

**COMUNICACIÓN BREVE**

MEDICINA (Buenos Aires) 2013; 73: 297-302

**NUEVA MUTACIÓN HETEROCIGOTA EN EL GEN DE LA PROTEÍNA REGULATORIA AGUDA DE LA ESTEROIDEOGÉNESIS (StAR) EN UN PACIENTE 46,XY CON HIPERPLASIA ADRENAL CONGÉNITA LIPOIDEA****MARÍA SONIA BAQUEDANO, GABRIELA GUERCIO, ROXANA MARINO, ESPERANZA BERENSHTEIN, MARIANA COSTANZO, PABLO RAMÍREZ, MARCELA BAILEZ, ELISA VAIANI, MERCEDES MACEIRAS, MARCO A. RIVAROLA, ALICIA BELGOROSKY***Servicio de Endocrinología, Hospital Nacional de Pediatría Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina*

**Resumen** StAR forma parte del complejo multiproteico transduceosoma, encargado del transporte de colesterol y que facilita su entrada a la mitocondria. Mutaciones recesivas en el gen *STAR* causan formas clásicas y no clásicas de hiperplasia adrenal congénita lipoidea. Analizamos las consecuencias moleculares de una nueva mutación heterocigota en *STAR* en un paciente 46,XY con genitales ambiguos e insuficiencia adrenal. Hallamos un cambio heterocigota *de novo*, IVS1-2A>G, en el gen *STAR* y el polimorfismo heterocigota, pG146A, en *SF1*. No se detectaron mutaciones en los genes *CYP11A1*, *FDX1* y *FDXR*, *VDAC1* y *TSPO*. Por RT-PCR y secuenciación se observó un transcrito-exón2 y el transcrito normal (WT) de StAR, a partir del ARN de tejido gonadal del paciente. Se detectó el precursor (37 kD) y la proteína StAR madura (30 kD) en células COS-7 transfectadas con el plásmido mutante y WT. Por inmunofluorescencia la observación de co-localización de la proteína mutante (p.G22\_L59delStAR) en mitocondrias fue casi nula. La actividad de p.G22\_L59delStAR fue del  $65\% \pm 13$  respecto del WT. La co-transfección de los plásmidos p.G22\_L59delStAR y WT redujo la actividad de WT en  $62.0 \pm 13.9\%$ . La mutación IVS1-2A>G provocó la pérdida de los aminoácidos 22 a 59 en la secuencia mitocondrial N-terminal. Postulamos que ello conduciría a un plegamiento anormal de la proteína que alteraría su procesamiento y translocación. La proteína mutante p.G22\_L59delStAR podría interferir con la acción de la proteína StAR WT bloqueando el complejo transduceosoma y causando una forma dominante de deficiencia de StAR, que explicaría el fenotipo clínico en heterocigosis.

**Palabras clave:** deficiencia de StAR, efecto dominante negativo, hiperplasia adrenal congénita lipoidea

**Abstract** *Novel heterozygous mutation in the steroidogenic acute regulatory protein gene in a 46,XY patient with congenital lipid adrenal hyperplasia.* StAR facilitates cholesterol entry into the mitochondria as part of the transduceosome complex. Recessive mutations in the gen *STAR* cause classic and nonclassic congenital lipid adrenal hyperplasia. The aim of the study was to analyze the molecular consequences of a novel heterozygous *STAR* mutation in a 46,XY patient with ambiguous genitalia and adrenal insufficiency. We found a *de novo* heterozygous IVS-2A>G *STAR* mutation and the reported heterozygous p.G146A *SF1* polymorphism with normal *CYP11A1*, *FDXR*, *FDX1*, *VDAC1* and *TSPO* genes. RT-PCR and sequencing from patient's testicular RNA showed a -exon2 transcript and the wild-type (WT) transcript. Both 37 kDa precursor and 30 kDa mature protein were detected in COS-7 cell transfected with mutant and WT plasmids. Immunofluorescence showed almost no co-localization of mitochondria and mutant protein (delta22-59StAR). Delta22-59StAR activity was  $65 \pm 13\%$  of WT. Cotransfection with WT and delta22-59StAR plasmids reduced WT activity by  $62.0\% \pm 13.9$ . Novel splice-junction heterozygous *STAR* mutation (IVS-2A>G) resulted in the in-frame loss of amino acids 22 to 59 in the N-terminal mitochondrial targeting signal. A misfolded p.G22\_L59delStAR might interfere with WT StAR activity by blocking the transduceosome complex, causing an autosomal dominant form of StAR deficiency, explaining the clinical phenotype.

**Key words:** StAR deficiency, dominant negative effect, congenital lipid adrenal hyperplasia

Recibido: 21-I-2013

Aceptado: 27-III-2013

**Dirección postal:** Dra. Alicia Belgorosky, Servicio de Endocrinología, Hospital Nacional de Pediatría Juan P. Garrahan, Combate de los Pozos 1881, 1245 Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11) 4308-5325

e-mail: [abelgo@netizen.com.ar](mailto:abelgo@netizen.com.ar)

\*Este trabajo fue distinguido con el Premio Cossio en la Reunión Anual de la SAIC (Sociedad Argentina de Investigación Clínica) en Mar del Plata, noviembre de 2012

La proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR) facilita el transporte de colesterol desde la membrana mitocondrial externa (MME) hacia la membrana mitocondrial interna, siendo el paso limitante en la biosíntesis de hormonas esteroideas<sup>1</sup>. La conversión mitocondrial de colesterol a pregnenolona es catalizada por la enzima P450<sub>sc</sub> (*CYP11A1*) y el sistema de transporte de electrones formado por la adrenoxina reductasa (*FDXR*) y la adrenoxina (*FDX1*).

La proteína StAR se sintetiza como una pre-proteína citoplasmática de 37 kD (285 aminoácidos) que contiene un péptido de señalización mitocondrial N-terminal de 62 aminoácidos que es clivado durante o luego de la traslocación a la mitocondria para dar la proteína madura intramitocondrial estable de 30 kD. El mecanismo de acción y el proceso de traslocación de StAR no están totalmente esclarecidos. La evidencia indica que StAR interacciona con otras proteínas formando parte de un gran complejo multiproteico, denominado transduceosoma, encargado del transporte de colesterol<sup>2</sup>. En este complejo, la preproteína en la MME es la forma activa y la fosforilación y traslocación intramitocondrial resultan críticos para aumentar la actividad esteroidogénica<sup>3-5</sup>.

Las mutaciones recesivas en el gen *STAR* son la causa más frecuente de Hiperplasia Adrenal Congénita Lipoidea (HACL) clásica y no clásica<sup>6-8</sup>. Las formas clásicas se caracterizan por presentar insuficiencia adrenal primaria neonatal y genitales externos femeninos independientemente del sexo genético. Los individuos afectados con la forma no clásica de HACL presentan insuficiencia adrenal tardía con desórdenes más leves de la diferenciación sexual. Las alteraciones moleculares del gen *STAR*, descritas en asociación con HACL, han contribuido al conocimiento de la relevancia de esta enzima para la esteroidogénesis adrenal y gonadal y para la diferenciación sexual masculina.

En este estudio evaluamos las consecuencias moleculares de una nueva mutación de *splicing* heterocigota en el gen *STAR* que provoca la disrupción del péptido de señalización mitocondrial. La misma fue hallada en un paciente 46,XY con genitales ambiguos, insuficiencia adrenal primaria y grave alteración de la esteroidogénesis adrenal y gonadal, características de HACL.

## Paciente

Infante nacido a término con cariotipo XY, primer hijo de padres no consanguíneos. Fue hospitalizado en el período neonatal por un cuadro de crisis adrenal con deshidratación, hipotonía, vómitos, succión débil, hipotermia, hipoglicemia, hiponatremia e hipercalemia, hiperpigmentación y pérdida de peso. Presentaba genitales ambiguos con muy escasa virilización, con un falo de 0.5 × 0.5 cm con hipospadia penoescrotal, labios completamente fusionados y gónadas palpables bilaterales. El perfil hormonal mostró niveles indetectables de sulfato de deidroepiandrosterona,

androstenediona, 17 OH-progesterona, testosterona, cortisol y aldosterona, con niveles de esteroideos que permanecían bajos luego del estímulo con hCG, altos niveles de ACTH y actividad de renina plasmática, compatible con una grave alteración de la esteroidogénesis adrenal y gonadal. A los 3 meses de edad, la respuesta gonadotrófica a GnRH (100 µg iv) fue compatible con una minipubertad normal. La ecografía abdominal mostró áreas adrenales normales y la genitografía mostró ausencia de restos mulerianos. Se le asignó sexo femenino y fue gonadectomizado a los 3 años de edad. El análisis histológico mostró testículos bilaterales inmaduros normales.

## Análisis genético

Se extrajo ADN genómico del paciente, su familia y 50 controles normales a partir de leucocitos de sangre periférica. El estudio fue aprobado por el comité de Docencia e Investigación del Hospital Garrahan. Se amplificaron y secuenciaron los exones y las regiones intrónicas flanqueantes de los genes *STAR*, *CYP11A1*, *NR5A1* (Factor esteroidogénico 1, SF-1), *FDX1*, *FDXR*, el gen del canal de aniones dependiente de voltaje 1 (*VDAC1*) y el gen de la proteína translocadora (*TSPO*).

## Análisis de ARN

Se aisló ARN total a partir de tejido gonadal del paciente utilizando *TRIZOL* (Invitrogen, Buenos Aires). Por RT-PCR se amplificó y se secuenció la región correspondiente a los exones 1 a 5 y a toda la región codificante del gen *STAR* y se analizaron los productos de *splicing* generados. Se utilizó como control un *pool* de ADN complementario (ADNc) preparado a partir de tejido testicular humano prepupal.

## Estudios funcionales

Se construyó un plásmido conteniendo el ADNc de StAR completo, proveniente del tejido testicular del paciente. Los estudios funcionales *in vitro* se realizaron en células COS-7 no esteroidogénicas transfectadas con el plásmido mutante y con un plásmido conteniendo el cADN salvaje (WT)<sup>9</sup>. Se confirmó la expresión y traducción de la proteína StAR WT y mutante mediante *Western Blot* utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti StAR humana. Para evaluar la localización intracelular de la proteína StAR WT y mutante se realizaron estudios de doble marcación inmunofluorescente con *Mito tracker Red* (un marcador específico de mitocondria). La actividad enzimática de StAR se midió como la producción de pregnenolona en células COS-7 co-transfectadas con el plásmido WT y/o mutante y un plásmido F2 que expresa una proteína de fusión P450<sub>sc</sub>/adrenoxina/adrenoxina reductasa<sup>10</sup>. La concentración de

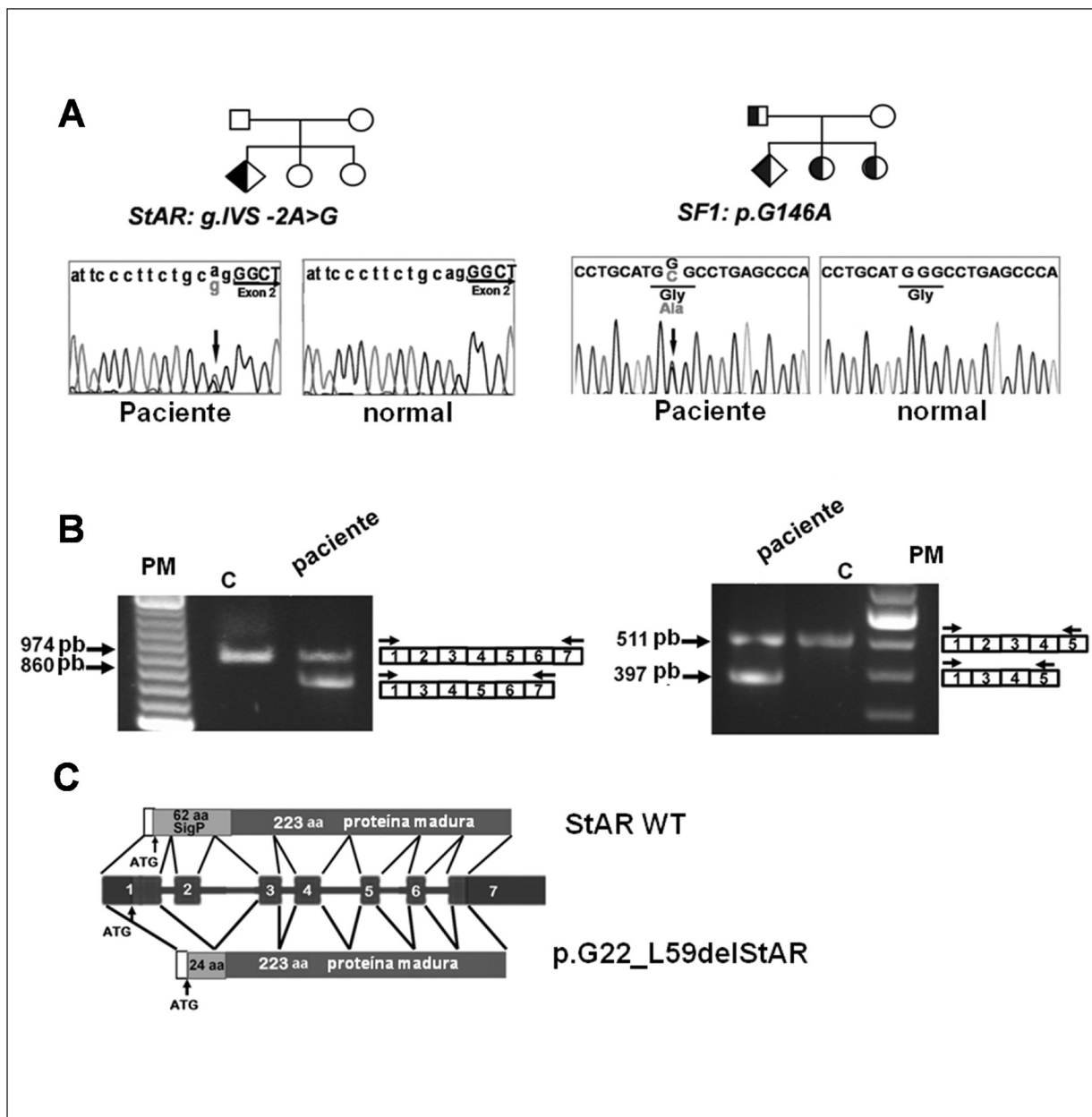


Fig. 1.- **A) Pedigrí de la familia afectada y análisis genético por secuenciación del ADN.** El paciente es heterocigota para la nueva mutación *de novo* IVS1-2A>G en el gen *STAR* (izquierda). Es también heterocigota para la sustitución G por C en el exon 4 del gen de SF-1, resultando en el polimorfismo G146A. El padre y las dos hermanas no afectadas son heterocigotas para el polimorfismo G146A en SF-1 (derecha). El paciente está marcado con un rombo debido al desorden congénito de la diferenciación sexual. Las flechas verticales indican la posición de los cambios. La secuencia exónica se indica en letras mayúsculas y las intrónicas en minúscula. **B) Análisis por RT-PCR del ARNm de StAR en el tejido testicular.** El ARNm proveniente del tejido testicular del paciente y de testículos humanos normales fueron retrotranscritos y amplificados con los *primers* S1 y AS1 (1) (panel derecho) y con los *primers* StAR1→18 and StAR511→494 (panel izquierdo). El ADNc proveniente del paciente muestra dos formas de *splicing*: la formal normal y un producto más corto correspondiente por secuenciación a la pérdida del exon 2 (114 pb). Los *primers* utilizados se indican con flechas. C, *pool* de ADNc de tejido adrenal humano normal; PM, marcador de peso molecular, 100bp (*Invitrogen*, Buenos Aires, Argentina). **C) Representación esquemática de la organización del gen STAR y de los productos de la transcripción del gen normal y mutado.** Una mutación en la posición -2 en el sitio aceptor de *splicing* del intrón 1 resulta en la pérdida del exon 2. El producto de *splicing* normal (arriba) resulta en un transcripto que codifica para la proteína StAR de 285 aminoácidos. El transcripto mutante (abajo) carece del exon 2 resultando en la pérdida de los aminoácidos 22 a 59 en el dominio N-terminal de señalización mitocondrial, sin alterar el marco de lectura (G22\_L59del StAR). C, *pool* de ADNc de tejido adrenal humano normal; PM, marcador de peso molecular, 100bp. Figura adaptada de Baquedano MS, Guercio G, Marino R, et al. Unique dominant negative mutation in the N-terminal mitochondrial targeting sequence of StAR, causing a variant form of congenital lipoid adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: E153-61. Copyright 2013, The Endocrine Society.

pregnenolona en el medio de cultivo se determinó por enzimo-inmunoensayo (*ALPCO Diagnostics*, Salem, NH, EE.UU.). Como control del sistema se utilizó como sustrato  $20\alpha$ -hidroxicolessterol que difunde libremente la membrana e indica la capacidad enzimática máxima del sistema<sup>1</sup>.

El estudio molecular del gen *STAR* reveló un cambio A por G heterocigota no descrito en la primera base del sitio aceptor de *splicing* del intrón 1 (IVS1-2A>G) (Fig. 1A). El padre, la madre y dos hermanas fueron normales para la mutación, por lo que se trataría de una mutación *de novo*. Esta variante no fue detectada en 100 alelos normales de *STAR*.

En el gen *NR5A1* se encontró una sustitución G por C heterocigota en el exón 4 que resulta en el polimorfismo p.G146A previamente descrito<sup>11</sup> (Fig. 1B). El padre y las dos hermanas no afectadas fueron heterocigotas para el polimorfismo. Un dato interesante es que este polimorfismo tendría una actividad del 80%<sup>11</sup>.

Dado que la sustitución A por G en el gen *STAR* modifica la secuencia consenso 3' aceptora de *splicing* (AG es la secuencia consenso normal del sitio aceptor de *splicing* y en este caso cambia en forma heterocigota por GG) se consideró que podría estar afectada la eficiencia de este sitio como aceptor de *splicing*. Para confirmar esta hipótesis se analizó *in vivo* el ARNm de StAR a partir de tejido gonadal del paciente. El transcripto WT esperado fue detectado en testículo prepuberal humano normal (Fig. 2A). Por el contrario, el cADN proveniente del tejido gonadal del paciente exhibió dos formas de *splicing*: el transcripto normal y un transcripto más corto correspondiente a la pérdida completa del exón 2 de StAR (114pb) (Fig. 2<sup>a</sup>). El análisis de la secuencia del ADNc mutado sugiere que esta variante de ARNm traduciría una proteína StAR que carece de los aminoácidos 22 a 59 en el péptido de señalización mitocondrial N-terminal (p.G22\_L59delStAR), sin alterar el marco de lectura (Fig. 2B).

El posible impacto de la traslocación y procesamiento mitocondrial de StAR en la esteroidogénesis es motivo de discusión. El clivaje mitocondrial de StAR parece estar asociado a la actividad de StAR en glándulas adrenales de rata<sup>4</sup>. Además, la pérdida de la secuencia de señalización mitocondrial, si bien aumenta la estabilidad de StAR, disminuye fuertemente su capacidad de promover la esteroidogénesis adrenal y gonadal en ratones<sup>12,13</sup>. En algún punto en desacuerdo con estos hallazgos, algunos estudios en células COS no esteroidogénicas muestran que la proteína StAR es completamente activa en citoplasma y que la delección de los 62 residuos aminoácidos amino terminal, incluyendo el péptido de señalización mitocondrial completo, impiden la traslocación a la mitocondria pero no afectan su actividad<sup>3,14</sup>.

A fin de evaluar las consecuencias funcionales de proteína p.G22\_L59delStAR anómala, se realizaron estudios *in vitro* transfectando células COS-7 con el plásmido WT y mutado. El análisis por *Western Blot* confirmó que tanto la proteína WT como la mutada se traducen en las células

COS-7, detectándose tanto la banda correspondiente a la preproteína (37 kD) como a la proteína madura (30 kD) (Fig. 2A). Sin embargo, la mutante p.G22\_L59delStAR fue procesada a la forma madura en relativa menor proporción que la StAR WT, lo que sugiere una alteración en el procesamiento y traslocación a la mitocondria de la proteína mutada. Por lo tanto, se realizaron estudios de doble marcación inmunofluorescente, a fin de evaluar si p.G22\_L59delStAR, que carece de 38 de los 62 aminoácidos que constituyen el péptido señal, sería capaz de alcanzar el destino final mitocondrial. Como se muestra en la Fig. 2C, casi no se observó colocalización de p.G22\_L59delStAR en mitocondrias, en comparación con las células COS-7 que expresan la proteína StAR WT.

Además, los ensayos de actividad revelaron que la actividad de la proteína mutante p.G22\_L59delStAR era del  $65 \pm 13\%$  respecto de la actividad StAR WT (Fig. 2B). Dado que la mutación IVS1-2A > G se encontró en estado heterocigota, se evaluó la posibilidad de que actuara como una mutante dominante negativa. La co-transfección con los plásmidos WT y mutante, también redujo la actividad de la proteína StAR WT en un  $62.0 \pm 13.9\%$  (Fig. 2B), lo cual sugiere un efecto dominante negativo.

Estos resultados nos permiten describir por primera vez una mutante dominante negativa de la proteína StAR. Hasta el momento, los defectos asociados al gen *STAR* seguían un modo de herencia autosómico recesivo. Por el contrario, este paciente estaba gravemente afectado en estado heterocigota, indicando una enfermedad dominante. Se secuenciaron 479 pb de la región promotora, así como la región codificante completa del gen *STAR*. La presencia tanto del cADN mutado como del normal, preparado por RT-PCR a partir del tejido testicular del paciente descartaron una delección parcial del gen o una putativa segunda mutación en regiones regulatorias, más allá de las 479pb corriente arriba del codón de inicio, o en secuencias intrónicas internas que afectarían la expresión normal del gen *STAR*.

Es sabido que la proteína StAR forma parte de un gran complejo macromolecular para facilitar el movimiento de colesterol a la mitocondria<sup>2</sup>. Considerando el hecho de que muchas enfermedades autosómicas dominantes son provocadas por mecanismos dominantes negativos, en los cuales un pequeño número de proteínas monómeras defectivas alteran un gran complejo funcional, postulamos que podría estar ocurriendo un plegamiento anormal de p.G22\_L59delStAR. De esta manera, la proteína mutante podría estar interfiriendo con la acción de la proteína StAR WT bloqueando el complejo transduceosoma y causando una forma dominante de deficiencia de StAR. Esto explicaría el fenotipo clínico en heterocigosis. En concordancia con esta hipótesis, los estudios biofísicos indicarían que cambios sutiles en el plegamiento de la proteína StAR podrían tener efectos importantes en su actividad de StAR<sup>15</sup>. Asimismo, no

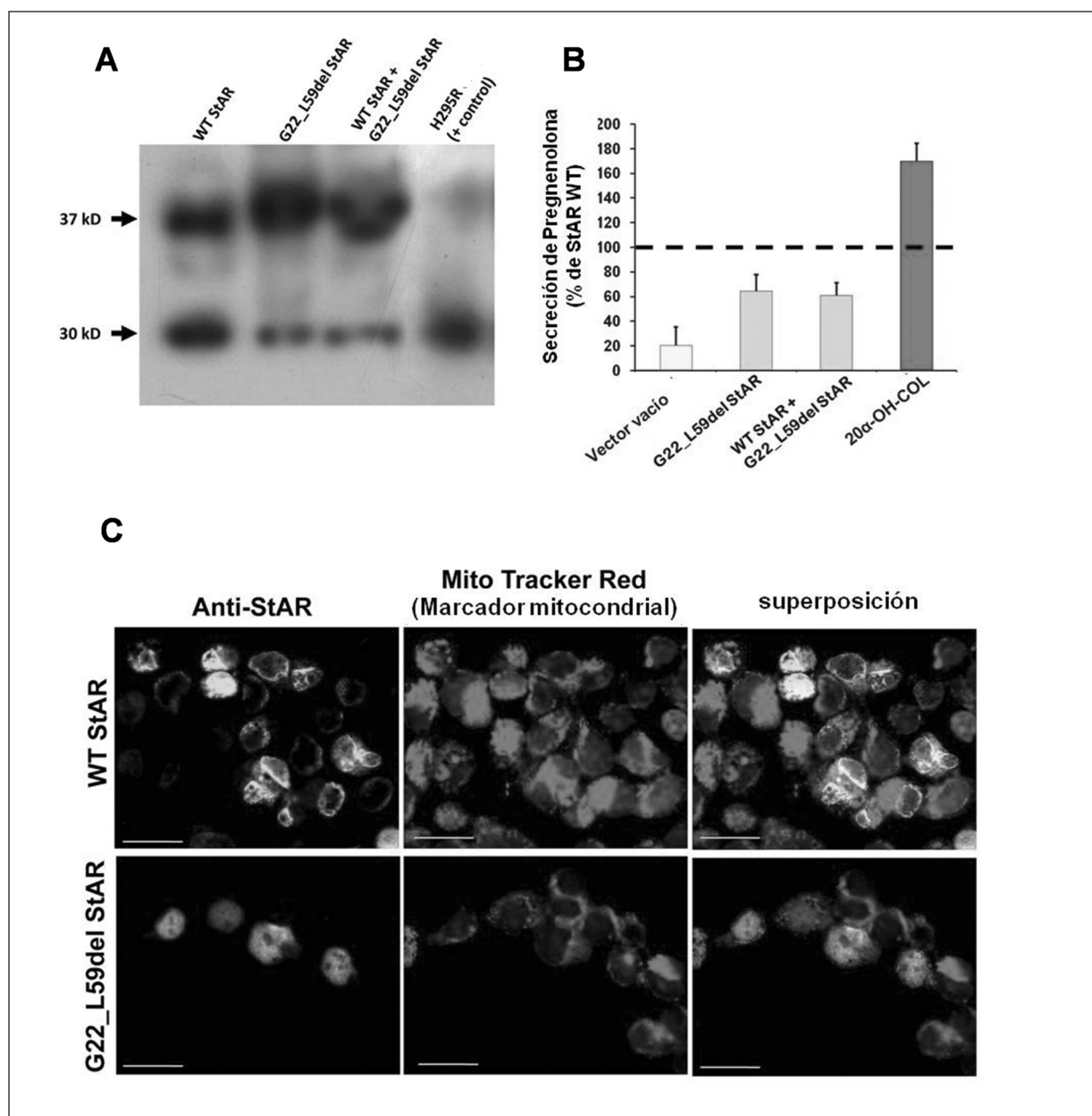


Fig. 2.— Estudios *in vitro* de la proteína StAR mutante. **A) Western blot.** Las células COS-7 fueron transfectadas en forma transiente con los vectores de expresión indicados. Las flechas indican las bandas específicas del precursor y de la proteína madura. Se detectaron bandas específicas de StAR para la proteína StAR WT y para la mutante p.G22\_L59del StAR. Se utilizó como control positivo un lisado de células adrenocorticales humanas, H295R. **B) Estudio funcional *in vitro*.** Las células COS-7 fueron co-transfectadas en forma transiente con los vectores de expresión F2 y los vectores WT, G22\_L59del StAR, WT + G22\_L59del StAR o el vector vacío. Luego de 48 horas, la pregnenolona secretada al medio de cultivo fue medida mediante un ensayo de ELISA comercial. 20α-OH-COL, esteroidogénesis proveniente de células control incubadas con 20α-hidroxicolesterol (5μg/ml); todos los otros datos muestran la esteroidogénesis a partir del colesterol celular endógeno. El valor para la StAR WT fue establecido como el 100% (línea punteada). Los resultados están expresados como media±DS para tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. La secreción de pregnenolona a partir del colesterol endógeno por las células COS-7 transfectadas con el vector F2 y el vector control vacío fue 5.2±1.3 ng/ml (16.4±4.1 nmol/l). En presencia de StAR WT, el promedio de secreción de pregnenolona fue 30.9 ± 8.1 ng/ml (97.6 ± 25.6 nmol/l). **C) Microscopia laser confocal de células COS-7 transfectadas.** Las células fueron incubadas con MitoTracker Red CMXRos (rojo, columna del medio) y antisuero policlonal anti-StAR humano como anticuerpo primario, y anticuerpo Alexa Fluor488 anti-conejo como segundo anticuerpo (verde, columna izquierda). La imagen superpuesta (columna derecha) muestra co-localización de mitocondrias y StAR en las células COS-7, que expresan StAR WT. Se observa escasa co-localización de la mutante p.G22\_L59del StAR y mitocondria. Escala = 20.0 μm. Figura adaptada de Baquedano MS, Guercio G, Marino R, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: E153-61. Copyright 2013, The Endocrine Society.

se han detectado mutaciones en los genes *CYP11A1*, *NR5A1*, *FDX1* y *FDXR*, potencialmente causantes del fenotipo del paciente. Parece improbable la existencia de un sinergismo entre la mutación de *STAR* y el polimorfismo G146A potencialmente hipofuncional en el gen *NR5A1*, dado que la actividad de transactivación está mínimamente disminuida en la variante G146A<sup>11</sup>.

Otros estudios muestran que las mutaciones de *STAR* con más de 10-20% de actividad WT *in vitro* se manifiestan como formas leves de HACL<sup>7,8</sup>. Sin embargo, se han descrito algunos casos de falta de correlación entre la actividad StAR *in vitro* y el fenotipo clínico<sup>6</sup>.

Si bien la mutante p.G22\_L59delStAR retuvo más del 60% de la actividad WT *in vitro*, el paciente presentó enfermedad de comienzo neonatal y grave trastorno de la diferenciación sexual al nacimiento. Las razones de esta disociación entre los estudios *in vitro* y el fenotipo clínico se desconocen. Dado que como parte del transduceosoma, la función de StAR depende de interacciones proteína-proteína<sup>2</sup>, podría especularse que ciertas mutaciones asociadas en alguna otra proteína, miembro del transduceosoma, podrían haber contribuido al fenotipo clínico. Con el fin de evaluar esta hipótesis, se hizo el estudio molecular de los componentes del transduceosoma, VDCA1 y TSPO, que interactúan directamente con StAR, regulando su traslocación y procesamiento<sup>2</sup>. Sin embargo, los genes *VDCA1* y *TSPO* fueron completamente normales en el paciente.

Alternativamente, dado que en las células COS-7, la proteína StAR puede estimular el metabolismo del colesterol independientemente de la secuencia de señalización N-terminal<sup>5,9</sup>, es posible que en este caso la expresión artificial de StAR en tejidos no esteroideogénicos no refleje completamente el mecanismo de acción de StAR en la mitocondria, como ya ha sido sugerido<sup>13</sup>.

Concluyendo, describimos una nueva mutación de *splicing* del gen *STAR* en estado heterocigota que generaría una proteína que carece de 38 de los 62 aminoácidos que constituyen el péptido de señalización mitocondrial N terminal. Hasta donde conocemos, este es el primer caso descrito de una forma dominante de HACL. Los estudios *in vitro* dieron cuenta del impacto funcional y del efecto dominante negativo. Nuestros resultados aportan evidencia del rol funcional que ejercería *in vivo* el péptido de señalización mitocondrial en la actividad de la proteína StAR.

**Conflictos de interés:** Los autores no tienen conflictos de interés para declarar.

## Bibliografía

1. Lin D, Sugawara T, Strauss JF 3rd, et al. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 1995; 267: 1828-31.
2. Rone MB, Fan J, Papadopoulos V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: Role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791: 646-58.
3. Miller WL. StAR search –What we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 589-601.
4. Artemenko IP, Zhao D, Hales DB, Hales KH, Jefcoate CR. Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 46583-96.
5. Arakane F, Kallen CB, Watari H. The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). StAR acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273: 16339-45.
6. Rose HS, Sugawara T, Strauss III JF, Miller WL. The pathophysiology and genetics of congenital lipid adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 1996; 335: 1870-8.
7. Baker BY, Lin L, Kim CJ, et al. Nonclassic congenital lipid adrenal hyperplasia: a new disorder of the steroidogenic acute regulatory protein with very late presentation and normal male genitalia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4781-5.
8. Flück CE, Pandey AV, Dick B, et al. Characterization of Novel StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) Mutations Causing Non-Classic Lipoid Adrenal Hyperplasia. *PLoS One* 2011; (5): e20178.
9. Bose HS, Lingappa VR, Miller WL. Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import. *Nature* 2002; 417: 87-91.
10. Harikrishna JA, Black SM, Szklarz GD, Miller WL. Construction and Function of fusion enzymes of human cytochrome P450scc system. *DNA Cell Biol* 1993; 12: 371-9.
11. WuQiang F, Yanase T, Wei L, et al. Functional characterization of a new human Ad4BP/SF-1 variation, G146A. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 987-94.
12. Granot Z, Geiss-Friedlander R, Melamed-Book N, et al. Proteolysis of normal and mutated steroidogenic acute regulatory proteins in the mitochondria: the fate of unwanted proteins. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 2461-76.
13. Sasaki G, Ishii T, Jeyasuria P, et al. Complex role of the mitochondrial targeting signal in the function of steroidogenic acute regulatory protein revealed by bacterial artificial chromosome transgenesis *in vivo*. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 951-64.
14. Arakane F, Sugawara T, Nishino H, et al. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: implications for the mechanism of StAR action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13731-6.
15. Bose HS, Baldwin MA, Miller WL. Incorrect folding of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in congenital lipid adrenal hyperplasia. *Biochemistry* 1998; 37: 9768-75.