

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MEDICAS Y NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA DE LA
NUTRICION

REGULACION DE LA REGION PROMOTORA DEL
GEN DE LA HISTIDASA (HAL) EN EL HIGADO
DE RATA POR GLUCAGON

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A

M. EN C. GABRIELA ALEMAN ESCONDRILLAS



TUTOR ACADEMICO:

DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO

MEXICO, D. F.

2005

m346194



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.



Doctorado en Ciencias Biomédicas

FACULTAD DE MEDICINA

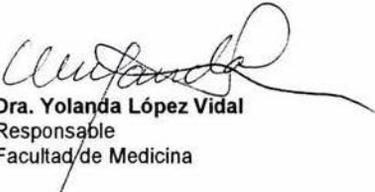
pdcB/grad/ 210Jur/2005

ING. LEOPOLDO SILVA
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION
ESCOLAR DE LA UNAM.
PRESENTE.

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevó a cabo el día 09 de marzo del 2005, **se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas** de alumna **GABRIELA ALEMAN ESCONDRILLAS**, con número de cuenta 9582175-3 y número de expediente 12952005 con la tesis titulada: **"REGULACION DE LA REGION PROMOTORA DEL GEN DE LA HISTIDASA (Ha) EN EL HIGADO DE RATA POR GLUCAGON"**, dirigida por el Dr. Armando Roberto Tovar Palacio.

PRESIDENTE: DR. ROBERTO CORIA ORTEGA
SECRETARIO: DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO
VOCAL: DRA. MARIA CRISTINA FERNANDEZ MEJIA
VOCAL: DRA. SARA HUERTA YEPEZ
VOCAL: DR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES
SUPLENTE: DR. ANGEL ZARAIN HERZBERG
SUPLENTE: DR. SERGIO ENCARNACION GUEVARA

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de mayo de 2005.



Dra. Yolanda López Vidal
Responsable
Facultad de Medicina



Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Coordinador
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

C.c.p. Biol. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.
Tutor(a) Dr. Armando Roberto Tovar Palacio.
Coordinación de Doctorado

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", bajo la asesoría del Dr. Armando R. Tovar Palacio y la co-asesoría del Dr. Felipe Vadillo Ortega y el Dr. Angel Zarain Herzberg.

Este trabajo de investigación fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 26591-M.

La beca para la realización de los estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas fue otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Registro No. 92243) y complementada por la Dirección General de Estudios de Posgrado (D.G.E.P.) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando R. Tovar Palacio y la Dra. Nimbe Torres y Torres, por cada minuto pasado en el laboratorio, por compartir conmigo sus conocimientos y un poco de su vida, por su inagotable paciencia, etc., etc.....

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Angel Zarain Herzberg y Dr. Felipe Vadillo Ortega, por sus atinados comentarios y extraordinaria paciencia durante cada sesión.

Al Q.F.B. Victor Ortiz Ortega, por todas las horas dedicadas a resolver el "Misterio de la Maldición de la Histidasa".

A mis niñas, Caro Flores y Gaby Quiroz por tenerme tanta paciencia y permitirme dirigir un poco de su desarrollo profesional, así como por tenerme la confianza de compartir un poco de sus vidas...

Al Dr. Héctor Bourges Rodríguez, por su confianza y apoyo durante todos los años de mi desarrollo profesional...

A la Dra. Tere Espinosa, por su alegría y disposición a ayudar y compartir experiencias...

A los miembros (presentes y pasados) del Lab. de Nutriología Molecular, Gabriel, Vero, Lariza, Natalia, Caro Ariza, Fernanda, Sra. Silvia, Gris, Lilia, Iván, Memo, Lety, Adriana López, Gaby Q., Maru, Bere, Luli, Vicky, Monse, Lidia y MUY ESPECIALMENTE a Caro Flores, Victor, Euclides, Claudia y Maggy por su ayuda y amistad, por hacer el trabajo más divertido, pero sobre todo por soportar mi hermoso genio.... GRACIAS!!

A la Dra. Elizabeth Langley y sus hijitos (uno de los cuales soy yo), Enrique, Tulia, Sara, Manuel y Laura por su ayuda, amistad y apoyo en momentos de crisis. Por que sin ustedes la realización de este trabajo hubiera sido casi IMPOSIBLE.....

Al Dr. Fernando López Casillas y miembros de su laboratorio, Valentín, José, Male, Dulce, Gaby, Yoshi y Vero, así como al Dr. Francisco Martínez Flores del Centro Nacional de Ortopedia y Rehabilitación por su invaluable ayuda en la realización de este trabajo.

Al Dr. Rubén Gutiérrez por mostrarnos el secreto casi indescifrable de la "ligación".

Agradezco muy especialmente a los integrantes del jurado, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus valiosos comentarios.

Dr. Roberto Coria Ortega
Dr. Armando Tovar Palacio
Dra. Sara Huerta Yépez
Dra. Cristina Fernández Mejía
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Dr. Angel Zarain Herzberg
Dr. Sergio Encarnación Guevara

INDICE

1.INTRODUCCIÓN:	
1.1. GENERALIDADES	2
1.2. METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS:.....	4
Destino de los aminoácidos.....	7
Sitios de control de la utilización de aminoácidos.....	7
Amino acil ARNt sintetasas	8
Síntesis de proteínas.....	8
Enzimas degradadoras de aminoácidos.....	9
1.3. LA HISTIDASA.....	10
1.4. EFECTO DE LA PROTEÍNA DIETARIA SOBRE EL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS Y SU RELACIÓN CON LAS HORMONAS:	11
1.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE AMINOÁCIDOS:	15
1.6. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA HISTIDASA:	18
1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	20
2. OBJETIVOS:.....	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	21
3. HIPÓTESIS:.....	21
4. MATERIAL Y MÉTODOS:	22
4.1. Clonación de la región flanco 5' del gen de la HAL en el hígado de rata:	22
Clonación dirigida en el vector p-Bluescript II (KS+):.....	25
Preparación de células competentes (<i>E. coli</i> XL-1 Blue y DH5 α) con CaCl ₂ :	25
Obtención del plásmido p-Bluescript-HAL y pGL3b-Hal:	26
Secuenciación con el método de terminación en cadena.....	26
4.2. Identificación del sitio de inicio de transcripción:	27
4.3. Funcionalidad de la región promotora del gen de la HAL en el hígado de rata.....	27
Clonación dirigida en el vector pGL3 basic:.....	27
Transfección del promotor HAL en la línea celular HepG2.....	28

Ensayo de luciferasa:	31
Ensayo de β -galactosidasa:.....	31
4.4. EFECTO DE LA PROTEÍNA DIETARIA EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HÍGADO DE RATA.	32
Animales.....	32
Tratamientos dietarios	32
Dietas	32
Determinación de la actividad enzimática de la histidasa	33
4.5. EFECTO DEL GLUCAGON EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS.	
Preparación y cultivo de hepatocitos de rata	33
Determinación de la concentración del ARNm específico de la histidasa (RNAm-HAL) en hepatocitos por Northern Blot:	34
HIBRIDACIÓN DEL RNAm CON LA SONDA DE HAL.....	34
5. RESULTADOS:	35
Secuencia de la región promotora del gen de la HAL en el hígado de rata	35
Efecto de la proteína dietaria en la expresión de HAL en hepatocitos de rata	38
Efecto del glucagon en la expresión del gen de HAL en cultivo primario de hepatocitos de rata	38
Efecto del PMA, forskolina y angiotensina II en la expresión génica de HAL en cultivo primario de hepatocitos de rata.	41
Análisis funcional del promotor del gen de la histidasa en el hígado de rata.....	41
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIONES	50
8. PERSPECTIVAS	51
7. BIBLIOGRAFIA.....	52

INDICE DE FIGURAS

FIG. 1. Principales sistemas involucrados en la regulación del metabolismo de aminoácidos	5
FIG. 2. Reacción catalizada por la histidasa	10
FIG. 3. Los receptores acoplados a proteínas G activan diversas vías de transducción de señales	14
FIG. 4. Diagrama de los sistemas de transducción de señales del glucagon	15
FIG. 5. Diagrama representativo de la obtención de la región 5' del gen de la histidasa en el hígado de rata	23
FIG. 6. Mapa del vector p-Bluescript II (KS+)	25
FIG. 7. Mapa del vector pGL3-basic.....	28
FIG. 8. Representación esquemática de las construcciones del promotor de la histidasa de rata y sus delecciones	29
FIG. 9. Secuencia de la región 5' del gen de la histidasa en el hígado de rata, con los sitios consenso indicados por MatInspector 7.2	36
FIG. 10. Determinación de la sitio de inicio de transcripción por primer extension	37
FIG. 11. Efecto de la proteína dietaria en la actividad y concentración de ARNm de HAL en hepatocitos aislados de hígado de rata	39
FIG. 12. Efecto del glucagon en la expresión del gen de HAL en cultivo primario de hepatocitos de rata	40
FIG. 13. Efecto del PMA, forskolina y angiotensina II en la expresión génica de HAL en cultivo primario de hepatocitos de rata	42
FIG. 14. Análisis de las transfecciones transitorias en la inducción del promotor del gen de HAL por hormonas y compuestos químicos	43

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Clasificación nutrimental de los aminoácidos.....	3
TABLA 2. Comparación de las concentraciones hepáticas de algunos aminoácidos en relación a la constante de Michaelis-Menten (Km) de las aminoacil-tARN sintetasas y de las enzimas degradadoras de aminoácidos.....	9

RESUMEN

A diferencia de los hidratos de carbono y los lípidos, los aminoácidos no tienen un almacén permanente en el organismo, por lo que el exceso de aminoácidos consumidos en la dieta se elimina a través de las enzimas degradadoras de aminoácidos. Una de estas enzimas es la histidasa (Hal), la primera enzima en la ruta de degradación de la histidina, que nos da un ejemplo del metabolismo de aminoácidos en el hígado. La proteína dietaria puede regular la expresión del gen de la Hal a través de cambios hormonales en glucocorticoides y glucagón. Existe una fuerte asociación entre el glucagón y la concentración de proteína de la dieta, así como entre la concentración de glucagón sérico y la actividad de la histidasa. El glucagón es capaz de activar dos posibles rutas de transducción de señales: PKA y PKC. No se conoce cuál de estas rutas es preferentemente utilizada por el glucagón para activar la expresión de Hal. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar esta ruta y aislar la región promotora del gen de la Hal en el hígado de rata para localizar posibles elementos de respuesta para AMPc, que es el segundo mensajero del glucagón y para glucocorticoides. Los resultados mostraron que la expresión del gen de la Hal era inducido 150% por la presencia de glucagón en cultivo primario de hepatocitos después de 45 minutos de incubación. La adición de PMA 100 nmol/l, inductor de la vía de PKC, incrementó al 100% la concentración de ARNm de Hal después de 4 horas de incubación. Los hepatocitos cultivados por 1-2 horas con forskolina 10 mmol/l, inductor de la vía de PKA, también incrementó en un 40% la expresión del gen de la Hal. Estos resultados indican que la expresión génica de Hal es activada tanto por la vía de PKA como por PKC. La identificación de la región promotora del gen de Hal se llevó a cabo por medio de la técnica de "Caminado sobre el Genoma" obteniendo un fragmento de 1248 pb. Se determinó que el sitio de inicio de la transcripción se encuentra localizado a 404 pb del ATG. Esta secuencia no mostró sitios consenso parecidos a la caja TATA o CAAT en las primeras 100 pb hacia la región 5' del sitio de inicio de transcripción, pero se encontraron dos sitios putativos para TATA a -152 y -263, y dos posibles cajas CAAT a -190 y -283. También existen 6 cajas ricas en GC -78, -130, -211, -312, -418, y +2 nt que son posibles sitios de unión para el factor Sp1. Así mismo hay siete sitios probables de unión para AP1, 4 sitios GATA, y un sitio de unión Oct-1. Se encontraron secuencias homólogas para varios elementos de respuesta para factores de transcripción exclusivos del hígado incluyendo C/EBP, NF-IL6, y HNF4 y tres posibles elementos de respuesta para glucocorticoides a -390, -446, and -528, así como un sitio para el receptor de estrógenos (ER) y para el receptor de progesterona (PR) a -218 and -697, respectivamente. La región promotora de Hal fue clonada en el vector pGL3 basic y transfectada en células HepG2. La actividad del gen reportero luciferasa fue significativamente estimulada por dexametasona (2.9-veces), glucagón (0.9-veces), forskolina (0.9 veces) y PMA (2 veces) sobre la expresión basal no estimulada. Esta evidencia apoya que el gen de la histidasa es estimulado por las rutas PKA y PKC, pero con preferencia hacia la ruta de PKA. De esta manera podemos concluir que los nutrientes contenidos en la dieta son capaces de regular a nivel molecular la expresión de los genes de las enzimas degradadoras de aminoácidos con el objeto de eliminar el exceso de aminoácidos que puede ser tóxico para el organismo.

1.INTRODUCCIÓN:

1.1. GENERALIDADES

Los aminoácidos son los bloques estructurales a partir de los cuales se sintetizan las proteínas en el organismo. El carbono α de los aminoácidos que es utilizado por las células es asimétrico, es decir que contiene cuatro sustituyentes enlazados covalentemente, un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y una cadena lateral que es el que da las propiedades químicas de cada uno de los aminoácidos. De acuerdo a la estructura química de la cadena lateral, los aminoácidos se han dividido en zwitterionicos o neutros, catiónicos o básicos y anionicos o ácidos [1]. Todas las proteínas en el organismo están constituidas de cualquiera de estos 20 aminoácidos. Desde el punto de vista nutricional, 8 de los 20 aminoácidos deben ser obligatoriamente consumidos en la dieta, a estos aminoácidos se les conoce como indispensables. Dos aminoácidos son clasificados como semiindispensables, la tirosina y la cisteína, debido a que estos son sintetizados directamente a partir de los aminoácidos indispensables fenilalanina y metionina respectivamente. El resto de los aminoácidos se les clasifica como dispensables ya que pueden ser sintetizados por el organismo. La histidina ha sido clasificada como un aminoácido indispensable durante la infancia, y dispensable durante la vida adulta (tabla 1). La denominación de dispensables no indica que se pueden omitir de la dieta, sino que por un cierto lapso de tiempo estos pueden ser sintetizados cuando se encuentran en bajas concentraciones. La falta de estos aminoácidos en individuos en crecimiento no permite que la tasa de crecimiento sea óptima.

Después de que se consumen los alimentos, las proteínas son hidrolizadas en el estómago y el intestino por medio de proteasas para dar lugar a aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos. Debido a que estos productos son compuestos hidrofílicos, requieren de la presencia de transportadores específicos en el intestino para ser introducidos al enterocito. Los aminoácidos libres absorbidos se dirigen al hígado vía porta, y junto con los aminoácidos procedentes del recambio proteico forman una poza común. Estos aminoácidos pueden tener distintos destinos metabólicos. El más importante es el de ser utilizados para la síntesis de proteínas. Además, los aminoácidos son también utilizados como precursores de algunas hormonas,

neurotransmisores, grupos hemo, bases púricas y pirimídicas, así como también de aminoácidos dispensables. Sin embargo a diferencia de los lípidos y de los hidratos de carbono, no existe un verdadero almacén de proteínas, por lo que un exceso de aminoácidos en la dieta es oxidado.

Aminoácidos	Tipo de aminoácido
Dispensables	
Alanina	Zwitteriónico o neutro
Arginina	Catiónico o básico
Acido aspártico	Aniónico o ácido
Asparagina	Zwitteriónico o neutro
Acido glutámico	Aniónico o ácido
Glutamina	Zwitteriónico o neutro
Glicina	Zwitteriónico o neutro
Prolina	Zwitteriónico o neutro
Serina	Zwitteriónico o neutro
Histidina (adultos)	Zwitteriónico o neutro
Indispensables	
Isoleucina	Zwitteriónico o neutro
Leucina	Zwitteriónico o neutro
Lisina	Catiónico o básico
Metionina	Zwitteriónico o neutro
Fenilalanina	Zwitteriónico o neutro
Treonina	Zwitteriónico o neutro
Triptofano	Zwitteriónico o neutro
Valina	Zwitteriónico o neutro
Histidina (infancia)	Zwitteriónico o neutro
Semiindispensables	
Cisteína	Zwitteriónico o neutro
Tirosina	Zwitteriónico o neutro

Tabla 1. Clasificación nutricional y por estructura química de los aminoácidos.

1.2. METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS:

Los organismos adultos generalmente se mantienen en un estado estable. Una entrada constante de nutrimentos, así como salida de energía y productos de deshecho permiten a los organismos mantener una composición constante. Cuando el estado estable se perturba por cambios en el medio ambiente, como son los cambios en la dieta en la cual existe variabilidad en la cantidad y calidad de los nutrimentos, así como la frecuencia con la que se consumen, se cambian los flujos de nutrimentos temporalmente, y esto dispara mecanismos regulatorios intrínsecos para mantener la homeostasis [2]. La homeostasis del ambiente interno de los mamíferos se logra mediante una serie de mecanismos de retroalimentación entre varios tejidos [3].

Los principales sistemas responsables para el mantenimiento de la homeostasis de las proteínas y aminoácidos corporales son la síntesis y degradación de proteínas, y la oxidación de todos los aminoácidos, así como la síntesis de aminoácidos dispensables. Cambios en la velocidad de estos sistemas permiten un ajuste en el balance de nitrógeno para mantener un equilibrio. Bajo situaciones en donde no se alcance el equilibrio se generara un balance negativo dependiendo del grado en el cambio en la ingestión de proteína. La oxidación de aminoácidos cambia rápidamente en respuesta a una ingestión de aminoácidos alterada; el cambio en la disponibilidad de sustratos parece ser determinante al menos inicialmente. Las enzimas involucradas en la degradación de aminoácidos también se ven afectadas dependiendo de la cantidad de proteína consumida, lo que se traduce en un cambio en su actividad específica. El efecto neto de estos factores es la conservación del esqueleto carbonado y el nitrógeno de los aminoácidos cuando la ingestión es baja, o por el contrario, un incremento en la eliminación de aminoácidos cuando la ingestión excede el requerimiento [3, 4] (figura 1).

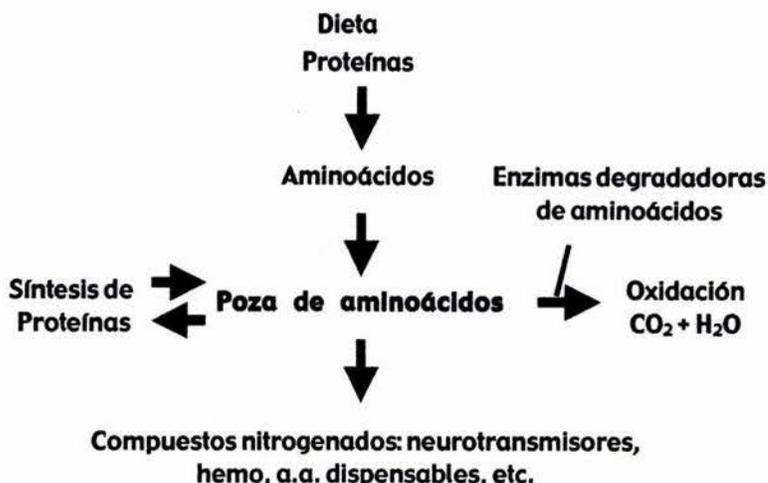


FIGURA 1. Principales sistemas involucrados en la regulación del metabolismo de los aminoácidos.

Para mantener el equilibrio nitrogenado, los aminoácidos se canalizan a diferentes vías metabólicas y los principales destinos son:

1. Incorporación a las proteínas tisulares. Debido a que las proteínas en los diferentes órganos y tejidos tienen una vida media, estas son degradadas a sus aminoácidos individuales, los cuales regresan a formar parte de la poza de aminoácidos libres para ser reutilizados. Este proceso denominado recambio proteico, es de gran importancia para permitir el funcionamiento de los diversos órganos y tejidos en diferentes circunstancias. Estudios utilizando la técnica de "dosis de inundamiento" con aminoácidos marcados han mostrado que el recambio proteico varía de un órgano a otro. Así se ha establecido que el recambio de proteínas en el intestino es de 110%/día, en el hígado de aproximadamente 35%/día, y en el músculo esquelético de 5 a 6%/día. De esta manera el aporte de aminoácidos a la poza de éstos por los diferentes órganos y tejidos será diferente [5-8].

2 . Algunos aminoácidos libres son utilizados para la síntesis de nuevos compuestos de nitrógeno, tales como bases púricas, creatina o neurotransmisores. La consecutiva degradación de estos productos generalmente no va seguida del retorno de los compuestos finales al depósito de aminoácidos. Por otro lado, los aminoácidos dispensables se forman en el organismo usando grupos amino derivados de aminoácidos indispensables [9].

3. Parte de los aminoácidos libres son catabolizados. El grado de oxidación de los aminoácidos depende de la concentración de aminoácidos en la dieta. Debido a que no existe un verdadero almacén de proteínas en el organismo todo exceso de aminoácidos es catabolizado. Esto se ha demostrado a través de estudios utilizando la técnica de balance de nitrógeno. Cuando se consumen concentraciones de proteína por arriba del requerimiento de un individuo, este no incrementa su contenido de nitrógeno corporal. Es decir, no aumenta la retención de nitrógeno, lo que indica que existen mecanismos que mantienen un nivel de nitrógeno corporal [10, 11]. Cuando aumenta la oxidación de aminoácidos, el esqueleto carbonado de éstos se pierde en forma de CO_2 o queda a su disposición como glucógeno y grasa, mientras que el nitrógeno es eliminado en forma de urea [12].

Se ha determinado que deben existir mecanismos específicos que mantienen la homeostasis del nitrógeno corporal. La evidencia muestra que los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la homeostasis son dependientes de los ajustes que se llevan a cabo en el sistema endócrino y de cambios en la actividad enzimática [3]. Se ha demostrado que la existencia de estos mecanismos es esencial para el correcto funcionamiento del organismo, y que cuando fallan como sucede en individuos con defectos congénitos en el catabolismo de aminoácidos, por ejemplo en el caso de la fenilcetonuria o del síndrome de jarabe de arce, en donde hay una deficiencia en la actividad de las enzimas fenilalanina hidroxilasa o deshidrogenasa de los cetoácidos de cadena ramificada respectivamente, se produce una acumulación de los correspondientes aminoácidos fenilalanina o aminoácidos de cadena ramificada en la

sangre lo que ocasiona diversas anomalías incluyendo deterioro neurológico, crisis metabólicas y retraso mental. Esto indica el efecto tóxico que puede ocasionar una acumulación de exceso de aminoácidos y de que no existe un almacén permanente para ellos. El hecho que una dieta alta en proteína no produzca una acumulación de las mismas en el cuerpo nos indica que no existe un almacén de proteínas. La retención de nitrógeno y el crecimiento se ven disminuidos si un aminoácido es eliminado de la dieta en individuos en crecimiento o se produce un balance de nitrógeno negativo en adultos [4, 9, 13, 14]. Estos hallazgos han permitido establecer cuales son los sitios que controlan la homeostasis de nitrógeno corporal.

Destino de los aminoácidos

El destino de los aminoácidos ya sea para ser utilizados en la síntesis de proteínas o para su degradación depende de las constantes de Michaelis-Menten (K_m) de las aminoacil-ARNt sintetetasas y de las enzimas degradadoras de aminoácidos. Se ha determinado que las K_m 's de las aminoacil-ARNt sintetetasas son de 1/10 a 1/100 más pequeñas (con mayor afinidad) que las K_m 's de las enzimas degradadoras de aminoácidos (tabla 2). Por lo tanto los aminoácidos son canalizados proteínas, un gran porcentaje de aminoácidos es canalizado hacia su oxidación en presencia de enzimas degradadoras de aminoácidos [4, 14].

Sitios de control de la utilización de aminoácidos

Los aminoácidos son retenidos temporalmente en el cuerpo de una manera muy efectiva. Por un lado las proteínas provenientes de la dieta son digeridas casi completamente y los aminoácidos liberados de la digestión son absorbidos totalmente; por otro lado, la reabsorción de aminoácidos del filtrado glomerular es altamente eficiente. De ahí que existan solamente dos sitios de control para la utilización de aminoácidos 1) síntesis de proteínas a través de las amino acil ARNt sintetetasas y 2) degradación de aminoácidos. Si alguno de estos dos mecanismos está defectuoso o se encuentra sobrecargado, un mecanismo restante como es la disminución en la ingestión de alimentos previene la acumulación de aminoácidos [4, 9, 13, 14].

Amino acil ARNt sintetasas

Los aminoácidos son utilizados principalmente para la síntesis de proteínas debido a que las aminoacil-ARNt sintetasas funcionan a su máxima velocidad (V_{max}) a bajas concentraciones de aminoácidos. Estas enzimas catalizan la unión de los aminoácidos a sus correspondientes ARN de transferencia (ARNt) en presencia de ATP. Los ARNt ya cargados con sus aminoácidos pueden unirse a su correspondiente codón presente en el ARN mensajero para ser utilizados en los ribosomas durante la síntesis de proteínas. Existe una aminoacil-ARNt sintetasa para cada uno de los 20 aminoácidos. Este resulta ser un mecanismo preventivo para evitar que los aminoácidos sean oxidados. Por el contrario, cuando se consume una dieta alta en proteína, las concentraciones de aminoácidos aumentan significativamente por lo que se activan las enzimas degradadoras de aminoácidos [15, 16].

Síntesis de proteínas

Los aminoácidos provenientes de la dieta son preferencialmente utilizados para la síntesis de proteínas debido a la mayor afinidad de los aminoácidos por las amino acil ARNt sintetasas (valores de K_m en el rango de μM). Por lo que los ARNt están siempre cargados con sus aminoácidos permitiendo una continua síntesis de proteínas. El consumo de la dieta estimula la producción de insulina, esta hormona a su vez estimula la síntesis de proteínas a través de un aumento en el transporte de aminoácidos hacia diferentes órganos o tejidos [17] y activa factores de iniciación del proceso de síntesis de proteínas que ocurre en los polisomas. Los aminoácidos por si solos no estimulan la síntesis de proteínas a excepción de la leucina y posiblemente la glutamina. La leucina en presencia de la insulina tiene un efecto aditivo sobre el incremento en la velocidad de síntesis de proteínas [18]. La leucina acelera la síntesis de proteínas aumentando la formación del factor de iniciación 4F (eIF4F). Se ha propuesto que este aminoácido activa directamente a la cinasa mTOR y esta a su vez fosforila al factor eIF4F o que la cinasa mTOR fosforile a las proteínas $p70^{S6k}$ y 4E-BP1 que a su vez activan al factor eIF4F [19-21].

Enzimas degradadoras de aminoácidos

Las enzimas degradadoras de aminoácidos son enzimas que se encargan de eliminar el exceso de aminoácidos que es tóxico para el cuerpo. Estas enzimas son las primeras en la ruta de degradación de cada uno de ellos y controlan el flujo de su degradación. Generalmente estas enzimas tienen baja afinidad por su sustrato para evitar que bajas concentraciones de aminoácidos en el cuerpo sean oxidadas [4, 14]. La mayoría de estas enzimas se encuentran en el hígado con la excepción de la enzima degradadora de los aminoácidos de cadena ramificada, que se encuentra en la mayoría de los tejidos extrahepáticos [22, 23].

Concentración hepática			Enzimas degradadoras de Aminoácidos	
		Km		
Baja proteína (6%)	Proteína adecuada (24%)	Amino acil sintetasa	Nombre	Km
		M		M
	10^{-4} M			
Triptofano	0.4	1×10^{-6}	Triptofano oxigenasa	1.5×10^{-4}
Treonina	1.8	4×10^{-6}	Treonina deshidratasa	2.9×10^{-2}
Valina	2.8	1×10^{-4}	Aminotransferasa AACR	4.3×10^{-3}
Arginina	0.1	2×10^{-6}	Arginasa	2.4×10^{-3}
Isoleucina	1.6	5×10^{-6}	Aminotransferasa AACR	8.0×10^{-4}
Tirosina	2.3	4×10^{-5}	Tirosina aminotransferasa	1.5×10^{-3}
Serina	14.6	5×10^{-4}	Serina deshidratasa	5.2×10^{-2}
Fenilalanina	1.7	1×10^{-5}	Fenilalanina hidroxilasa	1.1×10^{-3}

Tabla 2. Comparación de las concentraciones hepáticas de algunos aminoácidos en relación a la constante de Michaelis-Menten (Km) de las aminoacil-tRNA sintetasas y de las enzimas degradadoras de aminoácidos.

1.3. LA HISTIDASA

La histidasa (histidina-amonía liasa (HAL): EC 4.3.1.3.) es la enzima degradadora de la histidina que cataliza la desaminación irreversible no oxidativa de histidina para formar ácido urocánico [24] (figura 2).

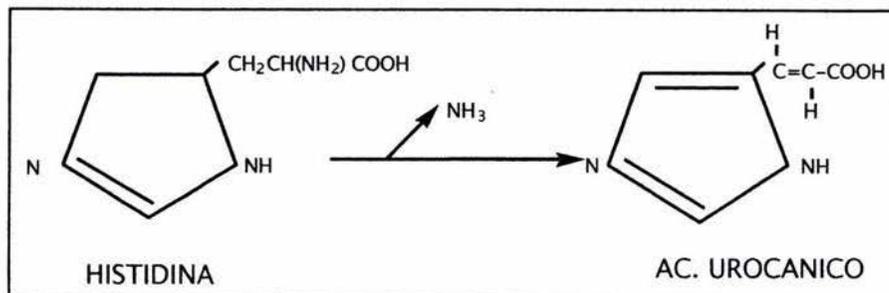


FIGURA 2. Reacción catalizada por la Histidasa.

En mamíferos, la histidasa está localizada principalmente en el hígado, aunque también se ha registrado actividad en la epidermis [25]. La enzima de ambos tejidos tiene la misma K_m , y tienen un patrón de expresión durante el desarrollo muy diferente. Mientras en el hígado se va aumentando la concentración de la enzima, en la piel va disminuyendo conforme se va madurando hasta llegar al estado adulto [25]. La deficiencia de la histidasa produce histidinemia, que resulta de la ausencia hereditaria de la enzima [26]. En la histidinemia, la deficiencia de la histidasa produce la disminución del contenido de ácido urocánico en la piel, cuya función parece ser la de proteger al individuo de los rayos U.V, lo que llevaría a los pacientes a un mayor riesgo de padecer cáncer de la piel [27]. En pacientes con histidinemia, la histidina es transaminada por una ruta alternativa en el hígado, para formar derivados de imidazol, cuyos metabolitos son encontrados en la orina. A pesar de esto, en la mayor parte de los casos conocidos de histidinemia, se ha observado un desarrollo normal del sujeto, y en muy pocos pacientes ha habido daño al sistema nervioso central. No hay evidencia de que la histidinemia sea perjudicial para el crecimiento, salud o desarrollo intelectual, por lo que la enfermedad se considera como "benigna" [28].

La histidasa tiene un peso molecular de aproximadamente 216 kDa y está formada por tres subunidades idénticas de 72 kDa cada una. La enzima tiene un pH óptimo de 8.5. El valor de Km para la L-histidina es de 2.0 mM a pH fisiológico [26].

El gen de la histidasa humana está localizado en el cromosoma 12 (q22-12q24.1) [29], y su ADNc también ha sido identificado [30, 31]. El gen humano tiene aproximadamente 25 kb y consiste de 21 exones. Su región promotora contiene secuencias homologas a sitios de unión de varios factores de transcripción específicos de hígado, que responden a glucocorticoides, así como sitios que responden a AMPc. El ADNc de la histidasa de rata tiene 2.2 kb con un marco de lectura abierta (ORF) de 1971 pb que codifica para un polipéptido de 657 aminoácidos con una masa molecular de 72,165 Da [32]. La histidasa de rata tiene una homología de 41 y 43% con las histidasas de *Pseudomonas putida* y *Bacillus subtilis*, respectivamente y una homología de alrededor de 90% entre el gen de la histidasa humana y la de murino [31].

1.4. EFECTO DE LA PROTEÍNA DIETARIA SOBRE EL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS Y SU RELACIÓN CON LAS HORMONAS:

La poza metabólica de los aminoácidos puede verse afectada por varios factores como son la oxidación de aminoácidos que juega un papel importante en respuesta a modificaciones en la ingestión de proteínas [33]. Otro factor determinante es la disponibilidad de aminoácidos, ya que las enzimas involucradas en su oxidación también se ven afectadas, presentando modificaciones en su actividad y/o en su concentración como respuesta a cambios en la concentración de proteínas o aminoácidos de la dieta. Cuando el nivel de proteínas de la dieta es alterado, se afecta la disponibilidad de aminoácidos para las diferentes pozas del cuerpo, variando el aporte de aminoácidos a los diferentes tejidos u órganos. Así, la mayoría de los aminoácidos indispensables sufre una abundante oxidación en el hígado, mientras que en otros tejidos es muy baja.

La actividad de algunas enzimas involucradas en la oxidación de los aminoácidos incrementa en respuesta a una elevada ingestión de proteínas, tal es el caso de ciertas aminotransferasas y de enzimas degradadoras de aminoácidos del hígado [34, 35]. Las modificaciones en la actividad de estas enzimas a corto plazo

pueden explicarse en base a la disponibilidad de sustrato, es decir, cambios en la concentración tisular de los aminoácidos que resultan en cambios paralelos en su oxidación [11, 36]. Por otra parte, existe un mecanismo a largo plazo que incluye un cambio en la expresión de genes que regulan la actividad de varias enzimas degradadoras de aminoácidos. El cambio en la expresión génica de estas enzimas puede ser regulado por un cambio hormonal causado por la ingestión de diferentes concentraciones de proteína. Los cambios hormonales tienen un papel esencial en la adaptación del individuo a la ingestión de proteínas y de energía [37].

Se ha demostrado que la concentración de algunas hormonas en el plasma de la rata [38], así como en el ser humano [39] varía de acuerdo a la dieta. Conforme se eleva la concentración de proteína en la dieta, se eleva la concentración plasmática de tiroxina, glucagón y corticoesterona, mientras disminuyen las concentraciones de T3, norepinefrina y epinefrina [39].

La ingestión de dietas desequilibradas produce cambios adaptativos en la estructura, función y composición enzimática de los tejidos para permitir la supervivencia más larga posible del organismo. Las hormonas median muchos de estos cambios enzimáticos; sin embargo algunos cambios son efecto directo de los nutrientes. Además de afectar la velocidad de secreción de las hormonas, cambios en las concentraciones de sustratos en el plasma pueden inducir efectos indirectos en el metabolismo. Por ejemplo, el glucagón y la hormona del crecimiento que se secretan en respuesta a la hipoglucemia, no solo estimulan reacciones para regresar la concentración de glucosa sanguínea a la normalidad, sino también estimulan la salida de otros compuestos, como aminoácidos para la gluconeogénesis [3].

Mecanismos de acción de las hormonas peptídicas: Las hormonas peptídicas en general actúan por medio de un receptor localizado en la membrana. Algunos de estos receptores al ser activados por su ligando presentan actividad de tirosina cinasas, y de esta manera inician cascadas de fosforilaciones que producen efectos específicos en la célula, como la insulina [40]. Por otro lado, un gran número de hormonas, neurotransmisores, mediadores locales y estímulos sensoriales ejercen su efecto en las células y los organismos mediante la unión a receptores acoplados a

proteínas G, las cuales activan enzimas que generan segundos mensajeros [40]. Están formadas por las subunidades α , β y γ ; y se conocen cuatro clases principales de proteínas G: G_s , que activa a la adenilato ciclasa, G_i , que inhibe a la adenilato ciclasa, G_q que activa a la fosfolipasa C (PLC), y G_{12} y G_{13} , de función desconocida [40] (figura 3).

Las proteínas G están inactivas cuando están unidas a GDP, y se activan al intercambiarse el GDP por el GTP a la subunidad alfa. La unión de GTP produce la disociación de $G\alpha$ -GTP de las subunidades $G\beta\gamma$. La desactivación de las proteínas G es necesaria para finalizar la respuesta celular y ocurre cuando la subunidad $G\alpha$ hidroliza GTP a GDP [40]. Aunque la mayoría de los receptores acoplados a proteína G median la transducción de señales via proteínas G, existe evidencia de que algunos de estos receptores también son capaces de enviar señales por moléculas de señalización alternativas, como la Jak2 cinasa, PLC, o PKC [41]. Se conoce ampliamente que las enzimas activadas por las proteínas G generan AMP cíclico (AMPc) o diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato respectivamente, los cuales funcionan como segundos mensajeros. El AMPc activa la PKA a través de disociar las subunidades represoras de las catalíticas de esta enzima. Una vez activada la PKA, esta es capaz de promover la activación de múltiples vías metabólicas por medio de la fosforilación de enzimas o proteínas específicas. La activación de la PKA también puede estimular la transcripción de algunos genes por medio de la fosforilación de factores de transcripción que pertenecen a la familia CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein), los cuales una vez fosforilados se unen a los Elementos de Respuesta a AMPc (CRE) presentes en los promotores de dichos genes. Existen otros factores que se conoce también se activan por la presencia del AMPc, como por ejemplo el factor AP1 [42-46].

El glucagon es una hormona que incrementa las concentraciones de AMPc. En la actualidad se conoce un solo receptor para esta hormona, sin embargo se ha descubierto que en células hepáticas no solo incrementa los niveles de AMPc a través de su acoplamiento con la adenilato ciclasa, sino que también es capaz de activar proteínas G que interactúan con la fosfolipasa C generando diacilglicerol e inositol 1,4,

5 trifosfato; esto permite una mayor versatilidad de esta hormona sobre los efectos que puede generar [47-49] (figura 4).

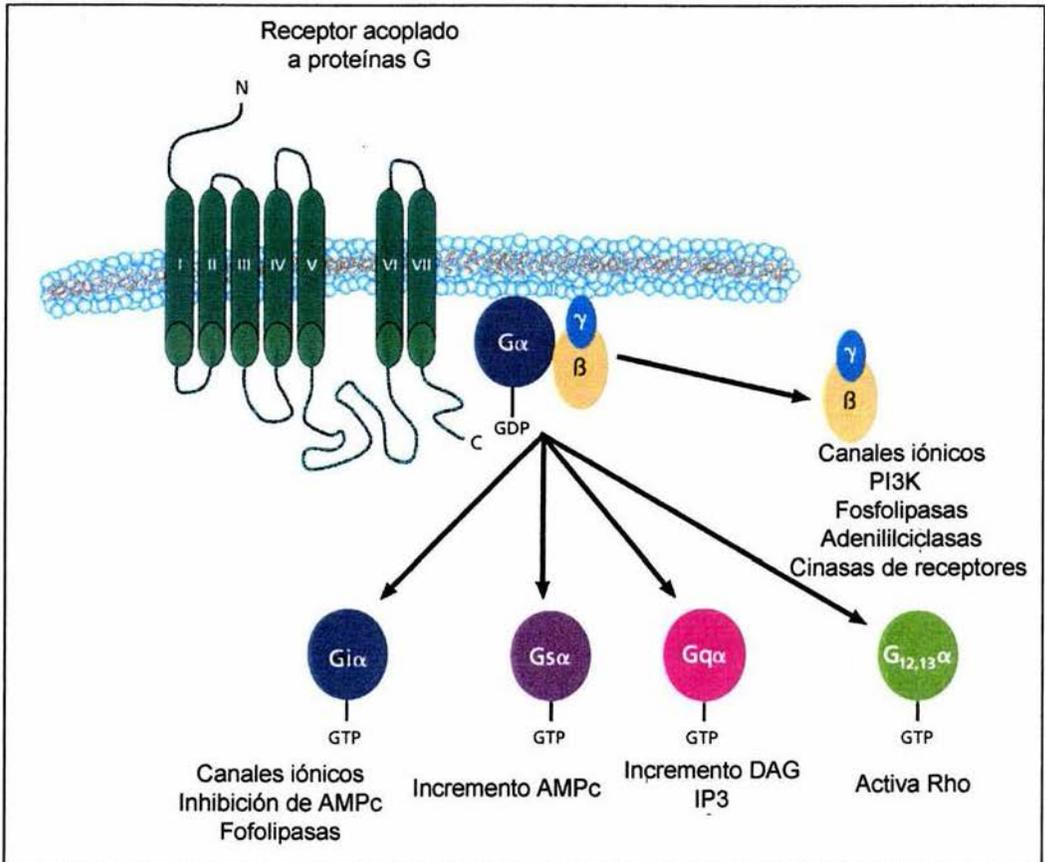


FIGURA 3. Los receptores acoplados a proteínas G activan diversas vías de transducción de señales.

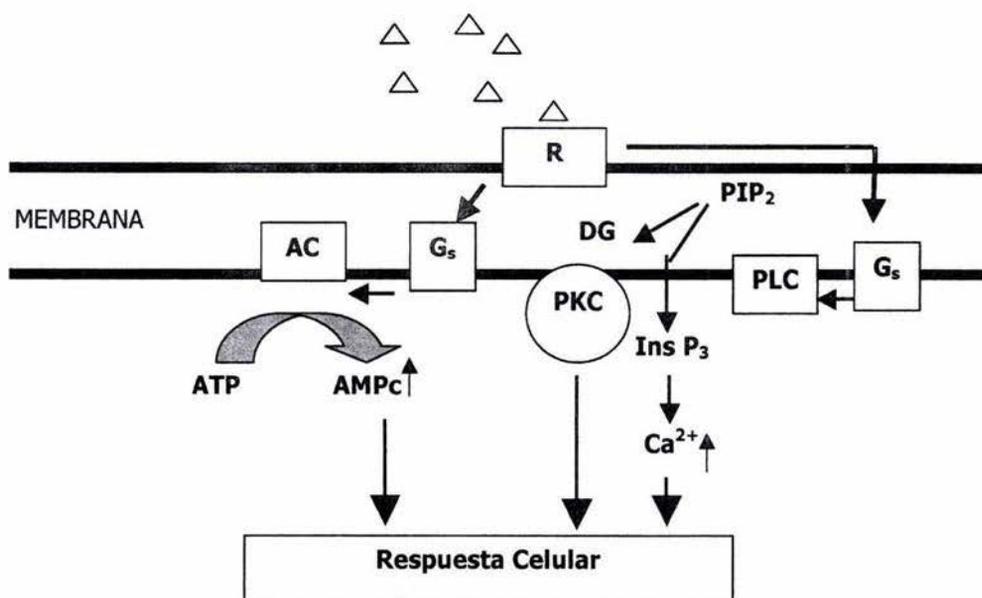


Figura 4. Diagrama de los dos sistemas de transducción de señales del glucagon. R=receptor, AC=Adenilato ciclasa, PIP=fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, DG= diacilglicerol, Ins P3=inositol trifosfato, PLC= fosfolipasa C.

1.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE AMINOÁCIDOS:

Los nutrientes, así como las hormonas también controlan la expresión de los genes [50, 51]. En los últimos años se ha identificado que componentes dietarios tales como los ácidos grasos poliinsaturados, colesterol, glucosa, fructosa, minerales específicos como el hierro, y vitaminas liposolubles como el ácido retinoico intervienen en la expresión de ciertos genes. Los blancos de estos nutrientes incluyen: a las proteínas nucleares y a los elementos que actúan en *cis* que regulan la transcripción; también a los eventos como el proceso de corte-empalme y proteínas específicas que modifican la estabilidad del ARN y la velocidad de traducción del ARNm [52-56]. Las enzimas degradadoras de aminoácidos son especialmente sensibles a cambios en la

dieta, incrementando su actividad con una dieta alta en proteína y disminuyéndola con una dieta alta en hidratos de carbono y baja en proteína. La concentración de proteína requerida para inducir cambios en las enzimas degradadoras de aminoácidos es variable de acuerdo a la enzima [57]. Sin embargo, existe poca información sobre el efecto de la proteína dietaria y por lo tanto de los aminoácidos en la ruta de la expresión génica.

Los nutrimentos pueden regular la vía de expresión de genes que codifican para diferentes enzimas actuando directamente o generar un estado hormonal específico en el organismo, y regular así la expresión de algunos genes [58].

La transcripción de diversos genes que están preferencialmente expresados en el hígado, es específicamente disminuida en animales que consumen dietas con restricción de proteína, tal es el caso de la mayor parte de las enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos.

El nivel de transcripción de los genes expresados en el hígado depende en parte de los factores de transcripción presentes en el mismo, como son los factores nucleares de hepatocitos (HNF) y las proteínas que responden al potenciador CCAAT (C/EBP). Marten y cols. [59] mostraron que la restricción en la proteína dietaria provoca diversos cambios en la actividad de unión al ADN de varios factores de transcripción, como HNF1, HNF3 α y β , HNF4, C/EBP α y β y SP1, teniendo un considerable efecto en la transcripción de diversos genes. Esto parece ser debido a los cambios hormonales del organismo en respuesta al cambio de la proteína dietaria, por ejemplo, se sabe que los aminoácidos son capaces de estimular la secreción de glucagon y de glucocorticoides pero estimulan muy poco la secreción de insulina [39, 60].

Algunos ejemplos de enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, cuya transcripción se ve afectada por la dieta y por lo tanto, por las hormonas, son la serina deshidratasa (SDH, E.C. 4.2.1.13.), la tirosina aminotransferasa (TAT, E.C. 2.6.1.5.) y la histidasa (HAL, E.C. 4.3.1.3.), entre otras.

Serina deshidratasa: Cuando el gen de la SDH se activa por la proteína dietaria, una región hacia 5' (upstream) se sensibiliza a la acción de la nucleasa ADNasa I, indicando un cambio en la estructura de la cromatina en estas áreas, y que estas áreas hipersensibles están cerca del sitio de inicio de la transcripción. El estado de nutrición y hormonal puede activar o inactivar la transcripción del gen de la SDH controlando factores regulatorios que actúan en dichas regiones del gen [61]. Haas y Pitot [62] demostraron que la región promotora del gen de la SDH posee elementos de respuesta para AMPc (CRE) que son los responsables de la inducción de este gen por AMPc y por glucocorticoides, ya que la capacidad de unión de la proteína que une a CRE (CREB) se incrementa con AMPc y dexametasona juntos, lo que demuestra que la inducción sinérgica del gen de SDH por AMPc y dexametasona es a través de un sitio CRE y se debe en parte a la regulación de la unión CREB-ADN con el tratamiento con glucocorticoides.

Tirosina aminotransferasa: Nitsch y cols. [63] reportan una represión en la actividad del gen de la TAT por insulina y una estimulación por glucocorticoides y glucagon, y plantean un modelo para las bases de la especificidad tisular del control hormonal de la TAT: Observaron que existen dos potenciadores a -2.5 y -3.6 kb a partir del sitio de inicio de la transcripción, que responden a glucocorticoides y glucagon, respectivamente, los cuales sinergizan con sitios de unión para los factores de transcripción enriquecidos del hígado como son HNF3 y HNF4 (Factores Nucleares de Hepatocitos). Por lo tanto, la interdependencia de los elementos que responden a hormonas y los motivos potenciadores célula-específicos parecen ser la base de la inducción hormonal de la expresión génica de la TAT específica del hígado y puede proveer la conexión para la activación del gen durante el desarrollo [63].

1.6. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA HISTIDASA:

Diversos estudios han mostrado que la administración de glucocorticoides, AMPc o glucagon incrementan considerablemente la actividad de la histidasa bajo diferentes cantidades de proteína dietaria [64-69]. El análisis de las constantes cinéticas de la histidasa ha revelado que al incrementar el contenido de proteína en la dieta, aumenta la V_{max} , sin cambio en la K_m . Esto indica que el aumento en la actividad enzimática se debe a un aumento en la cantidad de enzima degradadora y no a un cambio en la afinidad de la enzima por su sustrato. Esto se confirmó al observar que los cambios en la actividad de la HAL se asocian con incrementos en la concentración de proteína y en su ARNm específico y que también son inhibidos por una dieta alta en hidratos de carbono [70]. Esta inducción no se lleva a cabo en respuesta a diferentes concentraciones de histidina, su sustrato, sino únicamente en respuesta a un aumento en la ingestión de proteína [71]. Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que situaciones catabólicas que ocurren al consumir una dieta desequilibrada en aminoácidos [72], o como consecuencia de un padecimiento como el síndrome nefrótico [73] generan un estado hormonal que también induce la expresión de enzimas degradadoras de aminoácidos para utilizar los aminoácidos provenientes de la proteólisis del músculo como fuente de energía. Este proceso es temporal ya que en una desnutrición prolongada reprime tanto la producción de IGF-I [74], que es un indicador del estado nutricional, así como la expresión de los genes de las enzimas degradadoras para prevenir la degradación de aminoácidos. Sin embargo, después de una rehabilitación nutricional con una cantidad adecuada de proteína rápidamente se reestablece la capacidad de inducción de los genes de enzimas degradadoras de aminoácidos [75]. Por otro lado, la administración de hormonas (glucagon y glucocorticoides) regulan la expresión del gen de la histidasa [70]. Hallazgos más recientes en nuestro laboratorio mostraron que existe una correlación significativa entre la concentración de proteína ingerida, las concentraciones séricas de glucagon y la actividad de la HAL.

La administración de actinomicina D, un inhibidor de síntesis de ARN, inhibe la estimulación por glucocorticoides del ARNm de la HAL. Por otro lado, la administración de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, bloquea la inducción de la HAL

por acetato de hidrocortisona, lo que sugiere que la regulación del gen de la HAL es a nivel pretraduccional [65, 76].

Al estudiar la región 5' terminal del gen de la histidasa humana [31] se encuentra que tiene algunas regiones consenso correspondientes a elementos que responden a glucocorticoides, AMPc y a otros factores de transcripción del hígado. También contiene algunos sitios AP1 que responde a ácido retinoico, pero requiere de la presencia de AMPc para que sea funcional [77, 78]. Esto resulta interesante porque en estudios realizados en nuestro laboratorio se encontró que la deficiencia de retinol disminuye la actividad enzimática de la HAL en 40%. La administración de ácido retinoico aumentó nuevamente la actividad de HAL hasta alcanzar los niveles del grupo control. La deficiencia de retinol disminuye la concentración de ARNm de la HAL, pero al administrar una dosis de ácido retinoico se reestablece la expresión de HAL hasta los niveles observados en las ratas control. [79]

Por otro lado, Sano y cols. [80] reportaron una región adicional de 384 pb al ADNc reportado anteriormente (2136 pb) [32] correspondiente a la región 5' no traducida del gen de la HAL de hígado de rata, pero la región promotora no se conocía hasta la realización de este trabajo.

1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Se conoce que el consumo de dietas con un alto contenido de proteína incrementan la actividad, la concentración de la enzima HAL y de su ARNm [71]. Además, se comprobó que la regulación de la expresión del gen de la HAL en el hígado de rata está mediada por hormonas catabólicas como glucocorticoides y glucagon [70] y no por el substrato específico de HAL [71]. Se desconoce qué ruta de señalización utiliza el glucagon para inducir el gen de HAL, por lo que el conocer cuál de las dos probables rutas de señalización utiliza esta hormona aportará nuevos conocimientos a esta área de la Nutriología Molecular.

Al estudiar la región promotora del gen de otras enzimas degradadoras de aminoácidos (TAT y SDH) [62, 63] así como la del gen de la histidasa humana se han encontrado sitios consenso para elementos de respuesta a AMPc, glucocorticoides, AP1 y algunos otros factores de transcripción específicos de hígado.

La región promotora del gen de la histidasa de rata no se conoce, por lo que resultará interesante conocer qué otros factores regulan dicho gen, el cual es representativo de todas las enzimas degradadoras de aminoácidos expresadas en el hígado, y por lo tanto nos dará un parámetro para conocer la regulación del metabolismo de nitrógeno en el organismo.

2. OBJETIVOS:

2.1. OBJETIVO GENERAL:

Identificar y caracterizar la región promotora del gen de la histidasa (HAL) de la rata, así como la ruta de señalización por la que el glucagon la activa en el hígado.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Aislar y secuenciar la región reguladora 5' del gen de la histidasa.
2. Identificar el (los) sitio(s) de inicio de la transcripción y la región promotora del gen de la HAL de rata en el hígado.
3. Identificar los posibles elementos de respuesta de la región promotora del gen de la HAL de hígado de rata y su funcionalidad.
4. Identificar la ruta de señalización que utiliza el glucagon para inducir el gen de la HAL de hígado de rata.

3. HIPÓTESIS:

El gen de la histidasa (HAL) de rata es regulado transcripcionalmente en el hígado por hormonas (glucocorticoides y glucagon) mediante la unión de factores de transcripción con elementos de respuesta específicos en su región reguladora 5'.

4. MATERIAL Y MÉTODOS:

4.1. Clonación de la región flanco 5' del gen de la HAL de hígado de rata:

Para caracterizar el promotor del gen de HAL se utilizó la estrategia mediada por PCR de caminado por el genoma. Se utilizaron iniciadores específicos antisentido en la región 5' del ADNc de la HAL y primers sentido con adaptador de secuencia conocida para amplificar fragmentos genómicos del gen HAL de rata utilizando ADN genómico ligado a adaptador como templado (Genome Walker Kit, CLONTECH, Palo Alto, CA) (figura 5).

Los iniciadores se diseñaron a partir de la secuencia reportada previamente del ADNc de la HAL humana tomando en cuenta lo siguiente:

1. El primer exón del gen humano tiene 218 bases, el codón de iniciación ATG se encuentra en la base 244 por lo que se encuentra en el segundo exón del gen.
2. Para diseñar los iniciadores específicos se utilizaron las 150 primeras bases del exón 2 del humano (que tiene una alta homología con el ADNc de la rata) y se analizaron con el programa "Oligo 5" (Oligo 5) buscando las siguientes características:
 - a. Los primers debían ser de 25-28 nucleótidos de largo.
 - b. Tener un contenido de G/C de 40 – 60% para asegurar el alineamiento del templado a la temperatura de 67° C.
 - c. No debían formar uniones intramoleculares de hidrógeno.
 - d. Las secuencias 3' de los iniciadores específicos no debían alinearse con las secuencias 3' de los iniciadores sentido con adaptador.
 - e. No debía haber más de 3 G's y C's en las últimas 6 posiciones en el extremo 3' del iniciador.
 - f. Se debían diseñar iniciadores anidados.

Finalmente se obtuvieron las siguientes secuencias:

INICIADOR ESPECÍFICO EXTERNO ANTISENTIDO (GSP1):

5' TTG TTC TTC ATG TAG CGC CGC ACA G 3'

INICIADOR ESPECÍFICO INTERNO ANTISENTIDO (GSP2):

5' AAC ACT GAG CTT CCC GTC CTG GCA G 3'

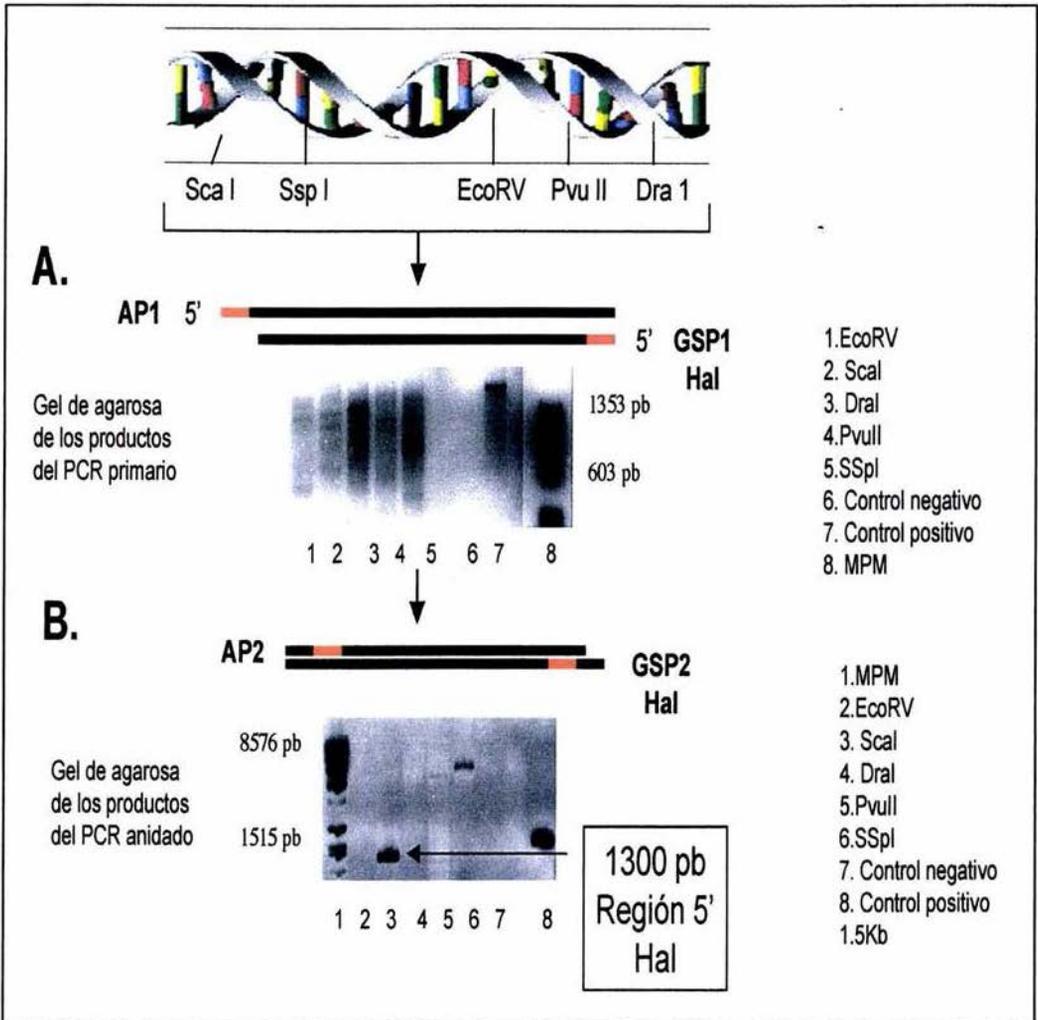


Figura 5. Diagrama representativo de la obtención de la región 5' del gen de la histidasa de hígado de rata. A. PCR utilizando como templado fragmentos con adaptador (AP) de DNA genómico de rata obtenidos con diferentes enzimas de restricción. B. PCR anidado para la obtención de una banda de aproximadamente 1300 pb correspondiente a la región 5' del gen de la HAL.

Las condiciones del PCR fueron las recomendadas en el manual del usuario. Brevemente, se realizaron dos reacciones de PCR: En la primera se utilizaron como templado los 5 fragmentos de DNA genómico de rata obtenidos con las enzimas de restricción *EcoRV*, *SspI*, *DraI*, *PvuII* y *Scal*. Se les adicionó amortiguador 10X Tth, dNTP's 10 mM, Mg(Oac)₂ 25mM, y los primers AP1 (adaptador) y GSP1 (exón 1 del gen de la HAL) y la enzima "advantage genomic polymerase mix". Para el PCR anidado, se utilizaron los primers AP2 y GSP2 y diluciones de los productos del PCR primario como templado. Todas las reacciones fueron incubadas en un termociclador Perkin Elmer 9600 con los siguientes programas:

PCR primario	7 ciclos	94°C	2 s
		72°C	3 min
	32 ciclos	94°C	2 s
		67°C	3 min
	HOLD	67°C	4 min

Para el PCR anidado se diluyeron cada uno de los productos obtenidos del PCR primario (1 µl en 49 µl de agua estéril).

PCR anidado	5 ciclos	94°C	2 s
		72°C	3 min
	32 ciclos	94°C	2 s
		67°C	3 min
	HOLD	67°C	4 min

El producto amplificado fue digerido con las enzimas de restricción *RsaI* y subclonado en el sitio *SmaI* del vector p-Bluescript KS(+) y secuenciado en ambos sentidos por el método de terminación en cadena utilizando dideoxinucleótidos terminadores marcados con ³³P [81]. Los productos de las reacciones se separaron en geles de poliacrilamida (8%)/urea 4M y secados en un secador de geles antes de exponerlos a una placa de radiografía (Kodak Biomax MR) a -70°C.

Clonación dirigida en el vector p-Bluescript II (KS+):

El vector p-Bluescript II (KS+) (GenBank # X52327) (Stratagene) es un plásmido de 2961 pb derivado de PUC 19. Posee un sitio de clonamiento múltiple enmarcado por los promotores T3 y T7. Es resistente a la ampicilina para selección de clonas positivas por antibiótico y además es posible hacer selección de color ya que posee el gen LacZ (figura 6).

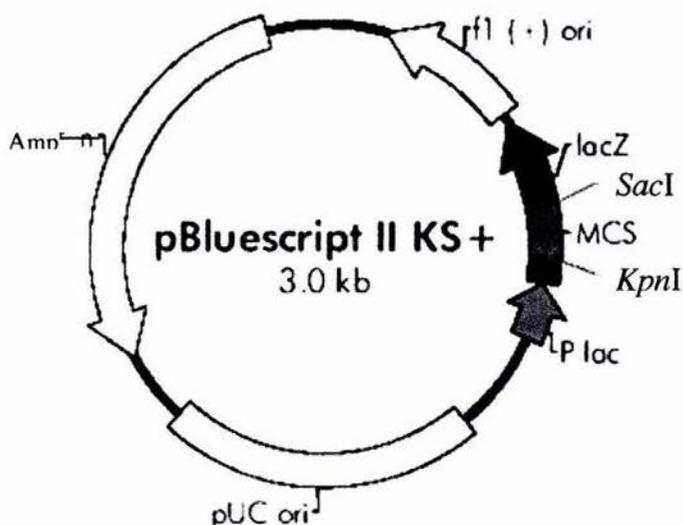


FIGURA 6. Mapa del vector p-Bluescript II (KS+). MCS=Sitio de Clonamiento Múltiple (www.stratagene.com).

Preparación de células competentes (*E. coli* XL-1 Blue y DH5 α con CaCl₂):

Se cultivaron las células de *E. coli* a una fase Log ($OD_{590} = 0.4$), para después concentrarlas por centrifugación y resuspenderlas en una solución de CaCl₂ (CaCl₂ 60 mM, glicerol 15%, PIPES 10 mM pH 7.0): La exposición a los iones calcio ocasiona que las células se hinchen y puedan capturar más fácilmente el ADN de un plásmido después de un choque térmico [82].

Obtención del plásmido p-Bluescript-HAL y pGL3b-Hal:

El vector se digirió con la enzima de restricción *EcoRV* (Roche) y el inserto (HAL) se digirió con *RsaI*. La digestión con *RsaI* produjo 2 fragmentos: el primero de aproximadamente 1000 pb y el segundo de aproximadamente 300 pb. El vector fue posteriormente defosforilado con fosfatasa alcalina (Roche) y purificado por extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol [81].

El inserto se obtuvo a partir de la electroelución de varios productos de PCR (Genome Walker) y la posterior purificación y concentración del ADN con columnas CENTRICON -30 (Amicon, Millipore).

El proceso de ligación se realizó con la enzima ADN T4 Ligasa (Roche) en una relación 1:3 (vector:inserto), se incubó a 16°C durante 16 horas. Con el producto obtenido de la ligación se transformaron bacterias *E.coli* XL1-Blue o DH5 α por choque térmico [81], se sembró en cajas con medio Luria-Agar con ampicilina (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y cuando se utilizaron las bacterias XL1-Blue también contenían IPTG y X-Gal para hacer la selección de color. Una vez obtenidas las colonias, se aisló el plásmido de las bacterias por la técnica de miniprep por lisis alcalina [81]. El producto obtenido fue digerido con *HindIII* y *BamHI* (Roche) para verificar la presencia del inserto. Una vez verificado, se procedió a secuenciar el producto.

Secuenciación con el método de terminación en cadena

Se utilizó el "kit" de secuenciación cíclica con terminadores marcados con ^{33}P "Termosecuencia" (Amersham) que consiste en sintetizar una hebra de ADN con una ADN polimerasa utilizando un ADN de una sola hebra como templado. La elongación de la terminación 3' del primer alineado es catalizada por una ADN polimerasa en presencia de nucleótidos α - ^{33}P 2'-desoxinucleósido-5' trifosfato (dNTP's), y es terminada por la incorporación de un nucleótido análogo 2', 3' -dideoxinucleósido -5' trifosfato (ddNTP) que no permite que se continúe la elongación. Cuatro reacciones separadas, cada una con un ddNTP diferente (ddG, ddA, ddT o ddC) dan la secuencia completa. El ddNTP marcado permite visualizar las cadenas de varios tamaños después de su separación en geles de poliacrilamida (8%)/Urea 4M, se transfirieron a

papel filtro 3MM Whatman y posteriormente secados en un secador de geles DrygelSr Modelo SE 1160 (Hoefer Scientific) antes de la autoradiografía a -70°C [81].

4.2. Identificación del sitio de inicio de transcripción:

Se utilizó la técnica de extensión de primer de (Primer Extensión) de Promega usando un primer diseñado a partir del ARNm de la HAL humana (GS2) marcado con ^{33}P -ATP y extendido por medio de la transcriptasa reversa para formar una sola hebra de ADNc a partir del templado de ARNm total obtenido de hígado de rata. El ADNc resultante se analizó en un gel de poliacrilamida (8%)/urea 4M junto a las reacciones de secuenciación descritas anteriormente. El sitio de inicio de transcripción fue confirmado utilizando el programa de computación MatInspector II (GenomatixSuite, <http://www.genomatix.de>) [83].

4.3. Funcionalidad de la región promotora del gen de la HAL de hígado de rata.

Clonación dirigida en el vector pGL3 basic:

El vector pGL3 basic (GenBank # U47295) (Promega) carece de secuencias promotoras y potenciadoras eucarióticas, permitiendo máxima flexibilidad en clonar secuencias regulatorias putativas. Contiene el ADNc de la luciferasa de luciérnaga, así como una región que contiene la señal de poliadenilación de SV40. La expresión de la actividad de luciferasa en células transfectadas con este plásmido depende de la inserción y correcta orientación del promotor funcional hacia 5' de *luc+* (figura 7).

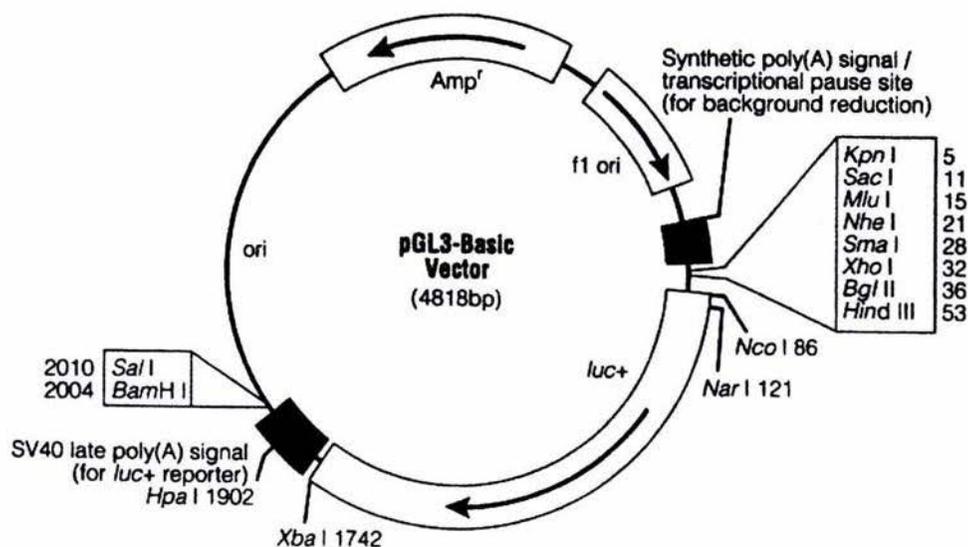


FIGURA 7. Mapa del vector pGL3-BASIC (Life Science Catalog 2004, www.promega.com)

Transfección del promotor HAL en la línea celular HepG2.

Para evaluar la funcionalidad del gen de la histidasa de hígado de rata se realizaron transfecciones transitorias en la línea celular Hep G2 (derivada de un hepatoma humano). Para realizar dichos ensayos se construyeron plásmidos quiméricos que tuvieran el promotor del gen de HAL de rata fusionado al gen reportero de luciferasa. Los plásmidos utilizados fueron los siguientes:

HAL815: fragmento de HAL de 815 pb en el vector pGL3 basic (Promega).

HAL420: fragmento de 424 pb (-381 a +22) en el mismo vector

HAL302: fragmento de 302 pb (-259 a +22) en el mismo vector

Al generar el fragmento HAL420 se eliminaron dos elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), dos sitios AP1, un sitio HNF-4 y un C/EBP. En el fragmento HAL 302 además se quitaron otro C/EBP y otro sitio AP1. La eliminación de estos

elementos de respuesta potenciales nos permitió realizar una evaluación inicial de la funcionalidad de dichos sitios.

Para generar los diferentes fragmentos se utilizó la técnica de PCR agregando los sitios de restricción *Xho*I y *Hind*III en cada uno. Los iniciadores utilizados fueron los siguientes: Hal815 sentido 5' cttactcgagACTATAGGGCAGCCTGGTT 3' (-815 a -797 pb), y antisentido 5'gcaagcttATCAGGGTTCCTATTCTC 3' (+39 a +22). Para Hal420 y Hal 302 sentido 5' gcgctcgagAAGACACAAC TTTTCGTTG 3' y 5'gcgctcgagATTAGGATTGCTACTCC 3', respectivamente. El primer antisentido fue el mismo utilizado para Hal815. Un resumen de todas las construcciones generadas se encuentra en la Figura 8.

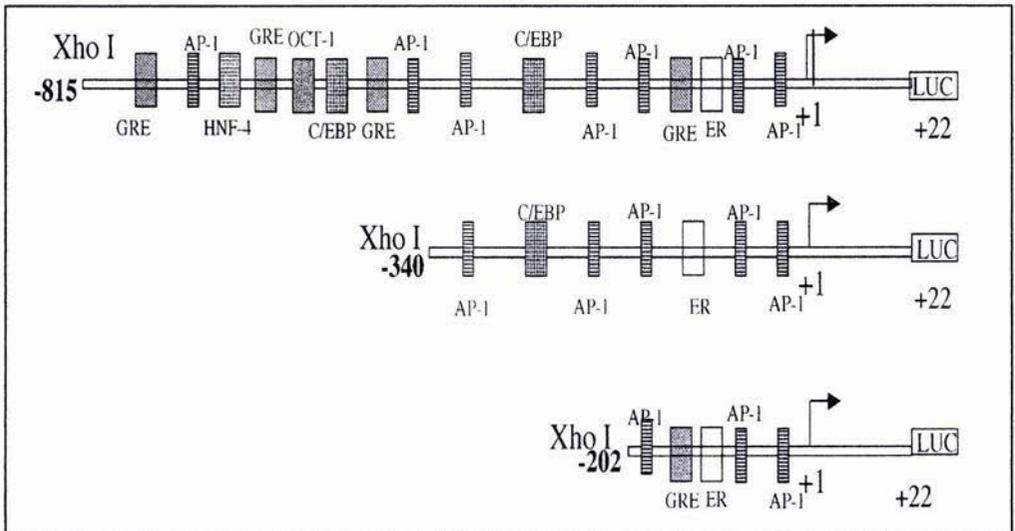


FIGURA 8. Representación esquemática de las construcciones del promotor de la histidasa de rata y sus delecciones. La flecha indica el sitio de inicio de transcripción.

Cada uno de los productos obtenidos fueron ligados via pGEM-T (Promega) toda la noche a temperatura ambiente. Brevemente, los vectores pGEM-T contienen seis timidinas en el sitio de clonamiento que permite la ligación de productos de PCR en los plásmidos evitando la recircularización del vector ya que provee una región compatible

para la serie de adeninas generadas por algunas polimerasas termoestables utilizadas en los PCR.

Los productos ligados en pGEM-T fueron digeridos con *HindIII/XhoI* y subclonados en pGL3 basic, previamente digerido con *HindIII* y *XhoI*.

Para determinar la eficiencia de transfección se transfectó el gen de β -galactosidasa (pSV- β -gal, Promega), el cual se expresa en forma constitutiva, lo que permite la normalización del ensayo.

El día anterior a la transfección se colectaron las células y se sembraron 3×10^4 células /pozo en cajas de 12 pozos (4cm^2). Se dejaron incubando toda la noche en medio α -MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en base a las recomendaciones del fabricante. Las cantidades de DNA utilizadas en el ensayo por cada pozo fueron las siguientes:

200 ng de plásmido pGL3-HAL

50 ng de receptor de glucocorticoides o pCMV5 (control)

25 ng de reportero de β -galactosidasa (pSV- β -gal)

Por cada pozo se utilizaron 2.5 μl de Lipofectamine 2000. A las 4 horas de realizada la transfección, se cambió el medio a las células y 24 horas después las células fueron tratadas con el reactivo/hormona correspondiente (glucagon, forskolina, dexametasona, ácido retinoico o PMA (ester de forbol miriastato), el tratamiento se repitió a las 48 horas y 3 horas después del último tratamiento las células fueron cosechadas para realizar los ensayos correspondientes.

Se realizó el ensayo del gen reportero con luciferasa, mediante la reacción de oxidación del sustrato luciferina, la cual emite luz que es detectada en un luminómetro. Para normalizar la transfección se determinaron los niveles de la enzima β -galactosidasa mediante una reacción de oxidación en la cual se emite luz que es detectada con un luminómetro en donde el sustrato es GalactonTM.

Después de 48 horas de iniciado el tratamiento correspondiente se aspiró el medio de las células y se lavaron dos veces con PBS 1X, se aspiró y se agregaron 100

μ l de solución de lisis por pozo (amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM, DTT 1mM, Tritón X-100 0.2%, pH 7.8) El extracto obtenido se utilizó para el ensayo de luciferasa y β -galactosidasa.

Ensayo de luciferasa:

Se tomaron 50 μ l del extracto celular y se colocaron en una cubeta para luminómetro. Se agregaron 50 μ l de luciferina 1mM y 200 μ l de solución de reacción (glicilglicina 25mM, $MgCl_2$ 15mM, ATP 5mM, BSA 0.5mg/ml, pH 7.8), utilizando los inyectores del luminómetro. El luminómetro se ajustó para que la lectura de la muestra se realizara durante 20 segundos [84].

Ensayo de β -galactosidasa:

Se tomaron 20 μ l de lisado y se agregaron 100 μ l de solución de reacción (amortiguador de fosfatos 100 mM, $MgCl_2$ 1mM, Galacton 1X, pH 8.0). Se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se ajustó el luminómetro para leer la muestra durante 5 segundos. Se agregaron 150 μ l de la solución aceleradora (NaOH 0.2M, TROPIX® 10%) con el inyector del luminómetro. Se configuró el luminómetro para que la lectura se hiciera 3 segundos después de agregarse la solución aceleradora.

Para normalizar los resultados se obtuvo la relación URL/luciferasa/URL β -galactosidasa. Para determinar la inducción se calculó la relación entre los valores registrados en presencia de hormona y aquellos en los que no se aplicó el tratamiento.

4.4. EFECTO DE LA PROTEÍNA DIETARIA EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HÍGADO DE RATA.

Animales

Se separaron doce ratas macho de la cepa Wistar (peso 75-90gr) en jaulas individuales de alambre de acero inoxidable. Los animales se mantuvieron a 22°C con un ciclo luz-obscuridad de 12h y con libre acceso al agua y alimento en el Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Tratamientos dietarios

Las 12 ratas fueron divididas al azar en 4 grupos de 4 ratas cada uno: 1) alimentadas con 6% de caseína (baja en proteína), 2) con 18% de caseína (adecuada en proteína) y 3) con 35% de caseína (alta en proteína). Todas las ratas fueron alimentada *ad libitum* por 10 días con su dieta correspondiente. Al terminar este tiempo las ratas fueron anestesiadas con eter para realizar la perfusion hepática y obtener los hepatocitos aislados. Los protocolos utilizados en todos los experimentos con animales fueron aprobados por la Comisión de ética para el estudio con animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Dietas

Las dietas se administraron en forma de polvo y contenían los siguientes ingredientes (g/Kg dieta): 60, 180 o 350 de caseína libre de vitaminas, 50 de aceite de maíz, 50 de mezcla mineral y 10 de mezcla de vitaminas. Almidón de maíz y sacarosa, en proporción 1:1 fueron adicionadas para completar 1 kg de dieta. La composición de las dietas se encuentra ampliamente descrita por Torres y cols., 1998 [71]. Todos los ingredientes se obtuvieron de Teklad, Madison, WI.

Determinación de la actividad enzimática de la histidasa (E.C. 4.3.1.3., HAL)

Los hepatocitos aislados por la técnica de colagenasa [85] (1×10^7 células) fueron lavadas con solución salina fría, y lisadas con NaOH 5 mmol/l en KCl 14 mmol/l. Las células lisadas fueron centrifugadas por 60 min a $105,000 \times g$, y el sobrenadante se almacenó a -80°C antes de medir la actividad de la HAL. El ensayo de la actividad enzimática se realizó de acuerdo a lo descrito por Torres et al, 1998 [71]. El método consiste en un ensayo espectrofotométrico basado en la aparición de ácido urocánico a 277 nm utilizando como sustrato la L-histidina.

El cambio en la absorbancia se midió a 277 nm en intervalos de 30 segundos durante 10 minutos con un espectrofotometro Beckman (mod. DU 640).

DEFINICION DE UNIDAD Y ACTIVIDAD ESPECIFICA: Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima capaz de transformar 1mmol de sustrato en producto (ácido urocánico) por minuto a 25°C . La actividad específica se expresa en unidades por minuto por mg de proteína. La concentración de proteína se determina por el método de Biuret utilizando como estándar albúmina sérica bovina.

4.5. EFECTO DEL GLUCAGON EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS.

Preparación y cultivo de hepatocitos de rata

Los hepatocitos aislados fueron obtenidos de hígados de ratas Wistar macho utilizando la técnica de perfusión con colagenasa [85]. Las células ($65,000/\text{cm}^2$) fueron cultivadas en cajas de 100 mm de diámetro y mantenidas en medio Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM) (Gibco BRL) suplementado con glucosa, L-glutamina, hidrocloreuro de piridoxina y piruvato de sodio. Después de dos horas, las células se lavaron y el cultivo se continuo en D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado. La viabilidad de los hepatocitos fue mayor al 90% en todos los casos.

Determinación de la concentración del ARNm específico de la histidasa (ARNm-HAL) en hepatocitos por Northern Blot:

La extracción del RNA total se realizó utilizando el método descrito por Chomczynski y Sacchi [86] utilizando aproximadamente siete millones de células.

15 μ g del RNA obtenido de las células se separa por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente el RNA se transfiere por capilaridad en medio salino a una membrana de Nylon (Hybond-N⁺).

HIBRIDACIÓN DEL ARNm CON LA SONDA DE HAL

La sonda de DNAc de la HAL utilizada fue un producto de 1005 pb obtenido por PCR amplificado a partir de DNAc de hígado de rata. Los primers sentido y antisentido utilizados en la reacción de PCR fueron 5'GCATCACCACGGGTTTT3' y 5'GGGCTATCATGAATCCAGAAT3', respectivamente. El producto de PCR se purificó utilizando el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) y marcado con Redivue [α -³²P]dCTP (110 TBq/mmol) utilizando Rediprime DNA labelling kit. Las membranas fueron incubadas con Buffer de prehibridación (Amersham) a 65°C por 30 minutos, y luego hibridadas con la sonda de DNAc de HAL (53.3 MBq/L) por 2.5 horas a 65°C. Las membranas se lavaron una vez con 2X SSC (1X SSC= 0.15 mol/L Cloruro de sodio/15 mmol/L citrato de sodio)/0.1% SDS a temperatura ambiente por 20 minutos, después 15 minutos con 0.1X SSC/0.1% SDS at 65°C. Las imágenes digitalizadas y la cuantificación de la radioactividad (CPM) de las bandas se hizo utilizando el Instant Imager (Packard Instrument, Meriden, CT). Las membranas también se expusieron con una placa fotográfica (Kodak, Mexico) a -70°C con una pantalla amplificadora.

5. RESULTADOS:

Secuencia de la región promotora del gen de la HAL en el hígado de rata:
La región fue aislada como se describe en "Material y Métodos". Se obtuvo un fragmento genómico de 1248 pb, de las cuales 430 pb coinciden con la secuencia de la región 5' no traducida reportada anteriormente [80], las 818 pb restantes no habían sido reportadas hasta la realización de este trabajo. El sitio de inicio de la transcripción (TSS) determinado por Primer Extension y confirmado usando el programa MatInspector II ((GenomatixSuite, <http://www.genomatix.de>) [83] se observó a 404 pb a partir del codon ATG de inicio de la traducción (figuras 9 y 10). Con una búsqueda asistida por computadora (programa MatInspector versión 7.2 basado en la base de datos TRANSFAC) (18) se encontraron algunos elementos que tienen posibles funciones en la regulación de la transcripción del gen de la HAL. No se encontró una caja TATA o CAAT dentro de la distancia esperada a partir del sitio de inicio de transcripción, aunque se encontraron 2 sitios para el factor de transcripción Sp1 por arriba del sitio de inicio de transcripción, y 2 cajas parecidas a TATA y CAT a -152, -263 y -190, -283, respectivamente. Se encontraron secuencias homólogas a sitios de unión para factores de transcripción enriquecidos del hígado o específicos del hígado como HNF-4, C/EBP y NFIL6 localizados entre -270 y -790 pb. Así mismo se encontraron 2 sitios de respuesta a glucocorticoides (GRE), 7 sitios de unión para los factores de transcripción AP-1 y 2 sitios del complejo Tax/CREB los cuales responden a AMPc. Finalmente, encontramos 2 sitios de unión para heterodímeros PPAR/RXR, y 1 para receptor de estrógenos. Adicionalmente, se encontraron secuencias homólogas a los factores de unión para GATA y el factor octamero 1 (OCT-1) (figura 9).

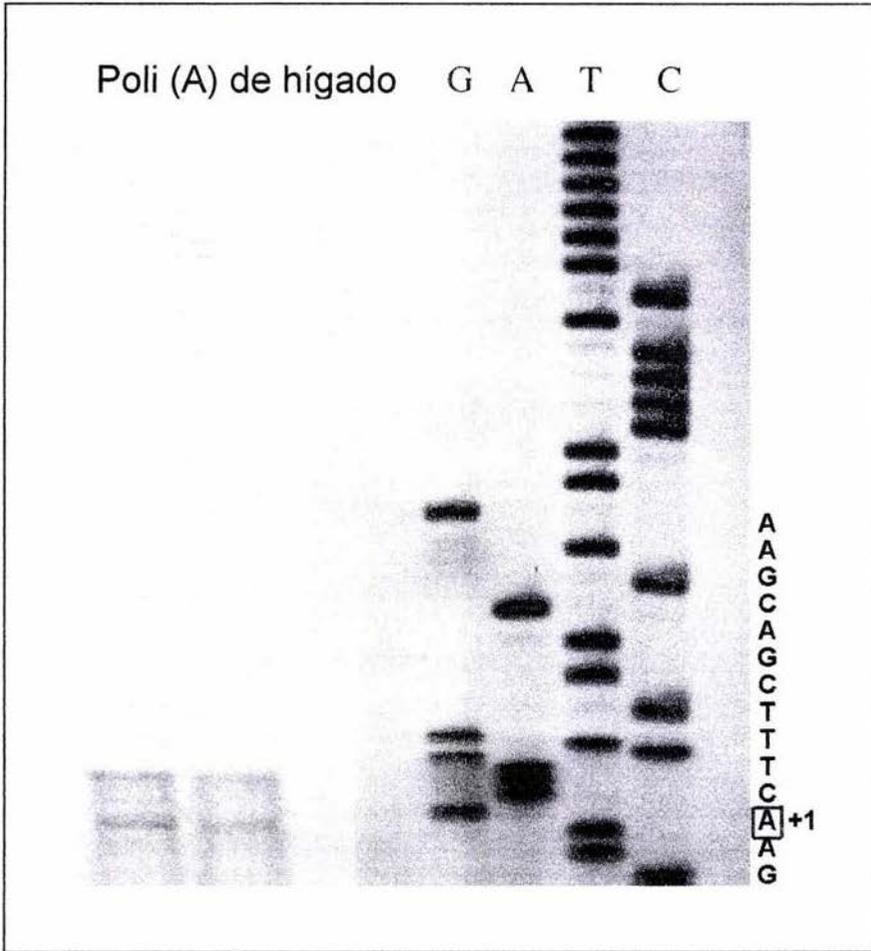


FIGURA 10. Determinación del sitio de inicio de transcripción del gen de la histidasa de rata por Primer Extension. El sitio de inicio de la transcripción se encuentra indicado en la secuencia ubicada a la derecha con +1.

Efecto de la proteína dietaria en la expresión de HAL en hepatocitos de rata.

Para estudiar el efecto de diferentes concentraciones de proteína dietaria en la actividad y concentración del ARNm de HAL en hepatocitos aislados se alimentó a las ratas durante 10 días con dietas con un contenido bajo de proteína (6% de caseína), adecuada en proteína (18% de caseína) y alta en proteína (35% de caseína). La actividad de HAL incrementó aproximadamente 11 veces en las ratas alimentadas con 18% de caseína en comparación con aquellas alimentadas con la dieta baja en proteína, mientras que en aquellas alimentadas con 35% de caseína la incrementaron en un 30% con respecto a las alimentadas con 18% de caseína. Los incrementos en la actividad de HAL se acompañaron de sus correspondientes incrementos en la concentración de ARNm de HAL como se muestra en la figura 11.

Efecto del glucagon en la expresión del gen de HAL en cultivo primario de hepatocitos de rata.

Se determinó el efecto del glucagon en la concentración de ARNm de HAL en cultivo primario de hepatocitos. En la figura 12A se observa que el glucagon (10^{-7} M) incrementó 46% la concentración de ARNm de HAL una hora después de la adición de la hormona. La concentración del ARNm de HAL regresó a su nivel basal a las dos horas de exposición con el glucagon (figura 12A). Posteriormente, se estudio el efecto de diferentes concentraciones de glucagon (10^{-6} to 10^{-10} M) en la concentración de ARNm de HAL después de una hora de incubación. Encontramos que la mayor estimulación de HAL fue cuando los hepatocitos fueron incubados con glucagon 10^{-10} M (figura 12B). Finalmente se realizó una curva de tiempo con esta concentración de hormona para observar la respuesta máxima de la concentración de ARNm de HAL al glucagon. Este experimento mostró que la máxima inducción de 1.5 veces se obtuvo después de 45-75 minutos de incubación (figura 12C). Estos datos muestran claramente que el glucagon es capaz de estimular la expresión del gen de HAL en cultivo primario de hepatocitos.

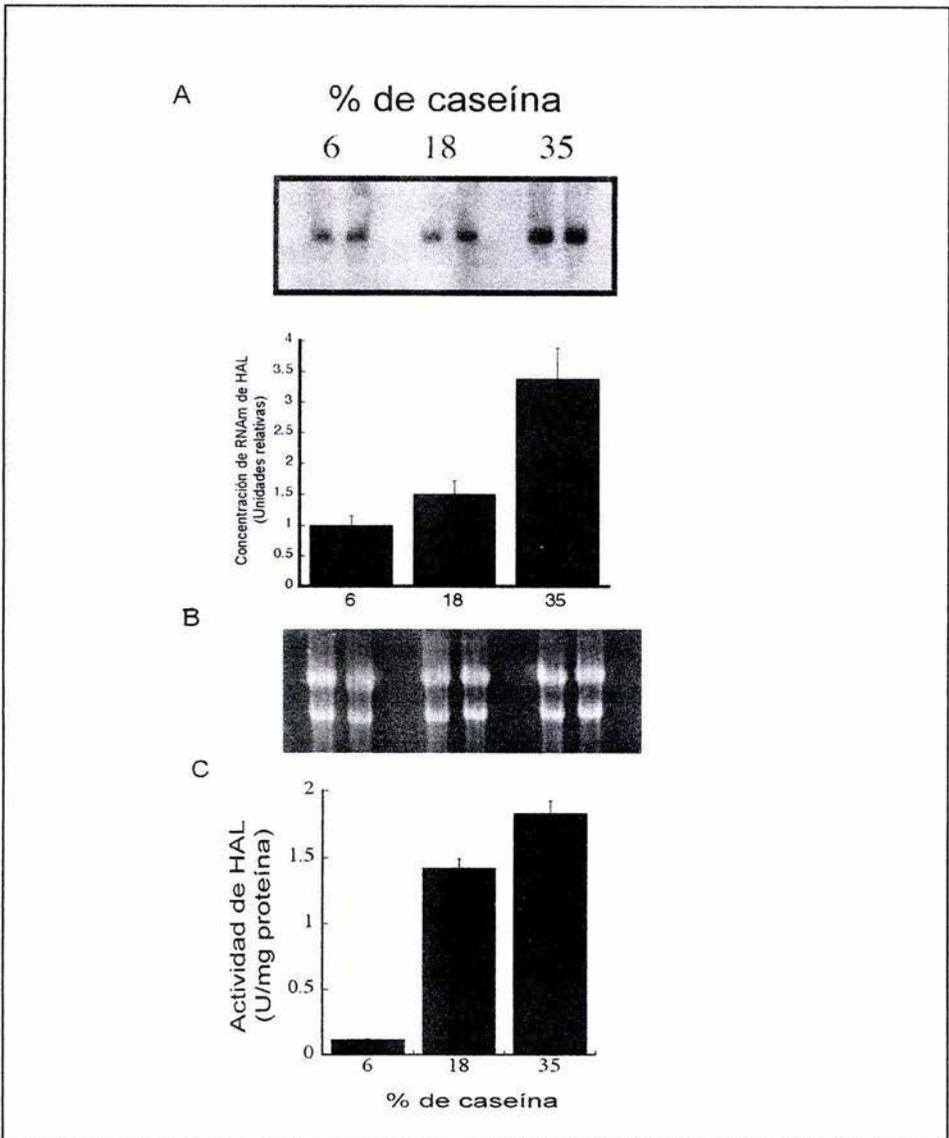


FIGURA 11. Efecto de la proteína dietaria en la actividad y concentración de ARNm de HAL en hepatocitos aislados de hígado de rata. A. Concentración de ARNm de HAL por Northern Blot y cuantificación de la expresión del ARNm de HAL por autoradiografía electrónica B. Gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio. C. Actividad de la histidasa expresada en Unidades/mg proteína.

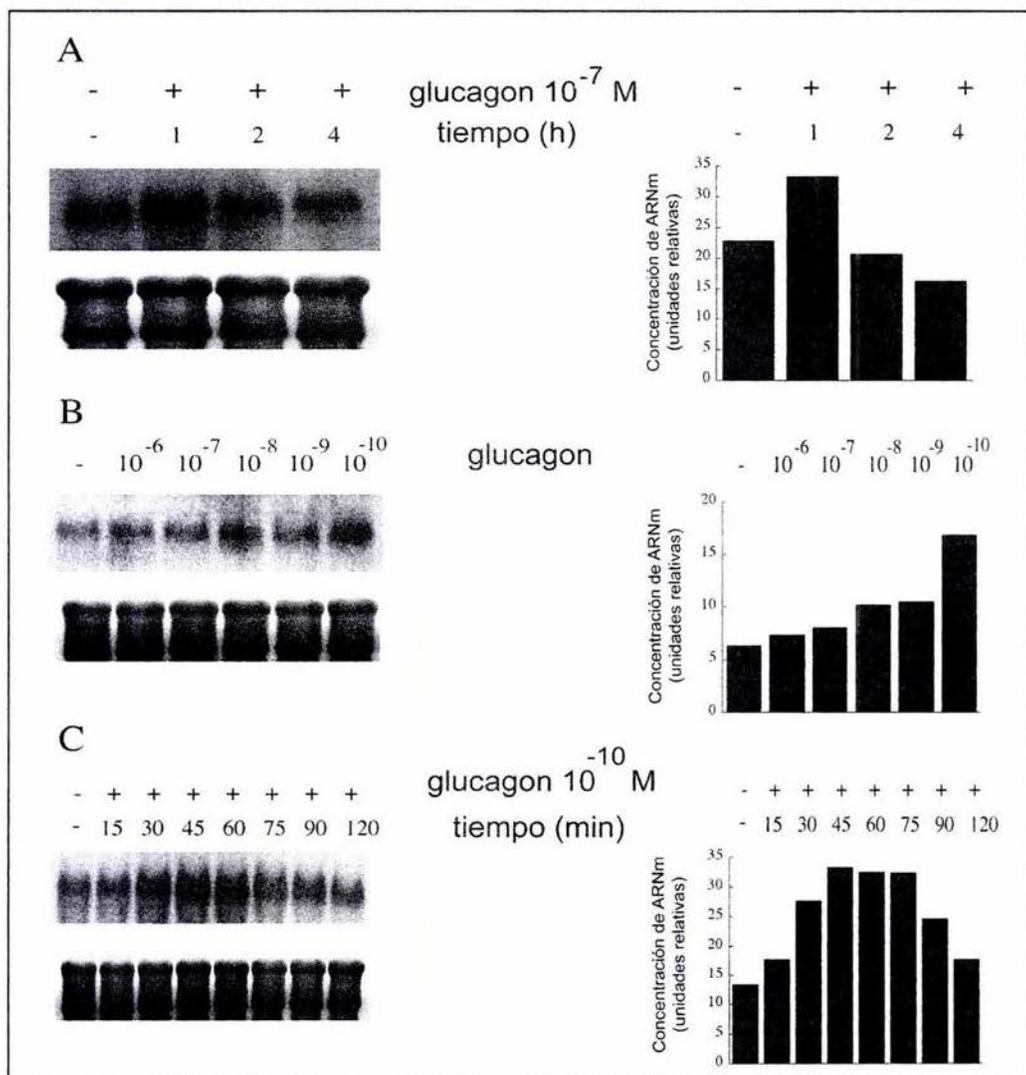


FIGURA 12. Efecto del glucagon en la expresión del gen de HAL en cultivo primario de hepatocitos de rata. A) Curva de tiempo del efecto del glucagon 10^{-7} M en la concentración del ARNm de HAL en hepatocitos de rata. B) Concentración de ARNm de HAL en hepatocitos incubados con diferentes concentraciones de glucagon. C) Curva de tiempo del efecto del glucagon 10^{-10} M concentración del ARNm de HAL en hepatocitos de rata. Los tres paneles muestran los análisis por northern blot de 15 μ g de ARN total obtenido de hepatocitos en diferentes condiciones, los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y la cuantificación de la concentración del ARNm de HAL por autorradiografía electrónica.

Efecto del PMA, forskolina y angiotensina II en la expresión génica de HAL en cultivo primario de hepatocitos de rata.

Para identificar la posible ruta de transducción de señales utilizada por el glucagon para activar la transcripción de HAL en hepatocitos se estudió el efecto de PMA, forskolina en presencia de 3-isobutil-1-metilxantina y angiotensina II en la concentración del ARNm de HAL. Los resultados (figura 13A) mostraron que la adición de PMA 100 nM fue capaz de duplicar la concentración del ARNm de HAL después de 4 horas de incubación (figura 13A). La incubación con forskolina 10mM por 1-2h también incrementó la expresión de HAL en aproximadamente 40% (figura 13B). La angiotensina II no tuvo efecto en la concentración del ARNm de HAL. (figura 13C). Estos datos sugieren que la expresión de HAL se encuentra activada tanto por PKA como por PKC.

Análisis funcional del promotor del gen de la histidasa de hígado de rata

La region promotora completa (pHal815) y dos diferentes delecciones de la region regulatoria del gen de la histidasa de hígado de rata generados por PCR fueron ligados en el vector reportero pGL3 basic. Cada una de las construcciones fue transfectada en células HepG2.

La actividad de la luciferasa en las transfecciones con pHal815 fue estimulada significativamente por dexametasona (2.9 veces), por glucagon y forskolina (0.9 veces) y por PMA (2 veces) en relación al control. Por otro lado, ninguno de los compuestos utilizados fue capaz de inducir la actividad de la luciferasa al transfectarse con la primera delección (pHal420). Al realizar el ensayo con pHal302, solo se observó estimulación con dexametasona (1.8 veces), pero no alcanzó los niveles observados en pHal815 (figura 14).

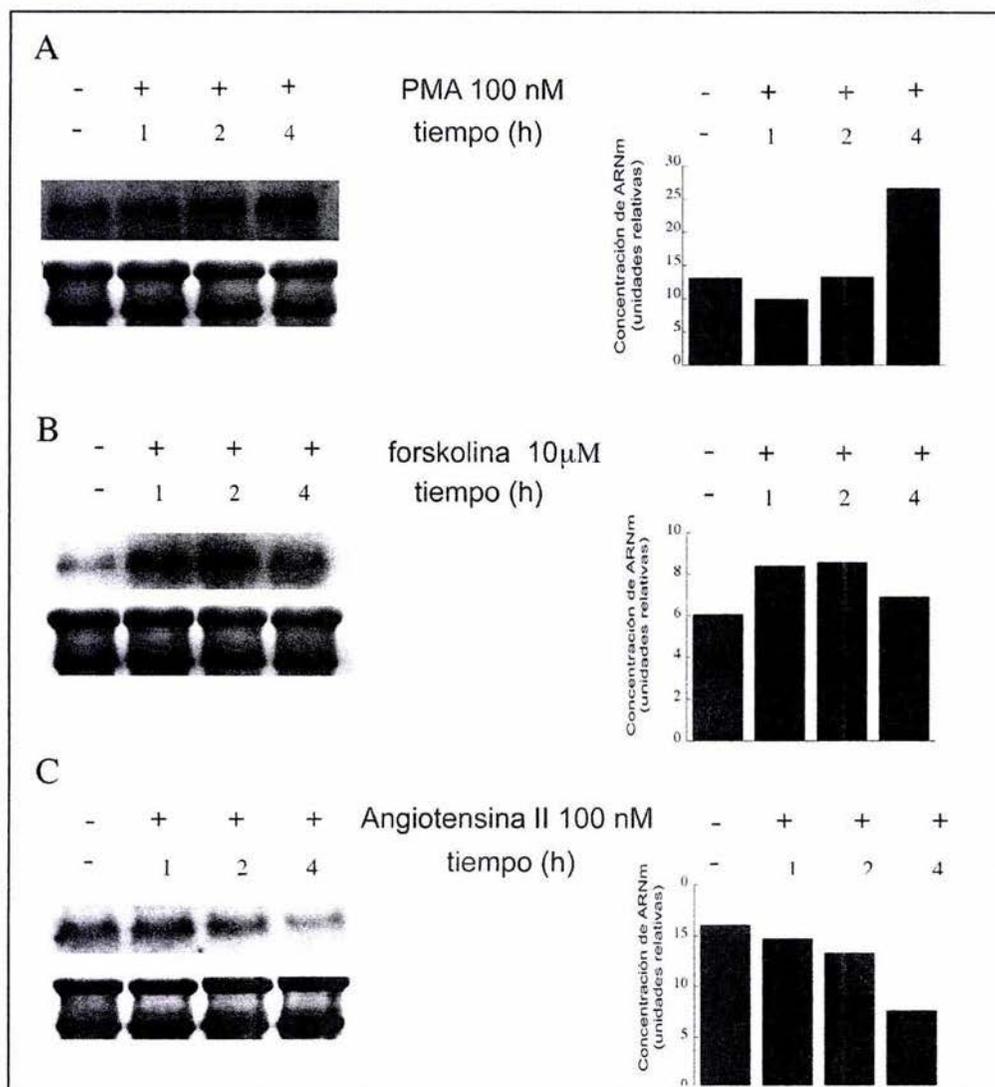


FIGURA 13. Efecto del PMA, forskolina y angiotensina II en la expresión génica de HAL en cultivo primario de hepatocitos de rata. A) Curva de tiempo del efecto de PMA 100 nM en la concentración del ARNm de HAL en hepatocitos de rata. B) Curva de tiempo del efecto de la forskolina 10 μ M en la concentración de ARNm de HAL en hepatocitos. C) Curva de tiempo del efecto de la angiotensina II 100 nM concentración del ARNm de HAL en hepatocitos de rata. Los tres paneles muestran los análisis por northern blot de 15 μ g de ARN total obtenido de hepatocitos en diferentes condiciones, los gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio y la cuantificación de la concentración del ARNm de HAL por autoradiografía electrónica.

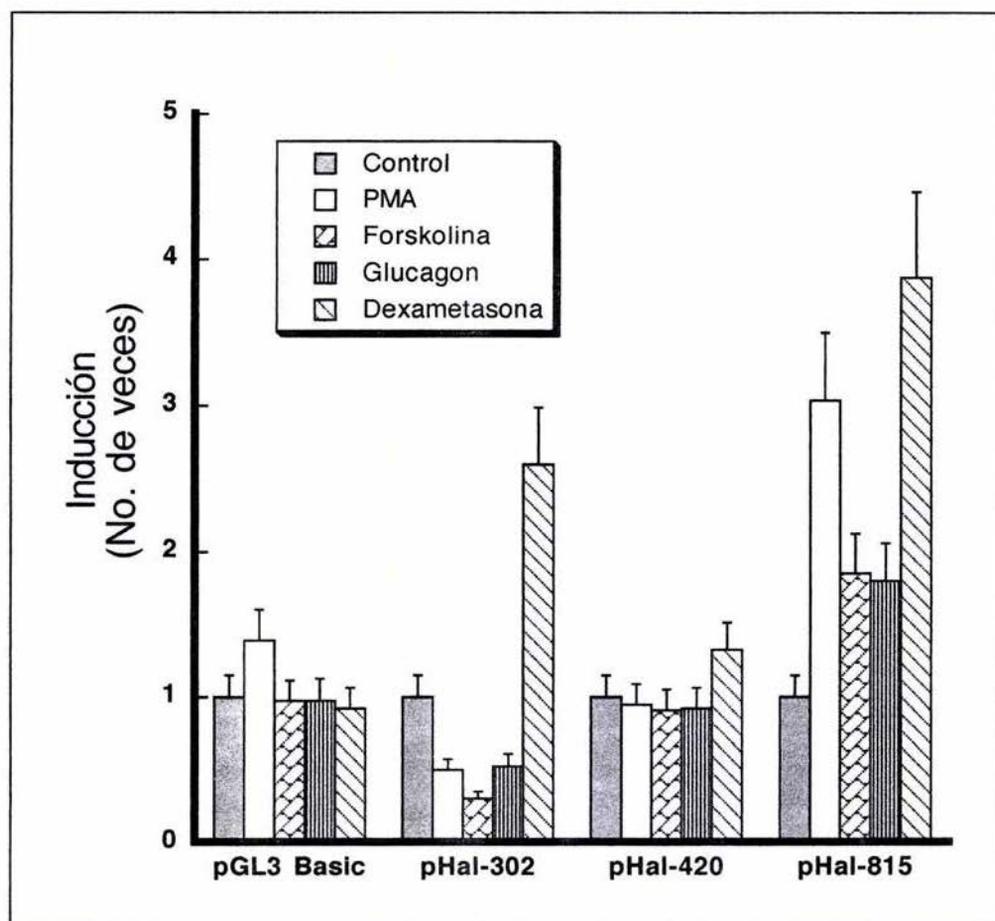


FIGURA 14 . Análisis de las transfecciones transitorias en la inducción del promotor del gen de HAL por hormonas y compuestos químicos. Las células HepG2 fueron transfectadas con los plásmidos Hal-pGL3basic (pHal 815, pHal340, pHal202) como se describió en la metodología. Las células fueron incubadas en el medio solo (control), con dexametasona $10\ \mu\text{M}$, glucagon 10^{-7}M , forskolina $10\ \mu\text{M}$, o PMA $1\ \mu\text{M}$. Para los ensayos con dexametasona las células fueron cotransfectadas con $50\ \text{ng}$ del receptor de glucocorticoides. La actividad de la luciferasa fue normalizada con la actividad de β -galactosidasa. Los datos de los 5 grupos fueron tomados de tres experimentos representativos y se muestran como promedio \pm E.S.M. de transfecciones hechas por triplicado.

6. DISCUSIÓN

La regulación del nitrógeno corporal está controlada principalmente a través dos mecanismos, la síntesis de proteínas, y la degradación de aminoácidos. Este último mecanismo es importante en la eliminación del exceso de aminoácidos, ya que estos pueden generar toxicidad [13]. El tiempo requerido para aumentar la capacidad de catabolizar el excedente de aminoácidos depende en parte del tiempo para inducir los genes de las enzimas degradadoras de aminoácidos. Estudios previos han mostrado que la actividad de la histidasa se induce cuando las ratas son alimentadas con una dieta con un alto contenido de proteína, y que esta inducción se lleva a cabo a nivel pretraduccional [71]. Posteriormente, observamos que hormonas catabólicas como glucocorticoides y glucagon, no solo estimulan la actividad de la HAL, sino también producen una inducción del gen de la histidasa [70].

En el presente trabajo, observamos que la concentración de ARNm de la HAL de hepatocitos obtenidos de ratas alimentadas con una alta concentración de proteína dietaria era mayor que la de aquellas ratas alimentadas con una concentración adecuada o baja en proteína, indicando la inducción de esta enzima para eliminar el exceso de histidina. Estos datos concuerdan con lo observado anteriormente [71], la actividad y expresión del ARNm de la HAL se mantuvieron bajos cuando la concentración de proteína dietaria estaba por debajo de 20%, al cubrirse los requerimientos de proteína de la dieta con esta cantidad, e ingerir una mayor cantidad de la misma, la expresión de HAL se incrementa.

Se ha descrito que la ingestión de una dieta alta en proteína [9, 87] o con la administración de una mezcla de aminoácidos [88], se incrementa la concentración de aminoácidos en el plasma y se estimula la secreción de glucagon por el páncreas. También se ha propuesto que las células α pancreáticas regulan la secreción de esta hormona en parte por un mecanismo dependiente de aminoácidos [89]. Estudios previos han mostrado que la inducción de diversas enzimas degradadoras de aminoácidos, incluyendo a la histidasa, es mediada por un incremento en la concentración de glucagon, que induce el catabolismo de aminoácidos [90]. En este

estudio demostramos que la adición de glucagon a hepatocitos en cultivo incrementa la concentración de ARNm de HAL, y que dicha estimulación es dosis y tiempo dependiente. Estos datos concuerdan con estudios previos que mostraron que las enzimas degradadoras de aminoácidos hepáticas están reguladas por el contenido de proteína de la dieta, o por la administración de glucagon a las ratas, o por la adición de esta hormona a hepatocitos en cultivo [14, 61, 62, 91, 92]. En estos estudios se ha demostrado que el glucagon induce las actividades y la concentración de los ARNm de las enzimas degradadoras de aminoácidos, pero no se ha establecido claramente cuál es la ruta o rutas de transducción de señales involucradas en la activación de la expresión de estas enzimas por el glucagon. Además, con la excepción de la serina deshidratasa, cuya región promotora posee sitios CRE (elementos de respuesta a AMPc) funcionales para su activación por AMPc [62], no se ha estudiado el promotor de otras enzimas degradadoras de aminoácidos para determinar si contienen elementos *cis* asociados con cambios en la expresión génica debida a la presencia de hormonas metabólicas como el glucagon o los glucocorticoides.

En el gen de la tirosina aminotransferasa se han estudiado dos regiones potenciadoras localizadas a -2.5 y -3.6 kb (relativas al sitio de inicio de la transcripción) que responden a glucocorticoides y glucagon, respectivamente [93, 94]. Los elementos de respuesta a estas hormonas actúan sinérgicamente con los sitios de unión para los factores de transcripción enriquecidos del hígado HNF3 y HNF4 (factor nuclear de hepatocitos 3 y 4). La interdependencia entre estos factores parece ser la responsable de la especificidad hepática de la TAT, así como en las diferencias encontradas en su expresión durante el desarrollo, ya que el gen de la TAT es inducido homonalmente sólo hasta después del nacimiento [63]. Existe la posibilidad de que el gen de la histidasa posea regiones potenciadoras que se regulen de esta manera para una máxima inducción hormonal.

El glucagon ejerce su acción a través de un receptor acoplado a proteína G, aunque se ha demostrado que esta hormona incrementa la concentración de AMPc, así como la concentración de calcio intracelular via inositol 1,4,5-trifosfato [49]. Esto indica

que la señalización por glucagon ocurre via PKA o PKC. Para estudiar si la inducción de la histidasa por glucagon era mediada por PKA o PKC, se incubaron hepatocitos aislados con forskolina, un activador de la adenilato ciclasa que provoca un incremento en la concentración de AMPc y activa a PKA, o PMA, un análogo estructural de diacilglicerol que activa a PKC. Nuestros resultados muestran que la concentración de ARNm de la HAL es inducida por ambos compuestos, indicando que la expresión de esta enzima ocurre via tanto PKA como PKC. Es interesante que la angiotensina II, que incrementa la liberación de calcio intracelular y no tiene efecto en la concentración celular de AMPc, no cambió la expresión de HAL. Por lo tanto, la expresión de HAL no está mediada por calcio-calmodulina cinasas.

Para comprender si la activación del gen de la histidasa ocurre como resultado de un incremento en la transcripción de HAL mediada por las rutas de señalización PKA o PKC, fue necesario aislar y secuenciar la región promotora del gen de la HAL de rata para identificar potenciales elementos de respuesta activados por AMPc o PMA.

Se determinó el sitio de inicio de la transcripción (TSS) por medio de la técnica de "Primer Extension", en el gel se observaron dos posibles bandas ubicadas a 404 y 406 pb del codón de inicio de la traducción (figura 9). En la literatura se ha descrito ampliamente que en esta técnica es común encontrar varias bandas ya que la transcriptasa reversa puede hacer una pausa durante la extensión en ARNm, especialmente cuando la región amplificada es rica en GC [95]. La cercanía de las dos bandas presentes en nuestro ensayo indican que esto puede haber sucedido, y no que existan dos TSS. Debido a que el análisis computacional predijo el sitio localizado a 404 pb de ATG suponemos que éste es el TSS correcto.

El análisis de la región promotora del gen de la HAL de rata mostró la falta de una caja TATA típica, pero fue rica en GC, resultando en la presencia de diversos motivos Sp1 y AP-1 cercanos al sitio de inicio de la transcripción (figura 8). Previamente, se había reportado un segmento de 610 nucleótidos de la región promotora del gen de la histidasa humana, y éste muestra una caja TATA consenso

[96]. Además, la repetición de adeninas en la secuencia de la región promotora de la histidasa de rata no está presente en la del gen humano. A pesar de esto, en los promotores de ambos organismos existe un número similar de sitios potenciales GRE (elemento de respuesta a glucocorticoides), GATA, C/EBP (proteínas que responden al potenciador CCAAT) y NF-IL6 (factor nuclear para interleucina-6, C/EBP β). La región regulatoria de la histidasa de rata muestra cuatro sitios AP1, en comparación con el gen humano que solo muestra dos, esta diferencia podría alterar la capacidad de ambos promotores para responder a el AMPc y/o PMA. Por otro lado, la región promotora del gen de la serina deshidratasa (SDH) de rata ha sido estudiada [97]. Esta región fue similar a la del promotor de la HAL de rata ya que carece de cajas TATA y CAAT típicas y posee diversas cajas GC que pueden ser sitios de unión para el factor de transcripción Sp1. Los sitios de unión a Sp1, tienen como función unir al complejo de inicio de la transcripción en promotores carentes de caja TATA [98-100]. Es necesario que en futuros experimentos se pruebe la funcionalidad de estos sitios en el gen de la HAL. El promotor de SDH contiene una repetición de adeninas entre los nucleótidos -157 y -178, que se asemejan a la repetición de 17 pb de adeninas presentes en la región promotora del gen de HAL de rata entre los nucleótidos -25 a -44. Más aún, el promotor de la SDH de rata contiene por lo menos dos sitios GRE y dos CRE, dándole la capacidad de responder a glucocorticoides y AMPc de una manera similar a la del promotor del gen de la HAL de rata [97].

El sitio GR/AP1 localizado a -496 pb del TSS resulta muy interesante ya que los factores AP1 pueden interactuar con el receptor de glucocorticoides para activar o reprimir la transcripción [101]. Estos sitios de unión pueden servir como puntos de unión para la regulación combinada, en los cuales factores de diferentes rutas de señalización pueden comunicarse para producir diferentes patrones de regulación de los que producen los factores individuales o de la suma de ambos [102]. Se sabe que AP1 media la acción de los esteroides de forbol (PMA) [103], además de ser capaz de funcionar como un CRE en algunos genes [104-106]. Debido a la cantidad de sitios AP1 presentes en el promotor del gen de HAL en el hígado de rata suponemos que una buena parte de la respuesta de este gen al glucagón es activada por estas regiones a

través del AMPc ya que la secuencia consenso de AP1 también es reconocida por CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc) [107]. Será interesante identificar si los sitios AP1 presentes en el gen de HAL responden directamente al AMPc y/o a PMA, así como evaluar la funcionalidad de la región GR/AP1.

El análisis funcional del promotor de la HAL en el hígado de rata mostró que la región entre los nucleótidos -340 a -815 es importante para la respuesta a glucagon, así como para forskolina y PMA. Esta región contiene un sitio TAX/CREB a -629 pb y tres sitios AP1 a -404, -452 y -691 pb que son sitios regulatorios potenciales para la respuesta a glucagon. Por otro lado, existen seis sitios GRE en el fragmento completo de 815 pb y todos parecen funcionales, aunque los sitios GRE en las posiciones -455, -628 y -780 pb son aparentemente más fuertes para la estimulación con glucocorticoides.

La actividad de la luciferasa en HAL815 incrementó con la adición de forskolina y glucagon, pero el incremento fue aún mayor con PMA y dexametasona. Esto nos indicó que el fragmento estudiado contenía elementos de respuesta funcionales. Para hacer una identificación inicial de cuáles sitios eran activos se diseñaron las dos delecciones probadas en este trabajo. El fragmento HAL420 solo contenía cuatro de los seis GRE y tres de los siete sitios AP1 presentes en HAL815. Uno de los sitios deletados fue el AP1/GR mencionado anteriormente. En los ensayos de funcionalidad realizados con este fragmento no se observó la inducción por PMA, forskolina, glucagon o dexametasona observada en el fragmento completo, lo que nos indica que en la región deletada se encuentran elementos importantes para la completa funcionalidad del promotor del gen de HAL. En el fragmento HAL302, que contenía un sitio AP1 menos que HAL420, solo se observó inducción con la dexametasona aunque no fue tan fuerte como la observada en HAL815. Esto resulta interesante ya que esta región es más pequeña que HAL420 y por lo tanto tiene menos elementos de respuesta presentes. Esto sugiere que en la región comprendida entre -202 y -340 existe algún elemento represor del receptor de glucocorticoides. Es necesario realizar

un estudio más detallado del análisis de los elementos activados en *cis* presentes en la región entre -340 y -815 pb.

Es interesante mencionar que al analizar la secuencia de la región reguladora del gen de HAL encontramos un elemento de respuesta a receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs). Estudios anteriores mostraron que los PPARs eran capaces de regular algunos genes de enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos y ciclo de la urea [108, 109]. Se sabe que la concentración de PPAR α en hepatocitos se incrementa en condiciones de estrés o ayuno y que regula principalmente la utilización de ácidos grasos durante el ayuno [110, 111]. Es probable que PPAR α también esté relacionado con la expresión de los genes de las enzimas degradadora de aminoácidos y por lo tanto sea un factor regulador global del metabolismo energético en el hígado. Esta teoría abre nuevas posibilidades de investigación en el control del metabolismo energético del organismo. En la actualidad nos encontramos analizando este segmento.

En resumen, este análisis mostró que la región promotora del gen de la HAL de rata contiene elementos de respuesta activos para hormonas metabólicas como glucagon y glucocorticoides, que son capaces de regular positivamente la expresión génica de la HAL de rata. Además, la estimulación por glucagon de la región promotora del gen de HAL ocurre preferentemente via PKA, aunque también puede estimularse via PKC. Por lo tanto, cuando las ratas consumen una alta concentración de proteína dietaria, existe un incremento proporcional en la concentración de glucagon sérico que a su vez activan las rutas de PKA y PKC e incrementan la transcripción de HAL llevando a un aumento en la cantidad de esta enzima para degradar el exceso de histidina. Por otro lado, bajo condiciones de estrés, los glucocorticoides también son capaces de inducir la expresión de HAL para oxidar histidina para compensar los requerimientos de energía. Parece ser que la mayor parte de las enzimas degradadoras de aminoácidos responden a ambas hormonas de manera similar, por lo tanto parece que el mecanismo que controla la expresión del gen de la histidasa de

hígado de rata es un mecanismo concertado a través del cual todas las enzimas degradadoras de aminoácidos controlan el balance de nitrógeno corporal.

7. CONCLUSIONES

1. El sitio de inicio de la transcripción del gen de la HAL de hígado de rata se localizó a 404 pb del codón de iniciación de la traducción ATG.
2. La secuencia no mostró sitios consenso para cajas TATA o CAAT en las primeras 100 pb hacia 5' del sitio de inicio de la transcripción.
3. Se encontraron 6 cajas ricas en GC que son sitios potenciales para la unión del factor de transcripción Sp1, siete posible sitios de unión AP1, un Oct-1, tres elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), y un sitio Tax/CREB.
4. La expresión de luciferasa fue estimulada por dexametasona, glucagon, forskolina y PMA cuando el promotor putativo se transfectó en células HepG2.
5. El gen de HAL es activado por el glucagon mediante las vías de transducción de señales PKA y PKC, siendo mayor su activación con PMA que con forskolina en cultivo primario de hepatocitos, indicando una preferencia por la vía PKC para activar la expresión de HAL.
6. El análisis funcional de la región promotora del gen de HAL de rata mostró que la región comprendida entre los nucleótidos -340 y -815 es importante para la respuesta con glucagon, así como para forskolina y PMA.

8.PERSPECTIVAS

1. Es importante continuar con la caracterización de la región promotora del gen de la histidasa en el hígado de rata para identificar los elementos de respuesta funcionales presentes en ella. Se sugiere utilizar ensayos de precipitación de la cromatina (Chips), retardo de movilidad de bandas (EMSA) y mutagénesis dirigida. Esto permitirá conocer en su totalidad la regulación del gen de HAL y en gran parte del resto de las enzimas degradadoras de aminoácidos presentes en el hígado. El elemento de respuesta a los proliferadores de peroxisomas (PPARs), ubicado a -494 pb a partir del sitio de inicio de la transcripción del gen de HAL, resulta de especial interés ya que hasta el momento el factor de transcripción PPAR α se ha relacionado exclusivamente a la oxidación de ácidos grasos. Encontrar que los genes relacionados con el catabolismo de aminoácidos se encuentran regulados por PPAR α abriría nuevas posibilidades hacia la investigación de los factores que controlan el metabolismo general del organismo.

2. Estudiar la región regulatoria 5' de la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada, única enzima degradadora de aminoácidos localizada en tejidos extrahepáticos, junto con la región promotora del gen de la histidasa, representativa del hígado, permitirán conocer en su totalidad los mecanismos de regulación del metabolismo de nitrógeno en el organismo.

3. Para definir la ruta de transducción de señales que utiliza el glucagon para regular al gen de la HAL, se recomienda la utilización de inhibidores y activadores específicos de las rutas de PKA y PKC.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Avila-Chavez, E., N. Torres, and A.R. Tovar, *Nuevos conocimientos del transporte de aminoácidos aniónicos y catiónicos*. Rev Invest Clin, 1997. **49**: p. 411-424.
2. Lehninger, A.L., *Regulación de la expresión génica*, in *Bioquímica*. 1989, Ed. Omega: Barcelona.
3. Olson, R.E., *Introductory remarks: nutrient, hormone, enzyme interactions*. Am J Clin Nutr, 1975. **28**: p. 626-637.
4. Young, V.R. and M. J.S., *Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans*. Am J Clin Nutr, 1990. **51**: p. 270-289.
5. Garlick, P.J., D.J. Millward, and J.C. Waterlow, *Protein turnover in cardiac and skeletal muscle*. J Physiol, 1973. **231**: p. 101P-102P.
6. McNurlan, M.A. and P.J. Garlick, *Rates of protein synthesis in rat liver and small intestine in protein deprivation and diabetes*. Proc Nutr Soc, 1979. **38**: p. 133A.
7. McNurlan, M.A., A.M. Tomkins, and P.J. Garlick, *The effect of starvation on the rate of protein synthesis in rat liver and small intestine*. Biochem J, 1979. **178**: p. 373-379.
8. McNurlan, M.A., P. Essen, S.D. Heys, V. Buchan, P.J. Garlick, and J. Wernerman, *Measurement of protein synthesis in human skeletal muscle: further investigation of the flooding technique*. Clin Sci, 1991. **81**: p. 1020-1024.
9. Munro, H.N., *Free amino acid pools and their regulation*, in *Mammalian Protein Metabolism*, H.N. Munro, Editor. 1970, Academic Press: New York. p. 299-386.
10. Millward, D.J., *Metabolic demands for amino acids and the human dietary requirement: Millward and rRvers (1988) revisited*. J Nutr, 1998. **128**(12 Suppl): p. 2563S-2576S.
11. Harper, A.E., *Some recent developments in the study of amino acid metabolism*. Proc Nutr Soc, 1983. **42**: p. 437-449.
12. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Amino Acids and Peptides*, in *Principles of Biochemistry*. 1993, Worth Publishers: New York.
13. Linder, M.C., *Nutrition and Metabolism of Proteins*, in *Nutritional Biochemistry and Metabolism*. 1991, Elsevier: New York. p. 87-109.
14. Harper, A.E., *Biological Factor influencing the utilization of amino acids*, in *Genetic Factors in Nutrition*. 1984, Academic Press, Inc. p. 243-267.
15. Damuni, F., Caudwell, B., Cohen, P., *Regulation of the aminoacyl-tRNA synthetase complex of rat liver by phosphorylation/dephosphorylation in vitro and in vivo*. Eur J Biochem, 1982. **129**: p. 57-65.
16. Deutscher, M.P., *The eucaryotic aminoacyl-tRNA synthetase complex: suggestions for its structure and function*. J Cell Biol, 1984. **99**: p. 373-377.
17. Tovar, A.R., J.K. Tews, N. Torres, and A.E. Harper, *Neutral amino acid transport into rat skeletal muscle: competition, adaptive regulation, and effects of insulin*. Metabolism, 1991. **40**: p. 410-419.
18. Tovar, A.R., J.K. Tews, N. Torres, D.C. Madsen, and A.E. Harper, *Competition for transport of amino acids into rat heart: Effect of competitors on protein synthesis and degradation*. Metabolism, 1992. **41**: p. 925-933.

19. Rhoads, R.E., *Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis*. J Biol Chem, 1999. **274**: p. 30337-30340.
20. Pollard, J.M., A.R. Galpine, and M.J. Clemens, *A novel role for aminoacyl-tRNA synthetases in the regulation of polypeptide chain initiation*. Eur J Biochem, 1989. **182**: p. 1-9.
21. Pain, V.M., *Initiation of protein synthesis in mammalian cells*. Biochem J, 1986. **235**: p. 625-637.
22. Miller, L.L., *The role of the liver and the non-hepatic tissues in the regulation of free amino acid levels in the blood*, in *Amino acid pools*, J.T. Holden, Editor. 1962, Elsevier: Amsterdam. p. 708-721.
23. Harper, A.E., R.H. Miller, and K.P. Block, *Branched-Chain Amino Acid Metabolism*. Ann Rev Nutr, 1984. **4**: p. 409-454.
24. Peterkofsky, A., *The mechanism of action of histidase: Amino-enzyme formation and partial reactions*. J Biol Chem, 1962. **237**(3): p. 787-795.
25. Bhargava, M.M. and M. Feigelson, *Studies on the mechanisms of histidase development in rat skin and liver*. Dev Biol, 1976. **48**: p. 226-236.
26. Brand, M. and A.E. Harper, *Histidine Ammonia-lyase from rat liver. Purification, properties and inhibition by substrate analogues*. Biochemistry, 1976. **15**(9): p. 1814-1821.
27. Taylor, R.G., H.L. Levy, and R.R. McInnes, *Histidase and histidinemia. Clinical and molecular considerations*. Mol Biol Med, 1991. **8**: p. 101-116.
28. Lam, W.K., M.A. Cleary, J.E. Wraith, and J.H. Walter, *Histidinaemia: a benign metabolic disorder*. Arch Dis Child, 1996. **74**: p. 343-346.
29. Taylor, R.G., J. García-Haras, S.J. Sadler, R.G. Lafreniere, H.F. Willard, D.H. Ledbetter, and R.R. McInnes, *Localization of histidase to human chromosome region 12q22-q24.1 and mouse chromosome region 10C2-D1*. Cytogenet Cell Genet, 1991. **56**: p. 178-181.
30. Suchi, M., N. Harada, Y. Wada, and Y. Takagi, *Molecular cloning of a cDNA encoding human histidase*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1216**: p. 293-295.
31. Suchi, M., H. Sano, H. Mizuno, and Y. Wada, *Molecular Cloning and Structural Characterization of the Human Histidase Gene (HAL)*. Genomics, 1995. **29**: p. 98-104.
32. Taylor, R.G., M.A. Lambert, e. Sexsmith, S.J. Sadler, P.N. Ray, D.J. Mahuran, and R.R. McInnes, *Cloning and expression of rat histidase*. J Biol Chem, 1990. **265**(30): p. 18192-18199.
33. Harper, A.E. *Proceedings of the XII International Congress of Nutrition. in Enzymatic basis for adaptative changes in amino acid metabolism*. 1986. London, England: John Libbey.
34. Block, K.P., R.P. Aftring, W.B. Mehard, and M.G. Use, *Modulation of rat skeletal muscle branched-chain α -cetoacid dehydrogenase in vivo. Effects of dietary protein and meal consumption*. J Clin Invest, 1987. **79**: p. 1349-1358.
35. Finkelstein, J.D., *Regulation of methionine metabolism in mammals, in Transmethylation*, E. Usdin, R.T. Borchardt, and C.R. Creveling, Editors. 1978, Elsevier/North Holland: New York. p. 49-58.
36. Krebs, H.A., *Some aspects of the regulation of fuel supply in omnivorous animals*. Adv Enz Regul, 1972. **10**: p. 397-420.

37. Pitot, H.C. and M.B. Yatvin, *Interrelationships of Mammalian Hormones and Enzyme Levels in Vivo*. *Physiol Rev*, 1973. **53**(1): p. 228-297.
38. Edozien, J.C., M.A.R. Khan, and C.I. Waslien, *Human protein deficiency: Results of a Nigerian village study*. *J Nutr*, 1976. **106**: p. 312-328.
39. Edozien, J.C., N. Niehaus, M.H. Mar, T. Makoui, and B.R. Switzer, *Diet-Hormone Interrelationships in the Rat*. *J Nutr*, 1978. **108**: p. 1767-1776.
40. Hamm, H.E., *The many faces of G Protein signaling*. *J Biol Chem*, 1998. **273**: p. 669-672.
41. Ji, T.H., M. Grossmann, and I. Ji, *G Protein-coupled receptors I. Diversity of receptor-ligand interactions*. *J Biol Chem*, 1998. **273**: p. 17299-17302.
42. Lewis-Tuffin, L.J., P.G. Quinn, and D.M. Chikaraishi, *Tyrosine hydroxylase transcription depends primarily on cAMP response element activity, regardless of the type of inducing stimulus*. *Mol Cell Neurosci*, 2004. **25**: p. 536-547.
43. Piech-Dumas, K.M., J.A. Best, Y. Chen, K. Nagamoto-Combs, C.A. Osterhout, and W.A. Tank, *The cAMP responsive element and CREB partially mediate the response of the tyrosine hydroxylase gene to phorbol ester*. *J Neurochem*, 2001. **76**: p. 1376-1385.
44. Chen, C. and I.C. Guo, *Effect of cAMP on protein binding activities of three elements in upstream promoter of human CYP11A1 gene*. *Life Sci*, 2000. **67**: p. 2045-2049.
45. Swanson, D.J., E. Zellmer, and E.J. Lewis, *AP1 proteins mediate the cAMP response of the dopamine beta-hydroxylase gene*. *J Biol Chem*, 1998. **273**: p. 24065-24074.
46. Merino, A., L. Buckbinder, F.H. Mermelstein, and D. Reinberg, *Phosphorylation of cellular proteins regulates their binding to the cAMP response element*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(35): p. 21266-21276.
47. Petersen, O.H. and C. Bear, *Two glucagon transducing systems*. *Nature*, 1986. **323**: p. 18.
48. Wakelam, M.J.O., G.J. Murphy, V.J. Hruby, and M.D. Houslay, *Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon*. *Nature*, 1986. **323**: p. 68-71.
49. Hansen, L.H., J. Gromada, T. Bouchelouche, T. Whitmore, L. Jelinek, W. Kindsvogel, and E. Nishimura, *Glucagon mediated Ca²⁺ signaling in BHK cells expressing cloned human glucagon receptors*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1998. **274**: p. C1552-C1562.
50. Simopolous, A.P., *Genetics and Nutrition: Or what your Genes can tell you about Nutrition*, in *Genetic Variation and Nutrition*, A.P. Simopolous and B. Childs, Editors. 1990, Basel, Karger: Washington, D.C. p. 25-34.
51. Fong, Y., L.L. Moldawer, and S.F. Lowry, *Experimental and Clinical Applications of Molecular Cell Biology in Nutrition and Metabolism*. *JPEN*, 1992. **16**(5): p. 477-486.
52. Clarke, S.D. and S. Abraham, *Gene expression: nutrient control of pre- and posttranscriptional events*. *FASEB J*, 1992. **6**: p. 3146-3152.
53. Goodridge, A.G., *The Role of Nutrients in Gene Expression*, in *Genetic variation and Nutrition*, A.P. Simopolous and B. Childs, Editors. 1990, Basel, Karger: Washington, D.C. p. 183-193.

54. Lemaigre, F.P. and G.G. Rousseau, *Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in rat liver*. *Biochem J*, 1994. **303**: p. 1-14.
55. Rosa, J.L., R. Bartrons, and A. Tauler, *Gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver*. *Biochem J*, 1992. **287**: p. 113-116.
56. Vaulont, S. and A. Kahan, *Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates*. *FASEB J*, 1994. **8**: p. 28-35.
57. David, K.C., C. Hargrove, and J.I. Hargrove, *Effects of dietary protein in gene expression*, in *Nutrition and Gene Expression*, C.D. Berdanier and J.I. Hargrove, Editors. 1994, CRC Press: New York.
58. Torres, N., H. Bourges, and A.R. Tovar, *Regulación de la expresión génica por nutrientes*. *Arch Lat Nutr*, 1996. **46**(2): p. 89-96.
59. Marten, N.W., F.M. Sladek, and D.S. Straus, *Effect of dietary protein restriction on liver transcription factors*. *Biochem J*, 1996. **317**: p. 361-370.
60. Chan, D.K.C. and J.L. Hargrove, *Effects of dietary protein on gene expression*, in *Nutrition and Gene Expression*, C.D. Berdanier and J.L. Hargrove, Editors. 1994, CRC Press: New York. p. 353-375.
61. Ogawa, H., M. Fujioka, Y. Su, R. Kanamoto, and H.C. Pitot, *Nutritional Regulation and Tissue-specific Expression of the Serine Dehydratase Gene in Rat*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(30): p. 20412-20417.
62. Haas, M.J. and H.C. Pitot, *Glucocorticoids stimulate CREB binding to a cyclic-AMP response element in the rat serine dehydratase gene*. *Arch Biochem Biophys*, 1999. **362**(2): p. 317-324.
63. Nitsh, D., M. Boshart, and G. Schutz, *Activation of the tyrosine aminotransferase gene is dependent on synergy between liver-specific and hormone-responsive elements*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993. **90**(June): p. 5479-5483.
64. Lamartiniere, C.A. and M. Feigelson, *Glucagon, cyclic AMP, estrogen and glucocorticoids induce elevations in synthetic rate of rat liver histidase*. *Fed Proc*, 1976. **35**: p. 1362.
65. Lamartiniere, C.A. and M. Feigelson, *Effects of estrogen, glucocorticoid, glucagon and adenosine 3':5'-monophosphate on catalytic activity, amount, and rate of de Novo synthesis of hepatic histidase*. *J Biol Chem*, 1977. **252**(10): p. 3234-3239.
66. Lee, S.C. and A.E. Harper, *Responses of mammalian histidine catabolic enzymes to dietary and hormonal treatments*. *Biochim Biophys Acta*, 1971. **244**: p. 135-145.
67. Lee, S.C., J.K. Tews, M.L. Morris, and A.E. Harper, *Rat liver histidase: Glucose repression and Half-life after casein hydrolysate feeding*. *J Nutr*, 1972. **102**: p. 319-330.
68. Pestana, A., *Dietary and hormonal control of enzymes of amino acid catabolism in liver*. *European J Biochem*, 1969. **11**: p. 400-404.
69. Schrimmer, M.D. and A.E. Harper, *Adaptive responses of mammalian histidine-degrading enzymes*. *J Biol Chem*, 1970. **245**(5): p. 1204-1211.
70. Alemán, G., N. Torres, H. Bourges, and A.R. Tovar, *Regulation of histidase gene expression by glucagon, hydrocortisone and protein-free/high carbohydrate diet in the rat*. *Life Sci*, 1998. **63**(18): p. 16663-1672.

71. Torres, N., L. Martinez, G. Alemán, H. Bourges, and A.R. Tovar, *Histidase expression is regulated by dietary protein at the pretranslational level in rat liver*. J. Nutr, 1998. **128**: p. 818-824.
72. Torres, N., L. Beristain, H. Bourges, and A.R. Tovar, *Histidine-imbalanced diets stimulate hepatic histidase gene expression in rats*. J Nutr, 1999. **129**: p. 1979-1983.
73. Ascencio, C., A.R. Tovar, O.N. Medina-Campos, J. Pedraza-Chaverri, and N. Torres, *Hepatic histidase and muscle branched chain aminotransferase gene expression in experimental nephrosis*. Life Sci, 2000. **67**: p. 2775-2784.
74. Tovar, A.R., A. Halhali, and N. Torres, *Effect of nutritional rehabilitation of undernourished rats on serum insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding proteins*. Rev Invest Clin, 1999. **51**: p. 99-106.
75. Tovar, A.R., A. Santos, A. Halhali, H. Bourges, and N. Torres, *Hepatic histidase gene expression responds to protein rehabilitation in undernourished growing rats*. J Nutr, 1998. **128**: p. 1631-1635.
76. Wicks, W.D., *Differential Effects of Glucocorticoids and Adenosine 3',5'-Monophosphate on Hepatic Enzyme Synthesis*. J Biol Chem, 1971. **246**(1): p. 217-223.
77. Mira-Y-Lopez, R., S. Jaramillo, and Y. Jing, *Synergistic transcriptional activation of the mouse urokinase plasminogen activator (uPA) gene and of its enhancer activator protein 1 (AP1) site by cAMP and retinoic acid*. Biochem J, 1998. **331**: p. 909-916.
78. DiSepio, D., M. Sutter, A.T. Johnson, R.A. Chandraratna, and S. Nagpal, *Identification of the AP1-antagonism domain of retinoic acid receptors*. Mol Cell Biol Res Commun, 1999. **1**: p. 7-13.
79. Ariza, A.C.G., *Efecto del acido retinoico sobre la expresion genica de la histidasa hepatica en ratas deficientes en retinol*, in Departamento de Salud. 2000, Universidad Iberoamericana: Mexico, D.F. p. 93.
80. Sano, H., T. Tada, A. Moriyama, H. Ogawa, K. Asai, Y. Kawai, M.E. Hodgson, T. Kato, Y. Wada, and M. Suchi, *Isolation of rat histidase cDNA sequence and expression in Escherichia coli. Evidence of extrahepatic/epidermal distribution*. Eur J Biochem, 1997. **250**: p. 212-221.
81. Ausubel, F.M., R. Bret, and R.E. Kingston, *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. K. Jassen. 1994, New York: John Wiley and Sons.
82. Maniatis, S.F., *Molecular Cloning. Laboratory Manual*. Second ed. Vol. 3. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
83. Quandt, K., K. Frech, H. Karas, E. Wingender, and T. Werner, *MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data*. Nucleic Acids Res., 1995. **23**: p. 4878-4884.
84. Langley, E., Z. Zhou, and E.M. Wilson, *Evidence for anti-parallel orientation of the ligand-activated human androgen receptor dimer*. J Biol Chem, 1995. **270**: p. 29983-29990.
85. Berry, M.N. and D.S. Friend, *High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: Biochemical and fine structural study*. J Cell Biol, 1969. **43**: p. 506-520.

86. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single step method for RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**: p. 156-159.
87. Hoffer, L.J., *Metabolic consequences of starvation*, in *Modern Nutrition in Health and disease*, M.E. Shils, et al., Editors. 1998, Williams and Williams. p. 645-660.
88. Ohneda, A., E. Parada, A.M. Eisentraut, and R.H. Unger, *Characterization of response of circulating glucagon to intraduodenal and intravenous administration of amino acids*. J Clin Invest, 1968. **47**: p. 2305-2322.
89. Shay, N.F., T.M. Ponder, A. Reddy, B.A. McCracken, and H.R. Gaskins, *Regulation of glucagon synthesis by nutrients in the aTC9 pancreatic alpha cell line*. FASEB J, 1994. **8**(4): p. A55-A60.
90. Gebhardt, R. and D. Mecke, *Permissive effect of dexamethasone on glucagon induction of urea-cycle enzymes in perfused primary monolayer cultures of rat hepatocytes*. Eur J Biochem, 1979. **97**(1): p. 29-35.
91. Noda, C., M. Yakiyama, T. Nakamura, and A. Ichihara, *Requirements of both glucocorticoids and glucagon as co-inducers for activation of transcription of the serine dehydratase gene in cultured rat hepatocytes*. J Biol Chem, 1988. **263**(29): p. 14764-14768.
92. Ulbright, C. and P.J. Snodgrass, *Coordinate induction of the urea cycle enzymes by glucagon and dexamethasone is accomplished by three different mechanisms*. Arch Biochem Biophys, 1993. **301**(2): p. 237-243.
93. Boshart, M., F. Weigh, A. Schmidt, R.E.K. Fournier, and G. Schutz, *A cyclic AMP response element mediates repression of tyrosine aminotransferase gene transcription by the tissue-specific extinguisher locus Tse-I*. Cell, 1990. **61**: p. 905-916.
94. Jantzen, H.M., U. Strahle, B. Gloss, F. Stewart, W. Schmid, M. Boshart, R. Miksicek, and G. Schutz, *Cooperativity of Glucocorticoid Response Elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene*. Cell, 1987. **49**(April 10): p. 29-38.
95. Carey, M. and S.T. Smale, *Transcriptional Regulation in Eukaryotes*. 2000, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 640.
96. Gidoni, D., J.T. Kadonaga, H. Barrera-Saldana, K. Takahashi, P. Chambon, and R. Tjian, *Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions*. Science, 1985. **230**: p. 511-517.
97. Owaga, H., D.A. Miller, T. Dunn, Y. Su, J.M. Burchman, C. Peraino, M. Fujioka, K. Babcock, and H.C. Pitot, *Isolation and nucleotide sequence of the cDNA for rat liver serine dehydratase mRNA and structures of the 5' and 3' flanking regions of the serine dehydratase gene*. Proc Natl Acad Sci USA, 1988. **85**: p. 5809-5813.
98. Pugh, B.F. and R. Tjian, *Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex*. Genes Dev, 1991. **5**: p. 1935-45.
99. Tamura, t. and K. Mikoshiba, *Role of GC-rich motif in transcription regulation of the adenovirus type 2 IV a2 promoter which lacks typical TATA-box element*. FEBS Lett, 1991. **282**: p. 87-90.
100. Dynan, W.S. and R. Tjian, *Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II*. Cell, 1983. **32**: p. 669-680.

101. Yamamoto, K.R., D. Pearce, J. Thomas, and J.N. Miner, *Combinatorial regulation at a mammalian composite response element*, in *Transcriptional Regulation*, S.L. McKnight and K.R. Yamamoto, Editors. 1992, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. p. 1169-1192.
102. Diamond, M., J.N. Miner, S.K. Yoshinaga, and K.R. Yamamoto, *Transcription factor interactions: Selectors of positive or negative regulation from a single DNA element*. *Science*, 1990. **249**: p. 1266-1272.
103. Mordack, J.C. and D.I.H. Linzer, *Co-localization of elements required for phorbol ester stimulation and glucocorticoid repression of proliferin gene expression*. *Genes Dev*, 1989. **3**: p. 760-769.
104. Arias, J., J.S. Alberts, P. Brindle, F.X. Claret, T. Smeal, M. Karin, J. Feramisco, and M. Montminy, *Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor*. *Nature*, 1994. **370**: p. 226-229.
105. Comb, M., N.C. Birnberg, A. Seasholtz, E. Herbert, and H. Goodman, *A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element*. *Nature*, 1986. **323**: p. 353-356.
106. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi, *AP-1 function and regulation*. *Curr Op Cell Biol*, 1997. **9**: p. 240-248.
107. Wisdom, R., *AP-1: One switch for many signals*. *Exp Cell Res*, 1999. **253**: p. 180-185.
108. Kersten, S., S. Mandard, P. Escher, F.J. Gonzalez, S. Tafuri, B. Desvergne, and W. Wahli, *The peroxisome proliferator- activated receptor alpha regulates amino acid metabolism*. *FASEB J*, 2001. **15**: p. 1971-1978.
109. Edgar, A.D., C. Tomkiewicz, P. Costet, C. Legendre, M. Aggerbeck, J. Bourget, B. Staels, C. Guyomard, T. Pineau, and R. Barouki, *Fenofibrate modifies transaminase gene expression via a peroxisome proliferator activated receptor alpha-dependent pathway*. *Toxicol Lett*, 1998. **98**: p. 13-23.
110. Leone, T.C., C.J. Weinheimer, and D.P. Kelly, *A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) in the cellular fasting response: The PPAR α null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999. **96**: p. 7473-7478.
111. Kersten, S., J. Seydoux, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, B. Desvergne, and W. Wahli, *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting*. *J Clin Invest*, 1999. **103**: p. 1489-1498.

Regulation by glucagon of the rat histidase gene promoter in cultured rat hepatocytes and human hepatoblastoma cells

Gabriela Alemán,^{1,4} Victor Ortiz,¹ Elizabeth Langley,^{2,3} Armando R. Tovar,¹ and Nimbe Torres¹

¹Departamento de Fisiología de la Nutrición, ²Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán; and ³Departamento Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, and ⁴Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Submitted 10 December 2004; accepted in final form 24 February 2005

Alemán, Gabriela, Victor Ortiz, Elizabeth Langley, Armando R. Tovar, and Nimbe Torres. Regulation by glucagon of the rat histidase gene promoter in cultured rat hepatocytes and human hepatoblastoma cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E172–E179, 2005. First published March 1, 2005; doi:10.1152/ajpendo.00584.2004.—Histidase (Hal), the amino acid-degrading enzyme of histidine, is regulated by the protein content of the diet and by hormones such as glucocorticoids and glucagon. However, glucagon can activate the following two possible transduction pathways: protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC). The aim of this study was to isolate the 5'-flanking region of rat Hal gene to locate possible cAMP- and glucocorticoid-responsive elements and to identify whether the activation of the Hal promoter by glucagon occurs via PKA or PKC. The results showed that glucagon was able to induce Hal expression 1.5-fold in primary hepatocytes. The addition of phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) and forskolin to hepatocytes increased Hal mRNA concentration by 100 and 40%, respectively. To identify the Hal gene regulatory region, a 1248-bp fragment of the 5'-region was obtained. The transcription initiation site was located at 404 bp from ATG. The sequence did not show consensus TATA-like or CAAT-like boxes in the first 100 bp upstream from the transcription start site. The promoter contained six GC rich boxes, seven putative AP1 binding sites, and four glucocorticoid-responsive elements. The putative Hal promoter region was cloned into the pGL3basic vector and transfected into HepG2 cells. Luciferase expression was significantly stimulated by glucagon (0.9-fold), forskolin (0.9-fold), PMA (2.0-fold), and dexamethasone (2.9-fold). This evidence supports that the Hal gene is turned on by glucocorticoids and by glucagon either via PKC or PKA, but prefers the PKA pathway.

protein kinase A; protein kinase C; gene regulation; amino acid catabolism

AMINO ACID CATABOLISM IS ESSENTIAL for maintaining normal amino acid concentrations in tissues and body fluids, since there is no storage for the excess amino acids from the diet. Defects in the catabolic pathways for each amino acid may lead to metabolic abnormalities that in some instances can be life-threatening (11). There are rate-limiting enzymes in the degradative pathways for each amino acid; however, there is scarce information on the mechanisms of gene regulation for the amino acid-degrading enzymes. An integrative knowledge of gene expression control of these enzymes can help to elucidate the basic mechanism by which the body is able to control its nitrogen content.

Catabolism of most amino acids occurs in the liver, with the exception of the branched-chain amino acids. Histidine is a

typical example of an amino acid degraded in the liver. The histidine-degrading rate-limiting enzyme is the histidine-aminonitrilase (E.C. 4.3.1.3), also known as histidase (Hal; see Ref. 26). In the rat, and in the mouse and human, the Hal gene is found as a single copy, and the cDNA from these species has high homology (18, 19). In the rat, the Hal gene codes for an mRNA of 1.97 kb that is translated into a protein of 657 amino acids with a relative molecular mass of ~72.1 kDa (20). The activity and gene expression of this enzyme is regulated mainly by the protein content in the diet, the greater the concentration, the higher the Hal expression (23). Hal expression rises rapidly after the protein requirement is met to eliminate excess histidine.

The increase in Hal mRNA concentration also occurs under catabolic stress (2) or through the ingestion of imbalanced histidine diets (21). Thus the administration of glucocorticoids, hormones involved in stress responses, also increase the expression of Hal mRNA (1). Conversely, severe undernutrition decreases the expression of Hal (25). These changes in Hal expression are associated with specific hormonal changes (22). Dietary protein content is associated with glucagon serum levels in the rat, and glucagon levels in turn are associated with hepatic Hal activity and mRNA concentration (24). In fact, when rats are injected with glucagon, Hal activity and mRNA concentration increase rapidly after 3 h of glucagon administration (1). It is now clear that liver cells possess a single type of glucagon receptor. Upon glucagon binding, the receptor is able to couple to multiple G proteins, thereby activating two distinct signaling pathways, one coupled to phospholipase C, generating diacylglycerol and inositol 1,4,5-trisphosphate, and the other coupled to adenylate cyclase, increasing cAMP levels. However, it is not known which of these signaling pathways activate Hal gene expression.

At present, there is no information about the regulation of the Hal gene promoter. Suchi et al. (17) reported the sequence of the Hal human gene and a short segment of its promoter; however, its functionality was not assessed. Additionally, the regulatory region of the Hal gene in the rat has not been established. Therefore, the purpose of the present work was to determine the promoter region of the rat Hal gene, to identify the potential *cis*-acting elements, and to assess its functionality. Furthermore, we studied which of the signaling pathways activated by glucagon was involved in Hal gene expression. Our results showed that Hal gene expression in cultured hepatocytes is activated by either protein kinase A (PKA) or protein

Address for reprint requests and other correspondence: N. Torres, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Depto. Fisiología de la Nutrición, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, México, D.F., 14000, México (e-mail: nimbet@quetzal.innsz.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

kinase C (PKC), and that the promoter of the gene contains the responsive elements that are activated by both signaling pathways. Furthermore, Hal promoter is activated by dexamethasone, indicating the presence of active glucocorticoid-responsive elements (GRE).

MATERIALS AND METHODS

Animals. Male Wistar rats, obtained from the Experimental Research Department and Animal Care Facilities at the National Institute of Medical Sciences and Nutrition, were housed individually in wire, stainless steel cages at 22°C with a 12:12-h light-dark cycle and with free access to diet.

Diets. Diets were administered in dry form and contain (in g/kg diet) 60, 180, or 350 vitamin-free casein, 50 corn oil, 50 mineral mix, and 10 vitamin mix. Cornstarch and sucrose, in 1:1 proportion, were added to complete 1 kg diet. The composition of the diets was described previously (23). Vitamin-free casein and the rest of the ingredients were obtained from Teklad (Madison, WI).

Dietary treatments. Twelve rats, weighing 75–90 g, had free access to the appropriate diet for 10 days and were randomly divided into three groups of four rats each: 1) 6% casein, 2) 18% casein, and 3) 35% casein. At the end of the 10-day period, rats were anesthetized with ether for hepatic perfusion to obtain hepatocytes. The protocols used in these experiments were approved by the Animal Care Committee of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition.

Preparation and culture of primary rat hepatocytes. Rat hepatocytes were isolated by the collagenase perfusion technique and separated from nonparenchymal liver cells and debris by centrifugation. Cell viability was assessed by the Trypan blue exclusion test and was always higher than 90%. Cells (65,000/cm²) were plated on treated culture dishes (100 mm diameter) and maintained in DMEM (GIBCO-BRL) supplemented with glucose, L-glutamine, pyridoxine hydrochloride, and sodium pyruvate. After 2 h, cells were washed, and the culture was continued in DMEM containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 100 mg/ml streptomycin (4).

Hal activity. Isolated hepatocytes (1 × 10⁷ cells) were washed with ice-cold saline and lysed with 5 mmol/l NaOH in 14 mmol/l KCl. The lysed cells were centrifuged for 60 min at 105,000 g, and the clear supernatant was stored at -80°C before measuring Hal activity. The activity was assayed as described previously (23). The method is based on the spectrophotometric measurement of the appearance of uroic acid at 277 nm. The reaction was linear for 10 min at 25°C in 0.1 mol/l pyrophosphate buffer, pH 9.2. An enzyme unit was defined as the formation of 1 nmol uroic acid/min. The protein concentration was measured by Lowry assay with BSA standards.

Northern blot analysis. Total cellular RNA was isolated from cultured hepatocytes with guanidine thiocyanate according to Chomczynski and Sachi (5). For Northern analysis, 15 µg RNA was electrophoresed in a 8 g/l agarose gel containing 2.2 mol/l formaldehyde, transferred to a nylon membrane filter (Hybond-N⁺), and cross-linked with an ultraviolet cross-linker (Amersham). RNA integrity and location of the 28S and 18S ribosomal RNA bands were determined under ultraviolet light. The cDNA probe was a 1005-bp PCR product amplified from rat liver Hal cDNA. The forward and reverse primers used for the PCR reaction were 5'-GCATCAC-CACGGGTTT-3' and 5'-GGGCTATCATGAATCCAGAAT-3', respectively. The PCR product was purified with the high pure PCR product purification kit (Roche) and labeled with Redivue [α -³²P]dideoxycytidine triphosphate (110 TBq/mmol) by using the Rediprime DNA labeling kit. Membranes were prehybridized with rapid-hyb buffer at 65°C for 1 h and then hybridized with the cDNA probe (53.3 MBq/l) for 2.5 h at 65°C. Membranes were washed one time with 2× citrate saline solution (SSC: 1× SSC = 0.15 mol/l sodium chloride and 15 mol/l sodium citrate) and 0.1% SDS (wt/vol) at room temperature for 20 min and then two times for 15 min with 0.1× SSC/0.1% SDS (wt/vol) at 65°C. Digitized images and quanti-

fication of radioactivity (dpm) of the bands were carried out using the Instant Imager (Packard Instrument, Meriden, CT). Membranes were also exposed to Ectascan film (Kodak de México, Guadalajara, México) at -70°C with an intensifying screen.

Growth and culture of HepG2 cells. Human HepG2 hepatoblastoma cells were grown to confluence in tissue-culture bottles (75 cm²) in 12 ml RPMI medium containing 100 g/l FCS. For subcultivation, trypsin-treated cells were diluted in the same medium and plated again on 12-well plates at a density of 3 × 10⁵ cells/well. The next day, cells were transfected with lipofectamine 2000 in serum-free medium, and, 4 h later, fresh serum-containing medium was applied. After transfection (24 h), experiments were started by applying fresh medium containing hormones or drugs at the concentrations indicated in Figs. 1–7.

Isolation of rat Hal 5' flanking region. Isolation of the promoter region of rat Hal gene was carried out using nested PCR reactions with specific antisense primers designed based on the Hal cDNA sequence and sense adaptor primers to amplify rat genomic DNA fragments (Genome Walker Kit). The external and nested gene specific reverse primers were 5'-TIG TTC ATG TAG CGC CGC ACA G-3' and 5'-AAC ACT GAG CTT CCC GTC CTG GCA G-3' corresponding to nucleotides +116 to +91 and +72 to +48 of rat Hal cDNA, respectively. The external and nested sense adaptor primers were provided by the manufacturer. The amplified product was digested with the restriction enzyme *Rsa* I, subcloned in the *Eco*R V site of p-BlueScript KS(+), and sequenced with the ThermoSequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit. The reaction products were separated in a polyacrylamide gel (80 g/l acrylamide-4 mol/l urea) that was dried before autoradiography at -70°C.

Primer extension analysis. To find the transcription initiation site, primer extension analysis was performed using the primer extension system-AMV RT kit described by the manufacturer (Promega). To determine the size of the products, sequencing reactions were performed and run on the same gel.

Reporter gene assays. To assess the functionality of the Hal promoter, different promoter fragments were inserted in the pGL3b-vector containing a luciferase reporter gene. The first PCR construct was generated using oligonucleotide primers [upper 5'-ctactcgagAC-TATAGGGCACCAGCGTGGT-3' (-815 to -797 bp) and lower 5'-gcgaagctATCAGGGTTTCCTAGTTCTC-3'(+39 to +22)]. The product was ligated via PGE-T overnight at room temperature. The ligated product was digested with *Hind* III/*Xho* I and subcloned into pGL3b, which had been digested with *Hind* III and *Xho* I. The rest of the inserts were 5'-deleted derivatives of the first insert. The first and second deletions (Hal-420 and Hal-302) were amplified using the following upper primers: 5'-gcctcgagAAGACACAACCTTTCGTTG-3', and 5'-gcctcgagATTAGGATTGCTACACTCC-3', respectively. A summary of all Hal-pGL3b constructs made is shown in Fig. 1.

Transfection protocol. Transient transfection using lipofectamine 2000 (Invitrogen) was carried out according to the manufacturer's instructions. For assays with a luciferase reporter gene, plasmid pSVβ containing β-galactosidase gene (25 ng/well) was cotransfected to normalize the transfection efficiency differences among samples. The total amount of DNA for assays not containing the glucocorticoid receptor plasmid was held constant by adding empty pCMV5 vector.

Luciferase and β-galactosidase assays. After the last hormone treatment (3 h), cells were processed for luciferase and β-galactosidase activity according to Promega's protocol for the luciferase assay system. For each well, 100 µl lysis buffer were added. Luciferase activity was measured as relative light units with a BD Monolight 3010C luminometer (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). The β-galactosidase activity was measured as described previously (3). The luciferase activity from different samples was normalized by β-galactosidase activity from the same sample. Each treatment was done by triplicate, and all experiments were repeated at least three times. Within each experiment, the promoterless vector (pGL3 basic)

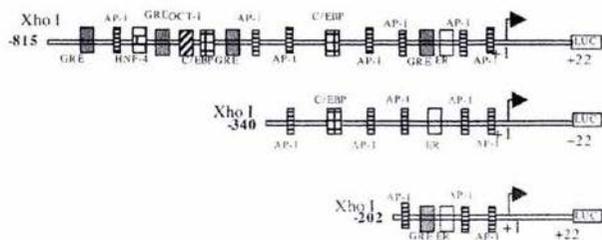


Fig. 1. Schematic representation of the rat histidase (Hal) promoter and its deletions. The arrow indicates the transcription start site. Numbering refers to the position of the transcription start site, which was set as -1 . GRE, glucocorticoid-responsive element

was also transfected into HepG2 cells as a negative control. The results are presented as degree of induction.

Reagents and chemicals. Nylon membranes filters (Hybond-N⁺), the Rediprime DNA labeling system, the ThermoSequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit, deoxycytidine 5'-[α -³²P]triphosphate (110 TBq/mmol), Redivue adenosine 5'-[γ -³²P]triphosphate (110 TBq/mmol), and Redivue 5'-[α -³²P]dideoxycytosine (55.5 TBq/mmol) were purchased from Amersham (Buckinghamshire, UK). The vitamin-free casein and the remaining ingredients of the diets were obtained from Teklad. Cell culture mediums and components and Lipofectamine 2000 were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). The luciferase assay system, β -galactosidase system, and primer extension system-AMV RT were obtained from Promega (Madison, WI). Signaling pathway reagents were obtained from Sigma (Indianapolis, IN). Genome walker was obtained from Clontech (Palo Alto, CA). The high Pure PCR product purification kit was obtained from Roche (Mannheim, Germany). The endofree plasmid purification kit was purchased from Qagen (Chatsworth, CA).

RESULTS

Structure of the 5'-flanking region of the Hal gene. Isolation of the 5'-flanking region of the Hal gene was performed by DNA walking using specific nested primers located in the first 120 bp after the initiation codon in the cDNA sequence (17, 20). This sequence in the human cDNA is located in exon 2 of the genomic sequence of the Hal gene (18). The PCR amplification product using genomic rat DNA cut with *EcoR* V restriction enzyme produced a single fragment of 1265 bp. The amplified product was digested with *Rsa* I and then cloned in pBS II KS(+). The cloned fragment was sequenced, and the first 430 bp coincided with the untranslated region sequence of the rat Hal gene previously reported by Sano et al. (16). The remaining 818 bp had not been reported previously. The initiation of transcription site of the Hal gene was determined by primer extension analysis using a specific antisense primer flanking the 5'-end of the cDNA sequence. The amplified product was located 403 bp upstream from the initiation codon (Fig. 2). Computational analysis using MatInspector version 2.2 software (16) coincided with our primer extension assays in indicating that the nucleotide located 403 bp from the initiation of translation was the putative transcription initiation site.

Sequence analysis of the 5'-flanking region of the Hal gene. Blast sequence analysis showed that the rat Hal promoter region obtained in the present study showed homology with a small sequence of the mouse genome located close to the Hal gene in chromosome 10, whereas there was no homology with any sequence of the human genome. Interestingly, the rat Hal cDNA sequence has an 87% identity for mouse and human over the coding region. At the amino acid level, rat Hal is 93%

conserved with both mouse and human Hal. The 818-bp DNA sequence of the 5'-flanking region of the Hal gene is shown in Fig. 3. Computational analysis to determine putative transcriptional binding sites was also performed with the MatInspector version 2.2 program at the TRANSFAC 7.2-Public 4.0 database (<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC/>). The sequence did not show consensus TATA-like or CAAT-like boxes in the first 100 bp upstream from the transcription start site. Instead, there are two putative TATA-like boxes at -152 and -263 bp and two putative CAAT-like boxes at -190 and -283 bp. There are also six GC-rich boxes at -78 , -130 , -211 , -312 , -418 , and $+2$ nt that are potential binding sites for the transcription factor Sp1 (8). Additionally, there are seven putative AP1, four GATA, and one Oct-1 binding site. Sequences homologous to several binding sites for liver-specific transcription factors including C/EBP, NF- κ B, and HNF-4 were found. There are also four GRE at -158 , -390 , -446 , and -528 and single estrogen receptor and progesterone receptor sites at -218 and -697 , respectively (Fig. 3).

Effect of dietary protein on Hal expression in rat hepatocytes. To examine the effect of different concentrations of dietary protein on Hal activity and mRNA concentration in rat

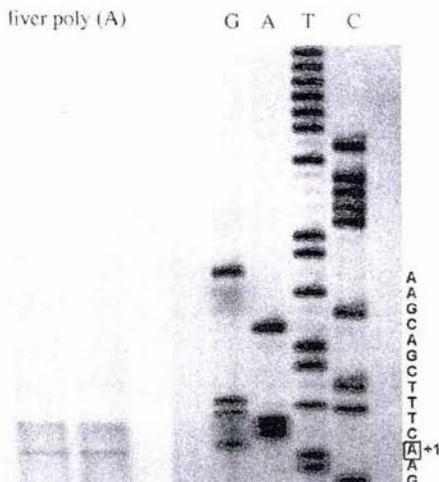


Fig. 2. Primer extension analysis of the hepatic Hal gene to determine the transcription initiation site.

-799 TATCCAAGGG CAAAGATAAG GAACACAAAC ACACACACAC ACACACACAC ACACACACAC
 HNF4/GATA/PPAR-RXR/ MZF GRE
 -739 ACACACACAC ACACCTGAGG GCCCGTGGGG AGTTAAAGTC CAAGTCCTGG TGACAGTAAT
 AP2 PR API GATA
 -679 CTCAAACACT TCTCTAACCT TCCCATCTAT CTAGCAGGCC CCGACCTCAG GGTIGACACA
 HNF4 TAX/CREB API
 -619 CACCAATGGA CTTTGTCTTT CCAGCCACC ATTGGGATGC CCAITTTACA GATAAAGTAA
 GATA CREB
 -559 GCTAAATCCC AGAGGTGTCA AATGACTGGC AATCACAGAG CCAGAACTTA GTACCGAGGT
 HNF4 OCT-1 GR
 -499 ACATGGCCATA GATCACAGCC TTAAGAATTT GGCCTTTGGG TTAGGAAACA GGAAGAACAT
 PPAR/RXR COUP/HNF4 C/EBP GRPR
 -439 TCACTCACCC CAGGGCAGTA AGCTGAGGGC CTCCAAGCTA TAGTGATICA TGTGTCTAAG
 EBOX/API AP2 SPI API GR
 -379 ACACAACTTT TCGTTGTGAA AATCCGCTCT TGCCTTCTTT TGTGGAGCCA TGGCTTCAGG
 C/EBP/NF16
 -319 AGCCCAAGGC AGTGGCAGGG AGGCGTTGCT CAACCGATGT TTGTGGAAATA AATAAA TGAA
 SPI
 -259 TTACGGATTGC TACACTCCGG GTGTCACTCC GGTGTGCACA ATTGACCCGAG GCGATCGGG
 C/EBP GR GATA
 -199 TGTCAAAAT GACCCGAGGG ATGCGTTTGA CCAGTTGAGTA ATTCTAAAGA GGGGAACCG
 Tax/CREB API GR
 -139 GGGGGGGGG GGGGGCGCTG GGGATTTAAGCTCAGTGTAG AGCGCTTACC TAGGAAGCGA
 SPI API
 -79 AGGCCCGGG TTCCGTCGCC AGCTCCGAAA AAAAGAACCA AAAAAAAAAA AAAAAAGAGG
 SPI
 -19 GGAACAGTAA GCAGCTTTCA AGCCGACTC AGAACGGGG AGAGAGAGAA CTAGGAACCC
 +1 SPI
 +42 TGATCAGGAG AAGTGGCAG AGGACCCAG ACTTCCAGAC CCTTGGTCTT GCTGCCATA
 +102 AGGCTACATT GAAAGTGGC TCAGTACTT ACATCCCTTT CTCTGCCCC TGTTTCAGCT
 +162 TCCAGAAAGG CCAACGGAAC ACCAGAGCCC GCAATCAATA TTTGTTCAA GTGTGGATGG
 +222 CTGAAGGCAA GGAAGGGGT GTGTTTGAAG AGTCCATTCT CAGTCTCCCT GCCAACCCACA
 +282 CCCAGCAGG CACTCCCCTC CCTGGTAAAG GATAAAGGCT CTCCCCATCC AGGACTGTAG
 +342 GGAAAGGAGC CAGCCCTTGG GTTCCAGCAA CCTTTAGCTC AGAAGGGCTA TAGTAGGTGA
 +402 GCCATGCTTA GGTACACGGT GCACGTGCGT GGGGAATGGC TGGCGGTA

Fig. 3. Nucleotide sequence of the rat hepatic Hal 5'-flanking region. The filled circle (assigned -1) represents the putative major transcription initiation site. Underlined are identified cis-element sequences homologous to binding sites for various transcription factors. *Italic* type shows previously reported non-translated region. **Bold** type indicates transcription and translation initiation sites. Box areas indicate putative TATA and CAAAT boxes.

isolated hepatocytes, rats were fed for 10 days with diets containing 6% (low-protein diet), 18% (adequate-protein diet), or 35% (high-protein diet) casein. Hal activity increased by ~11-fold in rats fed 18% casein diet compared with rats fed 6% casein diet, whereas rats fed 35% casein diet showed 30% increased Hal activity with respect to rats fed 18% casein diet. Increments in Hal activity were accompanied with corresponding increments in Hal mRNA, as shown in Fig. 4. These results indicate that the consumption of graded dietary protein concentrations increased Hal expression in rat isolated hepatocytes.

Effect of glucagon on Hal expression in rat cultured hepatocytes. Because glucagon is a hormone that increases when the protein content of the diet increases, we studied the effect of this hormone on Hal mRNA concentration in primary cultured rat hepatocytes. The effect of physiological concentration of glucagon (10^{-7} mol/l) on the time course response of Hal mRNA concentration showed an increase of 46% 1 h after the addition of glucagon. Hal mRNA concentration returned to basal levels after 2 h of exposure to the hormone (Fig. 5A). Furthermore, we assessed the effect of graded concentrations of glucagon (10^{-6} to 10^{-10} mol/l) on Hal mRNA concentration in cultured isolated rat hepatocytes. The highest stimulation of Hal mRNA was obtained after 1 h of incubation when cultured

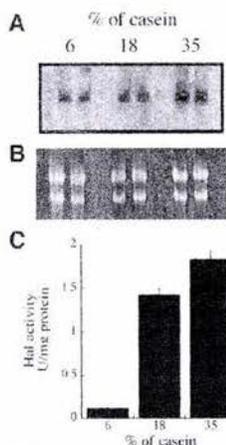


Fig. 4. mRNA concentration and Hal activity in hepatocytes of rats fed 6, 18, or 35% casein diets. A: Northern blot analysis of Hal mRNA in hepatocytes. B: ethidium bromide-stained gels. C: Hal activity expressed as U/mg protein.

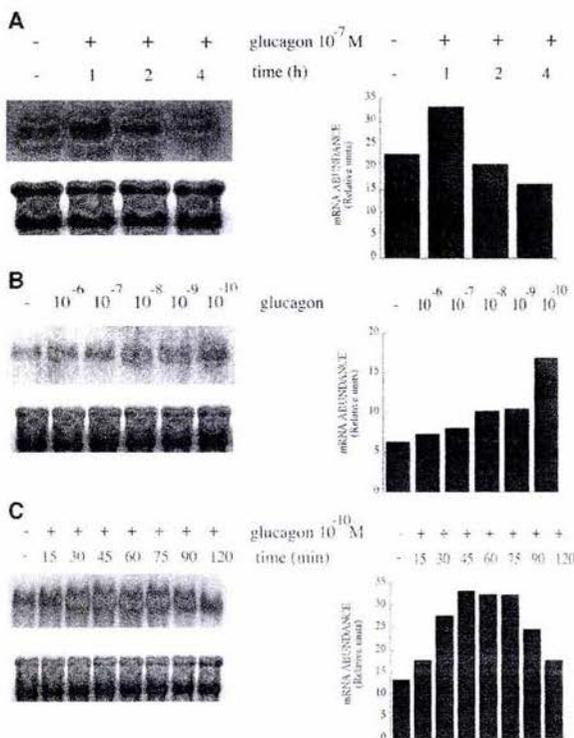


Fig. 5. Northern blot analysis of Hal mRNA in hepatocytes with different concentrations of glucagon. *A*: time course of glucagon (10^{-7} M)-treated hepatocytes on Hal mRNA. *B*: hepatocytes treated with different concentrations of glucagon. *C*: time course of glucagon (10^{-10} M)-treated hepatocytes on Hal mRNA. *A-C* show Northern blot analysis of 15 μ g total RNA from hepatocytes under different conditions (ethidium bromide-stained gels and quantification of Hal mRNA concentrations by electronic autoradiography).

hepatocytes were incubated with 10^{-10} mol/l glucagon (Fig. 5B). We carried out a time course experiment at this hormone concentration to see the maximal response of Hal mRNA abundance to glucagon. This experiment showed that the maximal induction of 1.5-fold was obtained after 45–75 min of incubation (Fig. 5C). These data clearly show that glucagon induces Hal gene expression in cultured rat hepatocytes.

Effect of PMA, forskolin, and ANG II on Hal gene expression in rat hepatocytes. There are two possible different signal transduction pathways that can be activated by glucagon. The first one is coupled to phospholipase C, causing breakdown of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, and the second one is coupled to adenylate cyclase, generating cAMP (10). To investigate which of these two signaling pathways was preferentially used to induce Hal transcription, we used phorbol 12-myristate,13-acetate (PMA), forskolin in the presence of 3-isobutyl-1-methylxanthine, or ANG II as activators of PKC, PKA, and calcium-calmodulin kinase, respectively. The results showed that addition of 100 nmol/l PMA doubled Hal mRNA concentration after 4 h of incubation in cultured rat hepatocytes (Fig. 6A). Cultured hepatocytes incubated for 1–2 h with 10 μ mol/l forskolin also increased Hal mRNA concentration by ~40% (Fig. 6B). ANG II did not change Hal mRNA levels. (Fig. 6C). These data indicated that Hal gene expression can be activated via either PKA or PKC.

Functional analysis of the rat liver Hal promoter. To analyze the function of the Hal promoter and to study whether the Hal gene was turned on via PKA or PKC, we cloned the Hal gene promoter in the pGL3 basic vector. The complete promoter region and two different 5'-deletion fragments of the rat Hal gene promoter, upstream of the transcription initiation site, were generated by PCR and ligated into the luciferase reporter vector pGL3-basic. These reporter constructs were transfected into HepG2 cells. The common downstream boundary of all these constructs was at the nucleotide position +22 from the transcription start site. In HepG2 cells, luciferase expression, under the control of the rat liver full-length Hal promoter, was significantly stimulated by dexamethasone (2.9-fold), glucagon (0.9-fold), forskolin (0.9-fold), and PMA (2.0-fold) over basal nonstimulated expression (Fig. 7). This evidence supported our findings using cultured hepatocytes that the Hal gene is turned on via PKC or PKA and that activation is higher with PMA than forskolin. As we have demonstrated previously, dexamethasone *in vivo* increases hepatic Hal mRNA concentration (1). Our present data support a direct role for dexamethasone on the activation of the Hal promoter. Deletion of nucleotides -815 to -340 from the rat Hal promoter, which removes the region containing three AP1 sites, a TAX/CREB site, and three glucocorticoid response elements, abolished the stimulation induced by PMA, forskolin, and glucagon but still showed

REGULATION OF RAT HISTIDASE PROMOTER BY GLUCAGON

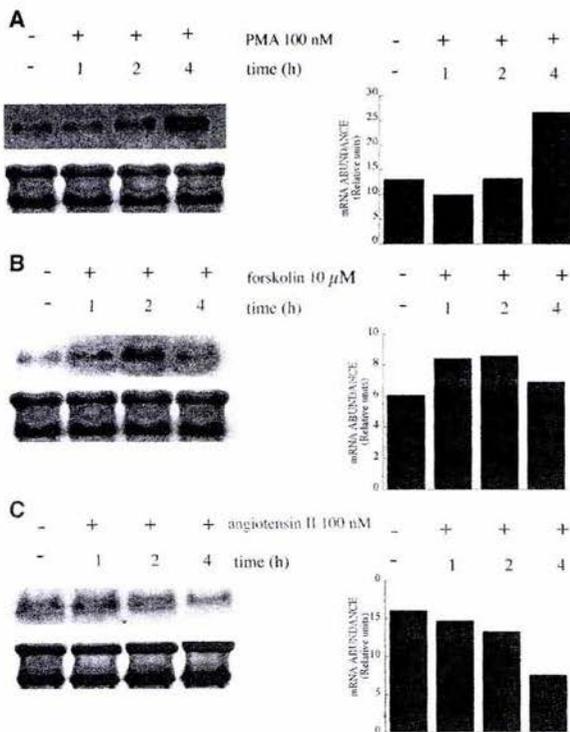


Fig. 6. Northern blot analysis of Hal mRNA in hepatocytes treated with different drugs. *A*: time course of the effect of 100 nM phorbol 12-myristate,13-acetate (PMA) on Hal mRNA. *B*: time course of the effect of 10 μM forskolin on Hal mRNA. *C*: time course of the effect of 100 nM ANG II on Hal mRNA. *A-C* show Northern blot analysis of 15 μg total RNA from hepatocytes under different conditions (ethidium bromide-stained gels and quantitation of Hal mRNA concentrations by electronic autoradiography).

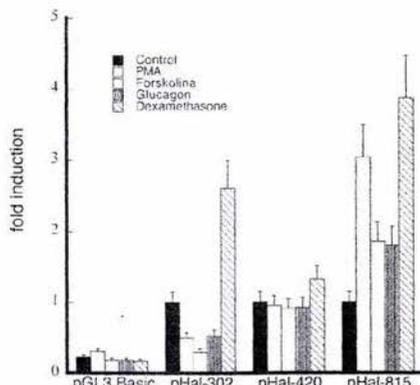


Fig. 7. Transient transfection analysis of induction by hormones and drugs. HepG2 cells were transfected with Hal-pGL3b plasmid as described in MATERIALS AND METHODS. The cells were treated with medium alone (control), 10 μM dexamethasone (Dex), 0.1 μM glucagon, 10 μM forskolin, and 1 μM PMA. For dexamethasone assays, cells were cotransfected with 50 ng glucocorticoid receptor. Luciferase activity was normalized to β-gal activity. Data for the 5 groups were taken from 3 representative experiments and are given as the mean ± range from triplicate transfections.

stimulation by dexamethasone, although to a lower extent compared with the full segment. Deletion of the segment containing nucleotides -815 to -202 was insensitive to treatment with PMA, forskolin, or glucagon. However, despite the deletion of 613 nucleotides, dexamethasone was able to induce luciferase activity by 1.6-fold compared with pGL3 promoterless vector. These results suggest that the GRE sites in this region may be more active when a potential repressive site found between -340 and -202 is deleted (Fig. 7).

DISCUSSION

Several studies in mammals have shown a lack of protein storage in the body after the consumption of a high-protein diet. Furthermore, high concentrations of many of the individual indispensable amino acids in body fluids lead to adverse effects and even toxicity. This implies the presence of specific mechanisms to control the excess of dietary amino acids to prevent deleterious effects. Conservation of body nitrogen and elimination of excess amino acids is mainly controlled by the amino acid-degrading enzymes. Understanding the mechanisms of regulation of expression of these enzymes will give insight into the fine tuning of amino acid catabolism.

In the present study, we observed that Hal mRNA concentration from cultured hepatocytes obtained from rats fed a

high-protein diet was higher than those fed an adequate- or low-protein diet, indicating the induction of this amino acid-degrading enzyme to eliminate the excess histidine. Previous studies have demonstrated that induction of several amino acid-degrading enzymes, including Hal, is mediated by an increase in glucagon concentration, which enhances amino acid catabolism (5). Also, it was demonstrated that ingestion of a high-histidine diet did not increase Hal expression, indicating that Hal gene is regulated by hormones but not by its substrate (22). In this study, we demonstrate that addition of glucagon to cultured hepatocytes increases Hal mRNA concentration, and the stimulation is dose and time dependent. These data are in agreement with previous studies that showed that other hepatic amino acid-degrading enzymes are regulated by the protein content of the diet, by the injection of glucagon to rats, or by the addition of this hormone to cultured hepatocytes (7, 9, 12–14, 27). In these studies, it has been demonstrated that glucagon stimulates amino acid-degrading enzyme activities and induces their mRNA. However, it has not been clearly established what signal transduction pathway(s) are involved in the activation of the expression of these enzymes by glucagon. In addition, with the exception of serine dehydratase (SDH), whose promoter contains functional cAMP-response element (CRE) sites for its activation by cAMP (9), other amino acid-degrading enzyme promoters have not been studied to determine whether they contain putative *cis*-acting elements associated with changes in gene expression due to the presence of metabolic hormones such as glucagon or glucocorticoids.

Glucagon exerts its action through a receptor coupled to a G protein; however, it was demonstrated that this hormone increases cAMP concentration and intracellular calcium concentration via inositol 1,4,5-trisphosphate (10). This indicates that glucagon signaling occurs via PKA or PKC. To assess if Hal induction by glucagon was mediated via PKA or PKC, isolated hepatocytes were incubated with forskolin, an activator of adenylate cyclase that causes an increase in cAMP levels and activates PKA, or PMA, a structural analog of diacylglycerol that activates PKC. Our results show that Hal mRNA is induced by both compounds, indicating that the expression of this enzyme occurs via either PKA or PKC. Interestingly, ANG II, which increases the release of intracellular calcium and has no effect on cellular cAMP levels, did not change Hal gene expression. Thus the increase of Hal expression is not mediated by calcium-calmodulin kinases.

To understand whether the activation of the Hal gene occurs as a result of an increase in Hal transcription mediated by signaling pathways involving PKA or PKC, it was necessary to isolate and sequence the promoter region of the rat Hal gene to identify potential *cis*-acting elements activated by cAMP or PMA. The analysis of the promoter region of the rat Hal gene revealed the lack of a typical TATA box but was GC-rich, resulting in the presence of several Sp1 and AP1 motifs near the transcription initiation site (Fig. 2). Conversely, a segment of 610 nucleotides from the human Hal promoter has been previously reported and shows a consensus TATA box (18). Additionally, the adenine repeat in the rat promoter sequence is not present in the human gene. Nonetheless, in the promoters of both organisms, there are a similar number of potential GRE, GATA, C/EBP, and NF- κ B sites. The rat Hal promoter shows four AP1 sites compared with the human promoter that only contains two sites, and this difference may alter the

capacity of both promoters to respond to cAMP and/or PMA. On the other hand, the regulatory region of the rat SDH gene promoter has been studied (13, 15). The SDH promoter region, similar to the rat Hal promoter, lacks typical TATA and CAAT boxes and has several GC boxes that may be binding sites for transcription factor Sp1. In addition, the SDH promoter contains a 22-bp adenine repeat between nucleotides -157 to -178, which resembles the 17-bp adenine repeat present in the rat Hal promoter between nucleotides -25 to -44. Furthermore, rat SDH promoter contains at least two GRE and two CRE sites, providing it with the capacity to respond to glucocorticoids and cAMP in a similar fashion as the rat Hal promoter.

The functional analysis of the rat Hal promoter showed that the region between nucleotides -340 to -815 is important for the response to glucagon and to forskolin and PMA. This region contains a TAX/CREB site at -629 bp and three AP1 sites at -404, -452, and -691 bp that are the potential regulator sites for glucagon response. On the other hand, there are at least six GRE sites in the complete fragment of 815 bp and all seem to be functional, although GRE sites at positions -455, -628, and -780 bp are apparently stronger sites for glucocorticoid stimulation. A more detailed study is required for the analysis of *cis*-acting elements in the region between -340 and -815 bp.

In summary, this analysis showed that the rat Hal gene promoter contains active response elements for the metabolic hormones, glucagon and glucocorticoids, that are able to up-regulate rat Hal gene expression. In addition, glucagon stimulation of the Hal promoter occurs preferentially via PKA, although it is also stimulated via PKC. Thus, when rats consume a high-protein diet, there is a proportional increase in serum glucagon levels that in turn activate PKC and PKA pathways and increase Hal transcription, leading to an increase in the amount of this enzyme to degrade excess histidine. Contrariwise, under stress conditions, glucocorticoids are also able to induce Hal expression to oxidize histidine to meet energy requirements. It seems that most of the amino acid-degrading enzymes respond to both hormones in a similar fashion; thus, it seems that the mechanism that controls Hal gene expression is a concerted mechanism through which all of the amino acid-degrading enzymes control body nitrogen balance. Further studies are required to prove this hypothesis.

GRANTS

G. Alemán was supported by fellowships from the program of Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM (Dirección General de Estudios Profesionales), and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). This work was supported by Grant 26591-M from CONACYT (to N. Torres).

REFERENCES

1. Alemán G, Torres N, Bourges H, and Tovar AR. Regulation of histidase gene expression by glucagon, hydrocortisone and protein-free high carbohydrate diet in the rat. *Life Sci* 63: 1663–1672, 1998.
2. Ascencio C, Tovar AR, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, and Torres N. Hepatic histidase and muscle branched chain aminotransferase gene expression in experimental nephrosis. *Life Sci* 67: 2775–2784, 2000.
3. Ausubel FM, Brent R, and Kingston RE. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley, 1994.
4. Berry MN and Friend DS. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: Biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43: 506–520, 1969.

5. Boden G, Tappi L, Jadali F, Hoeldtke RD, Rezvani I, and Owen OE. Role of glucagon in disposal of an amino acid load. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 259: E225-E232, 1990.
6. Chomczynski P and Sacchi N. Single step method for RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
7. Gebhardt R and Mecke D. Permissive effect of dexamethasone on glucagon induction of urea-cycle enzymes in perfused primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 97: 29-35, 1979.
8. Gidoni D, Kadonaga JT, Barrera-Saldana H, Takahashi K, Chambon P, and Tjian R. Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions. *Science* 230: 511-517, 1985.
9. Haas MJ and Pitot HC. Glucocorticoids stimulate CREB binding to a cyclic-AMP response element in the rat serine dehydratase gene. *Arch Biochem Biophys* 362: 317-324, 1999.
10. Hansen LH, Gromada J, Bouchelouche P, Whitmore T, Jelinek L, Kindsvogel W, and Nishimura E. Glucagon-mediated Ca²⁺ signaling in BHK cells expressing cloned human glucagon receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: C1552-C1562, 1998.
11. Harper AE. Biological Factor influencing the utilization of amino acids. In: *Genetic Factors in Nutrition*. New York: Academic, 1984, p. 243-267.
12. Nebes VL and Morris SMJ. Regulation of messenger ribonucleic acid levels for five urea cycle enzymes in cultured rat hepatocytes. Requirements for cyclic adenosine monophosphate, glucocorticoids, and ongoing protein synthesis. *Mol Endocrinol* 2: 444-451, 1988.
13. Noda C, Yakiyama M, Nakamura T, and Ichihara A. Requirements of both glucocorticoids and glucagon as co-inducers for activation of transcription of the serine dehydratase gene in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 263: 14764-14768, 1988.
14. Ogawa H, Fujioka M, Su Y, Kanamoto R, and Pitot HC. Nutritional Regulation and tissue-specific expression of the serine dehydratase gene in rat. *J Biol Chem* 266: 20412-20417, 1991.
15. Ogawa H, Miller DA, Dunn T, Su Y, Burcham JM, Perraino C, Fujioka M, Babcock K, and Pitot HC. Isolation and nucleotide sequence of the cDNA for rat liver serine dehydratase mRNA and structures of the 5' and 3' flanking regions of the serine dehydratase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5809-5813, 1988.
16. Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, and Werner T. MatInspector and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23: 4878-4884, 1995.
17. Sano H, Tada T, Moriyama A, Ogawa H, Asai K, Kawai Y, Hodgson ME, Kato T, Wada Y, and Suchi M. Isolation of rat histidase cDNA sequence and expression in *Escherichia coli*. Evidence of extrahepatic/epidermal distribution. *Eur J Biochem* 250: 212-221, 1997.
18. Suchi M, Sano H, Mizuno H, and Wada Y. Molecular cloning and structural characterization of the human histidase gene (HAL). *Genomics* 29: 98-104, 1995.
19. Taylor RG, Garcia-Haras J, Sadler SJ, Lafreniere RG, Willard HF, Ledbetter DH, and McInnes RR. Localization of histidase to human chromosome region 12q22-q24.1 and mouse chromosome region 10C2-D1. *Cytogenet Cell Genet* 56: 178-181, 1991.
20. Taylor RG, Lambert MA, Sexsmith E, Sadler SJ, Ray PN, Mahuran DJ, and McInnes RR. Cloning and expression of rat histidase. *J Biol Chem* 265: 18192-18199, 1990.
21. Torres N, Beristain L, Bourges H, and Tovar AR. Histidine-imbalanced diets stimulate hepatic histidase gene expression in rats. *J Nutr* 129: 1979-1983, 1999.
22. Torres N, Bourges H, and Tovar AR. Regulación de la expresión génica por nutrientes. *Arch Latinoam Nutr* 46: 89-96, 1996.
23. Torres N, Martínez L, Alemán G, Bourges H, and Tovar AR. Histidase expression is regulated by dietary protein at the pretranslational level in rat liver. *J Nutr* 128: 818-824, 1998.
24. Tovar AR, Ascencio C, and Torres N. Soy protein, casein, and zein regulate histidase gene expression by modulating serum glucagon. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E1016-E1022, 2002.
25. Tovar AR, Santos A, Halhali A, Bourges H, and Torres N. Hepatic histidase gene expression responds to protein rehabilitation in undernourished growing rats. *J Nutr* 128: 1631-1635, 1998.
26. Tovar AR and Torres N. Histidase. In: *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, edited by Creighton TE. New York: Wiley, 2002, p. 1643-1644.
27. Ulbright C and Snodgrass PJ. Coordinate induction of the urea cycle enzymes by glucagon and dexamethasone is accomplished by three different mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 301: 237-243, 1993.