

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

IDENTIFICACION DE LA REGION PROMOTORA DEL GEN
DE LA AMINOTRANSFERASA DE LOS AMINOACIDOS DE
CADENA RAMIFICADA MITOCONDRIAL DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

CAROLINA FLORES MARROQUIN

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARMANDO TOVAR PALACIO



MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Esta tesis fue realizada en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en el departamento de Fisiología de la Nutrición bajo la dirección del Dr. Armando R. Tovar Palacio.

Durante la realización de la maestría se contó con la beca de CONACyT y DGEP.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Flores Marroquín

Carolina

FECHA: 7/09/04

FIRMA: [Firma]

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, siempre agradeceré a mis padres la oportunidad que me dieron de estudiar y lograr los objetivos que me propuse, con tantos esfuerzos y amor lo hicieron. Espero que esta tesis sea digna de estos sacrificios. GRACIAS MAMÁ Y PAPÁ. En cuanto a mis hermanos y hermanas, también doy gracias por las enseñanzas y apoyo incondicional que me dan día a día. Como olvidar que gracias a ustedes cada uno de nosotros en menor o mayor medida a salido adelante. Yo se que aún cuando no este junto a mí todo el tiempo, siempre cuento con ustedes. Cada momento vivido con ustedes y con mis mascotas ha sido maravilloso.

A mis amigos, es mucha la gente que me ha apoyado y permitido que este trabajo llegue a su feliz termino, desde los técnicos de laboratorio (señora Silvia) hasta los que me ayudaron con experimentos (Enrique, Carlos, Lolita, Asunción, Dr. Gutiérrez, Dra. Elizabeth). También están los amigos que apoyaron emocionalmente (Lilia, Tulia, Sara, Ivan, Memo, Victor, Fernanda, Natalia, Fernando, Lety García, especialmente a Jesús). A todos ellos mil gracias.

A Gaby, a un cuando somos tan diferentes (color de piel, tipo de cabello, tu tienen un hijo, etc) nos acoplamos bastante bien, el trabajo no era malo cuando bromeábamos. A tu lado aprendí nuevas cosas en todos los sentidos, y cuando me necesites no dudes en llamarme. Gracias Gaby por las enseñanzas dadas.

A Lety, como olvidar el apoyo gracias a ti logre terminar el trabajo. Me siento contenta de haberte conocido también (momentos felices y momentos de tristeza). Eres una persona muy importante, y aún cuando al final nos distanciamos un poco te considero una buena amiga. Gracias Lety por compartir parte de tu vida conmigo.

A Fernando, no tengo mucho que decirte solo que gracias por la ayuda y amistad dada, porque todo lo que te estimo ya te lo he dicho. Muchas gracias Fer, por las salidas y compartir parte de tu tiempo.

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra manera contibuyeron para el feliz término de esta tesis, de manera especial al Dr Armando Tovar Palacio, y a mis sinodales Dra. Alicia Gonzáles M, Dra. María Elena Ibarra, Dr. Marco Antonio Cerbón, Dr. Javier Plasencia y Dr. Jorge Vázquez por sus comentarios y sugerencias.

A Carolina, después de llegar hasta este escalón uno se da cuenta que el camino para llegar hasta donde uno está, puede ser muy difícil o muy fácil depende de la dedicación de uno.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada	2
1.2. Catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada	5
1.3. Aminotransferasa de los aminoácidos de cadena ramificada (TAACR)	10
1.4. Isoformas de la TAACR	11
1.5. Especificidad de sustrato	14
1.6. Genes que codifican las isoformas de TAACR	15
1.7. Distribución de la TAACR en los tejidos	15
1.8. Estudios sobre la regulación de la TAACRm en ratas	19
1.9. Justificación	25
2. HIPÓTESIS	26
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo general	27
3.2. Objetivos específicos	27
4. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1. Aislamiento de la región promotora del gen de la TAACRm empleando la técnica de genome walker	28
4.2. Localización del sitio de inicio de la transcripción del ARN mensajero de la TAACRm de rata y análisis computacional del promotor	29
4.3. Construcciones de las delecciones del promotor de TAACRm	30
4.4. Clonación de las delecciones y el fragmento completo del promotor de TAACRm en el vector de la luciferasa	31
4.5. Cultivo de las células RIN-m5f	31
4.6. Transfección de las células RIN-m5f con lipofectamina 2000	31
4.7. Ensayo de luciferasa	32
5. RESULTADOS	
5.1. Estructura de la región promotora del gen de la TAACRm de la rata	34
5.2. Determinación del sitio de inicio en el promotor de la TAACRm	34
5.3. Análisis de la región promotora de la TAACRm	34
5.4. Análisis de funcionalidad de las delecciones y el promotor completo de TAACRm	35
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
7. CONCLUSIONES	50
8. BIBLIOGRAFÍA	51
9. ANEXO	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AACR	Aminoácidos de cadena ramificada
AcAc	Acetoacetato
AMP	Monofosfato de adenosina
AR	Ácido retinoico
ARP-1	Proteína de regulación de apolipoproteína
ATP	Trifosfato de adenosina
CACR	α -cetoácidos de cadena ramificada
CBP	Proteína de enlace a CRE
C/EBP	Proteína de enlace al aumentador CCAAT
CIC	α -cetoisocaproato
CIV	α -cetoisovalerato
CMV	α -ceto β -metilvalerato
c-Myc	Oncoproteína reguladora del ciclo celular
COUP-TF	Factor de transcripción del promotor de la ovoalbúmina de pollo
CRE	Elemento de respuesta a AMP cíclico
D-AAT	D-alanina aminotransferasa
DCCR	Deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada
DCCR-Pi	Deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada fosforilada
dNTP	Dideoxinucleótidos
DR2	Receptor de dopamina D2
DTT	Ditiotreitol
ECA 39	Gen de TAACRc de ratón
ECA 40	Gen de TAACRm de ratón
eIF4E	Factor de iniciación 4E de eucariotes
FP	Fosfato de piridoxal
HNF1β	Factor nuclear de hepatocitos 1 beta
HNF3α	Factor nuclear de hepatocitos 3 alfa
HNF4	Factor nuclear de hepatocitos 4
HNF4α7	Factor nuclear de hepatocitos 4 alfa 7
IMP	Monofosfato de inosina
MEF2	Factor aumentador de miocitos 2
MMLV	Virus de leucemia mieloide murina
N-CoR	Corepresor del receptor hormonal nuclear
NF1	Factor nuclear 1
NF-Y	Factor nuclear Y
OAA	Oxalacetato
OCT-1	Factor de enlace a octámeros 1
PCC4 Aza 1	Teratocarcinoma murina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pGL3b	Vector reportero de luciferasa básico
Pyr	Piruvato

RAR	Receptor de ácido retinoico
RIN-m5f	Línea celular de islotes de páncreas de rata
RHT	Receptor de hormona tiroidea
RT	Retrotranscriptasa
RXR	Receptor de retinoide X
SMART-RACE	Mecanismo de cambio en el extremo 5' del ARN transcrito- rápida amplificación de extremos de ADN complementario
SMRT	Mediador del silenciamiento de receptores de la hormona tiroidea y retinoica
Sp1	Proteína estimuladora 1
T4	Construcción del promotor sin el elemento de respuesta HNF4 en pGL3b
TAACRc	Transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada citosólica
TAACRm	Transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada mitocondrial
TAFs_{II}	Factores tipo II asociados a la caja TATA
URL/URG	Unidades relativas de luciferasa/ unidades relativas de β -galactosidasa
TBP	Proteína de enlace a la caja TATA
TFIIB	Factor de transcripción II B
TR	Construcción del promotor sin el elemento de Respuesta RAR en pGL3b
TT	Construcción del promotor completo de TAACRm en en pGL3b

RESUMEN

Los aminoácidos de cadena ramificada (AACR), la leucina, isoleucina y valina, son aminoácidos indispensables, los cuales intervienen en procesos importantes para la célula como la estimulación de síntesis de proteínas, producción de energía a través de su catabolismo, y dan en parte origen a aminoácidos importantes en la regulación de glucosa y el nitrógeno corporal como son la alanina y la glutamina. La regulación de la concentración de estos aminoácidos es a través de su degradación. El primer paso de este proceso que es común para los tres AACR, lo realiza la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (TAACR). Este paso se lleva a cabo en tejidos extrahepáticos. Existen dos isoformas de TAACR: la mitocondrial (TAACRm) la cual se encuentra en la mayoría de los tejidos, y la citosólica (TAACRc) que solo está en cerebro, ovario y placenta. A diferencia de las demás enzimas degradadoras de aminoácidos, la TAACR no se regula por concentración de proteínas en la dieta o por hormonas. Actualmente, se sabe que sólo bajo ciertas condiciones la enzima aumenta su expresión, como es el caso del hígado fetal (a diferencia del hígado adulto de rata, donde la enzima tiene baja expresión) y la glándula mamaria de rata lactante (particularmente en el día 12 de lactancia). Estas condiciones se asocian con altas tasas metabólicas, específicamente de síntesis de proteínas o generación de otros sustratos a partir de estos aminoácidos, y también de proliferación celular. Es importante mencionar que la cantidad de ARN mensajero, cantidad de proteína y actividad de la enzima, se encuentran relacionadas de tal manera que la regulación de la TAACR es transcripcional, es decir a nivel de su promotor el cual no se ha identificado. Por tal motivo el presente trabajo tuvo como objetivo, aislar y caracterizar la región promotora del gen de la TAACRm de la rata, con la finalidad de aportar datos para el entendimiento de la regulación de esta enzima. Mediante la metodología de "caminar sobre el ADN" se aisló un fragmento de 1100 pb de la región promotora de TAACRm. Posteriormente, por medio de SMART-RACE, se identificó el sitio de inicio de la transcripción, a 75 pb del primer exon y 82 pb del codón de inicio. Con la secuencia del promotor se analizaron los elementos potenciales de respuesta por medio de un programa computacional (matinspector). De estos elementos, los más importantes son los relacionados con el factor nuclear de hepatocitos 4 (HNF4) y con el receptor de ácido retinoico (RAR), factores asociados con metabolismo y proliferación celular.

Se hicieron las delecciones del promotor para analizar estos elementos potenciales de respuesta, y se evaluó su funcionalidad empleando el gen reportero de luciferasa. De los experimentos de funcionalidad en células RIN-m5f, se observó que la delección del elemento de respuesta HNF4 disminuyó 0.5 veces la expresión del gen reportero con respecto a la actividad del vector vacío, lo que indica que este elemento es importante para su funcionalidad. Por otro lado, la delección del elemento de RAR produjo un aumento de 2 veces la actividad de luciferasa. Interesantemente en esta región eliminada existen varios sitios de octámeros los cuales pueden ser represores que regulen la expresión de TAACRm, o quizás el elemento de respuesta de RAR sea un supresor. Para determinar con precisión la secuencia responsable de la represión se recomiendan hacer las construcciones eliminando los octámeros, o mutando específicamente el elemento de RAR. Estos experimentos aportan información sobre los mecanismos de regulación de la TAACRm, la cual es una enzima importante en el metabolismo de los AACR que son relevantes para el control del metabolismo de nitrógeno corporal.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada.

Los aminoácidos de cadena ramificada (AACR), leucina, isoleucina y valina son indispensables para los mamíferos (Brody, 1994), por lo que deben obtenerse a través de los alimentos. Estos forman alrededor del 50% de los aminoácidos indispensables provistos por la dieta (ver tabla 1.1), de ahí que no existen enfermedades asociadas con su deficiencia. Asimismo, representan aproximadamente el 52 % de las proteínas del músculo (Harper et al, 1984, Layman, 2003). Los AACR libres intervienen en diferentes funciones:

- A) Estimulación de la síntesis de proteínas. El suministro de leucina en animales sometidos a ejercicio exhaustivo o en ayuno (condiciones que favorecen el catabolismo), estimula la síntesis de proteínas (Layman, 2003 y Hamel et al, 2003).
- B) Producción de energía. El catabolismo de los AACR genera energía, así la leucina y la isoleucina producen 40 moles de trifosfato de adenosina (ATP) por mol de aminoácido, mientras que la oxidación de la valina genera la mitad. La aportación de energía provista por los AACR es igual a la producida por tirosina y fenilalanina (aminoácidos que generan grandes cantidades de ATP), sin embargo, éstos últimos no son tan abundantes como los de cadena ramificada (Ichihara, 1999). En algunos padecimientos se genera un catabolismo excesivo de AACR, lo que puede producir desequilibrios metabólicos. Por ejemplo, en pacientes con cirrosis hepática la concentración de AACR disminuye en la sangre debido a que el músculo aumenta la degradación de éstos (por la activación de la deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada (DCCR)) para producir más energía, y como consecuencia se puede presentar un desequilibrio de neurotransmisores en el cerebro, lo que puede dar origen a un coma hepático (Ichihara, 1999 y Taniguchi et al, 1996; Doering et al, 2000).
- C) Donadores de nitrógeno *de novo* para la producción de alanina y glutamina (Holecek et al, 2001).

Cuando el organismo se encuentra en un estado catabólico, el músculo libera aminoácidos para compensar la pérdida de éstos en otros órganos, principalmente se liberan

Tabla 1.1. Comparación del contenido de los AACR con el resto de los aminoácidos indispensables en diferentes alimentos (mg de aminoácido/ g de nitrógeno). Abreviaturas: Trp, triptofano; Thr, treonina; Ile, isoleucina; Leu, leucina; Lys, lisina; Met, metionina; Phe, fenilalanina; His, histidina.

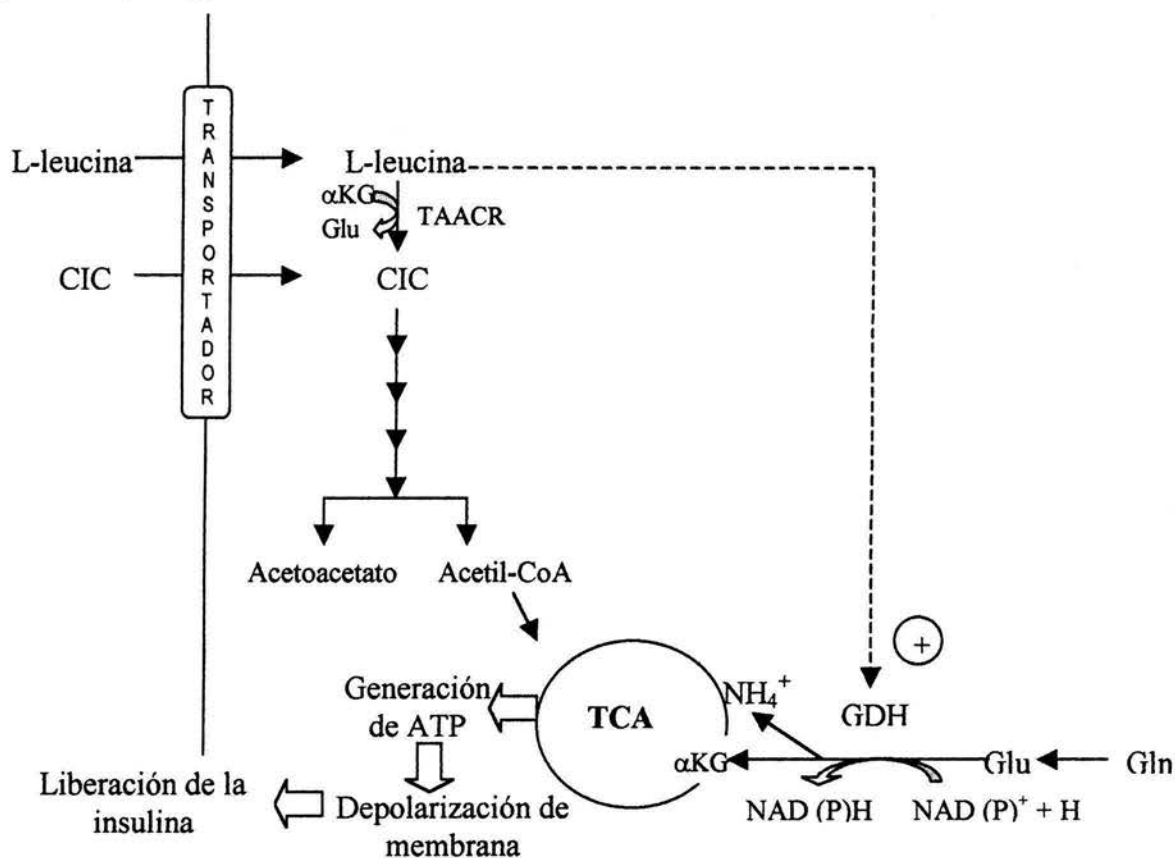
Alimento	Trp	Thr	Ile	Leu	Val	Lys	Met	Phe	His	% de AACR
Arroz	64	233	279	513	416	235	107	299	100	53.7
Caseína de la leche	84	269	412	632	465	504	194	339	190	48.85
Pastas	66	204	282	571	321	184	95	301	114	54.91
Elote	39	255	232	687	390	231	122	350	161	53
Frijol	58	271	355	573	379	464	63	345	178	48.65
Queso crema	57	289	368	654	388	381	511	162	197	46.65
Tocino	65	210	274	500	298	403	97	298	169	46.32
Tortilla de maíz	33	253	372	1012	328	156	120	272	138	63.7
Zanahoria	50	223	240	339	291	270	54	219	86	49.09
Carne asada	243	919	1089	1705	1155	1818	516	856	--	47.5
Huevo	246	745	983	1301	1096	955	454	853	--	50.9

Datos tomados de las tablas de los valores nutritivos de Méndez, 1990.

alanina y glutamina. La producción de estos aminoácidos se ha relacionado con los AACR de la siguiente manera: en condiciones catabólicas los AACR son rápidamente transaminados con el α -cetoglutarato para producir glutamato. El glutamato captura amonio por medio de la glutamina sintetasa formando glutamina. Además, el glutamato puede transaminarse con el piruvato para formar alanina. Los aminoácidos liberados en mayor concentración a la circulación sanguínea son la alanina y la glutamina, los cuales transportan el nitrógeno al hígado y pueden ser utilizados como fuente de energía. Se ha sugerido que la pérdida de glutamina del músculo disminuye la síntesis de proteínas en el órgano (Gore y Wolfe, 2002).

De los 3 aminoácidos el más abundante es la leucina (May et al, 1987). La leucina posee características particulares. Por ejemplo, se sabe que este aminoácido regula la actividad de la glutamato deshidrogenasa y de la ornitina-cetoácido aminotransferasa, las cuales controlan la cantidad de α -cetoglutarato y glutamato (Ikeda et al, 1976). Se ha visto que también la isoleucina puede regular a la glutamato deshidrogenasa en menor grado. Además condiciones de acidez también controlan la actividad de la enzima (Zhou et al, 1996). La leucina incrementa la oxidación de isoleucina y valina, mientras que la isoleucina y valina no afectan la degradación de leucina (Torres et al, 1993). Este efecto se ha descrito como el antagonismo de los aminoácidos de cadena ramificada aunque su mecanismo no se ha esclarecido completamente. La leucina y su correspondiente cetoácido, el α -cetoisocaproato (CIC), se han asociado con la estimulación de la producción de insulina en las células pancreáticas a través de la producción de ATP (Panten et al, 1972; Giroix et al, 1999; Krause et al, 2002) (figura 1.1); es importante mencionar que la leucina tiene un mayor efecto sobre la producción de esta hormona que el CIC. Por otro lado, se sabe que en el proceso de degradación de la valina se genera un metabolito tóxico, el metilacrilil-CoA, que reacciona con los grupos tioles libres de proteínas y con el glutatión reduciendo su actividad biológica. Este metabolito se elimina por acción de las enzimas crotonasa y la 3-hidroxiisobutiril-CoA (coenzima A) hidrolasa (Taniguchi et al, 1996). *In vitro* se ha observado que la deficiencia de AACR afecta a células de la respuesta inmune. Linfocitos B humanos transformados con el virus de Epstein Barr en ausencia de AACR, detienen su crecimiento en la fase G1 del ciclo celular (Doering y Danner, 2000).

Figura 1.1. Efecto de la leucina y el CIC en la secreción de insulina en islotes de páncreas. La leucina y el CIC al entrar a la célula siguen el proceso de degradación hasta producir acetoacetato y acetil-CoA. El acetil-CoA es susceptible de entrar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y producir ATP, el cual al acumularse en la célula estimula la entrada de K^+ y la salida de Ca^{+2} junto con la insulina. Se propone que la leucina puede estimular a la glutamato deshidrogenasa (GDH), para producir α -cetoglutarato (α -KG) partir de glutamato, así el α -KG entraría al TCA y produciría ATP. Abreviaturas: Gln, glutamina; Glu, glutamato



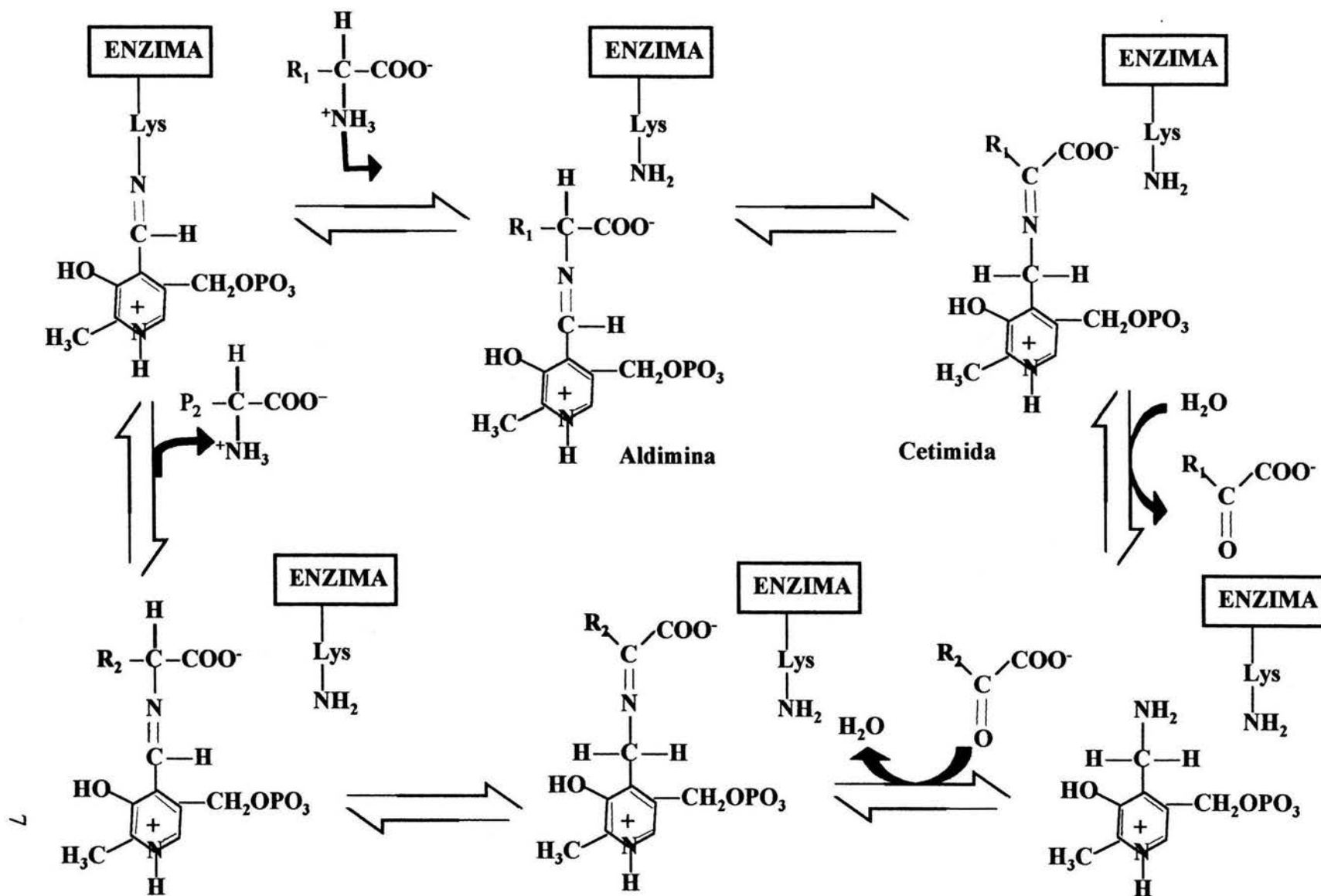
1.2. Catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada.

A diferencia del resto de los aminoácidos, los AACR comparten las dos primeras etapas en su ruta de degradación. El primer paso de su catabolismo es una transaminación reversible (Torres et al, 1993) a sus correspondientes α -cetoácidos de cadena ramificada (CACR), donde el grupo α -amino de los AACR es transferido al carbono α del aceptor fisiológico, el α -cetoglutarato. Aunque también se puede transferir el α -amino al α -ceto β -metilbutirato y al α -cetobutirato (Harper et al, 1984). Los productos de la transaminación

son el glutamato y los correspondientes CACR que son el α -cetoisocaproato (CIC) en el caso de leucina, el α -ceto β -metilvalerato (CMV) en la isoleucina y el α -cetoisovalerato (CIV) en la valina. Esta reacción es catalizada por la aminotransferasa de los aminoácidos de cadena ramificada (TAACR EC 2.6.1.42) localizada en el citoplasma y mitocondria de órganos extrahepáticos (Hutson, 1988; Hall et al, 1993). El mecanismo de la reacción de transaminación está clasificado como de ping-pong (Sugio et al, 1995). Este tipo de reacciones ocurren en dos etapas, que a su vez comprenden varias subetapas. En el caso de la TAACR se lleva a cabo de la siguiente manera (Figura 1.2): la lisina del sitio activo de la TAACR se encuentra unida al fosfato de piridoxal (FP) de forma covalente. La unión formada entre el grupo aldehído del FP y el grupo α -amino de la lisina, $-\text{CH}=\text{N}-$, se denomina base de Schiff. Cuando un aminoácido sustrato está cerca del sitio activo de la enzima, su grupo amino desplaza al grupo amino de la lisina proveniente de TAACR. En consecuencia se forma la base de Schiff entre el aminoácido sustrato y el FP; a esta especie química se le llama aldimina, en la cual la doble ligadura está entre el nitrógeno del amino proveniente del aminoácido sustrato y el carbono del grupo aldehído del FP. Posteriormente la doble ligadura de la especie cambia de posición produciendo una cetimida (la doble ligadura está entre el nitrógeno y el carbono del aminoácido sustrato). A continuación se produce la hidrólisis de la cetimida liberando un α -cetoácido y produciéndose un fosfato de piridoxamina. En las siguientes etapas ocurren las reacciones inversas a la formación del cetoácido, puesto que la enzima ahora recibe un cetoácido, para dar origen a un segundo aminoácido. La reacción de transaminación es reversible en un 80% (Tropp, 1997; Devlin, 1999).

El objetivo de la reacción de transaminación es transferir los grupos amino de los aminoácidos al α -cetoglutarato para formar glutamato. El glutamato tiene varias funciones como son: la síntesis de glutamina y aspartato importantes aceptores de nitrógeno, la síntesis de monofosfato de adenosina (AMP) y monofosfato de inosina (IMP) a través del ciclo del nucleótido de purina. Además, participa como neurotransmisor para estimular algunos canales iónicos en el cerebro, e interviene en la eliminación del nitrógeno proveniente de los diferentes aminoácidos en forma de urea (Nelson y Cox, 2000). El glutamato como grupo aceptor se puede originar del α -cetoglutarato, a través de la glutamato deshidrogenasa la cual se encuentra en la mitocondria. La transaminación en el

Figura 1.2. Mecanismo de transaminación. La figura muestra los diferentes desplazamientos que sufre el FP del sitio de unión a la enzima, por parte del aminoácido₁ y el α-cetoácido₁; para finalmente producir un cetoácido₂ y un aminoácido₂. En la figura las R son diferentes sustituyentes del aminoácido.

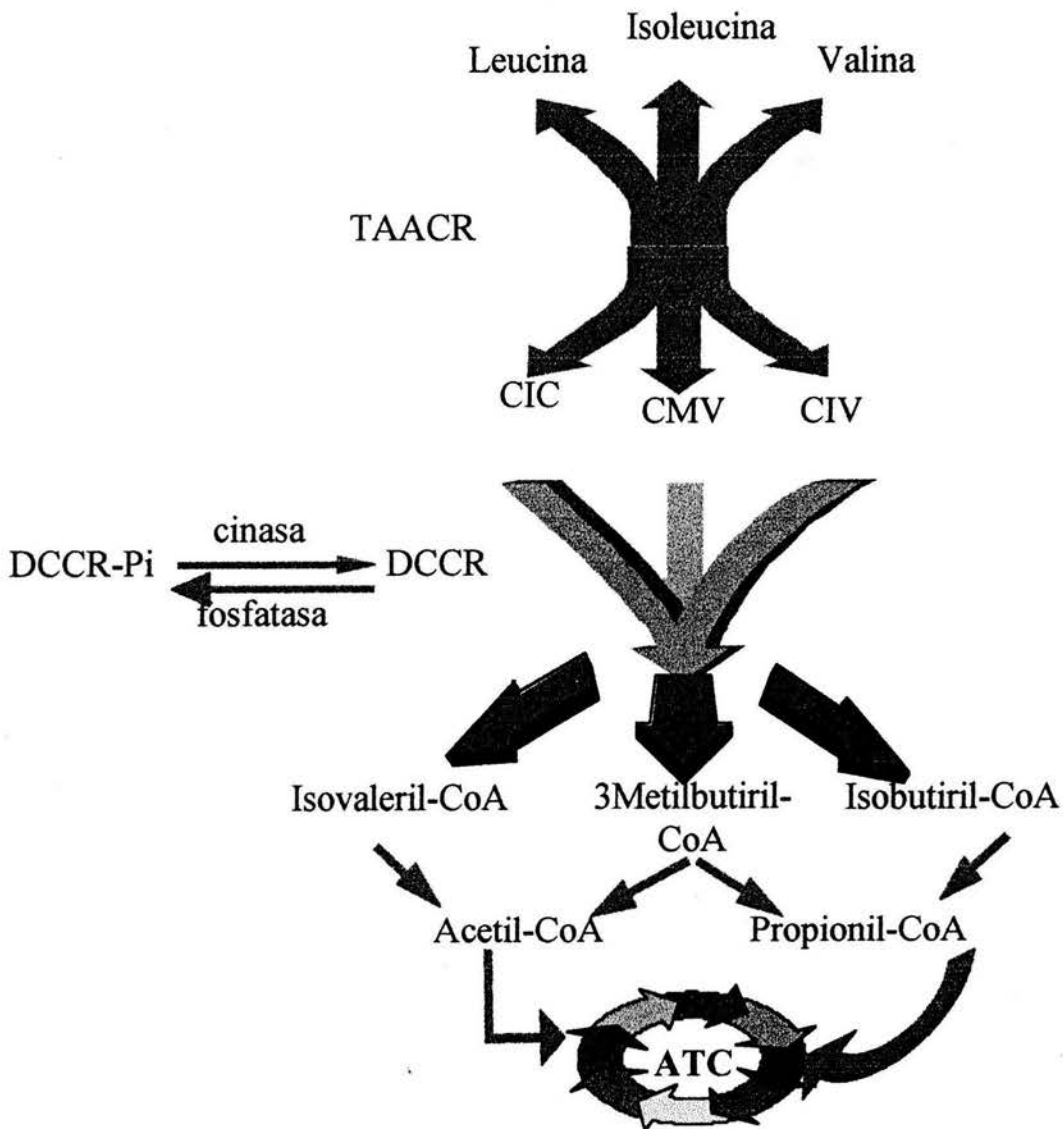


caso de TAACR es importante, ya que por medio de esta reacción se puede controlar la concentración de AACR disponibles (Shirai y Ichihara, 1971).

Los CACR pueden ser reaminados a sus respectivos aminoácidos (Ichihara, 1985) o ser descarboxilados irreversiblemente. Los productos de la descarboxilación son derivados de CoA con un carbón menos debido a la liberación de una molécula de dióxido de carbono. Este paso es catalizado por la DCCR, la cual es un complejo multienzimático que está formado por 3 subunidades catalíticas asociadas por interacciones no covalentes: (A) descarboxilasa de los cetoácidos de cadena ramificada (E1b) formada por dos subunidades α (47 kDa cada una) y dos β (38 kDa cada una), que contienen a la tiamina pirofosfato como grupo prostético; (B) la dihidrolipoil transacilasa (E2b) con lipoato como grupo prostético con una masa de 51 kDa; y (C) la dihidrolipoil deshidrogenasa (E3b) que contiene el dinucleótido de flavina y adenina como grupo prostético localizado en la superficie interna de la membrana mitocondrial, con una masa de 55 kDa (Harris et al, 1986). Además, existen otros grupos prostéticos que se requieren para la actividad de la enzima, la coenzima A y el dinucleótido de nicotinamida y adenina; también se requiere de calcio y magnesio. La afinidad de la DCCR varía dependiendo del sustrato, el CIC es el más afín a este complejo (Harper et al, 1984). Posteriormente los productos de la descarboxilación oxidativa por la DCCR siguen diferentes rutas de oxidación, a través de un complejo de enzimas similares a las involucradas en la oxidación de ácidos grasos, donde los productos resultantes se pueden incorporar al ciclo de los ácidos tricarbónicos (Harper et al, 1984; Harper, 1984) (figura 1.3). Las alteraciones en esta enzima producen la enfermedad llamada “jarabe de arce”, que es un error genético caracterizado por la baja o ausencia de actividad de DCCR. En el padecimiento de jarabe de arce se acumulan los AACR y sus cetoácidos correspondientes. Algunos de los síntomas que muestran los pacientes con esta enfermedad son el retardo mental y atrofia física que pueden llegar a producir coma y la muerte (McConnell et al, 1997).

En rata la actividad de la DCCR es alta en hígado, intermedia en riñón, estómago y corazón, y baja en músculo esquelético, tejido adiposo y cerebro (Harper et al, 1984). Por tal motivo, la descarboxilación oxidativa de los CACR principalmente se lleva a cabo en el hígado de este organismo (Suryawan et al, 1998).

Figura 1.3: Vía de degradación de los AACR. En el esquema se muestra el proceso por el cual los AACR, son transformados hasta acetyl-CoA y propionil-CoA. En la primera etapa ocurre una transaminación por la TAACR, produciendo los correspondientes α -cetoácidos (CIC, CMV, CIV). El siguiente paso es una descarboxilación que se lleva a cabo por DCCR, la cual puede ser regulada por fosforilaciones y defosforilaciones. Los productos de la oxidación son derivados de CoA de los cetoácidos. Finalmente cada uno de estos compuestos siguen diferentes vías de degradación para producir acetyl-CoA y propionil-CoA, dependiendo del caso. Estos compuestos pueden entrar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ATC).



La regulación de la DCCR es más compleja en la etapa adulta debido a cambios hormonales y dietarios (Doering et al, 1998). Uno de los principales mecanismos de regulación de la DCCR es la fosforilación de la enzima, específicamente en los residuos de serina 293 y serina 303 de la subunidad E1b. Cuando la DCCR está fosforilada es inactiva mientras que desfosforilada es activa. La enzima encargada de la fosforilación es la cinasa de la DCCR (Damuni y Reed, 1987). La cinasa se encuentra en altas concentraciones en la mitocondria de músculo esquelético adulto en rata y ratón, mientras que en hígado la cantidad de esta cinasa es muy baja, y en corazón, riñón y cerebro se presenta una cantidad intermedia. La cinasa es inhibida por el α -cetoisocaproato, el α -cloroisocaproato y el clofibrato, y es activada por potasio y fosfato inorgánico (Harris et al, 1994).

Las concentraciones elevadas de NADH, de los ésteres de CoA y ATP, una dieta baja en proteínas y la carencia de AACR regulan negativamente a la DCCR. Mientras que factores como los glucocorticoides la regulan positivamente. El sexo del organismo, así como a lo largo del día y la noche tienen efecto sobre la enzima, por ejemplo durante el día, la DCCR es activa en hembras y machos, mientras que en la noche la enzima en hembras es inactiva y en machos es activa (Harris et al, 2001; Doering y Danner, 2000; Harris et al, 1986; Harper et al, 1984).

Los dos productos finales de la degradación de la leucina son el acetoacetato y la acetil-CoA, los cuales permiten considerar a este aminoácido como cetogénico. Los productos de la degradación de la isoleucina son la propionil CoA y la acetil CoA. La propionil CoA es el único producto de la degradación de la valina, éste se transforma a succinil CoA por medio de la metilmalonil CoA mutasa. La succinil CoA se incorpora al ciclo de los ácidos tricarbónicos para producir posteriormente oxaloacetato, el cual, por medio de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas, es convertido en fosfoenolpiruvato y así entra en la vía de la gluconeogénesis. Por lo tanto la isoleucina es un aminoácido cetogénico y gluconeogénico (Nelson y Cox, 2000).

1.3. Aminotransferasa de los aminoácidos de cadena ramificada.

La TAACR se encuentra en mamíferos, plantas, bacterias, hongos, donde en la mayoría de los casos se conserva el patrón de distribución de ésta. En cuanto a la actividad y estructura de la enzima hay variaciones entre los organismos (Ooiwa et al, 1995; Papet et

al, 1992; Faure et al, 1999; Wallin et al, 1990; Bonfils et al, 2000 y Faure et al, 1999), por ejemplo la actividad de TAACR en rata es 10 veces más alta que en humano como se muestra en la tabla 1.2 (Suryawan et al, 1998). Es importante mencionar que el músculo esquelético de rata es el principal órgano donde se lleva a cabo la transaminación de los AACR, aun cuando la actividad de la enzima es baja en el músculo, este hecho tiene su explicación en la masa total de este órgano en el cuerpo (músculo representa alrededor del 40% de la masa corporal). Hay autores que consideran la disponibilidad del α -cetoglutarato, como una posible explicación de la variabilidad de la actividad de la enzima (Frick et al, 1988). Igual que para el caso de la DCCR, existen reportes de variaciones en la actividad de la TAACR asociadas con el sexo del organismo; por ejemplo, en rata la actividad de TAACR es alta en músculo esquelético de machos que en hembras (Yan y Birkhahn, 1997).

Tabla 1.2. Distribución de la actividad de TAACR en rata, humano y mono (U/ g de peso húmedo)

Tejido	Rata	Humano	Mono
Corazón	4894 \pm 216	387 \pm 23	ND
Músculo	1599 \pm 60	124 \pm 14	245 \pm 29
Cerebro	1944 \pm 94	510 \pm 49	434 \pm 39
Hígado	78 \pm 5	248 \pm 32	250 \pm 29
Riñón	3486 \pm 142	880 \pm 48	1215 \pm 133
Páncreas	11088 \pm 1187	NA	1790 \pm 185
Estómago	5842 \pm 415	447	559 \pm 57
Intestino delgado	489 \pm 22	241 \pm 11	383 \pm 22
Colon	894 \pm 37	254 \pm 23	NA
Adiposo	166 \pm 16	84 \pm 4	98 \pm 10

ND no determinado. Cuadro tomado de Suryawan et al, 1998.

1.4. Isoformas de la TAACR

Los primeros reportes de la transaminación de aminoácidos de cadena ramificada fueron en extractos de bacteria (Hutson et al, 1992, Feldman y Gunsalus, 1950), donde la

enzima interviene en la biosíntesis de los AACR y en su degradación. A partir de *Salmonella typhimurium* se cristalizó la TAACR, y se observó que la enzima es un hexámero. En *E. coli* existen varias transaminasas denominadas A (sustrato: leucina y aminoácidos aromáticos), B (sustrato: AACR) y C (sustrato: valina y piruvato) (Ichihara,1985; Atilés et al, 2000). La transaminación en bacteria produce reactivos que sirven para la generación de energía metabólica, regulación de la relación NADH/ NAD⁺ y el reciclaje de glutamato a partir de α -cetoglutarato (Kagamiyama y Haysahi, 2000).

Como se mostrará a continuación, en el caso de los mamíferos la TAACR posee diferentes características de su homóloga en bacterias. En 1966 se purificó la proteína, y en un principio se determinó la presencia de 3 isoformas de TAACR designadas como I (mitocondrial), III (citosólica) y II. La enzima II se localizaba exclusivamente en el hígado adulto y solo utilizaba como sustrato a la leucina con una Km de 25mM, lo que indicaba una baja afinidad de la enzima por el sustrato. La Km representa la cantidad de sustrato a la cual una enzima alcanza la mitad de la velocidad máxima. Su significado biológico está asociado con la afinidad de la enzima por los sustratos, así, si una enzima tiene una Km pequeña para cierto sustrato, esto indica que el sustrato es muy afín a la enzima, y ocurre lo contrario si la Km es grande. Posteriormente se demostró que la isoenzima II no existe, y que posiblemente la actividad de transaminación de AACR se debiera a que otra enzima pudiera utilizar estos aminoácidos como sustratos con muy baja afinidad. Actualmente solo se reconocen dos isoformas, la mitocondrial y la citosólica. Las proporciones de las dos isoformas de TAACR varían de tejido a tejido (Harper et al, 1984). La secuencia madura de TAACR mitocondrial en rata conserva un porcentaje de identidad de 82%, 95% y 45% con la de humano, de ratón y de eucariontes inferiores, respectivamente (Bledsoe et al, 1997; Bonfils et al, 2000; Goodwin et al, 1987; Faure et al, 1999; Kadowaki et al, 1982; Conway y Hutson, 2000).

Aunque en la actualidad no se tiene claro por qué se requiere de dos isoenzimas, algunos autores consideran las siguientes funciones de cada una de las isoformas:

*La TAACRm es empleada en el metabolismo oxidativo, ya que está en el mismo lugar que la DCCR (en mitocondria).

* La TAACRm ha sido considerada como un transportador de cetoácidos en la membrana mitocondrial, ésto se basa en los siguientes experimentos: en ensayos con

mutantes en los transportadores ABC de levadura, se ha observado que al introducir la enzima de TAACRm en las mutantes, Bap2, se restablece la actividad de transportador ABC. Por otro lado, estudios sobre el transportador de CACR que está en mitocondria de corazón de rata, han mostrado que el transportador comparte algunas de las características con la TAACRm, por lo que se sugiere que estas dos proteínas son la misma. Se ha demostrado que las cisteínas son esenciales tanto para la actividad enzimática de TAACRm como para el transporte de CACR a la mitocondria (Drow et al, 2000; Hutson et al, 1990; Hutson y Hall, 1993).

Asimismo, existen reportes (Montamat et al, 1988) sobre la presencia de TAACR tanto mitocondrial como citosólica en células espermáticas y espermatozoides de ratones. Montamat apoya la evidencia de que la transaminasa puede funcionar como un sistema de transporte α -cetoácidos del citosol a la mitocondria en las células espermáticas.

*En el caso de la citosólica solo posee la actividad de transaminación, en el cerebro se ha asociado con el balance de nitrógeno (Bixel et al, 1997).

La proteína de TAACRm en rata tiene 365 aminoácidos, con una presecuencia de 27 aminoácidos que codifica una secuencia que permite su direccionamiento hacia la mitocondria. El corte de la presecuencia ocurre entre una cisteína y una valina que es precedida por una arginina en la posición -2. La longitud total de ARN mensajero de la proteína es de 1.7 kb. El peso molecular de la proteína madura calculado a partir de su ADN complementario (ADNc) es de 41,300 Da, que coincide con el peso de la proteína aislada del extracto mitocondrial del corazón de rata determinado por SDS-PAGE (41,500 Da) (Hutson y Hall, 1993; Hutson et al, 1995). El peso molecular de la enzima no procesada es de 44,300 Da. La enzima pertenece al grupo de enzimas dependientes de fosfato de piridoxal que incluyen a la 4-amino-4-desoxicorismato liasa y a la D-alanina aminotransferasa (D-AAT) (Bledsoe et al, 1997). En el caso de la TAACRc, ésta contiene 410 aminoácidos con un peso molecular de 46,000 Da (Hutson et al, 1995).

En lesiones de cerebro, específicamente en la sustancia nigra, se ha visto un aumento en la expresión de la TAACRc y se ha postulado que la expresión de esta enzima está asociada con una etapa inicial en la apoptosis, aunque no ha sido confirmado (Kholodilov et al, 2000; Bixel et al, 1997; Hutson, 1998).

1.5. Especificidad de sustrato.

Los sustratos de la TAACRc y la TAACRm son semejantes (Harper, 1984). En concentraciones iguales de AACR las tasas de transaminación son: la leucina mayor que la isoleucina y, esta última, mayor que la valina (Leu > Ile > Val). Otros sustratos de las TAACR's son la norleucina y la norvalina. La metionina no es un buen sustrato de la enzima, ya que solo se transamina menos del 10% comparada con leucina. La TAACRm acepta también como sustratos al α -aminobutirato y α -aminoadipato (Hall et al, 1993; Taylor y Jenkins, 1966). En la tabla 1.3 se muestran los diferentes sustratos de las isoformas de TAACR.

Existen diferencias entre las isoformas en cuanto a su afinidad por los sustratos, estas diferencias se pueden observar al analizar las Km. La Km de la TAACRm es de 0.4 a 0.8 mM para la leucina e isoleucina y de 1.2 a 2.5 mM para la valina; mientras que la Km de TAACRc es aproximadamente 2 veces más bajo que la de TAACRm (Hutson, 2001). Estos valores son de 2 a 6 veces la concentración fisiológica de leucina e isoleucina encontradas en tejidos y de 4 a 10 veces la concentración de valina (Harper et al, 1984).

Tabla 1.3: Tasas de transaminación de TAACRc y TAACRm expresadas en relación a leucina en rata. La TAACRc (79.3 μ mol de leucina formada/ mg de proteína/ min) y la TAACRm (86.7 μ mol de leucina formada/mg de proteína/ min).

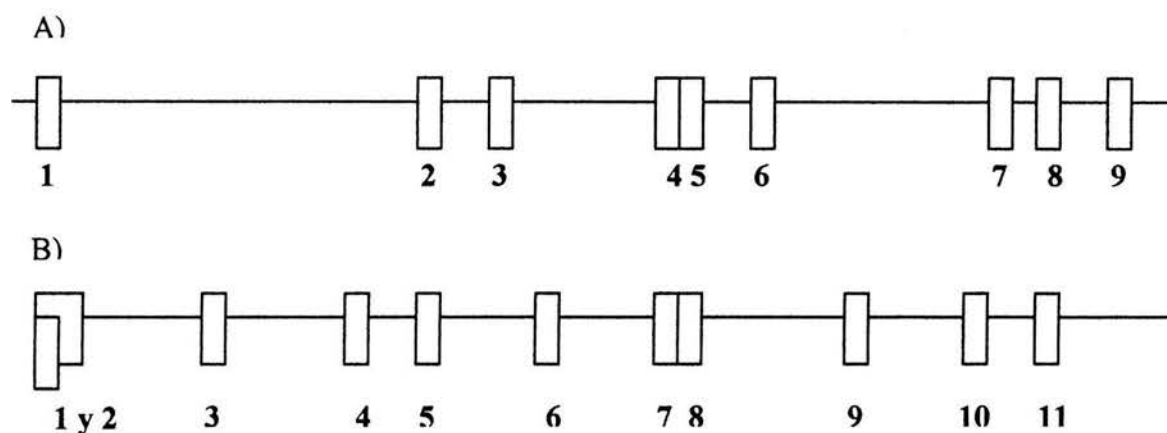
Aminoácido	TAACRc Tasa relativa %	TAACRm Tasa relativa %	Cetoácido	TAACRc Tasa relativa %	TAACRm Tasa relativa %
Leucina	100	100	CIC	100	100
Valina	71 \pm 3	88 \pm 4	CIV	82 \pm 4	64 \pm 3
D-Isoleucina	5 \pm 1	1 \pm 1	CMV	54 \pm 5	68 \pm 1
Glutamato	29 \pm 3	29 \pm 1	α - cetogluturato	76 \pm 4	68 \pm 4
Norleucina	24 \pm 3	21 \pm 1	α - cetocaproato	43 \pm 4	44 \pm 2
Norvalina	27 \pm 1	37 \pm 1	α - cetovalerato	58 \pm 4	56 \pm 1
Metionina	8 \pm 1	6 \pm 1	α - cetobutirato	22 \pm 4	20 \pm 3
Triptofano	2 \pm 1	1 \pm 0	α -ceto- β - metilbutirato	36 \pm 1	40 \pm 3
Fenilpiruvato	4 \pm 2	6 \pm 1	Piruvato	6 \pm 2	6 \pm 1

Tomado de Hall et al, 1993

1.6. Genes que codifican las isoformas de TAACR.

En el genoma de la rata las isoformas de transaminasa se encuentran localizadas en los siguientes cromosomas: en el cromosoma 1 se ubica la isoforma mitocondrial, mientras que en el cromosoma 4 está la isoforma citosólica (Bledsoe et al, 1997 y Wallin et al, 1990). En cuanto a la estructura del gen de la TAACRm, se sabe que posee 9 exones separados por 8 intrones. En el caso del gen de TAACRc tiene 11 exones y 8 intrones. Los arreglos de los genes se muestran en la figura 1.4.

Figura 1.4. Estructura del gen de TAACRm (A) y del gen TAACRc (B) en rata, los cuadros son los exones y las líneas son los intrones.

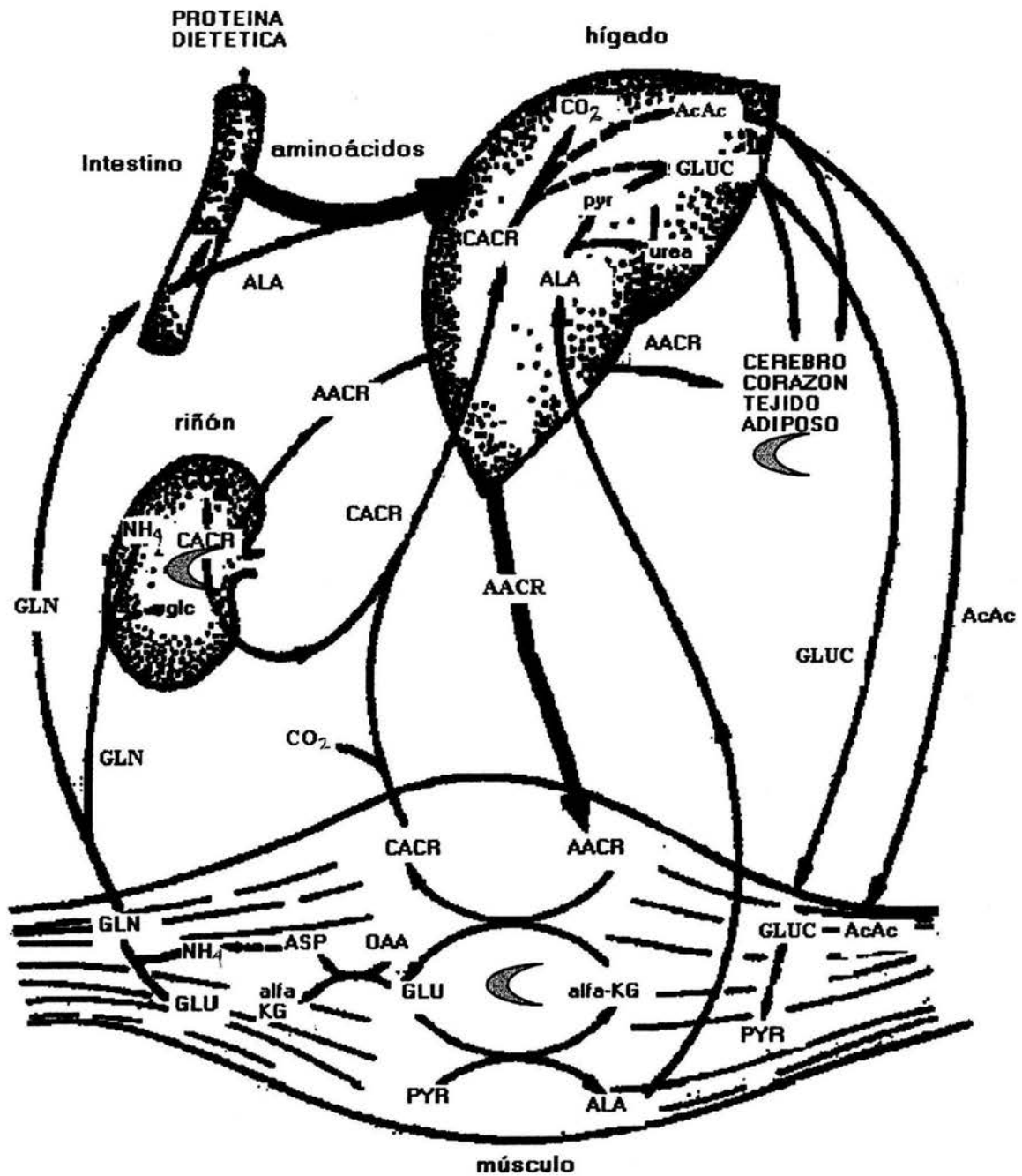


1.7. Distribución de la TAACR en los tejidos.

La TAACRm es una enzima ampliamente distribuida en los órganos extrahepáticos, mientras que la TAACRc su distribución es restringida a cerebro, ovario y placenta. La figura 1.5 muestra la vía que siguen los AACR en su catabolismo dentro del organismo. La actividad de la TAACRm en rata es variable dependiendo del órgano, por ejemplo el corazón y el páncreas son los órganos de mayor actividad, mientras que el hígado adulto tiene la actividad más baja como se muestra en la tabla 1.4 (Hutson et al, 1988; Goto et al, 1997).

Estudios recientes (Sweatt et al, 2004) de la localización de las isoformas en ratas muestran que la TAACRm se encuentra en el tubo digestivo, incluyendo esófago, duodeno y glándulas salivales (la actividad fue entre 24 y 40 % comparándola con la de páncreas), las células epiteliales que revisten el estómago poseen grandes cantidades de la TAACRm;

Figura 1.5. Órganos que intervienen en la vía de degradación de AACR. Los aminoácidos de las proteínas de la dieta pasan al hígado. La mayoría de los aminoácidos pueden ser degradados aquí, sin embargo los AACR son enviados a tejidos extrahepáticos, donde se encuentra la TAACR (media luna), primera enzima en el proceso de degradación de estos aminoácidos. Los CACR producidos en la reacción de transaminación son principalmente descarboxilados en el hígado. Abreviaturas: PYR, piruvato; GLUC, glucosa; GLN, glutamina; alfa-KG, α -cetoglutarato; OAA, oxalacetato; AcAc, acetoacetato; ALA, alanina.



mientras que la actividad más baja fue encontrada en yeyuno, ileon y colon, los cuales presentan del 5 a 8 % de los niveles pancreáticos. Considerando los tipos celulares que poseen la transaminasa, los autores sugieren que la enzima se encuentra en células que secretan enzimas. Se examinó la presencia de TAACRm en otros órganos como corazón (miofibras), riñón (células epiteliales de la corteza con altas concentraciones de la enzima, y glomérulos con baja concentración), páncreas (alta concentración en células acinares, y menor en islotes), testículos (células de Leydig), vaso, útero (células epiteliales secretoras), pulmón (epitelio alveolar y bronquial), timo, tracto reproductivo femenino (en los folículos ováricos). Por otro lado, en este estudio se pensaba que la TAACRc, se encontraba distribuida en otros órganos. Al emplear anticuerpos específicos para la isoforma citosólica, se observó por ejemplo que el estómago tiene la TAACRc, específicamente en los nervios que lo irrigan, lo mismo ocurrió para otros órganos que presentaban la isoforma. Con estas investigaciones se corrobora que la TAACRc solo está en neuronas (Sweatt et al, 2004).

Tabla 1.4. Actividad de la TAACRc y la TAACRm en mitocondria y citosol de los diferentes órganos y células. En la tabla se presenta la actividad de la enzima en los órganos y células, la cual se verifica con el uso de anticuerpos específicos para cada isoforma.

Tejido	Actividad de TAACR (nmol/mg de proteína/min)	Efecto de anticuerpo en la actividad de TAACR TAACRm y TAACRc % de actividad permanente	
Mitocondria			
Corazón	748±15	0	100
Mezcla de músculo	334±35	0	100
Riñón	411±6	0	100
Páncreas	5055±505	0	100
Hígado adulto	1±0	3	100
Hígado fetal	264±15	0	100
Cerebro	73±6	68	33
Placenta	180-215	0	100
Ovario	191-216	0	92
Citosol			
Cerebro	75±8	100	0
Placenta	8-9	100	14
Ovario	51-60	79	26
Células			
Hepatoma	6.67±1.04	0	100

NM: No medido

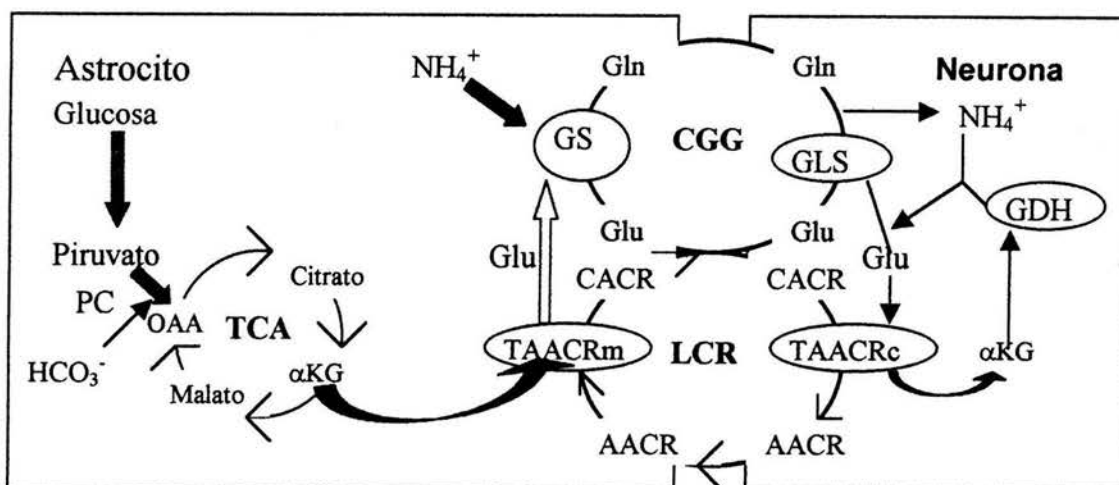
Se creía que la TAACRc era la única isoforma de transaminasa existente en cerebro, sin embargo, en estudios realizados con astrocitos se detectó la presencia de la TAACRm. Además se sabe que la entrada de leucina a cerebro es mayor que la de otros aminoácidos. Como los AACR en astrocitos son principalmente transaminados más que oxidados, se les ha considerado como donadores de nitrógeno (Zielke et al, 1997). La interacción entre los astrocitos y las neuronas es de la siguiente manera: los AACR entran a los astrocitos, donde sufren una transaminación (TAACRm) y su grupo amino es enviado al α -cetoglutarato para dar origen al glutamato, que posteriormente se transforma en glutamina. Ya que los cetoácidos formados son pobremente oxidados en astrocitos, éstos son enviados a las neuronas junto con la glutamina formada. En neuronas, la glutamina se desamina por acción de la glutaminasa produciendo glutamato éste junto (solo una parte) con los α -cetoácidos de cadena ramificada es transaminado (TAACRc) dando origen a los respectivos AACR. Parte del α -cetoglutarato producido en las neuronas experimenta una aminación reductiva a glutamato via glutamato deshidrogenasa. Los AACR y el glutamato restante son posteriormente enviados a astrocitos. El astrocito convertirá el glutamato a glutamina, y de nueva cuenta la enviará junto con los α -cetoácidos de cadena ramificada a las neuronas (Hutson et al, 1998). Los intercambios de aminoácidos entre los dos tipos celulares se han asociado con el ciclo de glutamato/ glutamina. El glutamato es un aminoácido excitatorio, de tal manera que es liberado por las neuronas dentro del espacio sináptico durante la actividad neuronal, el glutamato es rápidamente removido por astrocitos cercanos para producir glutamina. La glutamina de los astrocitos es posteriormente enviada a las neuronas, para mantener la poza de glutamato en estas células (ver figura 1.4)(Bixel et al, 2001; Bixel et al, 1997).

1.8. Estudios sobre la regulación de la TAACRm en ratas.

Después de que se purificó la TAACRm se realizaron diferentes estudios sobre la regulación de la enzima. Dentro de las primeras investigaciones se contemplaron diferentes factores en la regulación de la TAACRm, entre los cuales están:

Disponibilidad de sustratos. La actividad de transaminasa según algunos investigadores era modificada de acuerdo a la concentración de AACR y de los cetoácidos que aceptan el grupo amino de los aminoácidos (Harper et al, 1984; Hutson et al, 1988). En

Figura 1.6. Interacción entre astrocitos y neurona a través del ciclo de glutamato/ glutamina y la lanzadera de AACR. Abreviaturas: PC, piruvato carboxilasa; GS, glutamato sintetasa; TCA, ciclo de los ácidos tricarboxílicos; α KG, alfa cetoglutarato; OAA, oxalacetato; CGG, ciclo de glutamato/ glutamina; LCR, lanzadera de AACR; GLS, glutaminasa; GDH, glutamato deshidrogenasa.



experimentos de riñón perfundido con 2mM de α -cetoisocaproato de sodio, un ceto análogo de leucina, hubo un incremento en la actividad de TAACR a los 5 minutos alcanzando un máximo a los 15 minutos (Mitch y Chan, 1979). Esto llevó a pensar que la enzima podía ser regulada por la dieta; estudios realizados por Chan y Walser (1978) mostraron que en ratas con una dieta en CACR se incrementaba la actividad de transaminasa en diferentes órganos (ver tabla 1.5).

Tabla 1.5. Actividad de TAACR en órganos de rata alimentada con aminoácidos y cetoácidos (U/ mg de proteína)

Dieta	Músculo	Intestino	Cerebro	Riñón	Hígado
Dieta con AACR	0.233 \pm 0.010	0.091 \pm 0.003	0.427 \pm 0.011	0.243 \pm 0.009	0.014 \pm 0.003
Dieta con cetoácidos*	0.288 \pm 0.010	0.215 \pm 0.016	0.512 \pm 0.012	0.239 \pm 0.002	0.020 \pm 0.001

*ácido α -cetoisocaproico, ácido α -ceto- β metivalerico, ácido α -cetoisovalerico,

En cuanto al efecto de la dieta sobre regulación de transaminasa existen dudas. Estudios recientes (Torres et al, 1998) en ratas con diferentes concentraciones de proteína demuestran que la dieta no tiene un efecto importante en la regulación del gen de TAACRm, y solo en músculo se observó un ligero incremento de la actividad y cantidad de ARNm de TAACRm con una dieta al 50% de caseína. En el caso del efecto provocado por las hormonas como el glucagon (control: 8.1 ± 0.7 y hormona: 9.3 ± 0.5 mU/ mg de proteína) y la hidrocortisona (control: 9.1 ± 0.8 y hormona: 9.3 ± 1.0 mU/ mg de proteína), tampoco se muestra un incremento en la expresión de la enzima.

Infecciones o estados catabólicos del organismo. El tratamiento con endotoxina (por ejemplo el lipopolisacarido de *S enteritidis*) induce la producción de citocinas (después de una hora), las cuales afectan el metabolismo de la mayoría de los tejidos y órganos. Cuando se le suministró endotoxinas a las ratas, la actividad de TAACR se incrementó en hígado perfundido, mientras que la de DCCR disminuyó en hígado, la explicación que se da de este fenómeno es: ante la endotoxina el organismo evita degradar AACR para enviarlos a otros órganos, donde se usarán en la síntesis de proteínas (Ichihara, 1999; Holecek et al, 1998; Rao et al, 1982).

En enfermedades renales, se han reportado alteraciones en el metabolismo de aminoácidos. Por ejemplo en ratas que desarrollan síndrome nefrótico inducido con aminonucleósido de puromicina, la actividad de la TAACRm disminuye en este órgano. Esto se correlaciona con una disminución de la concentración del ARNm de la TAACRm (Ascencio et al, 1997; Shirai, 1971). Por otro lado, en un modelo de hepatitis inducido por la D-galactosamina, la actividad de TAACR en mitocondria de hígado y corazón aumentó como se muestra en la tabla 1.6.

Tabla 1.6. Efecto del tratamiento con D-galactosamina sobre la actividad de TAACRm en hígado (H) y corazón (C) (nmol/ mg de proteína/ 20 min)

Tratamiento	Número de ratas	Actividad
Control (H)	7	10.9 \pm 5.0
D-galactosamina (H)	3	30.3 \pm 1.8
Control (C)	7	308.5 \pm 47.5
D-galactosamina (C)	3	570.4 \pm 54.0

En la cetoacidosis diabética y uremia existe un desequilibrio en el metabolismo de AACR, lo que implica un aumento en la degradación de proteínas en músculo, como consecuencia de la estimulación de la DCCR, y la disminución de la concentración de AACR en plasma. Se propone que durante la acidosis aumenta la cantidad de glucocorticoides, y éstos contribuyen a la activación de la DCCR. Al medir la actividad de TAACRm sobre leucina se observó un aumento de 263 ± 17 nmol/ g.h (control) a 448 ± 23 nmol/ g.h (acidosis), como consecuencia del incremento en la disponibilidad de aceptores de aminos, α -cetoglutarato y piruvato, en el músculo de las ratas con acidosis (May et al, 1987).

Procesos tumorales. Niwa (1990) identificó un ADNc de ratón que denominó ECA 39, el cual proviene del ARNm sobreexpresado en la línea celular de un teratocarcinoma de ratón PCC4 Aza 1. Estudios posteriores revelaron que ECA39 presenta una alta homología con la TAACRc de humano y rata. Posteriormente se reportó en el ratón, que el gen de la TAACR citosólica es blanco de la regulación por c-Myc (Eden et al, 1996 y Kispal et al, 1996). La oncoproteína c-Myc se ha asociado con la proliferación celular y la apoptosis. En levadura, el homólogo de ECA39 está involucrado en la proliferación celular, específicamente en la transición de G1 a S (Schuldiner et al, 1991). Por otro lado, ECA40 (homólogo de TAACRm) se expresa en la fase estacionaria de crecimiento (Amir et al, 1996; Eden y Benvenisty, 1999; Ben-Yosef et al, 1998; Weggen et al, 2001).

En estudios de Ogawa e Ichihara (1972) en hepatomas, mostraron cambios en la actividad de las isoformas de TAACR. En células tumorales de hígado se encuentran las isoformas mitocondrial y citosólica; en mayor proporción la TAACRc que la TAACRm (Goto et al, 1977). En estadios avanzados las isoformas de TAACR son claramente detectadas. Por otro lado, en estudios *in vitro* con carcinomas de músculo esquelético de rata, se observó un aumento en el metabolismo de AACR, lo que implicó un incremento tanto en transaminasa (de aproximadamente 70%) como en deshidrogenasa (Argiles y López, 1992; Siddiqui y Williams, 1989).

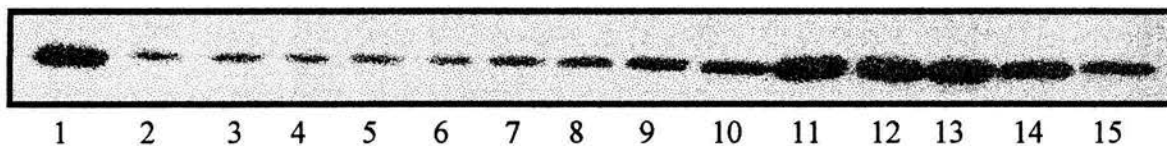
Aun cuando en los anteriores experimentos se presentaron condiciones que regularían al gen de TAACRm, en la mayoría de los casos el aumento tanto en la actividad como en la cantidad de proteína es modesto (Soemitro et al, 1989). El gen de la transaminasa se le puede considerar como un gen constitutivo, sin embargo existen ciertas

condiciones bajo las cuales la enzima aumenta su expresión más de 10 veces, como ocurre en el tejido mamario de rata lactante (datos no publicados de nuestro laboratorio y Hutson et al, 1992), en el hígado fetal (De Santiago et al, 1988; Kadowaki y Knox, 1982, Hutson et al 1992 y Torres et al 2001) y en el hígado en regeneración (datos no publicados). A continuación se mostrarán las 2 primeras situaciones.

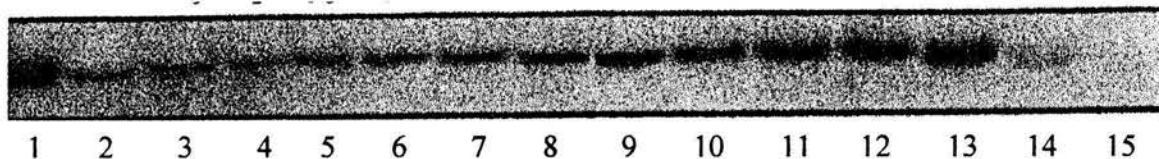
A. Glándula mamaria de rata lactante. En la rata virgen la actividad de la TAACRm (única isoforma presente en este órgano) es 2.8 veces más alta que la del hígado y 3.5 veces más baja que la del músculo esquelético. Cuando en la rata se inicia el proceso de gestación, la glándula mamaria se prepara para la producción de leche que ocurrirá en la etapa de la lactancia, aumentando su tamaño (incrementa la proliferación celular). En este periodo los niveles de actividad, proteína y ARN de la TAACRm van aumentando en forma proporcional, hasta llegar a 8 veces más que en la rata virgen. En el periodo de lactancia la expresión de la enzima continúa incrementándose hasta llegar a 15 veces en el día 12 de esta etapa, esta actividad de la TAACRm en glándula mamaria es comparable con las actividades de TAACRm en corazón y riñón (De Santiago et al, 1991). La posible explicación del aumento de la enzima está asociada con la producción de la leche, ya que en el proceso de degradación de la leucina se producen componentes importantes para la síntesis de lípidos que forman parte de la leche (Viña y Williamson, 1981); considerando lo anterior, la actividad de la DCCR también se incrementa. En la lactancia la TAACRm se localiza en las células epiteliales de los alvéolos, células productoras de la leche (Tovar et al, 2001). Por otro lado, se sabe que la síntesis de proteínas en la lactancia también es favorecida. Al analizar la actividad de reaminación de la enzima, se observa que ésta aumenta permitiendo así que los AACR puedan formar parte de las proteínas (De Santiago et al, 1998). La expresión de la TAACRm comienza a decaer después del destete (Tovar et al, 2001) (ver Figura 1.7).

Figura 1.7. Comportamiento de la TAACRm en la glándula mamaria de rata en las etapas de gestación, lactancia y destete. La figura muestra el comportamiento de la enzima en cuanto a su cantidad de proteína (A), ARN (B) y actividad (C). El orden de los carriles en el inciso A y B es el siguiente: 1, riñón; 2, rata virgen; del 3 al 9 son los días de gestación 1, 5, 10, 14, 16, 18 y 20; del 10 al 13 son los días de lactancia 1, 5, 10 y 12; del 14 al 15 son los días de destete 1 y 2.

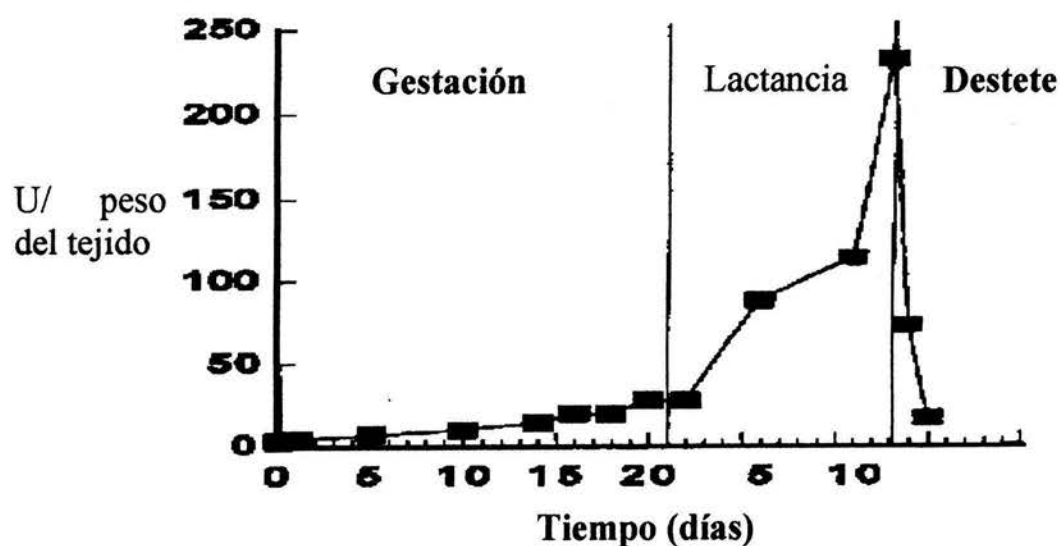
A) Proteína de TAACRm



B) ARN de TAACRm

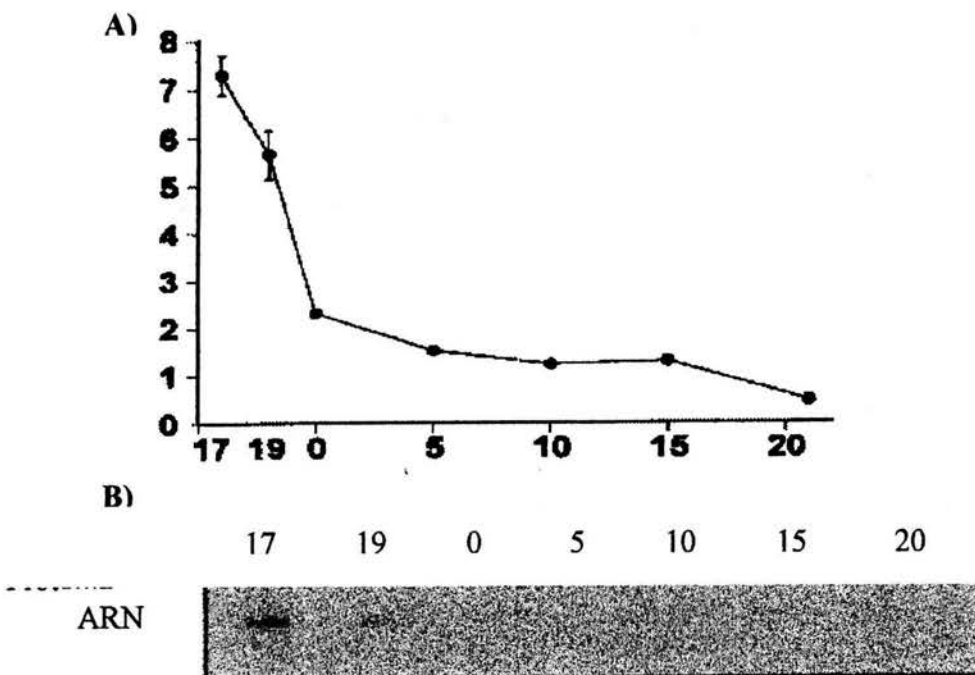


C) Actividad de TAACRm



B. En el hígado fetal se ha detectado la presencia de TAACRm, la cual tiene una alta actividad, de 7.28 mU/ mg de proteína, a diferencia del hígado adulto, 0.38 mU/ mg de proteína. En trabajos sobre el comportamiento de la enzima en el hígado fetal y adulto, se ha visto que TAACRm en el día 17 del feto posee cierta actividad, la cual comienza a decaer cuando el organismo está próximo a nacer, y se detiene en el día 21 postnatal en el cual tiene la actividad que se encuentran normalmente en adulto (ver figura 1.6). De igual manera como en glándula mamaria de rata lactante, la actividad y la cantidad de ARN están relacionados (Torres et al, 2001). La presencia de la TAACRm en hígado fetal se ha asociado con la producción de glutamato en el feto, importante en el balance de nitrógeno y producción de energía. Sin embargo, en el feto, los aminoácidos no son oxidados, su degradación solo ocurre bajo ciertas condiciones, por ejemplo una mala alimentación (Munro, 1983; Molina-Font, 1998). Por otro lado, los AACR específicamente la leucina e isoleucina son importantes en la regulación de insulina, hay reportes (Kloesz et al, 2001) de que esta hormona controla el intercambio de gases, como oxígeno, entre la madre y el feto. Por tal motivo debe existir un control de estos aminoácidos en el feto.

Figura 1.8. Expresión de la TAACRm en hígado fetal y adulto. En las figuras se observa como la actividad y la cantidad de ARN decae cuando el organismo crece. Los números de la figura B son los días del feto (17 y 19) y después de nacer (5, 10, 15 y 20), son iguales en la figura A.



1.9. JUSTIFICACIÓN

Los AACR son abundantes en los alimentos en relación con los aminoácidos indispensables. De los AACR se puede obtener energía, pueden estimular la síntesis de proteínas y de ellos se generan aminoácidos como la glutamina y alanina, importantes en el metabolismo de nitrógeno y glucosa.

En las células de los órganos extrahepáticos la transaminasa, primera enzima en la degradación de los AACR, transfiere el grupo amino de estos aminoácidos al alfa cetoglutarato produciéndose glutamato. De esta manera la enzima contribuiría a controlar la concentración de los AACR en la célula. Existen dos isoformas de esta enzima la mitocondrial y la citosólica, la primera se encuentra ampliamente distribuida en el cuerpo y sería la responsable de transaminar a los AACR, haciéndolos susceptibles de ser oxidados por la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada. En el caso de la citosólica ésta se restringe a cerebro, placenta y ovario.

Se ha observado que la TAACRm no está regulada como la mayoría de las enzimas degradadoras de aminoácidos, por la dieta y hormonas. Solo bajo ciertas condiciones asociadas con metabolismo y proliferación celular aumenta la expresión de esta enzima.

Considerando lo anterior tendrá gran relevancia el entender cómo se regula la expresión del gen de la TAACRm, la cual es regulada a nivel transcripcional. El aislamiento de la región promotora del gen de la TAACRm, así como estudios de funcionalidad de este promotor permitirán conocer cuáles son los posibles moduladores de la expresión de este gen. Además, este conocimiento también aportará indicios de por qué la expresión del gen de TAACRm cambia en situaciones previamente establecidas como hígado fetal y la glándula mamaria durante la lactancia.

2. HIPÓTESIS

La TAACRm es una enzima que, a diferencia de las enzimas degradadoras de aminoácidos, no es controlada por la dieta y hormonas. Bajo ciertas condiciones, la TAACRm aumenta su expresión como son: hígado fetal y en glándula mamaria de rata lactante del día 12. Estas condiciones implican altas tasas metabólicas, así como proliferación celular. En consecuencia, se espera que al aislar e identificar el promotor de la TAACRm, existan elementos potenciales relacionados con factores de transcripción metabólicos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL:

Aislar e identificar la región promotora a nivel molecular y funcional del gen de la TAACRm de la rata.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Aislar y secuenciar la región promotora del gen de la TAACRm.
2. Determinar el sitio de inicio de la transcripción en la región promotora del gen de la TAACRm.
3. Analizar los elementos consenso de respuesta en la región promotora del gen de TAACRm.
4. Analizar la funcionalidad del promotor TAACRm mediante ensayos empleando el gen reportero de luciferasa.
5. Realizar deleciones del promotor de TAACRm para encontrar regiones importantes en la regulación de éste.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Aislamiento de la región promotora del gen de la TAACRm empleando la técnica de Genome Walker:

La región 5' del gen de la TAACRm se obtuvo utilizando el método llamado “caminar sobre ADN” (Genome Walker). Esta técnica parte de la fragmentación del ADN genómico con diferentes enzimas –al conjunto de fragmentos obtenidos con cada enzima se les denomina “bibliotecas”-; a estas bibliotecas (cortadas en este caso con *EcoR V*, *Dra I*, *Pvu II* y *SspI*) se les agrega en el extremo 5' una secuencia conocida (adaptador). Al final de este proceso se tienen fragmentos de ADN genómico, en los cuales el extremo 5' es conocido. Si se conoce la secuencia del gen de interés, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés), usando oligonucleótidos específicos para el adaptador y el gen de interés, se pueden obtener productos de PCR que contengan el promotor del gen estudiado (Genome Walker, CLONTECH) (Siebert et al, 1995).

Se hacen dos PCR, para la primera se usaron las 5 bibliotecas a las que se les adicionó buffer 10X Tth, dNTP's (dideoxinucleótidos, 10 mM), Mg(OAc)₂ (25 mM), los oligonucleótidos AP1 (adaptador) y GSP1 (exón1 del gen de interés) (tabla 3.1) y la enzima “advantage genomic polymerase mix”. Las muestras fueron entonces incubadas en un termociclador Perkin Elmer 9500. El programa fue 7 ciclos de 94°C, 25 seg y 72°C, 4 min; seguidos de 32 ciclos: 94°C, 25 seg y 67°C, 4 min; y finalmente 1 ciclo de 67°C, 4 min. Para asegurar que los fragmentos de ADN obtenidos fueran específicos del gen de la TAACRm, se hizo una segunda PCR usando los siguientes oligonucleótidos AP2 (adaptador) y GSP2 (exon 1 del gen de interés) (tabla 4.1). El programa fue de 5 ciclos de 94°C, 25 seg y 72°C, 4 min; seguido de 20 ciclos de 94°C, 25 seg y 67°C, 4 min; finalmente un ciclo de 67°C, 4 min.

Los fragmentos obtenidos en la segunda PCR fueron secuenciados directamente por el método de Sanger (determinación de la secuencia con dideoxinucleótidos (USB).

Tabla 4.1. Secuencias de oligonucleótidos empleados. La abreviatura long es el número de los nucleótidos

Oligonucleótido	Dirección	Secuencia	Long
AP1	Sentido	5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'	22
GSP1	Antisentido	5' CGGAAGTGCGCCCCCATCAGGT3'	23
AP2	Sentido	5' ACTATAGGGCACGCGTGGT 3'	19
GSP2	Antisentido	5' CTGTCCTAGTATAGCTGCAGACATGA 3'	26
SMART II oligo	Sentido	5' AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG 3'	30
NUP	Sentido	5' AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT 3'	23
C4'	Sentido	5' GAGCCATCTCTCCAGCCCG 3'	19
CR'	Sentido	5' GCGTGTCCCACTATGCC 3'	19
C4R	Antisentido	5' CCGTGCGCCGGTAACTGT 3'	19

4.2. Localización del sitio de inicio de la transcripción del ARN mensajero (ARNm) de la TAACRm de rata y análisis computacional del promotor de TAACRm.

El sitio de inicio de la transcripción del ARNm de la TAACRm de rata se identificó por medio de la técnica de amplificación del cDNA **SMART-RACE** (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript- 5'- and 3'- rapid amplification of cDNA ends (CLONTECH)), que se basa en lo siguiente (Benchmarks, 2000).

Se emplea ARN total o mensajero y se sintetizo la cadena complementaria de éste por medio de retrotranscripción (RT). En la RT se emplea el oligo dT como cebador (al usarlo se asegura la captura exclusiva de ARNm), y un oligonucleótido de secuencia conocida con 3 guaninas en el extremo 3'(SMART oligo ver tabla 3.1). La retrotranscriptasa usada incorpora 3 citocinas al final de la cadena complementaria, es decir, las citocinas que se agregaron están después del sitio de inicio, de tal manera que las guaninas del SMART oligo se unirán a las citocinas de la cadena complementaria del ARN. Al final del proceso se obtiene un ARN de secuencia conocida en el extremo 5'. Posteriormente por medio de PCR utilizando un oligonucleótido específico para el gen de interés y uno para la secuencia conocida del extremo 5', se obtiene un producto delimitado

por la secuencia del SMART oligo y la del extremo 5' del gen. Al final se secuencia el producto y se buscan la secuencia del SMART oligo, específicamente las 3 citocinas, se asume que la siguiente base es el sitio de inicio.

Para determinar el sitio de inicio de la TAACRm, se empleo ARN total de riñón para la RT, oligo dT, SMART II oligo (tabla 3.1), buffer de RT (5X), DTT (20 mM), dNTP (10 mM), y reversa transcriptasa MMLV (200 U/ μ l); la mezcla se incubó a 42°C/ 1.5 h.

A continuación se hizo una PCR usando oligonucleótidos diseñados en el exon I del gen de TAACRm (oligonucleótido GSP2, tabla 3.1) y en la secuencia del adaptador en el extremo 5' (oligonucleótido NUP, tabla 3.1). La mezcla de reacción para la PCR fue: producto de RT, agua grado PCR, buffer de PCR (10X), dNTPs (10mM), polimerasa II (50X), y los oligonucleótidos antes mencionados. La muestra se incubó bajo el siguiente programa:

5 ciclos de 94°C/ 5 sec, 72°C/ 3 min

5 ciclos de 94°C/ 5sec, 70°C/ 10 sec, 72°C/ 3 min.

25 ciclos de 94°C/ 5 sec, 68°C/10 sec, 72°C/ 3 min.

Al final se corrió un gel de agarosa para verificar la amplificación de producto, posteriormente el producto fue secuenciado, y se identificó la secuencia del SMART II oligo seguida de las 3 citocinas, siendo la siguiente base el sitio de inicio.

Por otro lado, se hizo un análisis computacional de la secuencia promotora en el programa de Matinspector, para determinar los posibles elementos de respuesta. Los elementos de respuesta son secuencias de ADN a las cuales se les unen determinados factores de transcripción (Quandt et al, 1995).

4.3. Construcciones de las deleciones del promotor de TAACRm.

Para la construcción de las deleciones se empleó de modelo el promotor completo de la TAACRm. Se diseñaron oligonucleótidos para eliminar el elemento potencial del factor nuclear de hepatocitos 4 (HNF4) (oligonucleótidos C4' y C4R, ver tabla 3.1), el producto de PCR con este oligo es de 1000 pb, y del receptor de ácido retinoico (RAR) (oligonucleótidos CR' y C4R, ver tabla 3.1) el producto de PCR con este oligo es de 406 pb. Por medio de PCR se obtuvieron los fragmentos de las deleciones y se secuenciaron. Posteriormente se clonaron en el vector reportero pGL3b como más adelante se explica.

4.4. Clonación de las deleciones y el fragmento completo del promotor de TAACRm en el vector de la luciferasa.

La metodología para ligar el promotor de TAACRm y los fragmentos del promotor sin HNF4 y RAR en el plásmido reportero (pGL3b , PROMEGA) fue: clonar los fragmentos primero en el vector pGEM_T, (PROMEGA), y posteriormente se subclonaron en pGL3b. Los productos de PCR del promotor y los fragmentos sin HNF4 y RAR se mezclaron con el plásmido pGEM_T, buffer de ligasa 2X y T4 ligasa. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente toda la noche. Al final de este periodo se corrió un gel para verificar la ligación.

A continuación se transformaron las bacterias XL-1 Blue con los plásmidos por electroporación (Bio Rad); y se seleccionaron en placas con ampicilina (50 µg/ ml), isopropil-β-D-galactopiranosido (IPTG) (120 µg/ ml) y 5-bromo -4-cloro -3-indolil -β- D-galactosido (X-gal) (40 µg/ ml). Al siguiente día se seleccionaron las colonias blancas y posteriormente se obtuvo el plásmido de la bacteria por lisis alcalina (Sambrook et al, 1989). El inserto se liberó digiriendo con las enzimas XhoI y HindIII (37°C/ toda la noche). Por otro lado el vector de luciferasa fue cortado con las mismas enzimas que el inserto, y se defosforiló con fosfatasa alcalina incubando a 37°C / 30 min. Una vez digeridos los fragmentos de ADN de las deleciones y el promotor completo, se mezclaron con pGL3b, buffer para ligasa 10X, T4 ligasa y agua. Las mezclas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. El análisis de estas ligaciones se hizo igual que con el plásmido anterior (Knoche y Kephart, 1999; Kobs, 1995).

4.5. Cultivo de las células RIN-m5f.

La línea celular RIN-m5F (ATCC) fue derivada de células de islotes pancreáticas de rata (RIN-m). Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementadas con 10% de suero fetal de bovino en cajas de cultivo de 75 cm² (Corning).

4.6. Transfección de las células RIN-m5f con lipofectamina 2000.

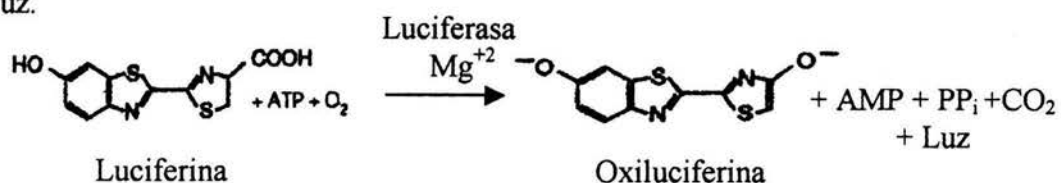
La lipofectamina 2000 empleada en este ensayo, es un lípido cationíco que se une a las moléculas de ADN y posteriormente se fusiona con la membrana plasmática, permitiendo la entrada del ácido nucleico a la célula.

Las células RIN-m5f se sembraron en placas de 12 pozos (250,000 células por pozo) (Nunclon). Al día siguiente a las células se les agregaron los plásmidos (previamente

purificados con Endofree plasmid maxi kit) con 1 μ l de lipofectamina 2000 (1 mg/ml, Invitrogen). De cada construcción del promotor se uso 300 ng de ADN/ pozo y del plásmido de β galactosidasa se utilizó 50 ng de ADN/ pozo, cada tratamiento se hizo por triplicado. La forma en que se transfectaron las células fue de la siguiente manera: los plásmidos y la lipofectamina se mezclaron e incubaron 20 min. Mientras este tiempo transcurría las células fueron lavadas con solución salina de fosfatos (PBS), y se les adicionó medio RPMI-1640 sin suero. Posteriormente se les agrego el ADN con la lipofectamina y después de 3 h se les suministró medio RPMI-1640 al 10% en suero fetal de bovino.

4.7. Ensayo de luciferasa

El plásmido reportero de pGL3b codifica a la luciferasa, la cual es una enzima producida en la luciernaga. Esta enzima oxida a luciferina originando un compuesto que emite luz.



En este ensayo la cantidad de luciferina oxidada está asociada con la cantidad de luciferasa producida, y esto a su vez indica que tan activo es el promotor que regula a la enzima.

A las 48 hrs de la transfección se cosecharon las células de la siguiente forma: se lavaron con PBS. A los pozos se les agregó amortiguador de lisis (se prepara en el momento, anexo) y se agitaron durante 5 min. A continuación se homogeneizaron los lisados de las muestras y se colocaron en tubos de plástico, una parte para el ensayo de luciferasa y otra para el de β -galactosidasa. Para el ensayo de luciferasa, a cada tubo se le agregó amortiguador de luciferasa (anexo) así como luciferina, y se leyeron en un luminómetro (Himes y Shannon, 2000).

Por otro lado, se hizo el ensayo de β -galactosidasa para normalizar el ensayo de luciferasa. El ensayo se basa en la producción de β -galactosidasa, la cual es una enzima codificada por el gen de lacZ de *E. coli*, esta enzima hidroliza azúcares de β -galactosa, tales como lactosa. Regularmente se emplea como sustrato de la β -galactosidasa el o-

nitrofenil- β -D-galactopiranosido, el cual transforma a o-nitrofenol que es un compuesto amarillo y se puede detectar por medio de un luminómetro.

Para el ensayo de β -galactosidasa, a los tubos con el lisado celular se les agregó el amortiguador de reacción (anexo), y se incubaron en obscuridad por 45 min. Al final de este periodo se les adicionó el acelerador (anexo) y se leyeron las muestras en el luminómetro.

5. RESULTADOS

5.1. Estructura de la región promotora del gen de la TAACRm de la rata.

Se ha visto que la TAACRm se regula sólo bajo ciertas condiciones, que están relacionadas con altas tasas metabólicas y proliferación celular. Esta enzima controla la concentración de AACR en las células, los cuales se asocian con la producción de energía y síntesis de proteínas, sin embargo, no hay investigaciones a la fecha que reporten los factores que regulan la expresión de la TAACRm bajo condiciones que la estimulen. Debido a que en el caso de la TAACRm existe una relación entre la cantidad de ARNm, proteína y actividad, se considera que la regulación de la enzima es a nivel transcripcional. Hasta el momento no se conoce la secuencia promotora del gen TAACRm. Por tal motivo se aisló el promotor de este gen empleando la técnica de “caminar sobre el ADN” con ADN de rata (Genome Walker, CLONTECH). Por medio de PCR de fragmentos de ADN genómico (bibliotecas), solo en una de ellas se obtuvo una banda de ADN que contiene la región potencial del promotor de la TAACRm. El producto fue 1100 pb a partir de la biblioteca designada como *EcoR V*. Al secuenciar el extremo 3' se confirmó que este fragmento correspondía a la secuencia del DNA complementario de la TAACRm (Gene Bank, U68417) y que se ubicaba en la región del exón 1 (figura 5.1). Posteriormente se secuenció el fragmento completo por el método de los didesoxinucleótidos de Sanger para su posterior análisis.

5.2. Determinación del sitio de inicio en el promotor de la TAACRm.

Con la secuencia nucleotídica de la región promotora, se procedió a determinar el sitio de inicio del gen empleando la técnica SMART- RACE, que se basa en adicionar una secuencia conocida en el extremo 5' de ARNm, esta secuencia se caracteriza por tener en su extremo 3' tres guaninas. Cuando se hace la RT, la enzima incorpora tres citocinas las cuales se aparean con las guaninas de la secuencia conocida. Si se hace una PCR empleando oligos específicos para el gen de TAACRm y para la secuencia conocida, al secuenciar este fragmento y buscar la secuencia adicionada, específicamente las 3 citocinas, la siguiente base se considera el sitio de inicio. El producto que se obtuvo por este procedimiento empleando el ARN total de riñón de rata, se secuenció y se buscó la secuencia del oligonucleótido adicionado, específicamente las tres citocinas, que

permitieron identificar cuál es la base del sitio de inicio. Con esta técnica se ubicó el sitio de inicio de la TAACRm a 75 pb del exón I y a 82 pb del ATG (figura 5.2).

5.3. Análisis de la región promotora de la TAACRm.

Posteriormente se analizó la secuencia del promotor por medio de un programa computacional (MatInspector) con la finalidad de conocer los elementos potenciales de respuesta (ver figura 5.3).

Tabla 5.3. Elementos potenciales de respuesta encontrados en el promotor de TAACRm

Elemento de respuesta potencial	Función del factor de transcripción
C/EBP (proteína de enlace al aumentador CCAAT) Dos elementos ubicados en: +26 a +43 y -10 a -29	Familia de factores de transcripción que puede intervenir en la respuesta inflamatoria, se expresan en células mieloides y linfoides. En algunos genes como el citocromo 2D5 de rata puede sinergizar con Sp1, para modular la transcripción (Rosati et al, 2001). En adipocitos, hígado, intestino y pulmón también se ha detectado la expresión de estos factores (Shiow y Lane, 2000; Foka et al, 2001).
Sp1 (proteína estimuladora) Dos elementos ubicados en: +12 a +25 y -5 a -8	Esta región está involucrada con procesos de ciclo celular, activa la transcripción de genes que no poseen caja TATA, ya sea solo o junto con otros elementos como NF1, AP1, C/EBP y factores generales de transcripción como TAF _{II} 110 y 130.
Oct 1 (Octámero 1) Tres elementos ubicados en: -690 a -674, -620 a -607 y -209 a -200	Miembro de la familia de octámeros, la cual es aparentemente distribuida en todas las células.
RAR (Receptor α 2 huérfano relacionado con ácido retinoico). Un elemento de respuesta en: -396 a -389	El receptor de ácido retinoico regula el desarrollo y diferenciación celular. Este receptor que se une a este elemento es ubicuo.
MEF2 (Factor aumentador de miocitos 2) Dos elementos ubicados en: -822 a -811 y -303 a -294	Este factor se asociaba con genes específicos de músculo, sin embargo se ha visto que se expresa en cerebro y tejido linfóide. Hay reportes acerca de estos elementos de respuesta en genes asociados con la proliferación celular (estímulos con suero y factor de crecimiento epidérmico). Por otro lado, se sabe que este factor es reclutado por el factor de transcripción GATA (Morin et al, 2000).

Elemento de respuesta potencial	Función del factor de transcripción
Elemento de respuesta homólogo a HNF3 (Factor nuclear de hepatocitos 3) Un elemento de respuesta en: -862 a -851	Regula genes específicos del hígado como tirosina aminotransferasa, proteína 1 de enlace al factor de crecimiento semejante a insulina. Intervienen en la diferenciación, inflamación y crecimiento celular (Imae et al, 2000)
HNF4/COUP (Factor nuclear de hepatocitos 4/ factor de transcripción del promotor río arriba de la ovoalbúmina de pollo) Un elemento de respuesta en: -972 a -957	El factor HNF4 se expresa en hígado, páncreas, riñón e intestino delgado. Este factor está relacionado con la diferenciación de hígado, sin embargo también interviene en el metabolismo de aminoácidos, de glucosa y lípidos. El factor COUP se considera un represor de HNF4 en la mayoría de los casos, pero existen algunos genes en los cuales éste sinergiza con HNF4 positivamente.
E4BP4 (proteína 4 de enlace a E4)	Se expresa de forma ubicua y tiene una función represora. Actualmente se sabe que en el gen de interleucina 3, este factor funciona como activador (Cowell, 2002).

5.4. Análisis de funcionalidad de las deleciones y el promotor completo de TAACRm .

Hasta este momento se conocen a nivel descriptivo los posibles elementos de respuesta del promotor. De los posibles elementos de respuesta que hay, el HNF4 y RAR están asociados con procesos generales de crecimiento y metabolismo, por lo cual se consideraron como posibles candidatos en la modulación de la transcripción del gen de TAACRm. Para estudiar la funcionalidad de éstos se hicieron deleciones del promotor y se clonaron en el vector reportero de luciferasa (figura 5.4). Debido a que no se han reportado factores que estimulen la activación de la TAACRm, se buscó un tipo celular que tuviera alta actividad de transaminasa de forma constitutiva, lo que implica que los factores de transcripción que activan este promotor están presentes. Al examinar los tejidos que más expresan TAACRm se escogió el páncreas debido a su elevada actividad de esta enzima.

Se cultivaron células de islotes de páncreas (RIN-m5f) y se transfectaron con el vector vacío o con el vector que contenía los insertos sin HNF4 y RAR (denominados T4 y TR respectivamente) o el fragmento completo (TT) del promotor. Empleando la construcción TT las unidades relativas de luciferasa normalizadas con las de

β -galactosidasa (vector que sirve para controlar las condiciones de transfección), mostraron un aumento de aproximadamente 2.8 veces con respecto al vector vacío. Al usar la construcción T4 se observó una disminución de 0.5 veces de las unidades relativas comparada con el vector vacío, y con la construcción TR hubo un aumento de 1.7 veces de comparado con el vector vacío (figura 5.5).

De los experimentos anteriores se puede inferir que: el promotor completo es funcional. El elemento de respuesta de HNF4 puede ser importante en la transcripción de TAACRm, ya que al eliminar éste, la actividad del promotor disminuyó. Con la eliminación del elemento de respuesta de RAR se observó un incremento en las unidades relativas de luciferasa, semejantes a las del promotor completo. Esto hace referencia a la posible existencia de uno o varios supresores en esta región. En esta construcción se esperaba que se abatiera la funcionalidad del promotor al eliminar el elemento del RAR, pero no fue así, puede ser que el RAR funcione como supresor más que como un activador, o puede ser que elementos como Oct-1 y EBP4E, que también están en esta región sean los responsables de esta supresión.

Figura 5.1: Análisis de los productos de PCR en las diferentes bibliotecas. En la figura se observa solo un producto en la biblioteca de EcoR V, después de la PCR empleando oligonucleótidos específicos para el gen de TAACRm y para la secuencia conocida adicionada en el extremo 5'. El orden de las muestras es el siguiente: 1. marcador de peso molecular; 2. biblioteca *DraI*; 3. biblioteca *Pvu II*; 4. biblioteca *Ssp I* y 5. biblioteca *EcoR V*.

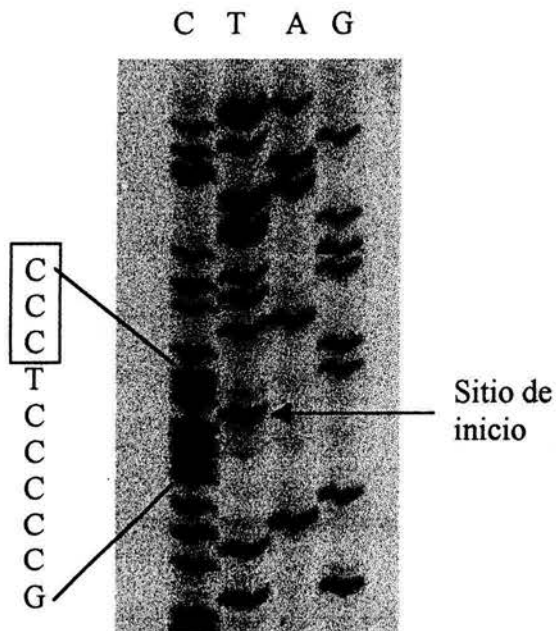
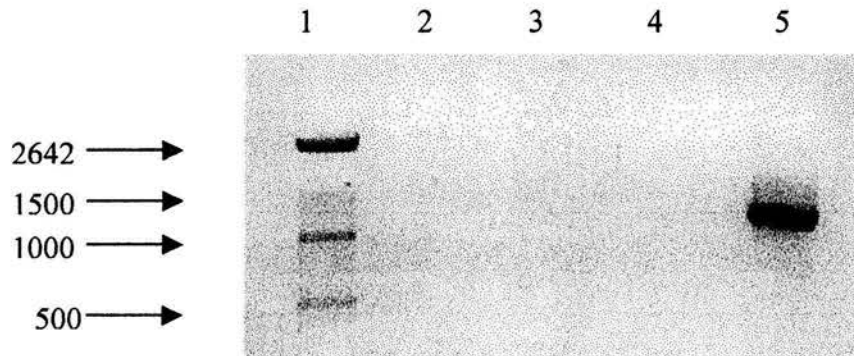


Figura 5.2: Ubicación del sitio de inicio en el promotor de TAACRm empleando el SMART RACE 5'. La secuencia subrayada es el SMART oligo, las 3 citocinas en negro son la referencia para ubicar el sitio de inicio, la timina en color claro es el sitio de inicio y el resto de la secuencia corresponde a la del promotor de TAACRm.

Secuencia total de la placa:

```
5'TCGTGCGGCCGGTAACTGTGCCG
GCCTGGGGCGCGGCCTGGTCAAAG
GCATTCCGGCCCCGCCCTGCTCAC
GCCCCCTCCGCGTACTCTGCGTT
GTTACCACTGCATT
```

Secuencia del SMART II oligo

Figura 5.3: Región promotora del gen de TAACRm en rata con sus elementos de respuesta potenciales. Esta secuencia incluye la ubicación de los elementos de respuesta potenciales marcados con una línea, la localización de los oligonucléotidos diseñados para construir las delecciones del promotor en negritas y subrayados, así como la base en negrita que corresponde al sitio de inicio, y la ubicación del codon de inicio.

-1146 TTTAAGTGA GCTATTCCTT TATTATTATT ATTATTATTA TTATTATTAT

-1096 TATTAAACCT TTCTTTTCTT TATTTAATGT ATGTGAGTAC GCTGTAGCTA

-1046 TCTTCAGACA CACCAGAAGA GGGCTTCAGA TCTCATTACA GATGGTTGTG

-996 AGCCACCACG TGGTTGCTGG GAATTGAACT CAGGACTTCT GGACCACT**GA**

COUP/HNF-4

-946 **GCCATCTCTC** **CAGCCCG**AGC TGTCCTTTT TATCAAAGCT GCTCACTCT
C4

-896 GCTTTGCCAC TAATGATAGT TCCTGTGAAG ATGCATTGTT TTTGTTGTTG

Homólogo a HNF-3

-846 TTGCTGCTTT AATTTTAGAA AATCTTTTTTA TAGCAAGCAG TAGTGGCACA

MEF2

-796 TCTTTAATTC CAGCTTGGGA GGGAGAGACA GGAGGATCTC TGTGAGTTTC

-746 AGGACAGCCT GGTTTACAGA GCTAGTTCCA GGACAGCCAG AGCTACACAG

Oct 1

-696 AGAAACCCTG TCTGTAAATC AATCAATCAA TGAAAGAAAA ATGTAAAAAG

-646 TTTTTTTGTG TGTGCATTGC TTGTATGTAT **GTAAGTGTGT** CGTGTGCATG

Oct 1

-596 ACTAGTGCCT GTGGAATTCA GAAGAGAGCT TAGGATCCCT TGGAACCGGA

-546 GTTACAGGCA GTTATGAGCT ATGTGGGTGC TAGGACCGAG CCCAGTCCTC

-496 TGGATGAGCA GCCCAGTAGT TTTAACTGTT CAGCCCTTTC CAACCTCCTT

-446 TTGTTTGAAG ACAGGGTTTC ACCATACAGC CCCGGCTGGC CTGGAACATA

-396 TTAGGTAGAT CAGAATGACT TTCAACTCAA GAGATCCTCC ACTTCTGTCT
RAR

-346 CCCAAACGCT GAGATTAAGG CGTGTCCCAC TATGCCCGGC AATATATAAA
CR' MEF2

-296 AAATTTAAAG GTCTGGGATC CGTTTTTCAGT GCTTAGAGCG CTTCCCAAAC

-246 ACTTATAAGG CCGTGGGTTCAGATCCCCAAG TACTCAAATG CAAAACAAAA

Oct 1

-196 GCCAAGGTAA ATGCCTAGCT GGGCTTGAGT GTGGCTGGGA TGGAGCAGGG

-146 CAGGGTGAAG GCAAGGAGGG AGAGAGTGTA TGACAGATCT GGA CTGTTCC

-96 AGCGCATGTT TTTCACAGCA GAGTCTGGGT CCCTGAGGTC CTATCACTAA

-46 GAACCGCCTG GCAGAAGTGA GGCTTGCAGA AGCAGCCATC TGCGGGAGGG
C/EBP +T

C/EBP

-5 GGCGTGAGCA GGGCGGGGCC GGAATGCCTT TCACCAGGCC GCGCCCCAGG
Sp1 Sp1

Inicio de traducción

+55 CCGGC ACAGT TACCGGCCGC ACGG GATCATGCTGCTGCAGCT ATACTAGGAC
C4R Exón I

Figura 5.4: Clonas positivas de las construcciones TT (promotor total), T4 (fragmento sin HNF4) y TR (fragmento sin RAR). En la figura se muestran las construcciones del promotor en pGL3b. En el primer carril de izquierda a derecha, está el marcador de peso molecular; 2, el vector solo de 4500 pb; 3, el promotor de TAACRm en pGL3b (TT); 4, el fragmento del promotor completo de TAACRm (1100 pb); 5, el fragmento del promotor sin HNF4 en pGL3b (T4); 6, el fragmento de sin HNF4 (1000 pb); 7, el fragmento sin RAR en pGL3b (T4); 8, el fragmento de promotor completo sin RAR (406 pb).

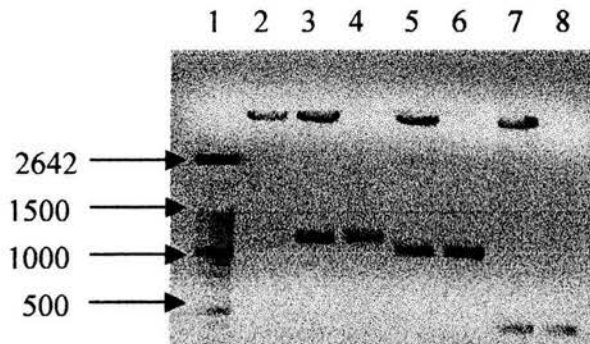
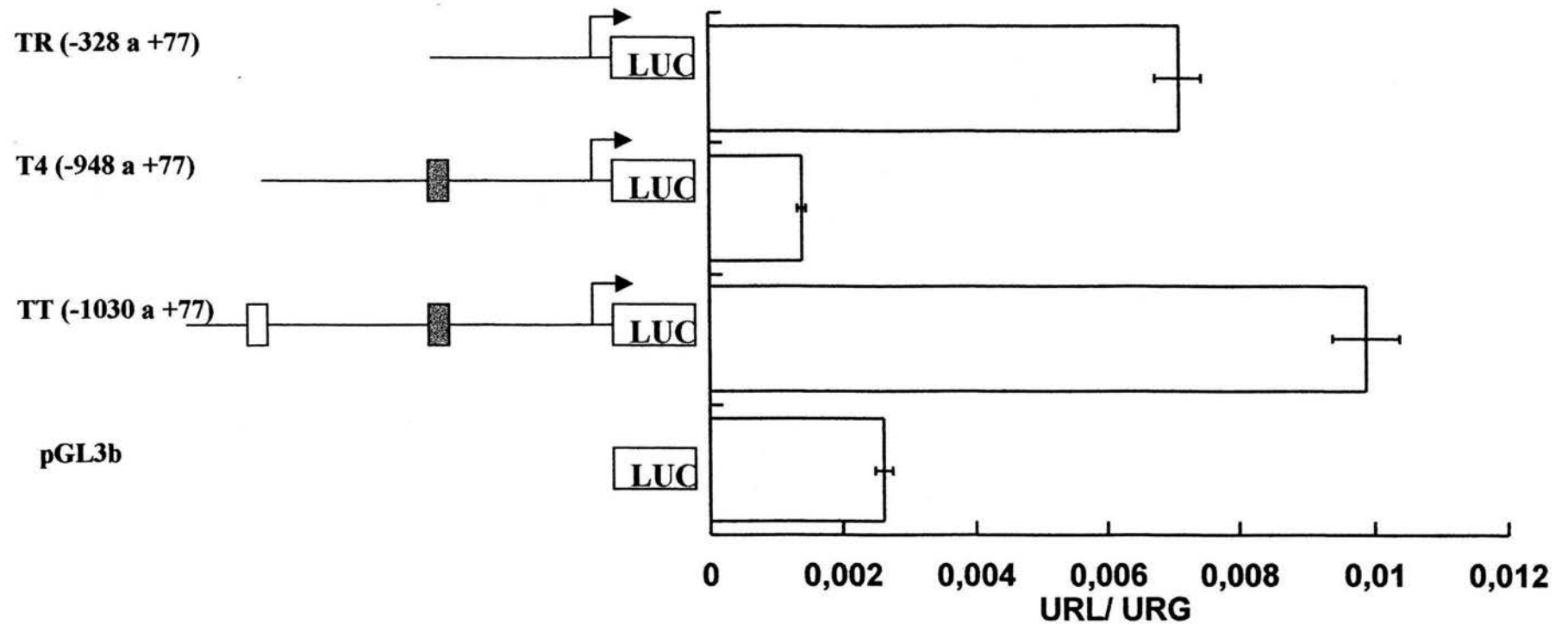


Figura 5.5. Ensayo de funcionalidad del promotor (TT) y los fragmentos sin HNF4 (T4) y RAR (TR) en células RIN-m5f. En la gráfica se muestran las unidades relativas de luciferasa normalizadas con las de β -galactosidasa (URL/ URG). El cuadro claro representa el elemento de respuesta de HNF4 y el cuadro oscuro es el elemento de respuesta de RAR.



6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los AACR son los aminoácidos indispensables más abundantes en los alimentos, de tal manera que es difícil generar deficiencia de estos nutrientes. Algunas de las funciones más importantes de estos aminoácidos son: intervenir en la síntesis de proteínas, generar ATP a partir de su oxidación, servir como esqueleto para la formación de glutamina (donadora de nitrógeno) y alanina (reguladora de glucosa). Estas características realzan la importancia de estudiar la regulación de la expresión de los enzimas que participan en la biosíntesis de estos aminoácidos. Por otro lado, en la vía de degradación de los AACR, a diferencia de los otros aminoácidos, comparten los dos primeros pasos de su ruta de degradación. En la primera parte los AACR son transaminados por su respectiva transaminasa; sin embargo, esta enzima es peculiar ya que se encuentra en la mayoría de los órganos extrahepáticos y en el hígado no está. De esto surge la pregunta ¿por qué la TAACRm tendría que estar fuera del hígado, siendo que este es el principal órgano metabólico de cuerpo?. Considerando que la actividad, la cantidad de proteína y de ARN mensajero están relacionadas en el caso de la TAACRm, esto indicaría que la posible explicación de la regulación de la enzima está en localizada en su promotor. Al analizar la secuencia del promotor a través de programas computacionales, se identificaron diversos elementos de respuesta potenciales que pudieran regular la expresión del gen de la TAACRm. Entre los elementos de respuesta potenciales que se encontraron hay varios asociados con metabolismo y crecimiento celular; asimismo hay elementos muy específicos de ciertos tejidos como músculo y páncreas por mencionar algunos. Los posibles candidatos para modular la regulación transcripcional en este fragmento del promotor son: 1) el elemento de respuesta para el receptor de ácido retinoico y 2) el elemento de respuesta para el factor nuclear de hepatocitos 4 (Louett et al, 2002). Sin embargo, otros elementos que no se estudiaron en el presente trabajo pudieran ser elementos potenciales de regulación de la expresión de la TAACRm y que requieren en un futuro un análisis más detallado. Por otro lado, existen otros factores de transcripción que pueden funcionar como activadores o represores, tal es el caso de los Oct 1, que se encuentra en el promotor de la TAACRm. Este factor transcripcional puede activar la transcripción de genes a través del reclutamiento de factores transcripcionales como el TBP (proteína de enlace a la caja TATA), el TFIIB (factor de transcripción II B) y el OBF-1 (factor de enlace al octámero 1);

también interacciona con receptores hormonales nucleares tales como RXR (receptor retinoide X), y el receptor de la hormona tiroidea (RHT). Por otro lado, cuando el octámero 1 funciona como inhibidor (por ejemplo en el gen de la prolactina), se une a corepresores como el mediador del silenciamiento de receptores de la hormona tiroidea y retinoica (SMRT); y el corepresor del receptor hormonal nuclear (N-CoR). Estos a su vez interaccionan con reclutadores de desacetilasas de histonas, formando complejos que modifican la estructura de la cromatina (Kakizawa et al, 2001). Aunque no se realizó una delección selectiva de los sitios Oct-1 en el promotor, al momento de hacer la delección del sitio RAR se eliminaron dos sitios Oct-1, y en respuesta a esto aumentó la actividad del reportero. Los sitios Oct-1 pueden mediar el silenciamiento “parcial” de la expresión del gen de la TAACRm.

Por otro lado, el papel del elemento potencial de respuesta de HNF4 en la regulación del gen de la TAACRm, puede explicar la ausencia de expresión del gen de la TAACRm en el hígado adulto a través de un mecanismo hipotético que a continuación se propone. En el desarrollo del hígado se producen varios cambios en cuanto a factores de transcripción, dependiendo de los estadios de éste. Existen diversas isoformas del factor de transcripción HNF4. Se ha reportado que la isoforma específica de HNF4 que se expresa en el hígado fetal es la isoforma HNF4 α 7. Por otro lado, en el hígado de la rata adulta se presenta solamente la isoforma HNF4 α 1. Es importante mencionar que las isoformas de HNF4 poseen diferentes capacidades de asociación con coactivadores (proteína de enlace a CRE, (CBP)/p300 y p160) y corepresores (SMRT); por ejemplo HNF4 α 1 es modulado más por SMRT que HNF4 α 7 (Torres-Padilla y Weiss, 2003). La región amino terminal de la isoforma HNF4 α 7 contiene una secuencia diferente a la del HNF4 α 1 y esta diferencia está dada por la presencia de un promotor diferente en el gen HNF4. Así, HNF4 α 1 se regula por dexametasona (además de otros elementos como C/EBP), mientras que HNF4 α 7 no lo es.

La regulación de un gen está dada por ciertos elementos de respuesta que interaccionan entre ellos, pero además depende del tipo celular y estadio de desarrollo. Por ejemplo hay factores que solo en el desarrollo fetal en hígado se expresan, como el HNF3 α y β , HNF1 β y HNF4 α 7, mientras que al nacer el organismo cambia el patrón de expresión a C/EBP α , HNF4 α 1 y receptor de glucocorticoides (Bailly et al, 2001). Esto muestra que

las isoformas de HNF4 están cambiando en el hígado de la vida fetal a la vida postnatal. Este cambio de patrón de isoformas de HNF4 coincide con el cambio en expresión de la TAACRm en hígado, es decir la presencia de actividad de esta enzima ocurre cuando está la isoforma HNF4 α 7, mientras que ésta desaparece cuando en el hígado aparece la isoforma HNF4 α 1. Interesantemente, se ha visto que la isoforma HNF4 α 7 se presenta en el páncreas de la rata adulta, y este órgano es uno de los que presenta mayor actividad de TAACRm (Boj et al, 2001; Torres et al, 2001; Torres y Weiss, 2003). Es necesario realizar más experimentos en los diferentes órganos y tejidos para poder determinar si la diferencia en la actividad de la TAACRm se deben a cambios en la concentración del factor de transcripción HNF4. Sin embargo, el gen de la TAACRm puede estar regulado por otros factores transcripcionales y la presencia o ausencia de otros coreguladores.

Existen reportes acerca de la regulación de un mismo gen en diversos órganos por diferentes factores transcripcionales. Por ejemplo, el caso del promotor de la aldehído deshidrogenasa en humanos, el cual tiene varios elementos repetidos directos (DR) a los que se pueden unir el HNF4, RXR, COUP-TF (factor de transcripción del promotor de la ovoalbúmina de pollo) y ARP-1 (proteína de regulación de apolipoproteína 1). Entre estos factores transcripcionales existe competencia, por ejemplo el COUP-TF puede antagonizar la activación de HNF4 y del receptor de ácido retinoico α , por lo que la unión de factores de transcripción dependerá de la cantidad de éstos en cada tipo celular. Hay reportes de que en la aldehído deshidrogenasa humana, los factores transcripcionales HNF4 o RXR estimulan la transcripción del gen. Por ejemplo el músculo esquelético y cardíaco se expresa esta enzima, sin embargo no posee HNF4 pero si expresan RXR, el cual se uniría a los elementos DR, en lugar de HNF4 (Pinaire et al, 2000; Duncan et al, 1998; Quian et al, 2000; Magee et al, 1998; Samad et al, 1997).

Otra posible explicación de la ausencia de la expresión de TAACRm en hígado de rata adulta, puede ser por efecto de la desacetilación del promotor del gen de esta enzima. El hígado fetal presenta el factor de transcripción HNF3 β , que se ha visto asociado con la reorganización de nucleosomas, en el caso de la albúmina. El cambio en compactación de la cromatina del gen de la TAACRm en hígado de rata adulta también requiere futura investigación.

Debido a que tanto el promotor del gen del factor HNF4 (Quián et al, 2000) y de la TAACRm poseen elementos de respuesta para el receptor de ácido retinoico, se podría hipotetizar que la adición de ácido retinoico estimule la expresión del gen de la TAACRm a través de un aumento en la expresión de HNF4, o por medio de una estimulación directa del gen de la TAACRm. De esta manera los niveles de expresión tejido específico de TAACRm podrían semejar al de la aldehído deshidrogenasa. Es decir, que en algunos tejidos su expresión dependiera de ambos factores, o de la presencia de uno u otro. El AR puede reprimir o activar genes a nivel transcripcional dependiendo del contexto de factores transcripcionales (Magee et al, 1998). Asimismo el AR puede estimular la expresión de genes considerados constitutivos, como es el caso del receptor D2 de dopamina (D2R) (Samad et al, 1997).

Existen otros elementos potenciales de regulación en la secuencia del promotor de la TAACRm obtenida en el presente trabajo, de los cuales no se hicieron deleciones, pero pueden contribuir con la regulación de TAACRm. Por ejemplo, Mef2 (factor aumentador de miocitos 2) es un factor que se asocia con el desarrollo del músculo y junto con GATA pueden estimular la transcripción en músculo esquelético y corazón de algunos genes, asimismo se sabe de la presencia de Mef2 que interacciona con jun para promover la proliferación celular (Morin et al, 2000). Por otro lado, también se determinó la existencia de elementos potenciales para factores transcripcionales como el COUP y E4BP4, los cuales tienen una función represora (Ikushima et al, 1997), sin embargo no conocemos si éstos en realidad son activos para el gen de la TAACRm. Se consideró que los elementos responsables de la transcripción basal del gen de la TAACRm son el C/EBP y el Sp1 (Nelson y Cox, 2000; Shirai e Ichihara, 1971; Taylor y Jenkins, 1966; Kispa et al, 1996).

Al analizar el promotor de la TAACRm se ve que posee características que lo pueden incluir en la categoría de genes de mantenimiento (housekeeping) (Baki y Alexis, 1994; Lachman, 1995; Burtler y Kadonaga, 2001; Park et al, 1999; Park y Levine, 1997), debido a que no tiene caja TATA (la más cercana probable está localizada a -278 pb) y tiene elementos de respuesta Sp1 (proteína estimuladora 1), ubicados de -5 a +8 y de +12 a +25. Este elemento permite el reclutamiento de varios factores asociados a la caja TATA (TAFs_{II}) como es el TAF_{II}130 y 110. Otros factores que pueden intervenir en el inicio de la transcripción en genes constitutivos son el C/EBP (proteína de enlace al aumentador

CCAAT), la caja CCAAT y el NF-Y (factor nuclear Y) (Philipsen y Suske, 1999; Garlatti et al, 1996; Scheweizer et al, 1994; Garlatti, 1993; Yamazaki et al, 2000; Kennett et al, 2002). De los factores de transcripción descritos, en el promotor de la TAACRm solo se encuentra el potencial elemento de respuesta C/EBP ubicado en las posiciones +26 a +43 y -10 a -29. Es interesante mencionar que la mayoría de los promotores de genes de mantenimiento presentan varios sitios de inicio, mientras que en el promotor de TAACRm solo se detectó 1 sitio. En el caso de otras transaminasas como la aspartato aminotransferasa, se ha reportado que su gen tiene expresión constitutiva; sin embargo, el gen de esta enzima se estimula con glucocorticoides en el hígado y el riñón (en el promotor hay elementos de respuesta a glucocorticoides). Al analizar detalladamente el promotor de la aspartato aminotransferasa se ve que el elemento C/EBP es relevante en la activación del gen. A este elemento se le unen varias proteínas como la C/EBP y el factor nuclear 1 (NF1) que son específicos de tejidos (Garlatti et al, 1993). Otro ejemplo es la fructosa-6-fosfato amidotransferasa, la cual no posee caja TATA y los elementos encargados de la transcripción son: Sp1 en las posiciones -17 a -5 y -64 a -76, y CCAAT en -286 a -225 y -177 a -155 (Yamazaki et al, 2000).

Debido a que estudios realizados en el laboratorio, han demostrado que la TAACRm no responde a estímulos dietarios (diferentes cantidades de proteína) u hormonales a diferencia de otros genes como por ejemplo el de la DCCR, no se esperaba en el promotor de TAACRm elementos de respuesta activados por hormonas, o por factores dietarios (Shirai y Ichihara, 1971; Mimura et al, 1968; Ichihara et al, 1967; Torres et al, 1998). La mayoría de los elementos de respuesta potenciales localizados por análisis computacional de la secuencia del promotor de TAACRm están asociados con crecimiento celular y a factores generales que intervienen en metabolismo u homeostasis. Las secuencias GC son sitios de unión al factor transcripcional Sp1 y este elemento en algunos genes está asociado con el desarrollo o crecimiento celular. El pH de la célula regula la unión del factor de transcripción Sp1 a su elemento de respuesta. A pH 6 se une al ADN 7 veces más fuerte que a pH 8, lo que ocurre en tumores sólidos, donde se produce hipoxia y acidosis lo que ocasiona una disminución del pH intracelular (Torigoe et al, 2003).

La TAACRm aparentemente está asociada con proliferación celular y a una alta tasa metabólica. Dentro del promotor hay elementos asociados con estas condiciones, sin

embargo, varios de estos ligandos como el HNF4 (-972 a -957 pb) y el RAR (-396 a -384) se asocian con otros procesos celulares. Considerando que la actividad de la TAACRm varía dependiendo del tejido, se puede mencionar que la cantidad de los factores importantes en la regulación varían de tejido a tejido. De esta manera, el nivel de expresión de la TAACRm en los tejidos dependerá de la concentración y la presencia o ausencia de ciertos factores transcripcionales en cada tejido. Otra explicación de la variación de la actividad de TAACRm, puede estar asociada con la presencia de elementos de respuesta que pueden funcionar como represores, tal es el caso de los octámeros 1, presentes en la región promotora de TAACRm.

Hasta este momento no se ha terminado de dilucidar el posible papel biológico de la TAACRm en ciertas condiciones previamente estudiadas. Por ejemplo, se considera que la enzima está asociada con condiciones de alta duplicación celular; como ocurre en el hígado en regeneración (trabajo no publicado; Kobayashi et al, 1995; Kurumiya et al, 2000), donde la actividad de TAACRm aumenta; o en hígado fetal. Sin embargo, hay un reporte que descarta la idea de que TAACRm esté asociada con proliferación (Ben-Yosef et al, 1998); esto aún no ha sido totalmente comprobado.

Se ha determinado que los AACR, particularmente la leucina, aumentan la síntesis de proteínas a través de la activación de la cinasa mTOR, la cual fosforila a la proteína cinasa 70 kDa, que a su vez fosforila a la proteína ribosomal S6, la cual permite que aumente la transcripción de genes que intervienen en la maquinaria de traducción. mTOR también fosforila al represor traduccional del factor de iniciación de eucariontes 4E, lo que permite que eIF4E sea liberado y se pueda unir a eIF4G y eIF4A, para ensamblar la maquinaria del ribosoma (Browne y Proud, 2002; Liu et al, 2001; Scassa et al, 2001; Shan et al, 2000; Xu et al, 1998). Los AACR pueden regular la síntesis de proteínas, pero no son los únicos factores que regulan este proceso (Lynch et al, 1999; Roberts et al, 1982; Rohn et al, 2003), se puede hipotetizar que los AACR sean enviados a tejidos extrahepáticos y ahí inicia su proceso de estimulación de la síntesis de proteínas requerida por el órgano, y el exceso de estos aminoácidos es catabolizado. Además, se ha reportado que los AACR modulan la actividad del sistema A de transporte de aminoácidos neutros de cadena corta (Peyrollier et al, 2000; Miquerol et al, 1994), el cual es muy importante, ya que se

encuentra en todos los tipos celulares y regula la concentración de la poza de aminoácidos libres, lo cual también repercutiría en la tasa de síntesis de proteínas.

La TAACRm a nivel metabólico es importante en la producción de glutamina, el cual es un aminoácido producido principalmente en el músculo esquelético, y su síntesis local está asociada con la cantidad de AACR del músculo. Este aminoácido es importante ya que lleva el nitrógeno a los diferentes órganos (Battaglia, 2000).

En el caso de la glándula mamaria lactante en porcinos, los AACR son importantes para la síntesis de proteínas de la leche. En la producción de leche de las vacas se requiere altas concentraciones de histidina, lisina, metionina, treonina y triptofano; mientras que el aspartato y el glutamato sirven como intermediarios de energía, así como donadores de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos no esenciales (Jackson et al, 2000).

7. CONCLUSIONES

En conclusión, la presente tesis muestra por primera vez la secuencia de la región promotora del gen de la TAACRm y se han identificado inicialmente dos sitios potenciales de regulación de la expresión del gen de esta enzima, los sitios HNF4 y RAR. La funcionalidad de estos sitios permite en parte entender cómo es que esta enzima se expresa bajo diferentes condiciones metabólicas; sin embargo, falta aún mucho por explorar en el resto de los sitios potenciales de elementos de respuesta para entender los mecanismos que permitan explicar por qué se expresa esta enzima en diferentes niveles en diferentes órganos o tejidos, también por qué se aumenta su expresión bajo condiciones de incremento en el metabolismo y proliferación celular y finalmente por qué en el hígado durante la vida postnatal deje de expresarse. El conocimiento de estos aspectos permitirán entender con mayor claridad la complejidad del metabolismo de los AACR.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aki K, Yokojima A y Ichihara A. 1968. Transaminase of branched chain acids. *J Biochem.* 65: 539-544.
- Amir E, Simchen G y Benvenisty N. 1996. Two yeast homologs of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. *J Biol Chem.* 271: 20242-20245.
- Argiles J.M y López-Soriano F. J. 1992. The enzymatic activities of branched-chain amino acid catabolism in tumors of rats. *Cancer Lett.* 61: 239-242.
- Ascencio C, Torres N, Sandoval R.L, Cruz C, Pedraza-Chaverri J y Tovar A.R. 1997. Reduced kidney branched chain aminotransferase expression in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Life Scien.* 61: 2407-2415.
- Atiles W.M, Dudley E.G y Steele L.J. 2000. Gene cloning, sequencing, and inactivation of the branched-chain aminotransferase of *Lactococcus lactis* LM0230. *Appl Environ Microb.* 66:2325-2329.
- Bailly A, Torres-Padilla M.E, Tinel A.P y Weiss M.C. 2001. An enhancer element 6 kb upstream of the mouse HNF4 α 1 promoter is activated by glucocorticoids of liver-enriched transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 29: 3495-3505.
- Baki L, Alexis N.M. 1994. The efficiency of nuclear processing of the tyrosine aminotransferase mRNA transcription increases after partial hepatectomy. *Eur J Biochem.* 225: 797-803.
- Battaglia F.C. 2000. Glutamine and glutamate exchange between the fetal liver and the placenta. *J Nutr.* 130:974S-977S.
- Benchmarks. 2000. Using the SMART cDNA system to map the transcription initiation site. *Biotechniques.* 28: 846-852.
- Ben-Yosef T, Eden A y Benvenisty N. 1998. Characterization of murine BCAT genes: Bcat1, a c-Myc target, and its homolog, Bcat2. *Mamm Genome.* 9: 595-597.
- Birnboim H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Method Enzymol.* 100: 243-255.
- Bixel M.G, Hutson S.M y Hamprecht B. 1997. Cellular distribution of branched-chain amino acid aminotransferase isoenzymes among rat brain glial cells in culture. *J Histochem Cytochem.* 45: 685-694.

- Bixel M.G, Shimomura Y, Hutson S.M y Hamprecht B. 2001. Distribution of key enzymes of branched-chain amino acid metabolism in glial and neuronal cells in culture. *J Histochem Cytochem.* 49: 407-418.
- Bledsoe R. K, Dawson P. A y Hutson S. M. 1997. Cloning of the rat and human mitochondrial branched chain aminotransferases (BCATm). *Biochem Biophys Acta.* 1339: 9-13.
- Block K.P y Harper A.E. 1984. Valine metabolism In vivo: Effects of high dietary levels of leucine and isoleucine. *Metabolism.* 33: 559-566.
- Boj F. S, Párrizas M, Maestro A. M, Ferrer J. 2001. A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 14481-14486.
- Bonfils J, Faure M, Gibrat JF, Glomot F y Papet I. 2000. Sheep cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase: cDNA cloning, primary structure and molecular modelling and its unique expression in muscles. *Biochim Biophys Acta.* 1494: 129-136.
- Brown G.J y Proud C.G. 2002. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *FEBS Lett.* 269: 5360-5368.
- Brody T. 1994. *Nutritional Biochemistry.* Academic Press Inc. San Diego. 20 pp
- Burtler E.F.J, Kadonaga T.J. 2001. Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Gene Dev.* 15:2515-2519.
- Chan W y Walser M. 1978. Effect of branched-chain keto-acids and dietary protein content on the activity of branched-chain amino acid transferase in rat tissues. *J Nutr.* 108: 40-45.
- Conway M. E y Hutson S. M. 2000. Mammalian branched-chain aminotransferases. *Method Enzymol.* 324: 355-365.
- Cowell G.I. 2002. E4BP4/ NFIL3, a PAR-related bzip factor with many roles. *BioEssays.* 24: 1023-1029.
- Damuni Z y Reed L.J. 1987. Purification and properties of the catalytic subunit of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase phosphatase from bovine kidney mitochondria. *J Biol Chem.* 262: 5129-5132.
- Davoodi J, Drown P.M, Bledsoe R.K, Wallin R, Reinhart G.D y Hutson S.M. 1998. Overexpression and characterization of the human mitochondrial and cytosolic

- branched-chain aminotransferases. *J Biol Chem.* 273: 4982-4989.
- Devlin M.T. 1999. *Bioquímica*. 3era edición. Reverté S.A. Barcelona. 446-450 pp.
- De Santiago S, Hernández-Montes H, Flores Huerta S y Villalpando S. 1991. Changes in the composition of mammary tissue, liver and muscle of rat dams during lactation and after weaning. *J Nutr.* 121: 37-43.
- De Santiago S, Torres N, Suryawan A, Tovar A, Hutson S. 1988. Regulation of branched-chain amino acid metabolism in the lactating rat. *J Nutr.* 128: 1165-1171.
- Doering C y Danner D.J. 2000. Amino acid deprivation induces translation of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase. *Am J Physiol Cell Ph.* 279: C1587-C1594.
- Doering C.B, Coursey C, Spangler W y Danner D.J. 1998. Murine branched chain α -ketoacid dehydrogenase kinase: cDNA cloning, tissue distribution, and temporal expression during embryonic development. *Gene.* 212: 213-219.
- Doering C.B, Williams I.R y Danner D.J. 2000. Controlled overexpression of BCKD kinase expression: metabolic engineering applied to BCAA metabolism in a mammalian system. *Metab Eng.* 2: 349-3459.
- Drown P.M, Torres N, Tovar A.R, Davoodi J y Hutson S.M. 2000. Use of reagents to investigate branched chain α -keto acid transport in mitochondrial. *Biochim Biophys Acta.* 77926: 1-12.
- Duncan S. A, Navas M. A, Dufort D, Rossant J y Stoffel M. 1998. Regulation of transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science.* 281:692-695.
- Eden A y Benvenisty. 1999. Involvement of branched-chain amino acid aminotransferase (Bcat1/Eca39) in apoptosis. *FEBS Lett.* 457: 255-261.
- Eden A, Simchem G, Benvenisty N. 1996. Two yeast homologs of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. *J Biol Chem.* 271: 20242-202445.
- Faure M, Glomot F, Bledsoe R, Hutson S y Papet I. 1999. Purification and cloning of the mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase from sheep placenta. *Eur J Biochem.* 259: 104-111.
- Feldman L.I y Gunsalus I.C. 1950. The occurrence of a wide variety of transaminases bacteria. *J Biol Chem.* 187: 821-830.

- Foka P, Koustein S y Ramji D. P. 2001. Molecular characterization of the *Xenopus* CCAAT-enhancer binding protein β gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* 285: 430-436.
- Frick P, Blinder L y Goodman M. 1988. Transamination and oxidation of leucine and valine in rat adipose tissue. *J Biol Chem.* 263: 3245-3249.
- Garlatti M, Aggerbeck M, Bouguet J, Barouki R. 1996. Contribution of nuclear factor 1 binding site to the glucocorticoid regulation of the cytosolic aspartate aminotransferase gene promoter. *J Biol Chem.* 271: 32629-32634.
- Garlatti M, Tchesnokov V, Daheshia M, Feilleux S, Hanoune J, Aggerbeck M. 1993. CCAAT/Enhancer-binding protein-related proteins binding to the unusual promoter of the aspartate aminotransferase housekeeping gene. *J Biol Chem.* 268: 6567-6574.
- Giroix H.M, Saulnier C y Portha B. 1999. Decreased pancreatic islet response to L-leucine in the spontaneously diabetic GK rat: enzymatic, metabolic and secretory data. *Diabetologia.* 42: 965-977.
- Goodwin G.W, Gibboney W, Paxton R, Harris R.A y Lemons JA. 1987. Activities of branched-chain amino acid aminotransferase and branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex in tissues of maternal and fetal sheep. *Biochem J.* 242: 305-308.
- Gore C.D, Wolfe R.R. 2002. The supplementation fails to affect muscle protein kinetics in critically ill 11 patients. *J Parenteral Teral Nutr.* 26:342-350.
- Goto M, Shinno H, Ichihara. 1977. Isozyme patterns of branched-chain amino acid transaminase in human tissues and tumors. *Gann.* 68: 663-667.
- Hall T.R, Wallin R, Reinhart G.D, Hutson S.M. 1993. Branched chain aminotransferase isoenzymes. *J Biol Chem.* 268: 3092-3098.
- Hamel G.F, Upward L.J, Siford L.G y Duckorth C.W. 2003. Inhibition of proteasome activity by selected amino acids. *Metabolism.* 52: 810-814.
- Harper AE, Miller RH, Block KP. 1984. Branched-chain amino acid metabolism. *Ann Rev Nutr.* 4: 409-454.
- Harper AE. 1984. Biological factors influencing the utilization of amino acids. In: Velázquez A, Bourges H, eds. *Genetic factors in nutrition.* 1st ed. Academic Press. Orlando. 243-278.

- Harris R.A, Kobayashi R, Murakami T y Shimomura Y. 2001. Regulation of branched – chain α -keto acid dehydrogenase kinase expression in rat liver. *J Nutr.* 131: 841S-845S.
- Harris R.A, Popov K.M, Zhao Y y Shimomura Y. 1994. Regulation of branched-chain amino acid catabolism. *J Nutr.* 124: 1499S-1502S.
- Harris RA, Han AC, Goodwin GW, Kuntz MJ, Paxton R. 1986. Regulation of the activity state of rat liver branched-chain α -keto acid dehydrogenase (BCKDH) by branched-chain alpha-ketoacids (BCKAs). *Federation Proc.* 45: 233.
- Harris R A, Paxton R, Powell S M, Goodwin G W, Kuntz M, Han AC. 1986. Regulation of branched-chain alpha ketoacid dehydrogenase complex by covalent modification. In: Weber G, ed. *Advances in Enzyme Regulation*. Pergamon Press. Indianapolis: 219-237.
- Himes S. R y Shannon M. F. 2000. Assays for transcriptional activity based on the luciferase reporter gene. *Method Mol Biol.* 130: 165-177.
- Holecek M, Sprongl L, Tichý M y Pecka M. 1998. Leucine metabolism in rat liver after a bolus injection of endotoxin. *Metabolism.* 47: 681-685.
- Holecek M, Sprongl L y Tilse I. 2001. Metabolism of branched-chain amino acids in starved rats: the role of hepatic tissue. *Physiol Res* . 50: 25-33.
- Hutson S, Wallin R, Hall T. 1992. Identification of mitochondrial branched chain aminotransferase and isoforms in rat tissue. *J Biol Chem.* 267 :15681-15686.
- Hutson S. 2001. Structure and function of branched chain aminotransferases. *Progress Nucleic Acid Res Mol Biol.* 70: 175-205.
- Hutson S. M y Hall T. R. 1993. Identification of the mitochondrial branched chain aminotransferase as a branched chain α -keto acid transport protein. *J Biol Chem.* 268: 3084-3091.
- Hutson S.M, Berkich D, Drown P, Xu B, Aschner M, LaNoue K.F. 1998. Role of branched-chain aminotransferase isoenzymes and gabapentin in neurotransmitter metabolism. *J Neurochem.* 71:863-874.
- Hutson S. M, Bledsoe R. T, Hall P.A y Dawson. 1995. Localization of transaminases. *J Biol Chem.* 270: 30344-30352.
- Hutson S.M, Fenstermacher D y Mahar C. 1988. Role of mitochondrial transamination in

- branched chain amino acid metabolism. *J Biol Chem.* 263: 3618-3625.
- Hutson S.M. 1988. Subcellular distribution of branched-chain aminotransferase activity in rat tissues. *J Nutr.* 118: 1475-1481.
- Hutson S, Roten S y Kaplan R.S. 1990. Solubilization and functional reconstitution of the branched-chain α -keto acid transporter from rat heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 87: 1028-1031.
- Ichihara A, Takahashi H, Aki K, Shirai A. 1967. Transaminase of branched-chain amino acid. II Physiological change in enzyme activity in rat liver and kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 26: 674-678.
- Ichihara A. 1985. Transaminases. En Christen P y Metzler D.E. *Biochemistry A series of monographs.* Vol.2. Wiley-interscience publication. New York: 430-439 pp.
- Ichihara A. 1999. BCA, HGF and Proteasomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 266: 647-651.
- Ikeda T, Konishi Y y Ichihara A. 1976. Transaminase of branched chain amino acids: XI. Leucine (methionine) transaminase of rat livers mitochondrial. *Biochim Biophys Acta.* 445: 622-631.
- Ikushima S, Inukai T, Inaba T, Nimer S.D, Cleveland J.L y Look A.T. 1997. Pivotal role for the NFIL3/ E4BP4 transcription factor in interleukin 3- mediated survival of pro-B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 2609-2614.
- Imae M, Inoue Y, Fu Z, Kato H y Noguchi T. 2000. Gene expression of the three members of hepatocyte nuclear factor-3 is differentially regulated by nutritional and hormonal factors. *J Endocrinol.* 167: R1-R5.
- Jackson S.C, Bryson J.M, Wang H y Hurley W.L. 2000. Cellular uptake of valine by lactating porcine mammary tissue. *J Anim Sci.* 78: 2927-2932.
- Kadowaki H y Knox W. E. 1982. Cytosolic and mitochondrial isoenzymes of branched-chain amino acid aminotransferase during development of the rat. *Biochem J.* 202: 777-783.
- Kagamiyama H y Hayashi H. 2000. Branched-chain amino-acid aminotransferase of *Escherichia coli*. *Method Enzymol.* 324: 103-113.
- Kakizawa T, Miyamoto T, Ichikawa K, Takeda T, Suzuki S, Mori J.I, Kumagai M, Yamashita K y Hashizume K. 2001. Silencing mediator for retinoid and thyroid

- hormone receptors interacts with octamer transcription factor-1 and acts a transcriptional repressor. *J Biol Chem.* 276: 9720-9725.
- Kennett B.S, Moorefield K.S y Horowitz J.M. 2002. Sp3 represses gene expression via the titration of promoter-specific transcription factors. *J Biol Chem.* 277: 9780-9789.
- Kholodilov N.G, Neystat M, Oo T.F, Hutson S.M y Burke R. E. 2000. Upregulation of cytosolic branched chain aminotransferase in substantia nigra following developmental striatal target injury. *Mol Brain Res.* 75: 281-286.
- Kispal G, Steiner H, Court D.A, Rolinski B y Lill R. 1996. Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the *myc* oncogene-regulated Eca39 protein. *J Biol Chem.* 271: 24458-24464.
- Kloesz L.J, Serdikoff M.C, Maclennan N.K, Adibi A.S y Lane H.R. 2001. Uteroplacental insufficiency alters liver and skeletal muscle branched-chain aminoacid metabolism in intrauterine growth-restricted fetal rats. *Pediatric Res.* 50: 604-610.
- Knoche K y Kephart D. 1999. Cloning blunt-end *Pfu* DNA polymerase-generated PCR fragments into pGEM-T vector systems. *Promega Notes.* 71: 10
- Kobayashi Y, Miyazawa H, Sasanuma A y Kuratomi K. 1995. Changes in activity levels and isozyme patterns of isoleucine aminotransferase in response to experimentally induced hepatic lesion. *Biochem Pharmacol.* 49: 1331-1334.
- Kobs G. 1995. pGEM- T vector: cloning of modified blunt-ended DNA fragments. *Promega Notes.* 55: 28.
- Krause U, Bertrand L, Maisin L, Rosa M y Hue L. 2002. Signalling pathways and combinatory effects of insulin and amino acids in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem.* 269: 3742-3750.
- Kurumiya Y, Nozawa N, Sakaguchi K, Nagino M, Nimura Y y Yoshida S. 2000. Differential supresion of liver-specific genes in regenerating rat liver induced by extended hepatectomy. *J Hepatol.* 32: 636-644.
- Lachman S. D. 1995. *Eucaryotic transcription factors.* 2da edición. Academic Press. Great Britain. 325 pp.
- Layman D.K. 2003. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *J Nutr.* 133: 261S-267S.

- Liu Z, Jahn L.A, Lomg W, Fryburg D.A, Wei L y Barrett E.J. 2001. Branched chain amino acids activate messenger ribonucleic acid translation regulatory proteins in human skeletal muscle, and glucocorticoids blunt this action. *J Clin Endocr Metab.* 86: 2136-2143.
- Louett J.F, Hayhurst G, Gonzales J.F, Girard J y Decaux J.F. 2002. The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase and gene expresión by cAMP in combination with HNF4 α and cAMP-response element-binding protein (CREB). *J Biol Chem.* 277: 37991-38000.
- Lynch C.J, Hutson S.M, Patson B.J, Vaval A y Vary T.C. 1999. Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats. *Am J Physiol Endoc M.* 283: E824-E835.
- Magee R.T, Cai Y, El-Houseini M, Locker J y Wan Y.J.Y. 1998. Retinoic acid mediates down-regulation of the α -fetoprotein through decreased expression of hepatocyte nuclear factors. *J Biol Chem.* 273: 30024-30032.
- May R.C, Hara Y, Kelly R.A, Block K.P, Buse M.G y Mitch W.E. 1987. Branched-chain amino acid metabolism in rat muscle: abnormal regulation in acidosis. *Am J Physiol.* 252: E712-E718.
- McConnell B.B, Burkholder B y Danner D.J. 1997. Two new mutations in the human E1 β subunit of branched chain α -ketoacid dehydrogenase associated with maple syrup urine disease. *Biochim Biophys Acta.* 1361: 263-271.
- Mendez C.F. 1990. *Tablas de valores nutritivos para cálculos dietéticos.* José Quintín. México.
- Miller L.L. 1982. The role of the liver and the non-hepatic tissues in the regulation of free amino acid levels in the blood. *Hepatology.* 12. 301-305.
- Mimura T, Yamada C, Swendseid ME. 1968. Influence of dietary protein level and hydrocortisone administration on the branched-chain amino acid transaminase activity in rat tissue. *J Nutr.* 95: 493-498.
- Miquerol L, Lopez S, Cartiert N, Tulliez M, Raymondjean M y Kahn A. 1994. Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J Biol Chem.* 269: 8944-8951.
- Mitch W.E y Chan W. 1979. α -ketoisocaproate stimulates branched-chain amino acid

- transaminase in kidney and muscle. *Am J Physiol.* 236: E514-E518.
- Molina-Font J.A. 1998. Nutrition and fetal growth. *Early Hum Dev.* 53 suppl: S51-S60.
- Montamat E.E, Vermouth N.T and Blanco A. 1988. Subcellular localization of branched-chain amino acid amino acid aminotransferase and lactate dehydrogenase C₄ in rat and mouse spermatozoa. *Biochem J.* 255: 1053-1056.
- Morin S, Charron F, Robitaille L y Nemer M. 2000. GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J.*19: 2046-2055.
- Munro H.N. 1983. The placenta in nutrition. *Ann Rev Nutr.* 3: 97-124.
- Nelson L.D y Cox M.M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 3ra edición Worth Publishers. 623-654 pp.
- Ogawa K Ichihara A. 1972. Isozyme patterns of branched- amino acid transaminase in various rat hepatomas. *Cancer Res.* 32: 1257-1263.
- Okada K, Hirotsu K, Sato M, Hayashi H y Kagamiyama H. 1997. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* branched-chain amino acid aminotransferase at 2.5 Å resolution. *J Biochem.*121: 637-641.
- Ooiwa T, Goto H, Tsukamoto Y, Hayakawa T, Sugiyama S, Fujitsuka N y Shimomura Y. 1995. Regulation of valine catabolism in canine tissues: tissue distributions of branched - chain aminotransferase and 2 - oxo acid dehydrogenase complex, methacrylyl – CoA hydratase and 3 – hydroxyisobutyryl –CoA hydrolase. *Biochim Biophys Acta.* 1243: 216-220.
- Panten U, Kriegstein E, Poser W, Schonborn J y Hasselblatt A. 1972 Effects of L-leucine and α - Ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS Lett.* 20: 225-228.
- Papet I, Glomot F, Grizard J y Arnal M. 1992. Regulation of branched-chain amino acid metabolism in ruminants. *Diabetes Metab.* 18: 122-128.
- Park H.D, Scott S, Rai R, Dorrington R, Cooper T. 1999. Synergistic operation of the CAR2 (Ornithine Transaminase) promoter elements in *Saccharomyces cerevisiae.* *J Bacteriol.* 181: 7052-7064.
- Park J. B y Levine M. 1997. The human glutaredoxin gene: determination of its organization, transcription start point, and promoter analysis. *Gene.* 197: 189-193.
- Peyrollier K, Hajduch E, Blair A.S, Hyde R y Hundal S. 2000. L-leucine availability

- regulates phosphatidylinositol 3 - kinase, p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase-3 activity in L6 muscle cells: evidence for the involvement of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in the L-leucine-induced up-regulation of system A amino acid transport. *Biochem J.* 350: 361-368.
- Philipsen S y Suske G. 1999. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 27: 2991-3000.
- Pinaire J, Hasanadka R, Fang M, Chou W.Y, Stewart M.J, Kruijer W y Crabb D. 2000. The retinoid X receptor response element in the human aldehyde dehydrogenase 2 promoter is antagonized by the chicken olvalbumin upstream promoter family of orpha receptors. *Arch Biochem Biophys.* 380:192-200.
- QIAGEN. 2000. *QIAGEN Plasmid Purification Handbook*. 2da edición. 37-40 pp.
- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E y Werner T. 1995. Matind and Matinspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acid Res.* 23: 4878-4884.
- Quian A, Cai Y, Magee R.T, Wan Y.Y. 2000. Identification of retinoic acid-responsive elements on the HNF1alpha and HNF4 alpha genes. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 837-842.
- Raetz C.R.H. 1990. Biochemistry of endotoxins. *Ann Rev Biochem.* 59:129-170.
- Rao T.I, Rao G.N, Swamy M y Sadasivudu B. 1982. Studies on metabolism of branched chain amino acids in branched and other tissues of rat with special reference to leucine. *J Neurosci Res.* 7: 387-395.
- Roberts A.F.C, Viña J.R, Munday M.R, Farrell R y Williamson D.H. 1982. Effects of inhibition of protein synthesis by cycloheximide on lipogenesis in mammary gland and liver of lactating rats. *Biochem J.* 204: 417-422.
- Roh C, Han J, Tzatsos A y Kandror K.V. 2003. Nutrient-sensing mTOR-mediated pathway regulates leptin production in isolated rat adipocytes. *Am J Physiol Endoc M.* 284: E322-E330.
- Rosati M, Valentin A, Patenaude J.D y Pavalkis G.N. 2001. CCAAT-enhancer-binding protein β (C/EBP β). *Nucleic Acid Res.* 23: 4878-4884.
- Samad T, Krezel W, Chambon P y Borrelli E. 1997. Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: activation of the D2 receptor promoter by members of the

- retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 14349-14354.
- Scassa M. E, Guberman A. S, Varone C. L y Cánepa E. T. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase and Ras/Mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for the regulation of 5-aminolevulinic acid synthase gene expression by insulin. *Exp Cell Res*. 271: 201-213.
- Schweizer-Groyer G, Groyer A, Cadepond F, Grange T, Baulieu E.E, Pictet R. 1994. Expression from the tyrosine aminotransferase promoter (-350 to +1) is liver-specific and dependent on the binding of both liver-enriched and ubiquitous trans-acting factors. *Nucleic Acids Res*. 22: 1583-1592.
- Siebert P.D, Chenchik A, Kellogg E.D, Lukyanov K.A y Lukyanov A.S. 1995. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res*. 23: 1087-1088.
- Shan O. J, Anthony J. C, Kimball S. R y Jefferson L. S. 2000. 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *Am J Physiol Endoc M*. 279: E715-E729.
- Shiow I y Lane M. D. 2000. Sequential repression and activation of the CCAAT enhancer-binding protein- α (C/EBP α) gene during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 12519-12523.
- Shirai A and Ichihara A. 1971. Transaminase of branched chain amino acids. *J Biochem* 70: 741-748.
- Siddiqui R. A y Williams J. F. 1989. The regulation of fatty acid and branched-chain amino acid oxidation in cancer cachectic rats: a proposed role for a cytokinase, eicosanoid, and hormone trilogy. *Biochem Med Metab Biol*. 42: 71-86.
- Soemitro S, Block K.P, Crowell P.L y Harper A.E. 1989. Activities of branched-chain amino acid-degrading enzymes in liver from rats fed different dietary levels of protein. *J Nutr*. 119: 1203-1212.
- Sugio S, Petsko G.A, Manning J.M y Ringe D. 1995. Crystal structure of a D-amino acid aminotransferase: how the protein controls stereoselectivity. *Biochemistry*. 34: 9661-9669.
- Suryawan A, Hawes J.W, Harris R.A, Shimomura Y, Jenkins A.E y Hutson S.M. 1998. A

- molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr.* 68: 72-81.
- Sweatt A. J, Wood M, Suryawan A, Wallin R, Willingham M. C y Hutson S. M. 2004. Branched-chain amino acid catabolism: unique segregation of pathway enzymes in organ systems and peripheral nerves. *Am J Physiol Endoc M.* 286: E64-E76.
- Taylor R. T y Jenkins W. T. 1966. Identification of transaminase. *J Biol Chem.* 241: 4396-4405.
- Taniguchi K, Nonami T, Nakao A, Harada A, Kurukawa T, Sugiyama S, Fujitsuka N, Shimomura Y, Hutson S. M, Harris R. A y Takagi H. 1996. The valine catabolic pathway in human liver: effect of cirrhosis on enzyme activities. *Hepatology.* 24: 1395-1398.
- Torigoe T, Izumi H, Yoshida Y, Ishiguchi H, Okamoto T, Itoh H y Kohno K. 2003. Low pH enhances Sp1 DNA binding activity and interaction with TBP. *Nucleic Acids Res.* 31: 4523-4530.
- Torres N, López G, De Santiago S, Hutson S.M y Tovar A.R. 1998. Dietary protein level regulates expression of the mitochondrial branched chain aminotransferase in rats. *J Nutr.* 128: 1368-1375.
- Torres N, Tovar A.R y Harper A. E. 1993. Metabolism of valine in rat skeletal muscle mitochondrial. *J Nutr Biochem.* 4: 681-689.
- Torres N, Vargas C, Hernández-Pando R, Orozco H, Hutson S.M y Tovar A.R. 2001. Ontogeny and subcellular localization of rat liver mitochondrial branched chain amino-acid aminotransferase. *Eur J Biochem.* 268: 6132-6139.
- Torres-Padilla E. M, Fougere - Deschatrette C, Weiss C. M. 2001. Expression of HNF4 alpha isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promoter usage and constitutive 3' end splicing. *Mech Develop.* 109:183-193.
- Torres-Padilla M. E y Weiss M. C. 2003. Effects of interactions of hepatocyte nuclear factor 4 α isoforms with coactivators and corepressors are promoter - specific. *FEBS Lett.* 539: 19-23.
- Tovar A. R, Becerril E, Hernández-Pando R, López G, Suryawan A, De Santiago S, Hutson S. M y Torres N. 2001. Localization and expression of BCAT during pregnancy and lactation in the rat mammary gland. *Am J Physiol Endoc M.*

280: E480-E488.

- Tropp E. B. 1997. *Biochemistry. Concepts and applications*. Brooks/ Cole Publishing Company. New York. Cap 11.
- Wallin R, Hall T.R y Hutson S. M. 1990. Purification of branched chain aminotransferase from rat heart mitochondrial. *J Biol Chem*. 265: 6019-6024.
- Weggen S, Preuss U, Pietsch T, Hilger N, Klawitz I, Scheidtmann K.H, Wiestler O.D y Bayer T.A. 2001. Identification of amplified genes from SV40 large T antigen-induced rat PNET cell lines by subtractive cDNA analysis and radiation hybrid mapping. *Oncogene*. 20: 2023-2031.
- Wu J.Y, Kao H.J, Li S.C, Stevens R, Hillman S, Millington D y Chen Y.T. 2004. ENU mutagenesis identifies mice with mitochondrial branched - chain aminotransferase deficiency resembling human maple syrup urine disease. *J Clin Invest*. 113: 434-440.
- Xu G, Kwon G, Marshall C.A, Lin T.A, Lawrence J.C y McDaniel M.L. 1998. Branched-chain amino acids are essential in the regulation of PHAS-I and p70 S6 kinase by pancreatic β -cells. *J Biol Chem*. 273: 28178-28184.
- Yamazaki K, Mizui Y, Oki T, Okada M, Tanaka I. 2000. Cloning and characterization of mouse glutamine: fructose-6- phosphate amidotransferase 2 gene promoter. *Gene*. 261: 329-336.
- Yang Q y Birkhahn R. H. 1997. Branched - chain transaminase and keto acid dehydrogenase activities in burned rats: evidence for a differential adaptation according to sex. *Nutrition*. 13: 640-645.
- Zhou X, Thompson J.R. 1996. Regulation of glutamate dehydrogenase by branched-chain amino acids in skeletal muscle from rats and chicks. *Int J Biochem Cell B*. 28: 787-793.
- Zielke H.R, Huang Y, Baad P.J, Collins R.M y Zielke C.L. 1997. The role of branched chain aminoacids in brain. *J Neurol*. 1998. 71: 863-874.

9. ANEXO

*Amortiguador de lisis (para 10 ml de solución).

Amortiguador de fosfatos pH 7.8:

K_2HPO_4 100mM 9.15 ml

KH_2PO_4 100mM 0.85 ml

Más 0.2% triton x-100 (20 μ l)

Se le agrega DTT 1M (1 mM concentración final) (10 μ l)

*Amortiguador de reacción (para 100 ml).

Na_2HPO_4 100 mM 93.2 ml

NaH_2PO_4 100 mM 6.38 ml

$MgCl_2$ 1M 100 μ l

Esta solución se puede almacenar a 4°C por un mes.

*Solución aceleradora.

Acelerador al 10% (v/v)

NaOH 0.2N (stock 2N)

Esta solución se almacena a 4°C y dura un año.

*Amortiguador de luciferasa (para 100 ml).

Glicil-glicina 0.5M (pH 7.8) 5 ml

$MgCl_2$ 1M 1.5 ml

ATP 100mM 5 ml

Albumina de suero de bovino 50 mg/ml 1 ml

Agua desionizada 87.5 ml