



FORMACIÓN CONTINUADA

Nuevos factores que intervienen en la regulación de la 1 alfa hidroxilasa renal de la vitamina D

A. L. Negri y E. Fradinger

Cátedra de Fisiología y Biofísica e Instituto de Investigaciones Metabólicas. Facultad de Medicina. Universidad del Salvador. Buenos Aires. Argentina.

INTRODUCCIÓN

La vitamina D existe en dos formas: el ergocalciferol o vitamina D₂ producida por plantas y el colecalciferol o vitamina D₃, producida en tejidos animales o por la acción de la luz casi ultravioleta (290-310) sobre el 7-dehidrocolesterol en la piel humana. Ambas son prohormonas biológicamente equivalentes que deben sufrir dos hidroxilaciones para poder activar al receptor de la vitamina D en los órganos blanco. La primera hidroxilación de la vitamina D ocurre en posición 25 a nivel hepático por la acción de la enzima mitocondrial P450c27 (CYP27A1), que también hidroxila al colesterol en posición c-26 y c-27 para iniciar la síntesis de ácidos biliares. Esta actividad catalítica no está regulada hormonalmente y los niveles circulantes de 25-hidroxi vitamina dependen principalmente de la ingesta dietética y del nivel de exposición solar.

La 25OH vit D al igual que la propia vitamina D, tiene una baja capacidad de unirse al receptor de la vitamina D para provocar una respuesta biológica. Debe transformarse primero en la 1,25 dihidroxivitamina D o calcitriol por una 1 alfa-hidroxilación a nivel del túbulo proximal del riñón producida por la 25-hidroxivitamina D₃ 1 alfa-hidroxilasa (CYP27B1). Este es el paso limitante obligado para la bioactivación de la vitamina D y es el que está estrechamente regulado por la paratohormona, calcio, fósforo y la propia 1,25(OH)2D^{1,2}.

Finalmente la 24 hidroxilación de la 1,25 dihidroxivitamina D producida por la enzima 25-dihidroxivitamina D₃ 24-hidroxilasa (CYP24A1), paso que inducible por el propio calcitriol, es el primer paso en el catabolismo de esta hormona a través de la oxidación en posición C-24 de la cadena lateral en los tejidos efectores.

HIDROXILASAS DE LA VITAMINA D

La vitamina D 25-hidroxilasa, la 1 alfa hidroxilasa y la 24 hidroxilasa pertenecen todas al tipo I de enzimas de citocromo P450 que se localizan a nivel mitocondrial. Funcionan como oxidasas que usan electrones del NADPH y oxígeno molecular^{3,4}. Para la catálisis por una enzima tipo I del P450, los electrones del NADPH son primero tomados por una flavoproteína, la ferredoxina reductasa, que está unida a la membrana interna mitocondrial o está en solución en la matriz mitocondrial. La ferredoxina puede inter-actuar con cualquier citocromo P450 mitocondrial. La porción P450 se une al sustrato, recibe los electrones y el oxígeno molecular y cataliza la reacción usando hierro de un grupo Hemo para coordinar el oxígeno. Las tipo II de enzimas del citocromo P450, como las enzimas esteroideogénicas 17 alfa hidroxilasa, 21 alfa hidroxilasa y aromatasas o de las enzimas hepáticas involucradas en el metabolismo de drogas, se diferencian de las tipo I en que se encuentran en el retículo endoplásmico y en que reciben electrones de una flavoproteína diferente, la P450 óxidoreductasa, ocasionalmente facilitada por el citocromo b₅ y sin la necesidad de una proteína hierro-azufre⁵.

Correspondencia: Dr. Armando Luis Negri
Instituto de Investigaciones Metabólicas
Libertad, 836, 1 piso
1012 Buenos Aires (Argentina)
E-mail: secger@idim.com.ar

Recientemente, usando la expresión heteróloga en bacteria *E. coli* se ha podido investigar en detalle las propiedades de estas enzimas dependientes de citocromo P450⁶. Al analizar los metabolitos de la vitamina D por el sistema reconstituido, la CYP27A1 produjo por lo menos siete formas de metabolitos menores incluyendo 1 alfa, 25(OH)2D3 además del metabolito mayor 25(OH)D3. Estos resultados indican que la CYP27A1 cataliza la múltiples reacciones involucradas en el metabolismo de la vitamina D3. Por el contrario la CYP27B1 solo cataliza la hidroxilación en la posición C-1 alfa de la 25(OH)D3 y la 24R,25 (OH)2D3. Los estudios enzimáticos de especificidad de sustrato de la CYP27B1 sugieren que la actividad de la 1 alfa hidroxilasa de la CYP27B1 requiere de la presencia del grupo hidroxilo en posición 25 de la vitamina D3 y que su actividad es aumentada por el grupo hidroxilo en posición 24 mientras que un grupo hidroxilo en la posición 23 disminuye en forma importante su actividad. Se han detectado 8 tipos de mutaciones de sentido cambiado en el gene de la CYP27B1 que se encuentran en los pacientes portadores de raquitismo dependiente de la vitamina D (VDDR-I) que determinan la abolición completa de la actividad de la 1 alfa hidroxilasa.

REGULACIÓN DE LA 1 ALFA HIDROXILASA (CYP27B1) RENAL

La actividad de la 1 alfa hidroxilasa renal y el ARNm de la CYP27B1 son estimulados por la PTH, la calcitonina, el factor de crecimiento insulínico I (IGF-I), la hipocalcemia y la hipofosfatemia, y es suprimida por la hipercalcemia, la hiperfosfatemia y por el propio calcitriol^{7,8}.

Estudios *in vivo* han sugerido que el factor clave activador de la 1 alfa hidroxilasa es la PTH y que este efecto es mediado por lo menos en parte por la inducción en las células blanco del AMPc.⁹ Estudios más recientes han resaltado la presencia de potenciales elementos respondedores al AMPc en áreas downstream (-1,4 Kb) con son respondedoras a la PTH en ensayos de promotor-responder¹⁰. El efecto estimulador de la PTH sobre la actividad de la 1 alfa hidroxilasa parece requerir tanto de la vía de la proteína quinasa A AMPc dependiente (PKA) como de la vía de la proteína quinasa C (PKC). Inicialmente se había propuesto que la inducción por PTH (y AMPc) sobre el gen la 1 alfa hidroxilasa ocurrían, por lo menos en parte, por vía transcripcional (10), y que la supresión por parte del calcitriol era también probablemente a

nivel transcripcional¹¹. Estudios más recientes de expresión de 1 alfa-hidroxilasa en células AOK-B50 y HKC-8 (células de túbulo proximal humano transformadas) han sugerido que la acción estimuladora de la PTH es directa sobre el gen de la 1 alfa-hidroxilasa, mientras que la acción represora del 1,25(OH) 2D3 es fundamentalmente indirecta y no involucra la participación de la PTH¹². No ha sido posible demostrar autorregulación en la actividad basal del promotor de la CYP 1 alfa y no se han identificado elementos respondedores a la vitamina D (VDREs) en el fragmento de 1,4 kb^{12,13}. Esto contrasta con el análisis del promotor murino que ha demostrado respuesta positiva a la PTH y negativa al calcitriol¹¹. Con respecto a la calcitonina, esta ha mostrado ser una potente estimuladora de la expresión de 1 alfa hidroxilasa¹¹ corroborando estudios previos en los cuales la calcitonina había mostrado estimular el ARNm de la 1 alfa hidroxilasa y la actividad en condiciones normocalcémicas¹⁴.

Sin embargo se ha encontrado que la más potente y rápida modulación de la expresión y actividad de la 1 alfa hidroxilasa ocurre siguiendo a cambios en el calcio extracelular¹⁵. Relativamente altos niveles de calcio (2 mM *versus* 1 mM) reducen la síntesis de 1,25 (OH)2D3, mientras que relativamente bajos niveles de calcio (0,5 mM *versus* 1 mM) incrementan la actividad enzimática. Estas respuestas ocurren dentro de las 24 horas pero son transitorias retornando a lo normal a las 24 horas¹⁵. Ya que se ha observado expresión del receptor sensor de calcio a lo largo del nefrón, esto sugiere que los cambios en el sensado local de los niveles de calcio pueden actuar como un determinante mayor tejido específico de la producción de calcitriol.

La hipofosfatemia incrementa la expresión del ARN m del P450c1alfa hidroxilasa en ratones, y el incremento en la expresión génica, que ocurre exclusivamente en el túbulo proximal, es debida por lo menos en parte a un incremento en la transcripción del gen P450c1alpha¹⁶.

NUEVOS FACTORES QUE REGULAN LA 1 ALFA HIDROXILASA RENAL

Factor de crecimiento fibroblástico 23

Los individuos afectados de un trastorno genético denominado raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (del inglés Autosomal Dominant Hypo-

phosphatemic Rickets o ADHR) se caracterizan por tener una pérdida renal aislada de fósforo, hipofosfatemia con concentraciones de calcitriol sérico inapropiadamente normales¹⁷.

Usando estrategias de posicionamiento clonal, el consorcio de estudio de ADHR encontró que familias con ese trastorno presentaban mutaciones de sentido cambiado en el gen que codifica un miembro de la familia de los factores de crecimiento fibroblástico (en inglés fibroblast growth factor, FGF), el FGF 23¹⁸. El gen que codifica este factor está localizado en el cromosoma 12p13¹⁹ y es uno de los 22 miembros de la familia de los FGF^{20,21}. La longitud completa del FGF 23 es de aproximadamente 26 KDa (251 aminoácidos). Tiene una región aminoterminal que contiene el dominio característico de los FGF y una novedosa porción carboxilo terminal de 77 aminoácidos. Las mutaciones que se detectaron en esas familias de ADHR afectaban a las argininas posicionadas tres aminoácidos aparte (R176 Q, R179 W y R179 Q). La repercusión que esas mutaciones tienen en la estructura del FGF 23 se aclaró cuando varios grupos de investigadores expresaron y estudiaron este factor *in vitro*. Además de la proteína esperada de 30.000 a 32.000 Mr que comprende al FGF 23 completo, se observaron dos fragmentos más pequeños. Esto mostraba que una parte del FGF 23 secretado era procesado a dos fragmentos de 18.000 y 12.000 Mr. El tamaño de los fragmentos y sus secuencias era consistente con un clivaje de la molécula en un sitio que contiene el motivo RXXR(5), característico del sitio de clivaje de enzimas del tipo de la pro-convertasa.

Las mutaciones identificadas en los pacientes con ADHR reemplazan los residuos de arginina dentro del sitio de consenso de clivaje de la proconvertasa. Como el FGF 23 presente en las familias con ADHR se expresa solamente como una proteína de 30.000 a 32.000 Mr *in vitro*, resto sugiere que las mutaciones impiden el procesamiento o degradación del FGF 23²²⁻²⁴.

La administración de FGF 23 recombinante a ratones normales induce una disminución precoz del calcitriol y una pequeña pero significativa disminución del fósforo sérico producida por incremento en la fosfaturia¹⁸. La exposición prolongada al FGF 23 producida por la implantación de células de ovario de hamster chino, conteniendo el gen FGF 23, en ratones desnudos atímicos, induce una severa hipofosfatemia, osteomalacia y disminución de los niveles de 1,25 dihidroxivitamina D₃, por disminución del mensajero de la 1 alfa hidroxilasa renal²⁵. Finalmente la deficiencia

de FGF 23 provocada en ratones por ablación dirigida del gen del FGF 23 resultó en hiperfosfatemia y marcado aumento en los niveles de 1,25 dihidroxivitamina D₃, así como anomalías esqueléticas²⁶. Todo lo anterior sugiere que el FGF 23 es una verdadera fosfatona y confirma su rol esencial y no redundante en el control de la homeostasis del fósforo y en el control de la 1 alfa hidroxilasa renal.

Productos del gen Klotho

Recientemente se ha desarrollado una cepa de ratón de vida media corta con una sola mutación genética que causa muchas enfermedades relacionadas con el envejecimiento. El gen responsable ha sido identificado como gen Klotho. Los ratones homocigotas para alelos severamente hipomórficos del gen Klotho (ratones klotho) exhiben un síndrome que se parece al envejecimiento humano, incluyendo aterosclerosis, osteoporosis, enfisema, alteraciones en la audición²⁷. Esto incluye calcificaciones ectópicas en las paredes arteriales y el estómago, atrofia del timo, disrupción de las células de Purkinje, atrofia gonadal (esterilidad), afinamiento de la piel, ataxia y anomalías de la glándula pituitaria, así como hipoglucemia e hiperfosfatemia²⁷.

El gen klotho codifica a la proteína Klotho, un nuevo tipo I de proteínas de membrana de la familia de las beta-glicosidasas y se expresa principalmente en las células tubulares distales del riñón, el plexo coroideo en el cerebro y las células principales de la glándula paratiroidea. A pesar de que la proteína Klotho guarda similitud de secuencia con miembros de la familia 1 de las glicosidasas, le faltan los residuos de ácido glutámico que se ha mostrado están comprometidos con la actividad catalítica de esta familia de enzimas. La función de esta proteína no está todavía bien caracterizada. La actividad enzimática de Klotho muestra que esta proteína funciona como una nueva beta-glucuronidasa y que los glucurónidos de beta-esteroides son potenciales candidatos como sustratos naturales del Klotho²⁸.

Análisis de cDNA reveló que el gen klotho también se expresa como una forma secretada, que le falta el segmento KL2, dominios transmembrana, y de dominios intracelulares, debido a alteraciones en el splicing del ARN. Por lo tanto, el klotho también puede actuar como un factor humoral^{27,29}. Nuevos anticuerpos establecidos contra Klotho permitieron la detección de la forma secretada de

Klotho, en el suero y en el líquido cerebroespinal³⁰. Sorprendentemente el Klotho secretado era de 130 kDa, en contraste con los 70 kDa predichos de los transcritos de gen klotho, sugiriendo que la forma secretada así como la forma asociada a la membrana de la proteína Kotho forman complejos oligomerizados. Estos hallazgos señalan un procesamiento post-translacional de los productos del gen Klotho y posibles sitios de regulación de su secreción *in vivo*. La proteína Klotho humana muestra 86% de identidad de aminoácidos con la proteína de ratón y es codificada por un gen que se extiende por más de 50 kb en el cromosoma 13q12²⁹.

Los ratones mutantes nulos para el gen Klotho muestran una homeostasis anormal del calcio y fósforo junto a un incremento en los niveles de séricos de 1,25-(OH)2D. En los ratones kl-/- a la edad de 3 semanas se encuentran niveles elevados de calcio sérico, fósforo y lo más notable, una gran elevación de los niveles séricos de 1,25-(OH)2D con respecto al ratón tipo salvaje. La reducción de las concentraciones séricas de 1,25-(OH)2D por restricción dietética resultó en un alivio de la mayor parte de los fenotipos, sugiriendo que ellos eran eventos que estaban camino abajo resultantes de los niveles elevados de 1,25-(OH)2D. Tsujikawa y cols. estudiaron las señales que llevan a una up-regulación de las enzimas activadoras de la vitamina D al examinar la respuesta en la expresión del gen de la 1 alfa-hidroxilasa a las hormonas reguladoras del calcio, como la PTH, calcitonina, y 1,25(OH)2D3. Estas vías estaban intactas en los ratones mutantes nulos para klotho, sugiriendo la existencia de circuitos regulatorios alternativos. También encontraron que la administración de 1,25(OH)2D3 induce la expresión de klotho en el riñón. Estas observaciones sugieren que el klotho puede participar en un circuito regulatorio negativo del sistema endocrino de la vitamina D, a través de la regulación de la expresión del gen de la 1 alfa-hidroxilasa³¹.

La vida media promedio de los ratones homocigotas para el gen klotho alterado fue de 9,6 + 1,1 semanas y su peso promedio no excedió los 10 g cuando se los alimentó con la dieta no purificada, CE-2. A pesar de ello, cuando estos ratones macho homocigotas para el klotho alterado fueron alimentados con dieta baja en fósforo (0,4 g/100 g) comenzando a la tercer semana de edad, ellos continuaron ganando peso alcanzando los 20 g o más para la 20 semana de edad³². Por lo tanto al considerar la relación entre la expresión del Klotho y el nivel de fósforo de la dieta, la proteína klotho pa-

rece ser controlada negativamente por el fósforo de la dieta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kumar R: Metabolism of 1,25-dihydroxy vitamin D3. *Physiol Rev* 64: 478-504, 1984.
2. Breslau NA: Normal and abnormal regulation of 1,25(OH)2 synthesis. *Am J Med Sci* 296: 417-425, 1988.
3. Nebert DW and González FJ: P450 genes: structure, evolution and regulation. *Annu Rev Biochem* 56: 945-993, 1987.
4. Black SD and Coon MJ P-450 cytochromes: Structure and function. *Adv Enzymo Relat Areas Mol Biol* 60: 35-87, 1987.
5. Auchus RJ, Lee TC, Miller WL: Cytochrome B5 augments the 17,20 lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *J Biol Chem* 273: 3158-3165, 1998.
6. Sakaki T, Kagawa N, Yamamoto K, and Inouye K: Metabolism of vitamin D3 by cytochromes P450 *Front Biosci* 10: 119-34, 2005.
7. St-Arnaud R, Messerlian S, Moir JM, Omdahl JL, Glorieux FH: The 25-hydroxy-vitamin D 1 alfa -hydroxylase gene maps to the pseudovitamin D-deficiency rickets (PDDR) disease locus. *J Bone Mineral Res* 12: 1552-1559, 1997.
8. Shinki T, Shimada H, Wakino S, Anazawa H, Hayashi M, Saruta T, DeLuca HF, Suda T: Cloning and expression of rat 25-hydroxvitamin D3-1 alfa hydroxylase cDNA *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94: 12920-12925, 1997.
9. Henry HL and Luntao EM: Interactions between intracellular signals involved in the regulation of 25-hydroxyvitamin D3 metabolism. *Endocrinology* 124: 2228-2234, 1989.
10. Brenza H, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawa H, Suda T, DeLuca HF: Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxvitamin D-1 alfa-hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (4): 1387-1391, 1998.
11. Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Koderia Y, Kawaguchi Y, Hosoya T, Kato S: Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1alpha,25(OH)2D3 in intact animals. *Endocrinology* 140 (5): 2224-31, 1999.
12. Brenza HL, DeLuca HF: Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Arch Biochem Biophys* 381 (1): 143-52, 2000.
13. Kong XF, Zhu XH, Pei YL, Jackson DM, Hollick MF: Molecular cloning, characterization and promoter analysis of human 25-hydroxyvitamin D3-1 alfa-hydroxylase gene. *PNAS* 96: 6988-6993, 1999.
14. Shinki T, Ueno Y, DeLuca HF, Suda T: calcitonin is a mayor regulator for the expression of renal 25-hydroxyvitamin D3 1 alfa-hydroxylase gene in normocalcemic rats. *PNAS* 96: 8253-8258, 1999.
15. Bland R, Walker E, Hughes SV, Stewart PM, Hewison M: Constitutive expression of 25-hydroxyvitamin D 1-alfa-hydroxylase in transformed human proximal tubular cell line: evidence of direct regulation of vitamin D metabolism by calcium. *Endocrinology* 140: 2027-2034, 1999.
16. Zhang MY, Wang X, Wang JT, Compagnone NA, Nellon SH, Olson JL, Tenenhouse HS, Miller WL, Portale AA: Dietary

FACTORES QUE REGULAN LA 1-ALFA HIDROXILASA

- phosphorus transcriptionally regulates 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase gene expression in the proximal renal tubule. *Endocrinology* 143 (2): 587-95, 2002.
17. Econs MJ and McEnery PT: Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: clinical characterization of a novel renal phosphate wasting disorder. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 674-681, 1997.
 18. The ADHR Consortium: Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet* 26: 345-348, 2000.
 19. Econs MJ, McEnery PT, Lennon Fand Spencer MC: Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is linked to chromosome 12p13. *J Clin Invest* 100: 2653-2657, 1997.
 20. Powers CJ, McLeskey SW, and Wellstein A: Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7: 165-197, 2000.
 21. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, and Shamashita T: Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6500-6505, 2001.
 22. White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B y cols.: ADHR mutations stabilize FGF23. *Kidney Int* 60: 2079-2086, 2002.
 23. Shimada T, Muto T, Urakawa I, Yoneya T, Yamazaki Y, Okawa K, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, and Shamashita T: Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology* 143: 3179-3182, 2002.
 24. Bai XY, Miao D, Goltzman d, Karpalis AC: The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances *in vitro* biological potency. *J Biol Chem* 278 (11): 9843-9, 2003.
 25. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, Takeuchi Y, Futyita Y, Fukumoto S, Yamashita T: FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun* 314 (2): 409-14, 2004.
 26. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fuyita T, Fukumoto S, Tomisuka K, Yamashita T: Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113 (4): 561-8, 2004.
 27. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima Y, Mutation of the klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* (London) 390: 45-51, 1997.
 28. Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, Henrissat B, Fujimori T, Nabeshima Y: Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J Biol Chem* 279 (11): 9777-84, 2004.
 29. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y: Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun* 242: 626-630, 1998.
 30. Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, Fujimori T, Nabeshima Y: Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett* 565 (1-3): 143-7, 2004.
 31. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y., Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol* 17 (12): 2393-403, 2003.
 32. Morishita K, Shirai A, Kubota M, Katakura Y, Nabeshima Y, Takeshige K, Kamiyal T, The progression of aging in klotho mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J Nutr* 131: 3182-3188, 2001.