 17β -HSD12 catalyzes efficiently the transformation of C19- as well as C18-steroids, in contrast with the human and primate enzymes which catalyze selectively the transformation of E1 into E2. This difference is in part due to the presence of a Leu residue at position 234 in the mouse enzyme. Because of its relatively small size, this amino acid does not exert steric hindrance toward entrance of C19-steroids in the binding site. On the other hand, a bulky Phe residue at this position causes major steric hindrance in both the human and monkey enzymes. Interestingly, human and monkey 17β -HSD3 possess an Ala residue which allows the enzyme to transform efficiently 4-dione into T due to its smaller size. However the molecular cause of 17β -HSD3 inability to metabolize C18-steroids is still unknown.

The mRNA tissue distribution analysis performed by quantitative RealTime PCR indicates that mouse 17β -HSD12 is distributed ubiquitously in numerous sexual tissues and adrenal gland, thus suggesting a central role in androgen and estrogen synthesis in this organism. Adipose tissue is now considered as an important endocrine organ which is a major site for metabolism of sex steroids (Blouin et al., 2006, Kershaw & Flier, 2004) and interestingly, the retroperitoneal fat exhibits a high level of 17β -HSD12 mRNA. This finding emphasizes the importance of the studied enzyme in numerous steroidogenic organs.

The different characteristics of mouse and human steroidogenic enzymes strongly suggest that sex steroid biosynthesis and their modes of action are very different in these two species. The mouse adrenal does not express P450c17 (Luu-The V. et al., 2005) and thus does not produce androgen adrenal precursors (DHEA and 4-dione) for the biosynthesis of active androgen and estrogen like the human and primate which produce large amount of adrenal precursors. Consequently, sex steroids in the mouse are produced almost exclusively by the gonads. Hence, upon gonadectomy the size of androgen- and estrogen-sensitive organs such as the prostate and uterus is reduced drastically. However, administration of an inactive steroid precursor to gonadectomized mice brings back the prostate and uterus to a normal size. The latter observation indicates that despite the fact that local production of active steroids in peripheral tissues is minimally active in rodents, due to the very low level of adrenal precursors, evolution has already put in place an

enzymatic structure necessary for their production. This system becomes highly active in the human and primate which possess high circulating levels of these steroid precursors. Indeed, sex steroid formation in peripheral target tissues (intracrinology) accounts for 40 to 50% of active androgens in the human prostate (Labrie F., 1991). Many observations clearly demonstrate that there are additional steroid hormone sources other than gonads. For example, in men having their testicles surgically removed or in whom androgen testicular secretion is blocked by treatment with an LHRH agonist, it is observed that, despite a 90-95% decrease of T levels in the blood, intraprostatic DHT concentration is decreased by only 50%. Another evidence lies in the normal development of secondary sexual characteristics in boys deficient in type 2 3 β -HSD. In that case, the conversion of DHEA into active steroids via type 1 3 β -HSD, expressed in peripheral tissues, is responsible for the apparition of those secondary sexual characteristics. Furthermore, the cloning of multiple genes encoding isoforms of steroidogenic enzymes in the human, namely types 1 and 2 3 β -HSD (Lachance et al., 1991, Lachance et al., 1990, Luu The V. et al., 1989, Rheume et al., 1992, Rhéaume et al., 1991), types 1 to 12 17 β -HSDs (Luu The V. et al., 1989, Peltoketo et al., 1988), as well as types 1 and 2 5 α -reductases (Andersson et al., 1991, Labrie Fernand et al., 1992) and 3 α -HSDs (Cheng et al., 1991, Dufort et al., 2001) advocate for the existence of a local biosynthesis in peripheral tissues. During recent years, inhibitors of steroidogenic enzymes have already led to the development of some interesting therapeutic compounds. For example, Proscar (Merck-Frost), an inhibitor of 5 α -reductase, has been used to treat successfully androgen-sensitive diseases such as alopecia (Van Neste et al., 2000), hirsutism (Fruzzetti et al., 1999) and benign prostatic hyperplasia (Ekman, 1999). More recently, inhibitors of aromatase have been shown to be highly efficient in breast cancer therapy (Buzdar, 2000, Goss & Strasser-Weippl, 2004, Howell et al., 2003). The gene encoding aromatase is a single gene having many alternative promoters allowing a tissue-specific expression of different transcripts encoding the same protein (Simpson et al., 1997, Simpson et al., 1994). On the other hand, estrogenic 17 β -HSDs (types 1, 7 and 12 17 β -HSD) possess very different primary structures, sharing only approximately 20% amino acids identity. These enzymes could represent more tissue-specific drug targets than aromatase for the treatment of estrogen-sensitive diseases such as breast cancers.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Nathalie Paquet, Guy Reinnitz and Melanie Robitaille for their skillful technical assistance. This work was financially supported by the Canadian Institute of Health Research (CHIR) (Grant No MOP-77698 to V.L.T.). Pierre-Gilles Blanchard is supported by a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

REFERENCES

- Andersson S, Berman DM, Jenkins EP & Russell DW 1991 Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 354 159-161.
- Blouin K, Richard C, Brochu G, Hould FS, Lebel S, Marceau S, Biron S, Luu-The V & Tchernof A 2006 Androgen inactivation and steroid-converting enzyme expression in abdominal adipose tissue in men. *J Endocrinol* 191 637-649.
- Buzdar A 2000 Exemestane in advanced breast cancer. *Anticancer Drugs* 11 609-616.
- Cheng KC, White PC & Qin KN 1991 Molecular cloning and expression of rat liver 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol* 5 823-828.
- Dufort I, Labrie F & Luu-The V 2001 Human Types 1 and 3 3alpha-Hydroxysteroid Dehydrogenases: Differential Lability and Tissue Distribution. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 841-846.
- Dufort I, Rheault P, Huang X-F, Soucy P & Luu-The V 1999 Characteristics of a highly labile human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 140 568-574.
- Ekman P 1999 Finasteride in the treatment of benign prostatic hypertrophy: an update. New indications for finasteride therapy. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 203 15-20.
- Fruzzetti F, Bersi C, Parrini D, Ricci C & Genazzani AR 1999 Treatment of hirsutism: comparisons between different antiandrogens with central and peripheral effects. *Fertil Steril* 71 445-451.
- Ghersevich S, Poutanen M, Tapanainen J & Vihko R 1994a Hormonal regulation of rat 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in cultured rat granulosa cells: effects of recombinant follicle-stimulating hormone, estrogens, androgens, and epidermal growth factor. *Endocrinology* 135 1963-1971.
- Ghersevich S, Nokelainen P, Poutanen M, Orava M, Autio-Harmainen H, Rajaniemi H & Vihko R 1994b Rat 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: primary structure and

regulation of enzyme expression in rat ovary by diethylstilbestrol and gonadotropins in vivo. *Endocrinology* 135 1477-1487.

Gibori G, Khan I, Warshaw ML, McLean MP, Puryear TK, Nelson S, Durkee TJ, Azhar S, Steinschneider A & Rao MC 1988 Placental-derived regulators and the complex control of luteal cell function. *Recent Prog Horm Res* 44 377-429.

Goss PE & Strasser-Weippl K 2004 Prevention strategies with aromatase inhibitors. *Clin Cancer Res* 10 372S-379S.

Howell A, Robertson JF & Vergote I 2003 A review of the efficacy of anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer with visceral metastases. *Breast Cancer Res Treat* 82 215-222.

Huang XF & Luu-The V 2000 Molecular characterization of a first human 3(alpha-->beta)-hydroxysteroid epimerase. *J Biol Chem* 275 29452-29457.

Kershaw EE & Flier JS 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89 2548-2556.

Labrie F 1991 Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 78 C113-118.

Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V, Simard J, Lachance Y, Bachvarov D, Leblanc G, Durocher F & Paquet N 1992 Structure of human type II 5a-reductase gene. *Endocrinology* 131 1571-1573.

Lachance Y, Luu-The V, Verreault H, Dumont M, Rhéaume É, Leblanc G & Labrie F 1991 Structure of the human type II 3b-hydroxysteroid dehydrogenase/D5-D4 isomerase (3b-HSD) gene: adrenal and gonadal specificity. *DNA and Cell Biology* 10 701-711.

Lachance Y, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Dumont M, de Launoit Y, Guérin S, Leblanc G & Labrie F 1990 Characterization of human 3b-hydroxysteroid dehydrogenase/D5-D4 isomerase gene and its expression in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 265 20469-20475.

Liu H, Robert A & Luu-The V 2005 Cloning and characterization of human form 2 type 7 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, a primarily 3beta-keto reductase and estrogen activating and androgen inactivating enzyme. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94 173-179.

Liu H, Zheng S, Bellemare V, Pelletier G, Labrie F & Luu-The V 2007 Expression and localization of estrogenic type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the cynomolgus monkey. *BMC Biochem* 8 2.

Luu-The V 2001 Analysis and characteristics of multiple types of human 17b-hydroxysteroid dehydrogenases. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 76 143-151.

Luu-The V, Pelletier G & Labrie F 2005 Quantitative appreciation of steroidogenic gene expression in mouse tissues: new roles for type 2 5alpha-reductase, 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase and estrogen sulfotransferase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93 269-276.

Luu-The V, Tremblay P & Labrie F 2006 Characterization of type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 3 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women. *Mol Endocrinol* 20 437-443.

Luu The V, Paquet N, Calvo E & Cumps J 2005 Improve real-time RT-PCR method for high throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *BioTechniques* 32 287-293.

Luu The V, Labrie C, Zhao HF, Couet J, Lachance Y, Simard J, Leblanc G, Cote J, Berube D, Gagne R et al. 1989 Characterization of cDNAs for human estradiol 17 beta-dehydrogenase and assignment of the gene to chromosome 17: evidence of two mRNA species with distinct 5'-termini in human placenta. *Mol Endocrinol* 3 1301-1309.

Marijanovic Z, Laubner D, Moller G, Gege C, Husen B, Adamski J & Breitling R 2003 Closing the gap: identification of human 3-ketosteroid reductase, the last unknown enzyme of mammalian cholesterol biosynthesis. *Mol Endocrinol* 17 1715-1725.

Mazza C, Breton R, Housset D & Fontecilla-Camps JC 1998 Unusual charge stabilization of NADP⁺ in 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* 273 8145-8152.

Mindnich R, Moller G & Adamski J 2004 The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 218 7-20.

Moon YA & Horton JD 2003 Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. *J Biol Chem* 278 7335-7343.

Mustonen MV, Poutanen MH, Isomaa VV, Vihko PT & Vihko RK 1997 Cloning of mouse 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and analysing expression of the mRNAs for types 1, 2, 3, 4 and 5 in mouse embryos and adult tissues. *Biochem J* 325 (Pt 1) 199-205.

Nokelainen P, Peltoketo H, Vihko R & Vihko P 1998 Expression cloning of a novel estrogenic mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase (m17HSD7), previously described as a prolactin receptor-associated protein (PRAP) in rat. *Mol Endocrinol* 12 1048-1059.

Peltoketo H, Isomaa V, Maentausta O & Vihko R 1988 Complete amino acid sequence of human placental 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA. *FEBS Lett* 239 73-77.

Peltoketo H, Luu-The V, Simard J & Adamski J 1999 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol* 23 1-11.

Rheaume E, Simard J, Morel Y, Mebarki F, Zachmann M, Forest MG, New MI & Labrie F 1992 Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Nat Genet* 1 239-245.

Rh eume  , Lachance Y, Zhao H-F, Breton N, Dumont M, de Launoit Y, Trudel C, Luu-The V, Simard J & Labrie F 1991 Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3b-hydroxysteroid dehydrogenase/D5-D4-isomerase in human adrenals and gonads. *Molecular Endocrinology* 5 1147-1157.

Sawetawan C, Milewich L, Word RA, Carr BR & Rainey WE 1994 Compartmentalization of type I 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase in the human ovary. *Mol Cell Endocrinol* 99 161-168.

Simpson ER, Michael MD, Agarwal VR, Hinshelwood MM, Bulun SE & Zhao Y 1997 Cytochromes P450 11: expression of the CYP19 (aromatase) gene: an unusual case of alternative promoter usage. *Faseb J* 11 29-36.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarnah B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD et al. 1994 Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15 342-355.

Torn S, Nokelainen P, Kurkela R, Pulkka A, Menjivar M, Ghosh S, Coca-Prados M, Peltoketo H, Isomaa V & Vihko P 2003 Production, purification, and functional analysis of recombinant human and mouse 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7. *Biochem Biophys Res Commun* 305 37-45.

Van Neste D, Fuh V, Sanchez-Pedreno P, Lopez-Bran E, Wolff H, Whiting D, Roberts J, Kopera D, Stene JJ, Calvieri S et al. 2000 Finasteride increases anagen hair in men with androgenetic alopecia. *Br J Dermatol* 143 804-810.

LEGENDS TO FIGURE

Figure 1. Amino acid sequence comparison of the mouse, human and monkey 17 β -HSD12 and 17 β -HSD3.

The amino acid sequences of the mouse 17 β -HSD12 and 17 β -HSD3 are aligned with their primate homologs. Amino acid sequences are presented in conventional single letter code and numbered on the right. Dashes represent identical amino acids while asterisks (*) show the gaps resulting from the alignment. The conserved sequences for the active (YXXXX) and co-factor binding (GXXXGXG) sites of the NADPH-preferring SDR proteins (Mazza et al., 1998) as well as the amino acid number 234 suspected for the substrate-specificity in the 17 β -HSD12 are underlined.

Figure 2. Substrate specificity of HEK-293 cells stably transfected with mouse 17 β -HSD12.

Different [¹⁴C]-labeled steroids (DHEA [A], 4-dione [B], E1 [C] and ADT [D]) were added to freshly changed culture medium at a concentration of 0.1 μ M. After 0, 6, 24 and 48h of incubation, the media were collected to extract steroids. Metabolites were quantified as described under Materials and Methods. Non transfected HEK-293 cells were used as controls. The data are expressed as mean \pm SEM of triplicate measurements.

Figure 3. Effects of L234A and L234F amino acid substitutions on mouse 17 β -HSD12 activity.

HEK-293 cells were transiently transfected with the expression vectors encoding mouse 17 β -HSD12 (Wild type) and mutants in which the L at amino acid position 234 has been substituted with either A or F (L234A and L234F, respectively). The ability of transfected cells to convert E1 into E2 and 4-dione into T was determined as described under Materials and Methods.

Figure 4. Tissue mRNA expression levels of mouse 17 β -HSD12 measured by RealTime PCR.

The mRNA expression levels were quantified in the indicated male (A) and female (B) tissues using RealTime PCR. RealTime PCR was performed as described under Materials and Methods. Results are expressed as mean \pm SEM of triplicate measurements.

Figure 1

m17 β -HSD12	****MECAPPAAGFLYWVGASTIAYLALRASYSLFRAFQVWCVGNEALVGPRLGEWAVVT	56
h17 β -HSD12	****--S-L-----G-V-----I-----T-LR--G-----G---G-----	56
mk17 β -HSD12	****--S-L-----G-V-----I-----T-LR--G-----G---G-----	56
m17 β -HSD3	****--KLFI---LFVGL*****VC-VKCMRF-QHLFLRFCKALPSSFLRS*M-Q---I-	50
h17 β -HSD3	MGDVL-QFFILT-L-VCL*****-C--KCVRF-RCVLLNY-K-LPKSFLRS*M-Q---I-	54
mk17 β -HSD3	MGDVL-QFFILT-L-VCL*****-C-VKCMRF-RCILLNY-K-LPKPFLRS*M-Q---I-	54
m17 β -HSD12	<u>GGTDGIGKAYAEELAKRGMKIVLISRSQDKLNQVSNNIKEKFNVETRTIAVDFSLDDIYD</u>	116
h17 β -HSD12	-S-----S-----H---V-----K---D---SE-----K-----ASE----	116
mk17 β -HSD12	-G-----S-----V-----Q---D---SE-----K-----T-E----	116
m17 β -HSD3	-AG-----SF---RH-LNV-----TLE--QTIAEE-ERTTGSGVKIVQA--TRE----	110
h17 β -HSD3	-AG-----SF-----LNV-----TLE--EAIATE-ERTTGRSVKI-QA--TK----E	114
mk17 β -HSD3	-AS-----SF---R--LDV-----MLE--QATATE-ERTTGRSVKI-QA--TK----E	114
m17 β -HSD12	KIKTGLSGLEIGVLVNVGMS*YEYPEYFLEIPDLNTIKKLININVLVSVCKVTRLVLPG	175
h17 β -HSD12	-----A-----I-----*-----DV-----V---M---I-----M-Q-----	175
mk17 β -HSD12	-----A-----I-----*-----DV-----V---M---I-----M-Q-----	175
m17 β -HSD3	H--EH-E---N-I-----LPSFF-SH--SSSGE***SQN--HC-IT--V-M-Q---KH	167
h17 β -HSD3	H--EK-A-----I-----LPNLL-SH--NA--E***-QS--HC-IT--V-M-Q-I-KH	171
mk17 β -HSD3	H--EK-T-----I-----LPNLL-SH--NA--E***-QSV-HC-IT--V-M-Q-I-KH	171
m17 β -HSD12	MVERSKGVILNISSASGMLPVPLLTIIYSATKAFVDFFSQCLHEEYKSKGIFVQSVMPYL	235
h17 β -HSD12	-----A-----G-----T-----R---V-----L--F-	235
mk17 β -HSD12	-----A-----G---F-----T-----R-----L--F-	235
m17 β -HSD3	-ES-R--L-----GAALR-W--YSL---S---YT--KA-SV--RD---II-VLT--SI	227
h17 β -HSD3	-ES-Q--L-----GIALF-W--YSM---S---CA--KA-Q-----A-EVII-VLT--A-	231
mk17 β -HSD3	-ES-R--L-----GIALF-W--YSM---S---CT--KA-Q---RA-EVII-VLT--A-	231
m17 β -HSD12	ATKLAKIQKPTLDKPSAETFVKSIAIKTVGLQTRTTGYVIHSLMGSINSIMPRWMYFKIIM	295
h17 β -HSD12	-----R-----P-----S--N--L--A-----I-NL-S-I-L--V-	295
mk17 β -HSD12	-----RK-----TP-----S--N--L--V---W-I-NL-S-I-L--A-	295
m17 β -HSD3	S-PMT-YLN*NKMTKT-DE---ESL-Y-TIGAESC-CLA-EIIAI-LNRI-SRIFYSSTA	286
h17 β -HSD3	S-AMT-YLNTNVITKT-DE---ESLNY-TIGGE-C-CLA-EILAGFL-LI-A-AFYSGAF	291
mk17 β -HSD3	S-AMT-YLNTNVITKT-DE--QESLNY-TIGGE-C-CLA-EILAGFL-LI-A-AFYSGAF	291
m17 β -HSD12	G*FSKSLRNRYLKKRKKK*	312
h17 β -HSD12	N*MN--T-AH----T---*	312
mk17 β -HSD12	N*MN-AT-VH----I---*	312
m17 β -HSD3	QR-LLTRYSD---RNIS-R	305
h17 β -HSD3	QRLLLTHYVA---LNT-VR	310
mk17 β -HSD3	QRLLLTHYVA---LNT-VR	310

Figure 2

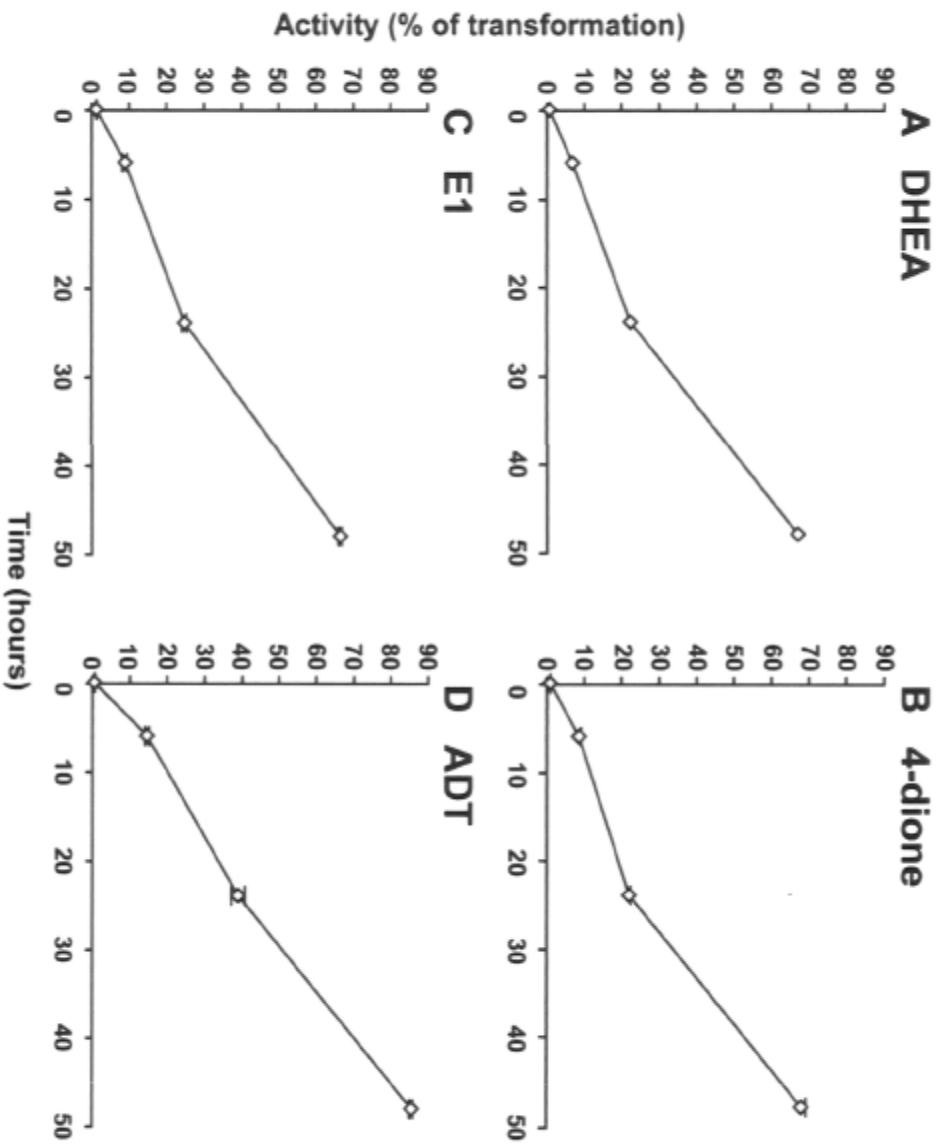
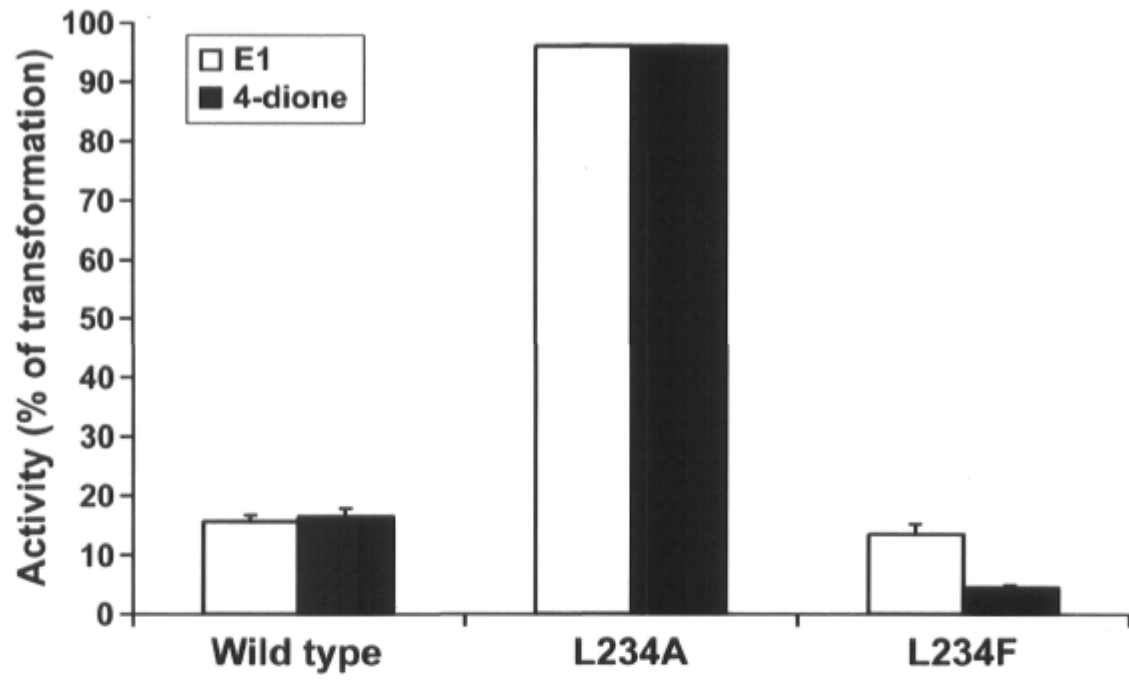


Figure 3



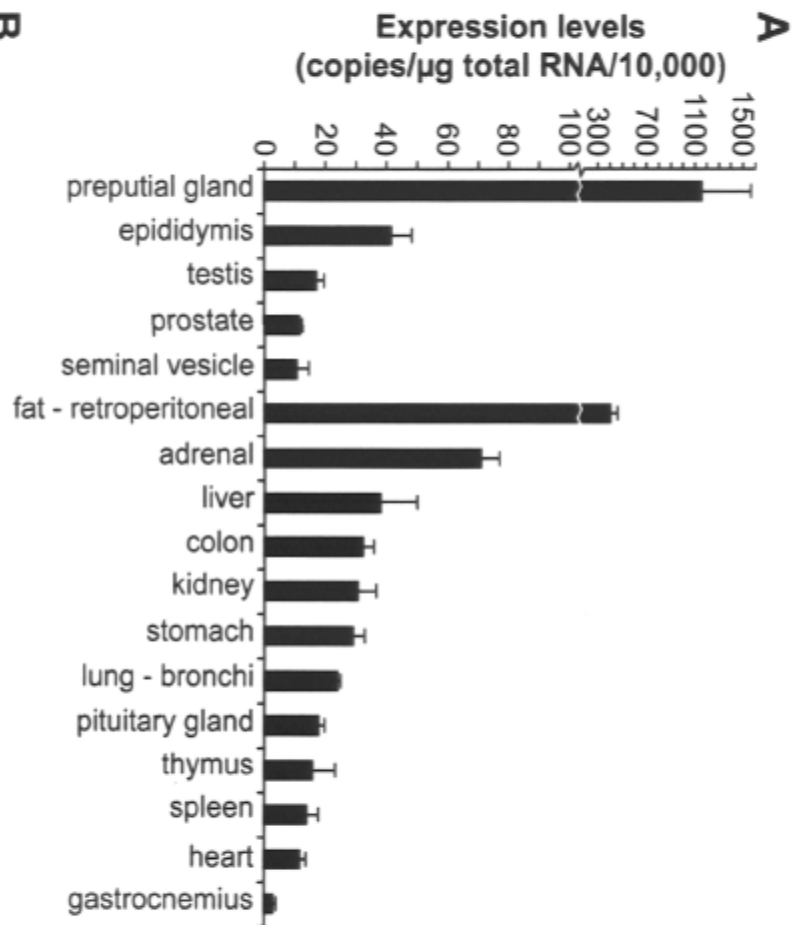
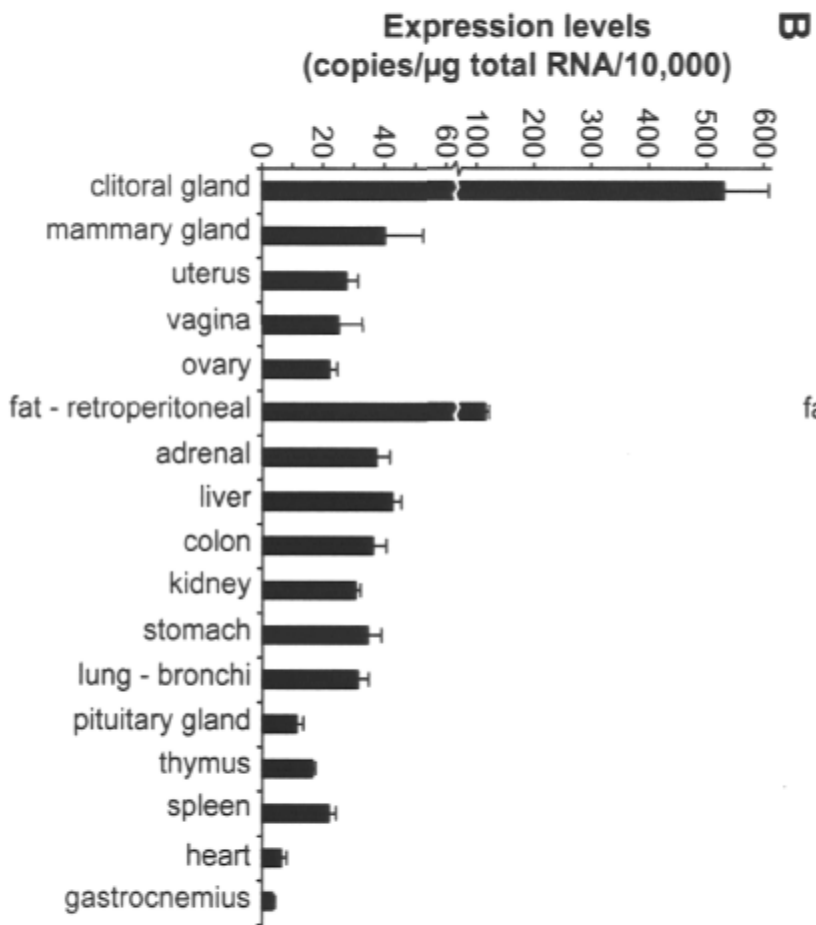


Figure 4

Partie C

Étude de la spécificité de l'homologue de la 17 β -HSD de type 12 chez *C. elegans*

Avant-propos

Ayant prouvé que l'importance de l'acide aminé 234 pour la sélection du substrat était conservée pour les 17 β -HSD de type 12 chez l'humain et la souris, nous avons voulu étudier ce résidu particulier dans la protéine LET-767, l'homologue de *C. elegans*. De plus, comme le professeur Serge Desnoyers s'interrogeait sur certaines mutations de LET-767 qui étaient létales, nous avons voulu vérifier si ces dernières influençaient la transformation des stéroïdes effectuée par l'enzyme sauvage. Pour mener à bien ces études, j'ai complété plusieurs essais enzymatiques sur des cellules HEK-293 transfectées transitoirement. De même, j'ai conçu différents mutants de la protéine originale pour étudier le rôle et l'importance de différents résidus, notamment celui correspondant à la position 234 des protéines humaine et murine ainsi que ceux responsables des mutations létales. Par la suite, j'ai analysé les résultats obtenus afin d'aider les professeurs Luu-The et Desnoyers à rédiger l'article qui suit.

Résumé

L'enzyme LET-767 est apte à modifier différents substrats stéroïdiens. Des mutations inactivant cette dernière ont affecté la croissance, la reproduction et le développement dans l'organisme *Caenorhabditis elegans*. Le gène LET-767 encode une protéine qui partage respectivement 29% et 38% d'homologie dans sa séquence d'acides aminés avec les 17 β -HSD de type 3 et de type 12. Dans le but de caractériser l'activité enzymatique de LET-767, nous avons préparé des cellules HEK-293 en culture exprimant de façon transitoire le gène d'intérêt. Les résultats ont prouvé que l'enzyme est apte à catalyser la transformation du 4-dione en testostérone et de l'estrone en estradiol. En comparaison, chez l'humain, la

17 β -HSD de type 3 est spécifique aux androgènes alors que la 17 β -HSD de type 12 est spécifique aux estrogènes. Comme nous avons précédemment démontré que la spécificité de substrat était due à l'encombrement stérique généré par le résidu phénylalanine 234 pour la 17 β -HSD de type 12, nous nous sommes intéressés aux résidus correspondants soit l'alanine 230 pour la 17 β -HSD de type 3 et le méthionine 251 pour LET-767. Des mutagenèses dirigées furent effectuées pour doter l'enzyme LET-767 de résidus alanine ou phénylalanine en position 251 pour ainsi mimer ses orthologues. Les résultats indiquent que le mutant M251A conserve son habilité à convertir le 4-dione en testostérone alors que le mutant M251F préfère transformer l'estrone. Ces données confirment donc le rôle crucial de l'acide aminé à cette position quant à la spécificité de l'enzyme. Dans un autre temps, nous avons étudié l'effet de trois mutations létales pour l'organisme *C. elegans* soit G72E, G153R et G199R. En générant les mutants correspondants à ces substitutions, nous avons déterminé que les différentes enzymes mutées perdaient une partie de leur aptitude à convertir l'estrone en estradiol et devenaient inaptes à transformer le 4-dione en testostérone. Bref, les trois mutations létales empêchent l'organisme de bien métaboliser certains stéroïdes actifs. L'ensemble des résultats suggère donc que LET-767 est bel et bien l'ancêtre des 17 β -HSD de type 3 et 12. De même, l'identification de nouvelles positions cruciales à l'activité enzymatique de LET-767 sera d'une grande utilité dans l'étude de la préférence de substrat et de la structure des 17 β -HSD.

Statut de l'article au moment du dépôt final :

Accepté pour publication dans le Journal of Endocrinology et présentement sous presse.

Article

***C. elegans* LET-767 is able to metabolize androgens and estrogens and likely shares common ancestor with human types 3 and 12 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases.**

Serge Desnoyers^{1,4}, Pierre-Gilles Blanchard², Jean-François St-Laurent¹, Steve N. Gagnon¹, David L. Baillie³, and Van Luu-The^{2,4}

¹Pediatrics Research Unit and ²Oncology and Molecular Endocrinology Research Center, Laval University Medical Center (CHUL) and Laval University, Quebec, Canada, G1V 4G2, ³Dept. of Molecular Biology and Biochemistry, Simon Fraser University, Burnaby, Canada, V5A 1S6.

Corresponding author:

Pr. Van Luu-The

Oncology and Molecular Endocrinology Research Center,

Laval University Hospital Research Center (CRCHUL) and Laval University

2705 Laurier Boulevard

Quebec, Quebec, Canada G1V 4G2

Tel: (418) 654-2296

Fax: (418) 654-2761

ABSTRACT

Mutations that inactivate LET-767 are shown to affect growth, reproduction and development in *Caenorhabditis elegans*. Sequence analysis indicates that LET-767 shares the highest homology with human types 3 and 12 17β -hydroxysteroid dehydrogenases. Using LET-767 transiently transfected into HEK-293 cells, we have found that the enzyme catalyzes the transformation of both 4-androstenedione into testosterone as well as estrone into estradiol, similar to that of mouse 17β -HSD12 but different from human and primate enzymes that catalyze the transformation of estrone into estradiol. Previously, we have shown that amino acid F234 in human 17β -HSD12 is responsible for the selectivity of the enzyme toward estrogens. To assess whether this amino acid position 234 in LET-767 could play a role in androgen-estrogen selectivity, we have changed the methionine M234 in LET-767 into F. The results show that the M234F change causes the loss of the ability to transform androstenedione into testosterone while conserving the ability to transform estrone into estradiol, thus confirming the role of amino acid position 234 in substrate selectivity. To further analyze the structure-function relationship of this enzyme, we have changed the 3 amino acids corresponding to lethal mutations in *let-767* gene. The data show that these mutations strongly affect the ability of LET-767 to convert estrone into estradiol and abolish its ability to transform androstenedione into testosterone. The high conservation of the active site and amino acids responsible for enzymatic activity and substrate selectivity strongly suggests that LET-767 shares common ancestor with human 17β -HSD3 and 12.

INTRODUCTION

The 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs) are key enzymes responsible for the formation and inactivation of sex steroids (Labrie et al., 2000, Labrie et al., 1997, Luu-The Van, 2001, Mindnich et al., 2004). Members of the 17 β -HSD family fall into two groups: the reductive and the oxidative 17 β -HSDs. The reductive 17 β -HSDs produce active androgens and estrogens by catalyzing the formation of the hydroxy group at position 17 β of the steroid backbone. The oxidative 17 β -HSD transforms the hydroxy group into keto and inactivates the steroids. Type 3 17 β -HSD (17 β -HSD3) is a reductive 17 β -HSD present in the testis and catalyzes the transformation of 4-androstenedione into testosterone (Geissler et al., 1994). Its deficiency is the cause of the male pseudohermaphroditism in affected boys. Human 17 β -HSD12 is structurally closely related to 17 β -HSD3. The similarities include conserved active site and cofactor binding site. Moreover, their genomic organization is similar: 11 exons of approximately the same size spanning large chromosomal regions, i.e. 240 kb for 17 β -HSD12 and 103 kb for 17 β -HSD3. Therefore, 17 β -HSD3 and 17 β -HSD12 may be duplicate genes. Both genes have however evolved to acquire different substrate selectivity, androgen for 17 β -HSD3 and estrogen for 17 β -HSD12 in human and primates (Liu et al., 2007, Luu-The V. et al., 2006). It is noteworthy that mouse 17 β -HSD12 catalyzes the transformation of both androgens and estrogens (Blanchard & Luu-The, 2007). In agreement with their role in the formation of active sex steroid and reproduction in human, 17 β -HSD3 is highly expressed in the testis while 17 β -HSD12 is expressed significantly in the ovary and mammary gland (Luu-The V. et al., 2006).

The importance of steroid-metabolizing enzymes is not limited to mammals. Analysis of the *C. elegans* genome reveals the presence of up to six genes sharing high homology with 17 β -HSDs: *let-767*, *dhs-5*, *stdh-1*, *sdth-2*, *tag-57*, and *C06B3.5* (WormBase web site, <http://www.wormbase.org>, release WS159, June 22, 2006). Of particular interest, *Let-767* mutants, show a reduction in growth and a decrease in brood size similar to the phenotype observed in wild-type worms grown in the absence of cholesterol (Merris et al., 2003). The data strongly suggests that *LET-767* is involved in the metabolism of cholesterol (Kuervers et al., 2003). However, the enzymatic product that may be generated by *LET-767* in *C.*

elegans is most probably not an androgen nor estrogen because it has been shown that AR and ER are missing in *C. elegans* (Baker, 2003, Bertrand et al., 2004).

Since LET-767 shows the highest homology with 17 β -HSD3 and 12, we would like to assess whether LET-767 is able to transform the substrates of these enzymes, namely, androstenedione and estrone. In the present study, we show, using transformed embryonic kidney (HEK-293) cells transiently expressing LET-767, that this enzyme catalyzes the conversion of estrone into estradiol, as well as 4-androstenedione into testosterone. Furthermore, site-directed mutagenesis analysis correlate the inactivation of LET-767 enzymatic activity with the establishment of a lethal phenotype caused by developmental arrest. Taken together, our data strongly suggest that LET-767 shares common ancestor with human 17 β -HSD3 and 12 genes.

MATERIALS AND METHODS

C. elegans strains

The strains used in this study were obtained from the *Caenorhabditis elegans* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis, MN) and from the laboratory of Dr. David Baillie (Simon Fraser University, British-Columbia, Canada). These include: the wild-type N2 var. Bristol strain, BC4849 sDp3 (III;f); *dpy-17*(estrone64) *let-767*(s2819) *ncl-1*(estrone865) *unc-32*(estrone89)III, BC4981 sDp3 (III;f); *dpy-17*(estrone64) *let-767*(s2176) *unc-32*(estrone89)III, BC4174 sDp3 (III;f); *dpy-17*(estrone64) *let-767*(s2464) *unc-32*(estrone89)III.

Nematode culture and growth conditions

C. elegans were handled and cultured according to standard protocol (Hope, 1999) in order to prepare RNA and to perform RNAi experiment. Briefly, worms were grown at 20°C on Nematode Growth Medium (NGM) agar plates seeded with *E. coli* strain OP50 as a source of food. For liquid cultures, worms were first grown on ten 9-cm plates until bacteria were cleared from the surface (usually 3 days). The worms were then transferred to 1 L S basal medium (0.1 M NaCl, 0.05 M KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 6. 5 µg/mL cholesterol, 0.01 M potassium citrate, pH 6, 0.05 mM EDTA, 0.025 µM FeSO₄•7H₂O, 0.01 µM MnCl₂•4H₂O, 0.01 µM ZnSO₄•7H₂O, 0.001 µM CuSO₄•5H₂O, 3 mM CaCl₂, 3 mM MgSO₄) supplemented with 7 g of *E. coli* strain NA22 paste. Cultures were continuously shaken at 250 rpm for 4-5 days. Worms were then harvested in 200-ml centrifuge bottles, put on ice for 30 min, and centrifuged for 5 min at 300xg at 4°C. The resulting pellet (usually 5-10 mL) was washed twice with M9 buffer (22 mM KH₂PO₄, 42 mM Na₂HPO₄, 86 mM NaCl, 1 mM MgSO₄). The worms were finally washed with 0.1 M NaCl and then resuspended in 20 ml 0.1 M NaCl, mixed with 20 ml 60% (w/v) sucrose and centrifuged for 3 min at 300xg at 4°C. Floating worms were recovered and washed twice in 0.1 M NaCl.

Isolation of *let-767* cDNA, 5'-RACE and construction of pCMVneo-Let767

The EST clone yk475a10 was kindly provided by Dr. Yuji Kohara (National Institute of Genetics, Mishima, Japan). To determine the true 5'-end cDNA, as well as the trans-

splicing nature of let-767 mRNA, PCR was performed on an oligo(dT)-primed cDNA library made from poly(A)⁺ RNA from mixed-stage worm culture (see RNA preparation below). PCR amplifications were performed using SL1 primer (5'-GTT-TAA-TTA-CCC-AAG-TTT-GAG-3'), SL2 primer (5'-GGT-TTT-AAC-CCA-GTT-ACT-CAA-G-3') or a gene-specific primer (GSP1) (5'-ATG-GCT-TGC-CAG-TGC-TTC-TTG-3') as forward primers and a gene-specific reverse primer (GSP2) (5'-GCG-AGA-AGA-TCT-TTG-TAA-GCA-3'). The distance between GSP1 and GSP2 is 359 bp. The PCR conditions using the Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, Ontario, Canada) were as follow: first, a denaturing step at 94°C for 90 sec; second, a step at 98°C for 10 sec followed by a step at 55°C for 10 sec repeated 25 times and a final step at 72°C for 5 min. The PCR products were sequenced using an automated dideoxynucleotide DNA sequencing using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described (Liu et al., 2007). It appeared that the sequence of yk475a10 contained the entire coding region of let-767. The cDNA fragment of let-767 was then excised from the EST and inserted into a pCMVneo vector downstream from a cytomegalovirus promoter, at the Eco RI and Kpn I restriction sites. The resulting pCMVneo-Let767 vector was sequenced to verify its integrity and stably transfected into HEK-293 cells as described previously (Liu et al., 2007).

RNA preparation

Total RNA was prepared from frozen worm pellets by first pulverizing them in a mortar with liquid nitrogen then homogenizing the resulting powder with a polytron in a sonicating buffer (500 mM NaCl, 200 mM Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS, 100 mM β-mercaptoethanol). An equal volume of phenol (pH 4.3) was added to extract RNA. The aqueous phase was further treated (3 to 5 times) with an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (125:24:1), pH 4.3 to remove protein. Total RNA was precipitated by addition of 0.1 volume of 3 M NaOAc, pH 5.2, and 2 volumes of 100% ethanol, and incubation at -75°C. Poly(A)⁺ RNA was extracted from total RNA by a poly(dT)-column using an mRNA purification kit (Pharmacia, Piscataway, NJ).

dsRNA-induced phenotype

Forward and reverse RNA strand encoding LET-767 were synthesized using T3 and T7 promoters of the EST clone yk475a10 and the Ribomax RNA synthesis kit (Promega). The two single-stranded RNAs were annealed to form dsRNA and injected as described (Fire et al., 1998). Microinjected worms (dsRNA or buffer) were allowed to lay eggs for a period of 16 hours. Ten egg-laying hermaphrodites were placed individually on fresh plates. They were allowed to lay egg until there were about 30 embryos on plates. Then the egg-laying hermaphrodites were removed from plates. Photographs of the F1 progeny were taken every 12 hours using a Photometrics CoolSnap Fx camera attached to a Nikon E1000 microscope. N2 worms (not injected) were synchronized using the bleaching technique (Hope, 1999). Eggs were placed on NGM plate with OP50 bacteria. Photographs were taken every 12 hours.

Sequencing of let-767 alleles

To identify nucleotide changes in LET-767 lethal mutants, cDNA encoding LET-767 was amplified by PCR on homozygous *dpy-17 let-767 (s2176) unc-32*, *dpy-17 let-767 (s2819) unc-32*, and *dpy-17 let-767 (s2464) unc-32*. The primers used were 5'-TAG-TTA-CAA-GAA-ATA-ATG-GAG-TCG-T-3' as forward primer and 5'-TGA-AGC-ATT-GTT-GGG-TTA-CTG-T-3' as reverse primer. The amplified PCR products were sequenced using an automated dideoxynucleotide DNA sequencing using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the following primers: 5'-TAG-TTA-CAA-GAA-ATA-ATG-GAG-TCG-T-3', 5'-TGA-AGC-ATT-GTT-GGG-TTA-CTG-T-3', 5'-CTC-GAG-AAG-TAT-TCC-AGC-ATT-GAG-3', and 5'-ACG-GAG-CCG-TGT-TCG-CTA-AAT-C-3'.

Amino acid substitution using site-directed mutagenesis

Amino acid substitution on the LET-767 expression vector was performed as described (Dufort et al., 1999) using the Quick Change Site-directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) and the following primer pairs: 5'-CAT-GCT-CCC-TTG-GCC-ACT-CTT-GAC-3' and 5'-GTG-TCC-TGC-CAT-ACG-CCG-TAG-CTA-CAA-AAC-T-3'; 5'-CCC-TGT-TTC-CTG-TGC-CTC-TCT-ACT-C-3' and 5'-GTG-CTG-ACC-CCA-TAT-TTT-GTC-TCG-ACT-GCA-ATG-3'; 5'-ACC-GGA-GCC-ACT-GAC-GAA-ATC-GGA-AAA-

GCA-TAC-3' and 5'-ACC-GGA-GCC-ACT-GAC-GAA-ATC-GGA-AAA-GCA-TAC-3'; 5'-CTT-ATT-AAC-AAC-GTT-AGA-ATG-AGC-TAC-GAA-TAT-3' and 5'-CTT-ATT-AAC-AAC-GTT-AGA-ATG-AGC-TAC-GAA-TAT-3'; 5'-GTC-GCA-CGA-AAG-GCT-AGA-GTC-ATT-GTT-AAT-GTT-3' and 5'-GTC-GCA-CGA-AAG-GCT-AGA-GTC-ATT-GTT-AAT-GTT-3'. These primers allow to make the amino acid M234F, M234A, G58E, G135R and G182R substitutions, respectively. The integrity of the constructs was verified by sequencing of the inserted DNA fragment. Plasmid DNA was prepared using the Qiagen Mega Kit (Qiagen, Chatsworth, CA). Oligonucleotide primers were synthesized with a DNA synthesizer ABI-394 (Perkin-Elmer-Cetus, Emerville, CA).

Enzymatic assay

Determination of the activity was performed in transiently transfected intact cells in culture as previously described (Dufort et al., 1999). Briefly, cells were plated into 6-well plates at a density of 5×10^5 cells/well in MEM (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% (v/v) calf fetal serum (Hyclone, Logan, UT, USA) at 37°C under a 95% air/5% CO₂ humidified atmosphere. Five µg of pCMVneo- plasmid containing cDNA insert encoding LET-767 as well as LET-767 mutants was transfected into cells using ExGen 500 transfection kit as indicated by the manufacturer (Fermentas Canada Inc., Burlington, ON, Canada). A mock transfection was performed as control with the expression vector pCMVneo without insert. After 16h incubation, the transfection medium is removed and 2 ml of MEM culture medium is added. 0.1 µM of the indicated ¹⁴C-labeled steroid (Dupont, Inc., Mississauga, Canada) was added to freshly changed MEM culture medium and incubated for 24h. After incubation, steroids were extracted twice with 1 ml ether. The organic phases were pooled and evaporated to dryness. The resulting dry steroids were solubilized in 50 µl dichloromethane and applied onto Silica Gel 60 TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany) before separation by migration using a toluene: acetone (4:1) solvent system. Substrates and metabolites were identified by comparison with reference steroids, and quantified using the PhosphorImager System (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA).

RESULTS

Mutational analysis of let-767 and transcripts trans-splicing

Let-767 is known to be essential for the worm development (Kuervers et al., 2003). The three alleles that confer developmental arrest and lethality (s2176, s2819 and s2464) were originally isolated from screens performed by Dr. David Baillie's group (Stewart et al., 1998, Vatcher et al., 1999). These alleles have been genetically characterized and are referred to as early-larval lethal for s2176, mid-larval lethal for s2819, and maternal-effect lethal for s2464 (Kuervers et al., 2003). Only the s2176 was characterized at the molecular level. It was shown to be a missense mutation replacing the guanine 403 for an adenine which changes the G135 to R (G135R) (Fig. 1B and Kuervers et al. (Kuervers et al., 2003)). In order to further characterize the s2819 and the s2464 alleles, we sequenced the entire let-767 genes isolated from homozygous mutants by single worm PCR. The sequences obtained revealed that s2819 and s2464 have missense mutations (Fig. 1A and B). The mutation in s2819 replaces guanine 544 for an adenine which changes G182 to R (G182R). Likewise, s2464 has guanine 173 changed to an adenine which changes G 58 to E (G58E).

It has been reported that the expression profile of let-767 is uniform throughout the life cycle of the worm, thus it is expressed at all developmental stages, and that transcripts are either not trans-spliced or trans-spliced with SL1 (Wormbase web site, <http://www.wormbase.org>, release WS159, June 22, 2006). Our observation shows that part of the let-767 transcripts are also trans-spliced by SL2 (Fig. 1 C). The exact significance of this peculiar trans-splicing status is not known. However, the 5'-RACE analysis provides evidence about the true nature of the 5' structure of the let-767 transcripts. It shows that the start codon is 51 nucleotides downstream from what was earlier suggested (Kuervers et al., 2003).

Effect of RNA interference (RNAi) of let-767 expression on the development of C. elegans

To assess the function of let-767, we performed an RNAi experiment using the coding sequence of let-767. As illustrated in Fig. 2, N2 worms injected with dsRNA covering the

entire coding sequence of *let-767* stop their development at the first larval-second larval (L1-L2) stages, whereas wild-type N2 worms not injected with dsRNA or injected with microinjection buffer alone progress normally through all developmental stages. This is in agreement with the observation that alleles *s2176*, *s2819* and *s2464* confer a null phenotype in the form of early larval arrest (Kuervers et al., 2003).

LET-767 catalyzes efficiently the transformation of androstenedione and estrone into testosterone and estradiol in transfected cells, respectively

Sequence alignment (Fig. 3) shows that *let-767* shares similar consensus amino acid sequences for cofactor and active site with human 17 β -HSD3 and 12. To determine whether *C. elegans* LET-767 is able to catalyze the conversion of androstendione and estrone into testosterone and estradiol such as human 17 β -HSD3 and 12, respectively, we cloned the coding region of *let-767* cDNA into a mammalian expression vector, pCMVneo (12), and introduced it into HEK-293 cells by transient transfection. As shown in Fig. 4, cells transfected with an expression vector lacking a cDNA insert (Mock) display no measurable conversion of 4-androstenedione into testosterone and estrone into estradiol. On the other hand, in the presence of the cDNA insert encoding *let-767*, high conversion of 4-androstenedione to testosterone and estrone to estradiol has been observed, thus indicating that LET-767 is able to convert androgen as well as estrogen substrates. The situation is similar to that observed with the mouse 17 β -HSD12 (Blanchard & Luu-The, 2007) that possesses a small size amino acid (L) at position 234. In human, 17 β -HSD12 (Luu-The V. et al., 2006) has lost the ability to metabolize androgen that is produced by the isoform 17 β -HSD3 (Geissler et al., 1994). The presence in the mouse and human of 17 β -HSD3 that catalyses the formation of testosterone in the testis suggests that the mouse 17 β -HSD12 is rather implicated in the biosynthesis of estrogen although it has the ability to convert androgen substrate.

Role of M234 in substrate preference

Previously (Luu-The V. et al., 2006), we have shown that the amino acid F234 in human 17 β -HSD12 is responsible for the estrogen selectivity. Using 3D-structure modeling and site directed mutagenesis we have shown that the large size of F in 17 β -HSD12 could

prevent C19-steroid from entering the active site by steric hindrance, while the smaller size of A, the corresponding amino acid in type 3 17 β -HSD permit the entrance of androgen (Luu-The V. et al., 2006). As illustrated in the amino acid sequence alignment of LET-767 with 17 β -HSD3 and 12 (Fig. 3), the corresponding amino acid at this position in *C. elegans* is M234. To determine if the smaller size of M compare to F could be responsible for the ability of LET-767 to metabolize 4-androstenedione as well as estrone (Fig. 4), we performed a M234F substitution. As expected, the ability of the mutated enzyme to transform 4-androstenedione, compared to the transformation of estrone, is much lower than that observed with the wild type and M234A substitution (Fig. 5).

Effect of lethal mutations in let-767 on the ability to metabolize 4-androstenedione and estrone

As mentioned above, there are three lethal point mutations in let-767 that change G at positions 58, 135 and 182 into E, R and R respectively. To determine how these amino acid substitutions affect LET-767 enzymatic activity we have substituted these amino acids in LET-767 expression vectors by site directed mutagenesis, as described in Materials and Methods. As illustrated in Fig. 6, all three mutations: G58E, G135R and G182R inactivate the transformation of 4-androstenedione to testosterone (Fig. 6A) as well as the transformation of estrone into estradiol Fig. 6B). These results suggest that there is a strong relationship between development lethal mutations and the ability to metabolize androgen and estrogen by LET-767.

DISCUSSION

In this paper we show that *let-767* in *C. elegans* encodes a homolog of human 17 β -HSD3 and 12, the two enzymes involved the formation of testosterone (Geissler et al., 1994) and estradiol(Luu-The V. et al., 2006), a key natural androgen and estrogen, respectively. However, in contrast with the human enzymes that show substrate specificity, LET-767 catalyzes the transformation of 4-androstenedione into testosterone as well as estrone into estradiol, similar to that found in the mouse 17 β -HSD12 (Blanchard & Luu-The, 2007). Previously, we have shown that the amino acid F234 is responsible, in part, for the androgenic-estrogenic substrate specificity. Mutational study of the corresponding amino acid in *C. elegans* (M234) (Fig. 4) confirms the ability of this amino acid to control the entrance of C19- or C18-steroid into the active site. The conserved amino acid position responsible for androgen/estrogen selectivity as well as the conserved amino acid sequence for active and cofactor binding sites strongly suggest that *let-767* shares common ancestor with 17 β -HSD12 and its duplicate type 3 17 β -HSD gene. In human and primates 17 β -HSD3 and 12 diverge and acquire substrate specificity for androgen and estrogen, respectively. In the mouse, it is likely that androgen/estrogen selectivity is less critical than in human, since many estrogen selective 17 β -HSDs in human such as 17 β -HSD1 and 12 catalyze as well the production of androgens (Blanchard & Luu-The, 2007, Nokelainen et al., 1996). It is noteworthy that 17 β -HSD3 is responsible for the formation of testosterone, one of a key steroid hormone. The gene is specifically expressed in the human testis and its deficiency is responsible for male pseudohermaphroditism in young boys (Geissler et al., 1994) that affect the formation of the internal male reproductive structures (epididymes, seminal vesicles and vas deferens) as well as the initiation and maintenance of spermatogenesis and the development and maintenance of secondary male characteristics such as voice deepening and muscle strength (Wilson, 1978). This could be related to the mutations of *let-767* (alleles s2176, s2819 and s2464) that affect the production of steroid hormone in *C. elegans* responsible for developmental arrest leading to early-larval, mid-larval and maternal effect lethality (Kuervers et al., 2003). Using site directed mutagenesis (Fig. 6A and 6B), we have also shown a strong relationship between these lethal mutations and the ability to metabolize androgen and estrogen and most probably the active hormone in *C. elegans*.

It is noteworthy that all the point mutations involve a glycine codon. This is not surprising since all G codons have at least two guanines and that the mutagen used to generate these mutations is EMS, a chemical known to preferentially attack guanines (Singer & Kusmierk, 1982). It is even more important to note that all the missense mutations involve conserved G (Fig. 3). G is a non-polar amino acid. Mutational changes to a basic amino acid such as R or an acidic amino acid such as E is predictive of profound changes regarding the structure and/or the function of the encoded protein.

Similar to LET-767 that is able to metabolize vertebrate hormone androgen and estrogen, it has been shown that the plant enzyme responsive for *det2* mutation that cause small dark-green dwarfs displaying pleiotropic defects in light-regulated development during multiple stages of the *Arabidopsis* plant life cycle, is also able to convert vertebrate steroid hormone testosterone into dihydrotestosterone although its natural plant steroid hormone is campestanol, a brassinosteroid (Li et al., 1997). It is noteworthy that the human type 2 5α -reductase is also able to convert campesterol into campestanol and it is identified as ortholog of *det2* in plant (Li et al., 1997). The similarity between the two cases: LET-767/ 17β -HSD12 and *det2*/ 5α -reductase, suggests that LET-767 is involved in the biosynthesis of active steroid in *C. elegans* that has a structure different with sex steroids in mammals but it could play an equivalent role.

The present data show that LET-767 is able to metabolize the same substrate as human 17β -HSD3 and 12 enzymes and it also contains the amino acid involved in the substrate selectivity. These data strongly suggest that LET-767 could be used as model for studying the structure-activity relationship of 17β -HSD3 and 12. It could also help in designing specific inhibitors for these enzymes, which represent interesting drug targets for the treatment of androgen and estrogen sensitive diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Yuji Kohara for providing us with EST clone yk475a10, Guy Remnitz for his skillful technical assistance, and Bob Johnsen for comments. This work is partially supported by The Foundation for Research into Children's Diseases. J.-F. St-L. and P.-G. B. are supported by studentships from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. D.L.B. holds a Canadian Research Chair and is supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC Canada) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR). S.D is a Junior 2 Research Fellow from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. Part of this work was supported by CIHR grant MOP-77698 to V.L.T.

REFERENCES

Baker ME 2003 Evolution of adrenal and sex steroid action in vertebrates: a ligand-based mechanism for complexity. *Bioessays* 25 396-400.

Bertrand S, Brunet FG, Escriva H, Parmentier G, Laudet V & Robinson-Rechavi M 2004 Evolutionary genomics of nuclear receptors: from twenty-five ancestral genes to derived endocrine systems. *Mol Biol Evol* 21 1923-1937.

Blanchard P-G & Luu-The V 2007 Differential androgen and estrogen substrates specificity in the mouse and primates type 12 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Journal of Endocrinology* In press.

Dufort I, Rheault P, Huang X-F, Soucy P & Luu-The V 1999 Characteristics of a highly labile human type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 140 568-574.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE & Mello CC 1998 Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 806-811.

Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW & Andersson S 1994 Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet* 7 34-39.

Hope I 1999 *C. elegans: A practical approach*, Oxford University Press, Oxford.

Kuervers LM, Jones CL, O'Neil NJ & Baillie DL 2003 The sterol modifying enzyme LET-767 is essential for growth, reproduction and development in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Genet Genomics* 270 121-131.

Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Simard J & Labrie C 2000 Role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid formation in peripheral intracrine tissues. *Trends Endocrinol Metab* 11 421-427.

Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Labrie C, Simard J, Breton R & Belanger A 1997 The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* 62 148-158.

Li J, Biswas MG, Chao A, Russell DW & Chory J 1997 Conservation of function between mammalian and plant steroid 5alpha-reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 3554-3559.

Liu H, Zheng S, Bellemare V, Pelletier G, Labrie F & Luu-The V 2007 Expression and localization of estrogenic type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the cynomolgus monkey. *BMC Biochem* 8 2.

Luu-The V 2001 Analysis and characteristics of multiple types of human 17b-hydroxysteroid dehydrogenases. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 76 143-151.

Luu-The V, Tremblay P & Labrie F 2006 Characterization of type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 3 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women. *Mol Endocrinol* 20 437-443.

Merris M, Wadsworth WG, Khamrai U, Bittman R, Chitwood DJ & Lenard J 2003 Sterol effects and sites of sterol accumulation in *Caenorhabditis elegans*: developmental requirement for 4alpha-methyl sterols. *J Lipid Res* 44 172-181.

Mindnich R, Moller G & Adamski J 2004 The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 218 7-20.

Nokelainen P, Puranen T, Peltoketo H, Orava M, Vihko P & Vihko R 1996 Molecular cloning of mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I and characterization of enzyme activity. *Eur J Biochem* 236 482-490.

Singer B & Kusmierk JT 1982 Chemical mutagenesis. *Annu Rev Biochem* 51 655-693.

Stewart HI, O'Neil NJ, Janke DL, Franz NW, Chamberlin HM, Howell AM, Gilchrist EJ, Ha TT, Kuervers LM, Vatcher GP et al. 1998 Lethal mutations defining 112 complementation groups in a 4.5 Mb sequenced region of *Caenorhabditis elegans* chromosome III. *Mol Gen Genet* 260 280-288.

Vatcher GP, Barbazuk WB, O'Neil NJ, Marra MA, Ha T & Baillie DL 1999 Identification and characterization of a serine hydroxymethyltransferase isoform in *Caenorhabditis briggsae*. *Gene* 230 137-144.

Wilson JD 1978 Sexual differentiation. *Annu Rev Physiol* 40 279-306.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1. let-767 gene structure, mutational analysis and transsplicing structure.

A. Structure of let-767. Exons are boxed, introns are represented by lines. ATG and TAA represent start and stop codons respectively. **B.** Nucleotide sequence illustrating the nucleotide changes in s2464, s2176 and s2819 compared to the wild-type N2 sequences (upper panels). The amino acid substitutions are indicated in parentheses. **C.** Evidence that the mRNA of let-767 is transspliced with SL1 or SL2. DNA fragments obtained by PCR amplification using gene specific primer 1 (GSP1) which start at the start codon and GSP2 which is 359 bp downstream of the start as well as the splice leader 1 (SL1) primer or the SL2 primer as forward primer and GSP2 as the reverse primer were separated on agarose gel electrophoresis. Specific bands were excised from the gel and their sequence was determined by automated sequencing. The partial sequences obtained for SL1 and SL2 are shown along with an untranslated sequence (GTAAC) and the start codon ATG.

Figure 2. Silencing of let-767 by RNAi induces developmental arrest.

N2 wild-type worms were either not injected (N2), injected with microinjection buffer (Buffer) or injected with let-767 dsRNA (let-767 (RNAi)). The F1 progeny was followed throughout their entire life cycle until they reached adulthood, and photographs were taken every 12 hours, a period of time roughly equivalent to a developmental stage. Worms injected with dsRNA from let-767 display a developmental arrest phenotype. L: larval stage.

Figure 3. Comparison of amino acid sequences of LET-767, 17 β -HSD12 and 17 β -HSD3

Amino acids are presented in conventional single letter code and numbered on the right. Dashes (-) and dots (*) represent identical and missing amino acids, respectively. The consensus sequences for co-factor binding and active sites are underlined.

Figure 4. Conversion of 4-androstenedione and estrone by LET-767.

The experiments were performed using transiently transfected cells in culture containing 0.1 μM of the indicated [^{14}C]-labelled androstenedione and estrone. 4-dione, conversion of 4-androstenedione to testosterone; Estrone, conversion of estrone to estradiol. 100% conversion represents 34 and 35 pmoles/h/ 10⁶ cells for the conversion of 4-dione and E1, respectively. The incubation of control HEK-293 cells with the same substrates serves as control. The data are expressed as means \pm SEM of triplicate measurements.

Figure 5. Effects of M234F and M234A amino acid substitutions on LET-767 activity.

HEK-293 cells were transiently transfected with expression vectors encoding LET-767 (Wild Type) and mutants with a substitution of M at position 234 for F (M234F) or A (M234A). The ability of transfected cells to convert estrone to estradiol and 4-androstenedione to testosterone were determined as described in Materials and Methods. The data are expressed as means \pm SEM of triplicate measurements.

Figure 6. Effects of substitution with amino acids from lethal mutants on LET-767 activity.

HEK-293 cells were transiently transfected with expression vectors encoding LET-767 (Wild Type) and mutants containing G58E, G135R and G182R substitution. The ability of transfected cells to convert 4-androstenedione to testosterone (**6A**) and estrone to estradiol (**6B**) were determined as described in Materials and Methods. The data are expressed as means \pm SEM of triplicate measurements.

Figure 1

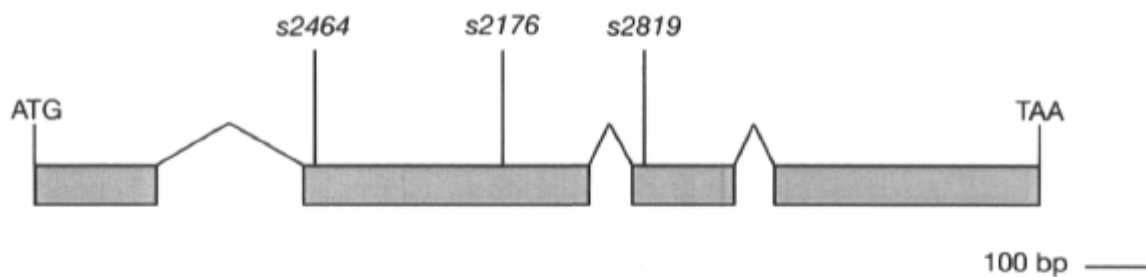
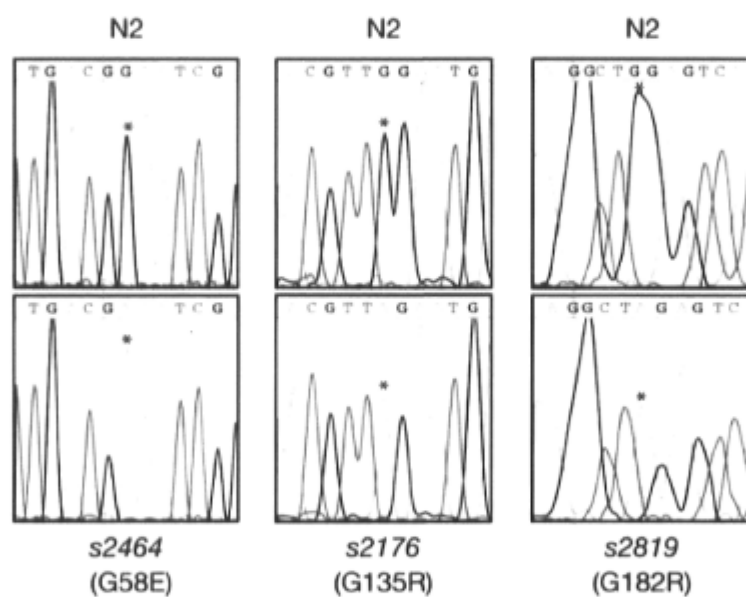
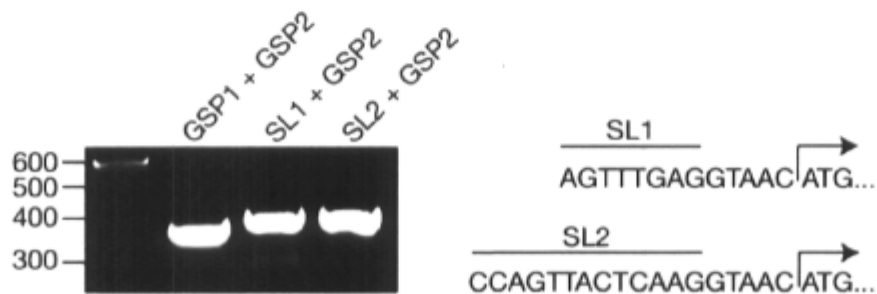
A**B****C**

Figure 2

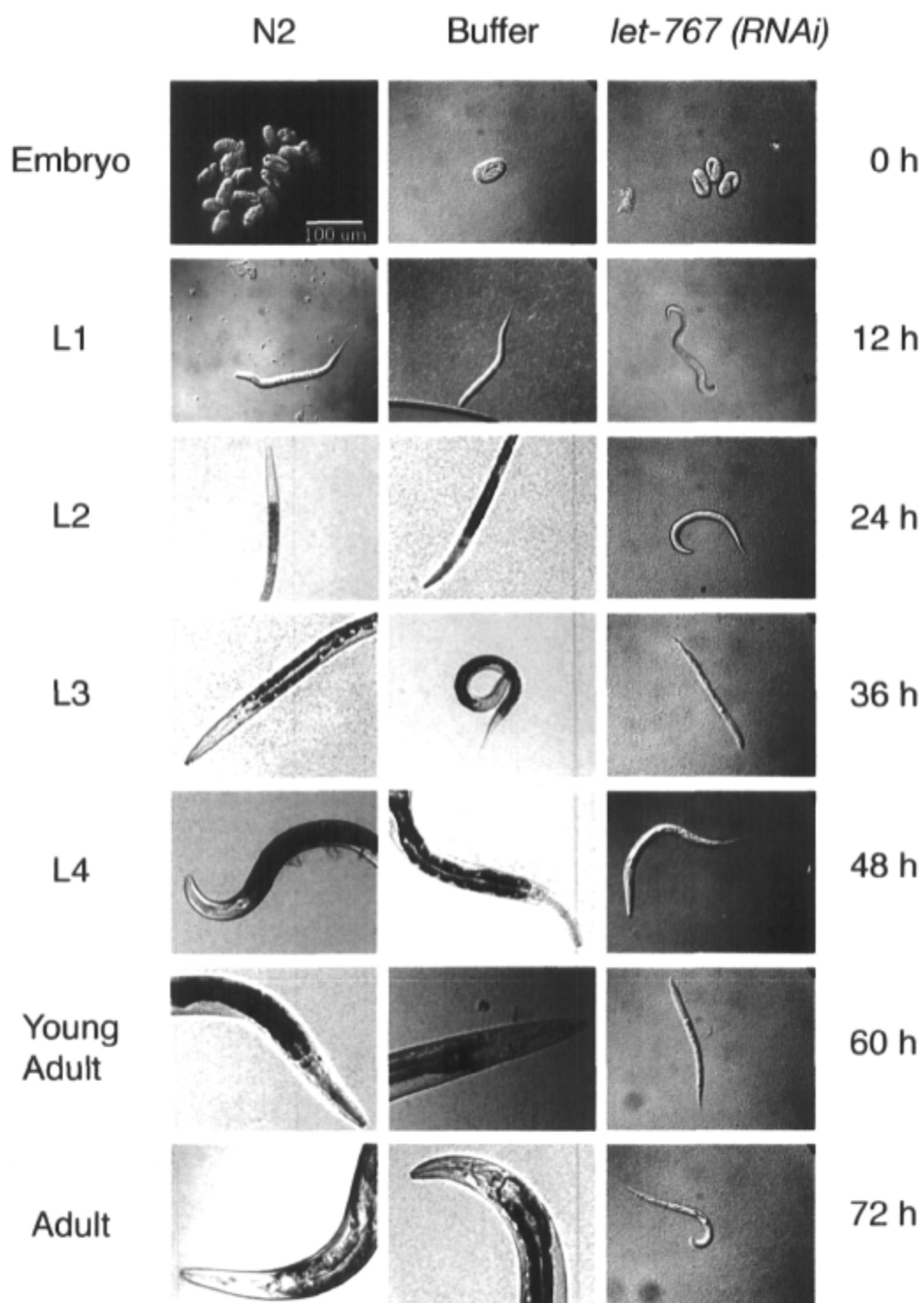


Figure 3

LET-767	MACQCFLVGAGYVALAA*VAYRLTI*FSNILGPYVLLSPIDLKKRAGA*	47
h17 β -HSD12	-ESALPAA-FL-WVG-GT---LA-R-SY-LFTALR-WGVGNEAGVGP-LG	50
h17 β -HSD3	-GDVL*EQFFILTG-LVCL-CLAKCVRF-RCVLLNYWKVLPKSFL-S*MG	48
LET-767	SWAVVTGATDGIGKAYAFELARRGFNVLLVSRVTSKLDKKEILEKYSSI	98
h17 β -HSD12	E-----ST-----S--E---KH-MK-V-I--SKD---QVSS--K--FKV*	100
h17 β -HSD3	Q---I---G-----S----K--L--V-I---LE--EAIAT--ERTTGR*	98
LET-767	EVRTAAFDFPTNAAPSAYKDLLATLNQVEIGVLINNVGMSYEYPDVLHKVDG	149
h17 β -HSD12	-T--I-V--A**SEDI-DKIKTG-AGL---I-V-----EYFLD-PD	149
h17 β -HSD3	S-KIIQA---**KDDI-EHIKEK-AGL---I-V-----LPNLLPSHFLNAP	147
LET-767	GIERLANITTINTLPPTLLSAGILPQMVARVIVNVGSSAGANQMALW	199
h17 β -HSD12	LDNVIKKMIN--ILSVCKMTQLV--G--E-SK-A-L-IS-GS-MLPVP-L	199
h17 β -HSD3	D**IQSLIHC-ITSVVKMTQL--KH-ES-QK-L-L-IS-GIALFPWP-Y	195
LET-767	AVYSATKKYVSWLTAILRKEYEHQGITVQTIAPMMVATKMSKVKRTSFFT	249
h17 β -HSD12	TI-----TF-DFPSQC-HE--RSK-VF--SVL--F----LA-IRKPTLDK	249
h17 β -HSD3	SM--S-AF-CAPSKA-QE--KAKEVII-VLT--A-S-A-T-YLN-NVI-	245
LET-767	PDGAVFAKSALNTVGNVSDTTGYITHQLQLELMDLIPTFIRDKILTNSV	299
h17 β -HSD12	-SPET-V---IK---LQ-R-N--LI-A-MGSIISNL-SW-YL--VM--NK	299
h17 β -HSD3	KTADE-V-ES--Y-TIGGE-C-CLA-EILAGFLS---AWAFYSGAFQRL	295
LET-767	GTRAAALRKKEREAKSQ	316
h17 β -HSD12	S---HY-*---**TK-N*	312
h17 β -HSD3	L-**HYVAYLKLNT-VR	310

Figure 4

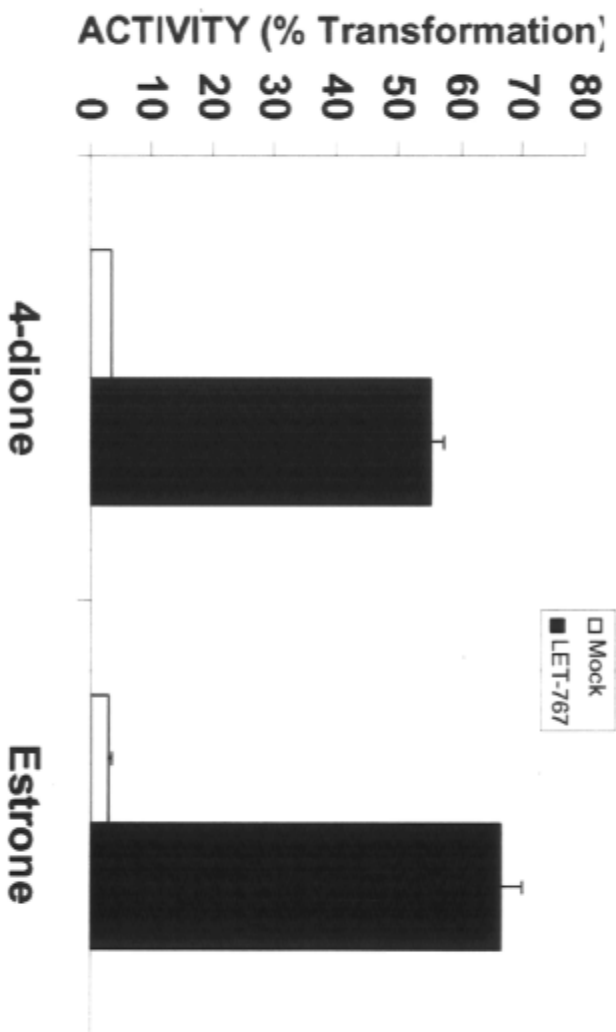


Figure 5

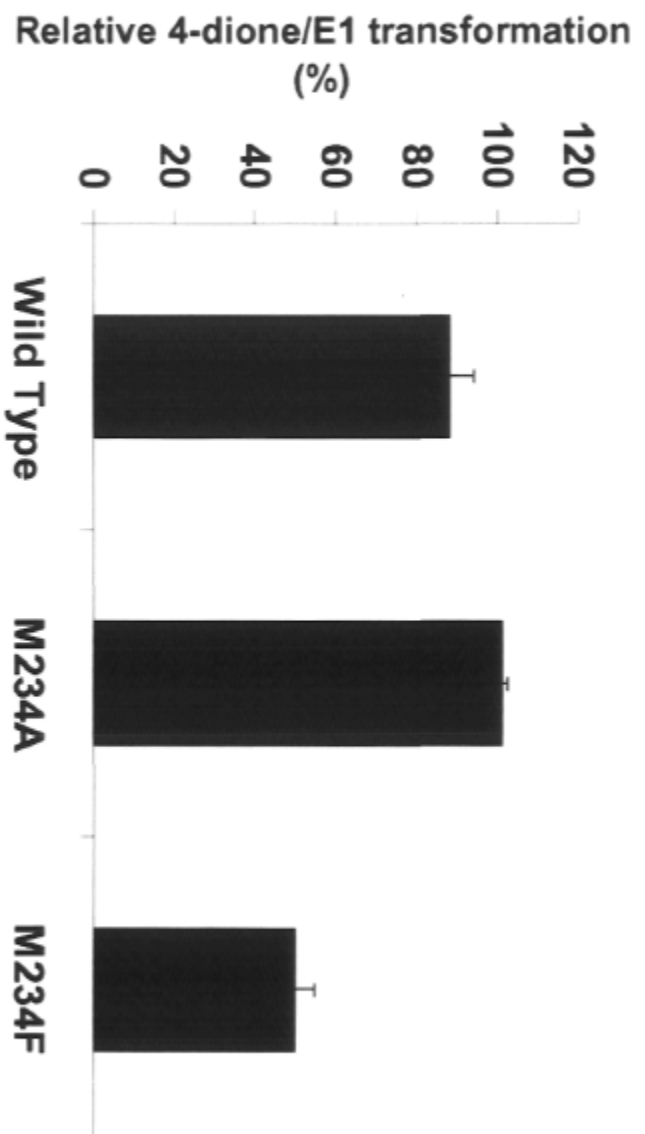
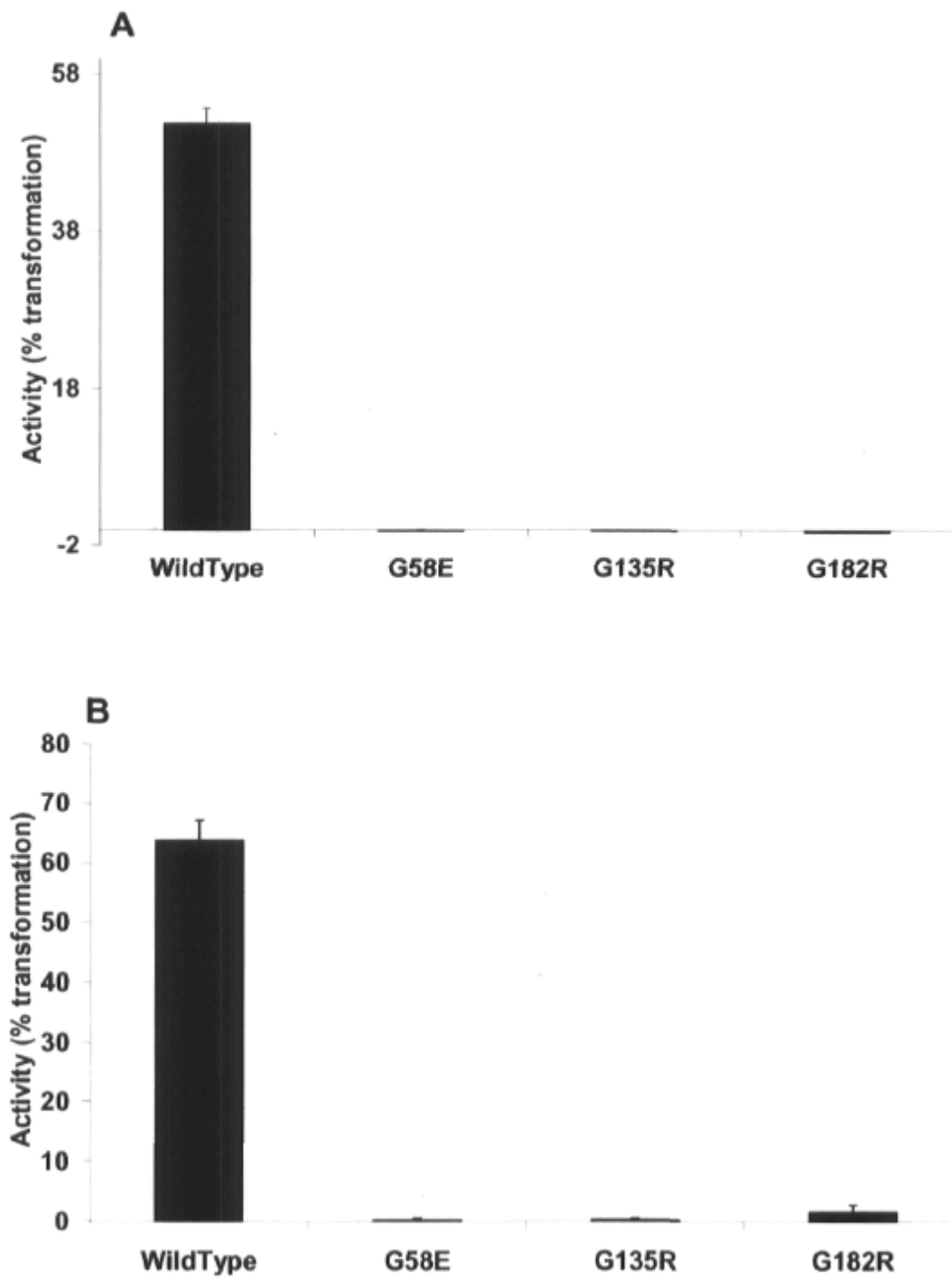


Figure 6



Partie D

Conclusion

Les travaux présentés confirment à la fois l'importance de l'encombrement stérique aux environs du site catalytique des 17 β -HSD ainsi que le degré de spécialisation moindre des enzymes de la stéroïdogénèse chez les rongeurs. Effectivement, alors que l'humain possède des protéines spécialisées dans la synthèse des androgènes et des estrogènes, on remarque que les homologues murins possèdent souvent une gamme de substrats plus large. Il apparaît donc que l'évolution vers le primate s'accompagne d'une spécificité accrue. Comme la souris est un modèle animal fréquemment employé en endocrinologie, cette étude rappelle aux chercheurs l'importance de tenir compte du fait que la stéroïdogénèse chez cet organisme n'est pas une copie conforme du processus métabolique humain. Alors que la 17 β -HSD de type 12 humaine est spécifique aux estrogènes, celle de souris peut également se charger de l'activation des androgènes.

De plus, les résultats du présent mémoire soulignent le rôle des études de structure-fonction dans la compréhension mécanistique des enzymes. Ce type d'expérience permet de comprendre comment les chemins métaboliques se sont articulés au cours de l'évolution en analysant des homologues chez des espèces distantes comme ce fut le cas pour *C. elegans*. La modélisation par homologie couplée à la détermination de nouvelles structures tridimensionnelles aideront à élucider de nouvelles régions clés chez les 17 β -HSD et ainsi obtenir une connaissance plus fine des sites de liaison aux cofacteurs ainsi que des sites actifs. Ultiment, ces données permettront de produire des inhibiteurs spécifiques aux 17 β -HSD, ce qui représente une avenue thérapeutique intéressante (Lukacik *et al.* 2006), et de prédire les fonctions d'enzymes de la stéroïdogénèse nouvellement caractérisées.

Bibliographie

- Adamski, J., T. Normand, et al. (1995). "Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV." *Biochem J* **311** (Pt 2): 437-43.
- Andersson, S., W. M. Geissler, et al. (1996). "Molecular genetics and pathophysiology of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency." *J Clin Endocrinol Metab* **81**(1): 130-6.
- Arensburg, J., A. H. Payne, et al. (1999). "Expression of steroidogenic genes in maternal and extraembryonic cells during early pregnancy in mice." *Endocrinology* **140**(11): 5220-32.
- Auchus, R. J., T. C. Lee, et al. (1998). "Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer." *J Biol Chem* **273**(6): 3158-65.
- Aziz, N., M. M. Maxwell, et al. (1993). "Downregulation of Ke 6, a novel gene encoded within the major histocompatibility complex, in murine polycystic kidney disease." *Mol Cell Biol* **13**(3): 1847-53.
- Baker, M. E. (1994). "Sequence analysis of steroid- and prostaglandin-metabolizing enzymes: application to understanding catalysis." *Steroids* **59**(4): 248-58.
- Baker, M. E. (1996). "Unusual evolution of 11beta- and 17beta-hydroxysteroid and retinol dehydrogenases." *Bioessays* **18**(1): 63-70.
- Baker, M. E. (2001). "Evolution of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases and their role in androgen, estrogen and retinoid action." *Mol Cell Endocrinol* **171**(1-2): 211-5.
- Baker, M. E. (2004). "Co-evolution of steroidogenic and steroid-inactivating enzymes and adrenal and sex steroid receptors." *Mol Cell Endocrinol* **215**(1-2): 55-62.
- Bayliss, W. M. and E. H. Starling (1899). "The movements and innervation of the small intestine." *J Physiol* **24**(2): 99-143.
- Bayliss, W. M. and E. H. Starling (1900). "The movements and the innervation of the large intestine." *J Physiol* **26**(1-2): 107-18.
- Bayliss, W. M. and E. H. Starling (1901). "The movements and innervation of the small intestine." *J Physiol* **26**(3-4): 125-38.
- Bayliss, W. M. and E. H. Starling (1902). "The mechanism of pancreatic secretion." *J Physiol* **28**(5): 325-53.
- Belanger, C., V. Luu-The, et al. (2002). "Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity." *Horm Metab Res* **34**(11-12): 737-45.
- Biswas, M. G. and D. W. Russell (1997). "Expression cloning and characterization of oxidative 17beta- and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases from rat and human prostate." *J Biol Chem* **272**(25): 15959-66.
- Boehmer, A. L., A. O. Brinkmann, et al. (1999). "17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency: diagnosis, phenotypic variability, population genetics, and worldwide distribution of ancient and de novo mutations." *J Clin Endocrinol Metab* **84**(12): 4713-21.
- Brereton, P., T. Suzuki, et al. (2001). "Pan1b (17betaHSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung." *Mol Cell Endocrinol* **171**(1-2): 111-7.

- Breton, R., D. Housset, et al. (1996). "The structure of a complex of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADP⁺ identifies two principal targets for the design of inhibitors." *Structure* **4**(8): 905-15.
- Brock, B. J. and M. R. Waterman (1999). "Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species." *Biochemistry* **38**(5): 1598-606.
- Burstein, S. and M. Gut (1976). "Intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone: kinetics and mechanism." *Steroids* **28**(1): 115-31.
- Carson-Jurica, M. A., W. T. Schrader, et al. (1990). "Steroid receptor family: structure and functions." *Endocr Rev* **11**(2): 201-20.
- Casey, M. L., P. C. MacDonald, et al. (1994). "17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progestin regulation of gene expression in human endometrium." *J Clin Invest* **94**(5): 2135-41.
- Chai, Z., P. Brereton, et al. (2003). "17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells." *Endocrinology* **144**(5): 2084-91.
- Chen, S. A., M. J. Besman, et al. (1988). "Human aromatase: cDNA cloning, Southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15." *DNA* **7**(1): 27-38.
- Chung, B. C., K. J. Matteson, et al. (1986). "Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(23): 8962-6.
- Chung, B. C., J. Picado-Leonard, et al. (1987). "Cytochrome P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(2): 407-11.
- Clarke, T. R., P. A. Bain, et al. (1993). "Enzyme characteristics of two distinct forms of mouse 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase complementary deoxyribonucleic acids expressed in COS-1 cells." *Endocrinology* **132**(5): 1971-6.
- Deslypere, J. P., M. Young, et al. (1992). "Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene." *Mol Cell Endocrinol* **88**(1-3): 15-22.
- Duan, W. R., D. I. Linzer, et al. (1996). "Cloning and characterization of an ovarian-specific protein that associates with the short form of the prolactin receptor." *J Biol Chem* **271**(26): 15602-7.
- Dufort, I., P. Rheault, et al. (1999). "Characteristics of a highly labile human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase." *Endocrinology* **140**(2): 568-74.
- Dumont, M., V. Luu-The, et al. (1992). "Expression of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in mammalian cells." *J Steroid Biochem Mol Biol* **41**(3-8): 605-8.
- Endoh, A., S. B. Kristiansen, et al. (1996). "The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase." *J Clin Endocrinol Metab* **81**(10): 3558-65.
- Evans, C. T., D. B. Ledesma, et al. (1986). "Isolation and characterization of a complementary DNA specific for human aromatase-system cytochrome P-450 mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(17): 6387-91.
- Fan, Y. S., R. Sasi, et al. (1992). "Localization of the human CYP17 gene (cytochrome P450(17 alpha)) to 10q24.3 by fluorescence in situ hybridization and simultaneous chromosome banding." *Genomics* **14**(4): 1110-1.

- Fevold, H. R., M. C. Lorence, et al. (1989). "Rat P450(17 alpha) from testis: characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both delta 4- and delta 5-steroid-17,20-lyase reactions." Mol Endocrinol **3**(6): 968-75.
- Finn, C. A. and L. Martin (1974). "The control of implantation." J Reprod Fertil **39**(1): 195-206.
- Fomitcheva, J., M. E. Baker, et al. (1998). "Characterization of Ke 6, a new 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and its expression in gonadal tissues." J Biol Chem **273**(35): 22664-71.
- Geissler, W. M., D. L. Davis, et al. (1994). "Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3." Nat Genet **7**(1): 34-9.
- Ghosh, D., V. Z. Pletnev, et al. (1995). "Structure of human estrogenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase at 2.20 A resolution." Structure **3**(5): 503-13.
- Ghosh, D. and P. Vihko (2001). "Molecular mechanisms of estrogen recognition and 17-keto reduction by human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1." Chem Biol Interact **130-132**(1-3): 637-50.
- Ghosh, D., Z. Wawrzak, et al. (1994). "The refined three-dimensional structure of 3 alpha,20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and possible roles of the residues conserved in short-chain dehydrogenases." Structure **2**(7): 629-40.
- Ghosh, D., C. M. Weeks, et al. (1991). "Three-dimensional structure of holo 3 alpha,20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a member of a short-chain dehydrogenase family." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10064-8.
- Graef, V. and M. Fuchs (1975). "[Studies on the complete enzymatic hydrolysis of steroid conjugates in urine (author's transl)]." Z Klin Chem Klin Biochem **13**(4): 163-7.
- Graham-Lorence, S., M. W. Khalil, et al. (1991). "Structure-function relationships of human aromatase cytochrome P-450 using molecular modeling and site-directed mutagenesis." J Biol Chem **266**(18): 11939-46.
- Guillemette, C. (2003). "Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes." Pharmacogenomics J **3**(3): 136-58.
- Haeseleer, F. and K. Palczewski (2000). "Short-chain dehydrogenases/reductases in retina." Methods Enzymol **316**: 372-83.
- Halkerston, I. D. and S. R. Stitch (1956). "The enzymic hydrolysis of steroid conjugates. 2. Hydrolysis of steroid conjugates in urine." Biochem J **63**(4): 710-5.
- He, X. Y., G. Merz, et al. (1999). "Human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase is a single-domain multifunctional enzyme. Characterization of a novel 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase." J Biol Chem **274**(21): 15014-9.
- He, X. Y., G. Merz, et al. (2000). "Function of human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase in androgen metabolism." Biochim Biophys Acta **1484**(2-3): 267-77.
- He, X. Y., H. Schulz, et al. (1998). "A human brain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase is identical to an amyloid beta-peptide-binding protein involved in Alzheimer's disease." J Biol Chem **273**(17): 10741-6.
- Henderson, J. (2005). "Ernest Starling and 'Hormones': an historical commentary." J Endocrinol **184**(1): 5-10.

- Higashi, Y., H. Yoshioka, et al. (1986). "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 **83**(9): 2841-5.
- Hu, M. C., N. C. Hsu, et al. (2002). "Steroid deficiency syndromes in mice with targeted disruption of *Cyp11a1*." Mol Endocrinol **16**(8): 1943-50.
- Hyatt, P. J., J. B. Bell, et al. (1983a). "Preparation and steroidogenic properties of purified zona fasciculata and zona reticularis cells from the guinea-pig adrenal gland." J Endocrinol **96**(1): 1-14.
- Hyatt, P. J., K. Bhatt, et al. (1983b). "Steroid biosynthesis by zona fasciculata and zona reticularis cells purified from the mammalian adrenal cortex." J Steroid Biochem **19**(1C): 953-9.
- Hyndman, D., D. R. Bauman, et al. (2003). "The aldo-keto reductase superfamily homepage." Chem Biol Interact **143-144**: 621-31.
- Ishimura, K. and H. Fujita (1997). "Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes." Microsc Res Tech **36**(6): 445-53.
- Janssen, J. M., R. Bland, et al. (1999). "Estradiol formation by human osteoblasts via multiple pathways: relation with osteoblast function." J Cell Biochem **75**(3): 528-37.
- Jez, J. M., T. G. Flynn, et al. (1997a). "A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily." Biochem Pharmacol **54**(6): 639-47.
- Jez, J. M., T. G. Flynn, et al. (1997b). "A nomenclature system for the aldo-keto reductase superfamily." Adv Exp Med Biol **414**: 579-600.
- Jin, Y. and T. M. Penning (2001). "Steroid 5 α -reductases and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **15**(1): 79-94.
- Jornvall, H., B. Persson, et al. (1995). "Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR)." Biochemistry **34**(18): 6003-13.
- Kagimoto, K., M. R. Waterman, et al. (1989). "Identification of a common molecular basis for combined 17 α -hydroxylase/17,20-lyase deficiency in two Mennonite families." Hum Genet **82**(3): 285-6.
- Kallberg, Y., U. Oppermann, et al. (2002). "Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs)." Eur J Biochem **269**(18): 4409-17.
- Katagiri, M., N. Kagawa, et al. (1995). "The role of cytochrome b5 in the biosynthesis of androgens by human P450c17." Arch Biochem Biophys **317**(2): 343-7.
- Khanna, M., K. N. Qin, et al. (1995). "Substrate specificity, gene structure, and tissue-specific distribution of multiple human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases." J Biol Chem **270**(34): 20162-8.
- Kikuti, Y. Y., G. Tamiya, et al. (1997). "Physical mapping 220 kb centromeric of the human MHC and DNA sequence analysis of the 43-kb segment including the *RING1*, *HKE6*, and *HKE4* genes." Genomics **42**(3): 422-35.
- Krazeisen, A., R. Breitling, et al. (1999). "Determination of cDNA, gene structure and chromosomal localization of the novel human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 7(1)." FEBS Lett **460**(2): 373-9.
- Labrie, F. (1991). "Intracrinology." Mol Cell Endocrinol **78**(3): C113-8.
- Labrie, F., V. Luu-The, et al. (2005). "Is dehydroepiandrosterone a hormone?" J Endocrinol **187**(2): 169-96.

- Labrie, F., V. Luu-The, et al. (2003). "Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone." *Endocr Rev* **24**(2): 152-82.
- Labrie, F., V. Luu-The, et al. (2000). "Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease." *J Mol Endocrinol* **25**(1): 1-16.
- Lachance, Y., V. Luu-The, et al. (1990). "Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells." *J Biol Chem* **265**(33): 20469-75.
- Lachance, Y., V. Luu-The, et al. (1991). "Structure of the human type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD) gene: adrenal and gonadal specificity." *DNA Cell Biol* **10**(10): 701-11.
- Landers, J. P. and T. C. Spelsberg (1992). "New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **2**(1): 19-63.
- Laudet, V. (1997). "Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor." *J Mol Endocrinol* **19**(3): 207-26.
- Leenders, F., V. Dolez, et al. (1998). "Structure of the gene for the human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type IV." *Mamm Genome* **9**(12): 1036-41.
- Lewis, M. J., J. P. Wiebe, et al. (2004). "Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma." *BMC Cancer* **4**: 27.
- Lewis, E. F. (1965). "Castration in the treatment of advanced breast cancer." *Cancer* **18**(12): 1558-62.
- Lifton, R. P., R. G. Dluhy, et al. (1992). "A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension." *Nature* **355**(6357): 262-5.
- Lin, D., S. M. Black, et al. (1993). "Steroid 17 alpha-hydroxylase and 17,20-lyase activities of P450c17: contributions of serine106 and P450 reductase." *Endocrinology* **132**(6): 2498-506.
- Lin, D., J. A. Harikrishna, et al. (1991). "Missense mutation serine106----proline causes 17 alpha-hydroxylase deficiency." *J Biol Chem* **266**(24): 15992-8.
- Lin, D., L. H. Zhang, et al. (1994). "Modeling and mutagenesis of the active site of human P450c17." *Mol Endocrinol* **8**(3): 392-402.
- Lin, S. X., F. Yang, et al. (1992). "Subunit identity of the dimeric 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from human placenta." *J Biol Chem* **267**(23): 16182-7.
- Lin, S. X., D. W. Zhu, et al. (1996). "Studies on the three-dimensional structure of estrogenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase." *J Endocrinol* **150 Suppl**: S13-20.
- Lin, T. M. and C. Chang (1997). "Cloning and characterization of TDD5, an androgen target gene that is differentially repressed by testosterone and dihydrotestosterone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 4988-93.
- Liu, H., A. Robert, et al. (2005). "Cloning and characterization of human form 2 type 7 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, a primarily 3beta-keto reductase and estrogen activating and androgen inactivating enzyme." *J Steroid Biochem Mol Biol* **94**(1-3): 173-9.

- Liu, S., C. Huang, et al. (2007). "Molecular cloning and expression analysis of a new gene for short-chain dehydrogenase/reductase 9." *Acta Biochim Pol* **54**(1): 213-8.
- Lovering, A. L., J. P. Ride, et al. (2004). "Crystal structures of prostaglandin D(2) 11-ketoreductase (AKR1C3) in complex with the nonsteroidal anti-inflammatory drugs flufenamic acid and indomethacin." *Cancer Res* **64**(5): 1802-10.
- Lukacik, P., K. L. Kavanagh, et al. (2006). "Structure and function of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases." *Mol Cell Endocrinol* **248**(1-2): 61-71.
- Lukacik, P., B. Keller, et al. (2007). "Structural and biochemical characterization of human orphan DHRS10 reveals a novel cytosolic enzyme with steroid dehydrogenase activity." *Biochem J* **402**(3): 419-27.
- Luo, X., Y. Ikeda, et al. (1994). "A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation." *Cell* **77**(4): 481-90.
- Luu-The, V. (2001). "Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase." *J Steroid Biochem Mol Biol* **76**(1-5): 143-51.
- Luu-The, V., G. Pelletier, et al. (2005). "Quantitative appreciation of steroidogenic gene expression in mouse tissues: new roles for type 2 5alpha-reductase, 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase and estrogen sulfotransferase." *J Steroid Biochem Mol Biol* **93**(2-5): 269-76.
- Luu-The, V., M. Takahashi, et al. (1991). "Evidence for distinct dehydrogenase and isomerase sites within a single 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase protein." *Biochemistry* **30**(36): 8861-5.
- Luu-The, V., P. Tremblay, et al. (2006). "Characterization of type 12 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 3 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women." *Mol Endocrinol* **20**(2): 437-43.
- Luu The, V., C. Labrie, et al. (1989a). "Characterization of cDNAs for human estradiol 17 beta-dehydrogenase and assignment of the gene to chromosome 17: evidence of two mRNA species with distinct 5'-termini in human placenta." *Mol Endocrinol* **3**(8): 1301-9.
- Luu The, V., Y. Lachance, et al. (1989b). "Full length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human 3 beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase." *Mol Endocrinol* **3**(8): 1310-2.
- Marijanovic, Z., D. Laubner, et al. (2003). "Closing the gap: identification of human 3-ketosteroid reductase, the last unknown enzyme of mammalian cholesterol biosynthesis." *Mol Endocrinol* **17**(9): 1715-25.
- Martel, C., E. Rheaume, et al. (1992). "Distribution of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and activity in rat and human tissues." *J Steroid Biochem Mol Biol* **41**(3-8): 597-603.
- Matteson, K. J., J. Picado-Leonard, et al. (1986). "Assignment of the gene for adrenal P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase) to human chromosome 10." *J Clin Endocrinol Metab* **63**(3): 789-91.
- McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002). "Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators." *Cell* **108**(4): 465-74.
- Mendelson, C. R., E. E. Wright, et al. (1985). "Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against human aromatase cytochrome P-450 (P-450AROM), and their use in its purification." *Arch Biochem Biophys* **243**(2): 480-91.

- Mindnich, R., G. Moller, et al. (2004). "The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases." *Mol Cell Endocrinol* **218**(1-2): 7-20.
- Moisan, A. M., M. L. Ricketts, et al. (1999). "New insight into the molecular basis of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: identification of eight mutations in the HSD3B2 gene eleven patients from seven new families and comparison of the functional properties of twenty-five mutant enzymes." *J Clin Endocrinol Metab* **84**(12): 4410-25.
- Moller, G., E. G. van Grunsven, et al. (2001). "Molecular basis of D-bifunctional protein deficiency." *Mol Cell Endocrinol* **171**(1-2): 61-70.
- Moon, Y. A. and J. D. Horton (2003). "Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade." *J Biol Chem* **278**(9): 7335-43.
- Morohashi, K., Y. Fujii-Kuriyama, et al. (1984). "Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for mRNA of mitochondrial cytochrome P-450(SCC) of bovine adrenal cortex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(15): 4647-51.
- Morohashi, K., K. Sogawa, et al. (1987). "Gene structure of human cytochrome P-450(SCC), cholesterol desmolase." *J Biochem (Tokyo)* **101**(4): 879-87.
- Motojima, K. (2004). "17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 11 is a major peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene in mouse intestine." *Eur J Biochem* **271**(20): 4141-6.
- Nakajin, S. and P. F. Hall (1981a). "Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis. Purification and properties of A C21 steroid side-chain cleavage system (17 alpha-hydroxylase-C17,20 lyase)." *J Biol Chem* **256**(8): 3871-6.
- Nakajin, S., J. E. Shively, et al. (1981b). "Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis: two enzymatic activities (17 alpha-hydroxylase and c17,20-lyase) associated with one protein." *Biochemistry* **20**(14): 4037-42.
- Napoli, J. L. (2001). "17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 9 and other short-chain dehydrogenases/reductases that catalyze retinoid, 17beta- and 3alpha-hydroxysteroid metabolism." *Mol Cell Endocrinol* **171**(1-2): 103-9.
- Nelson, D. R., L. Koymans, et al. (1996). "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." *Pharmacogenetics* **6**(1): 1-42.
- Nokelainen, P., H. Peltoketo, et al. (1998). "Expression cloning of a novel estrogenic mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase (m17HSD7), previously described as a prolactin receptor-associated protein (PRAP) in rat." *Mol Endocrinol* **12**(7): 1048-59.
- Nokelainen, P., T. Puranen, et al. (1996). "Molecular cloning of mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and characterization of enzyme activity." *Eur J Biochem* **236**(2): 482-90.
- Nussey, S. and S. A. Whitehead (2001). *Endocrinology : an integrated approach*. Oxford, UK, Bios.
- Ogishima, T., H. Shibata, et al. (1991). "Aldosterone synthase cytochrome P-450 expressed in the adrenals of patients with primary aldosteronism." *J Biol Chem* **266**(17): 10731-4.
- Oonk, R. B., J. S. Krasnow, et al. (1989). "Cyclic AMP-dependent and -independent regulation of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 (P-450_{sc}) in rat ovarian granulosa cells and corpora lutea. cDNA and deduced amino acid sequence of rat P-450_{sc}." *J Biol Chem* **264**(36): 21934-42.

- Orentreich, N., J. L. Brind, et al. (1984). "Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood." J Clin Endocrinol Metab **59**(3): 551-5.
- Parker, K. L., D. D. Chaplin, et al. (1985). "Expression of murine 21-hydroxylase in mouse adrenal glands and in transfected Y1 adrenocortical tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(23): 7860-4.
- Payne, A. H., I. G. Abbazade, et al. (1997). "The multiple murine 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms: structure, function, and tissue- and developmentally specific expression." Steroids **62**(1): 169-75.
- Payne, A. H. and D. B. Hales (2004). "Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones." Endocr Rev **25**(6): 947-70.
- Pelletier, G., V. Luu-The, et al. (2001). "Immunoelectron microscopic localization of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human prostate and mammary gland." J Mol Endocrinol **26**(1): 11-9.
- Peltoketo, H., V. Isomaa, et al. (1988). "Complete amino acid sequence of human placental 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA." FEBS Lett **239**(1): 73-7.
- Peltoketo, H., V. Luu-The, et al. (1999). "17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes." J Mol Endocrinol **23**(1): 1-11.
- Penning, T. M. (1997). "Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases." Endocr Rev **18**(3): 281-305.
- Penning, T. M., M. E. Burczynski, et al. (2001). "Structure-function aspects and inhibitor design of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3)." Mol Cell Endocrinol **171**(1-2): 137-49.
- Picado-Leonard, J. and W. L. Miller (1987). "Cloning and sequence of the human gene for P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase): similarity with the gene for P450c21." DNA **6**(5): 439-48.
- Pittaway, D. E., R. N. Andersen, et al. (1983). "Human ovarian 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase activity: a comparison of normal and polycystic ovarian tissues." J Clin Endocrinol Metab **56**(4): 715-9.
- Pletnev, V. Z. and W. L. Duax (2005). "Rational proteomics IV: modeling the primary function of the mammalian 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 8." J Steroid Biochem Mol Biol **94**(4): 327-35.
- Privalle, C. T., J. F. Crivello, et al. (1983). "Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(3): 702-6.
- Puranen, T. J., R. M. Kurkela, et al. (1999). "Characterization of molecular and catalytic properties of intact and truncated human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzymes: intracellular localization of the wild-type enzyme in the endoplasmic reticulum." Endocrinology **140**(7): 3334-41.
- Qiu, W., M. Zhou, et al. (2004). "Crystal structures of the multispecific 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5: critical androgen regulation in human peripheral tissues." Mol Endocrinol **18**(7): 1798-807.
- Reed, M. J., A. Purohit, et al. (2005). "Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition." Endocr Rev **26**(2): 171-202.

- Rheaume, E., Y. Lachance, et al. (1991). "Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads." Mol Endocrinol **5**(8): 1147-57.
- Rodrigues, N. R., I. Dunham, et al. (1987). "Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia." Embo J **6**(6): 1653-61.
- Russell, D. W. and J. D. Wilson (1994). "Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes." Annu Rev Biochem **63**: 25-61.
- Shikita, M. and P. F. Hall (1973). "Cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria: an enzyme for the side chain cleavage of cholesterol. II. Subunit structure." J Biol Chem **248**(16): 5605-9.
- Simard, J., F. Durocher, et al. (1996). "Molecular biology and genetics of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family." J Endocrinol **150 Suppl**: S189-207.
- Simard, J., A. M. Moisan, et al. (2002). "Congenital adrenal hyperplasia due to 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta(5)-Delta(4) isomerase deficiency." Semin Reprod Med **20**(3): 255-76.
- Simpson, E. R., M. S. Mahendroo, et al. (1994). "Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis." Endocr Rev **15**(3): 342-55.
- Soucy, P. and V. Luu-The (2000). "Conversion of pregnenolone to DHEA by human 17alpha-hydroxylase/17, 20-lyase (P450c17). Evidence that DHEA is produced from the released intermediate, 17alpha-hydroxypregnenolone." Eur J Biochem **267**(11): 3243-7.
- Su, J., M. Lin, et al. (1999). "Complementary deoxyribonucleic acid cloning and enzymatic characterization of a novel 17beta/3alpha-hydroxysteroid/retinoid short chain dehydrogenase/reductase." Endocrinology **140**(11): 5275-84.
- Suzuki, T., A. D. Darnel, et al. (2001). "5alpha-reductases in human breast carcinoma: possible modulator of in situ androgenic actions." J Clin Endocrinol Metab **86**(5): 2250-7.
- Swart, P., A. C. Swart, et al. (1993). "Progesterone 16 alpha-hydroxylase activity is catalyzed by human cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase." J Clin Endocrinol Metab **77**(1): 98-102.
- Thomas, J. L., W. L. Duax, et al. (2003). "Structure/function relationships responsible for coenzyme specificity and the isomerase activity of human type 1 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase." J Biol Chem **278**(37): 35483-90.
- Thomas, J. L., C. Frieden, et al. (1995). "An NADH-induced conformational change that mediates the sequential 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase activities is supported by affinity labeling and the time-dependent activation of isomerase." J Biol Chem **270**(36): 21003-8.
- Thomas, J. L., R. P. Myers, et al. (1989). "Human placental 3 beta-hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid 5----4-ene-isomerase: purification from mitochondria and kinetic profiles, biophysical characterization of the purified mitochondrial and microsomal enzymes." J Steroid Biochem **33**(2): 209-17.
- Torn, S., P. Nokelainen, et al. (2003). "Production, purification, and functional analysis of recombinant human and mouse 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7." Biochem Biophys Res Commun **305**(1): 37-45.

- Vandenheuevel, F. A. (1967). "Complete hydrolysis of steroid conjugates and quantitative extraction of free steroids from urine." *Can J Biochem* **45**(2): 191-202.
- Watanuki, M., G. A. Granger, et al. (1978). "Cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria. Immunochemical properties and purity." *J Biol Chem* **253**(9): 2927-31.
- White, P. C., K. M. Curnow, et al. (1994). "Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes." *Endocr Rev* **15**(4): 421-38.
- White, P. C., M. I. New, et al. (1986). "Structure of human steroid 21-hydroxylase genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(14): 5111-5.
- White, P. C. and P. W. Speiser (2000). "Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency." *Endocr Rev* **21**(3): 245-91.
- Wilson, J. D. (1999). "The role of androgens in male gender role behavior." *Endocr Rev* **20**(5): 726-37.
- Wilson, J. D., J. E. Griffin, et al. (1993). "Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency." *Endocr Rev* **14**(5): 577-93.
- Wise, P. M. (2002). "Estrogens and neuroprotection." *Trends Endocrinol Metab* **13**(6): 229-30.
- Woods, M. N., S. L. Gorbach, et al. (1989). "Low-fat, high-fiber diet and serum estrone sulfate in premenopausal women." *Am J Clin Nutr* **49**(6): 1179-83.
- Wu, L., M. Einstein, et al. (1993). "Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity." *J Biol Chem* **268**(17): 12964-9.
- Yan, S. D., J. Fu, et al. (1997). "An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease." *Nature* **389**(6652): 689-95.
- Yan, S. D., Y. Shi, et al. (1999). "Role of ERAB/L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase type II activity in Abeta-induced cytotoxicity." *J Biol Chem* **274**(4): 2145-56.
- Youngblood, G. L. and A. H. Payne (1992). "Isolation and characterization of the mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20-lyase gene (Cyp17): transcriptional regulation of the gene by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in MA-10 Leydig cells." *Mol Endocrinol* **6**(6): 927-34.
- Youngblood, G. L., C. Sartorius, et al. (1991). "Isolation, characterization, and chromosomal mapping of mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase." *Genomics* **10**(1): 270-5.
- Zuber, M. X., E. R. Simpson, et al. (1986). "Expression of bovine 17 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells." *Science* **234**(4781): 1258-61.