

16
2ef. 03081



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

"REGULACION DE LA EXPRESION GENICA DE LA
HISTIDASA DE HIGADO DE RATA POR LA
INGESTION DE PROTEINA DIETARIA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
NIMBE TORRES Y TORRES

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2 58591



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.

INDICE

	Pagina
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCION	11
Articulo: Regulación de la Expresión Génica por	
Nutrimentos	
Control del metabolismo de aminoácidos.....	11
Histidina amonio-liasa (Histidasa)	12
Características.....	13
Regulación	15
Histidasa en la epidermis	15
Histidinemia	17
Acido urocánico como protector de	
la luz ultravioleta	17
Acido urocánico como un inmunoregulador.	18
JUSTIFICACION.....	19
OBJETIVO	20
RESULTADOS	22

Articulo: Histidase expression is regulated by dietary
protein at the pretranslational level in rat liver

DISCUSION GENERAL	43
REFERENCIAS	46
APENDICE	59

A G R A D E C I M I E N T O S

Con admiración, amor y agradecimiento por su valiosa asesoría, apoyo y por su inmensa paciencia a mi esposo Armando quien ha compartido conmigo sus conocimientos, amistad y confianza.

A mis hijitas Tania y Mariana por recibir su cariño y alegría.

A mis padres quienes me han apoyado y brindado su amor incondicionalmente durante toda mi vida.

A mi hermana Norma y a mi sobrina Ixchel por su continuo cariño, apoyo y comprensión.

A las señoras Alicia y Teresa Tovar por su invaluable ayuda.

Al Dr. Héctor Bourges por la libertad y la confianza que me ha brindado para la realización de mi investigación. Al Dr. Juan Pedro Laclette por su profesionalismo y asesoría en parte de mi investigación. Al Dr. Antonio Velázquez por su adecuada guía en la dirección de mi tesis.

Al Dr. Alfred Harper por brindarme sus conocimientos, mostrarme un ejemplo de justicia, humanidad y como un profesor y asesor admirable. A la Dra. Susan M. Hutson por sus sugerencias en algunas partes de esta investigación y por brindarme la oportunidad de aprender de una mujer y madre investigadora.

Por último quisiera agradecer a la Doctores Ma. del Carmen Gómez Eichelmann, David Romero Camarena, Irma Villalpando Fierro, Mario Zurita Ortega, José Pedraza Chavarri y Sergio Sánchez Esquivel por la discusión, sugerencias y comentarios para el enriquecimiento de esta tesis .

Este trabajo se realizó en el área de Nutriología Molecular del Departamento de Fisiología de la Nutrición de la Subdirección General de Nutrición del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" bajo la dirección del Dr. Héctor Bourges Rodríguez.

Este trabajo se llevó a cabo con los financiamientos que se me otorgaron por parte del CONACYT No. 212226-5-33313M y del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP-Tesis doctoral, UNAM-CCH)

RESUMEN

Los aminoácidos provenientes de la proteína dietaria cumplen diversas funciones. Dentro de éstas funciones se encuentran la de síntesis de proteínas, síntesis de aminoácidos dispensables así como la síntesis de otros compuestos nitrogenados (hormonas, neurotransmisores, bases nitrogenadas). A diferencia de los hidratos de carbono y lípidos, los aminoácidos no se pueden almacenar por lo que el exceso se elimina para evitar toxicidad por aminoácidos.

El mecanismo por el cual el exceso de aminoácidos se oxida es a través de las enzimas degradadoras de aminoácidos. Existe una enzima degradadora para cada aminoácido con excepción de los aminoácidos de cadena ramificada. Estas enzimas juegan un papel muy importante en la conservación de nitrógeno corporal en situaciones donde la ingesta de proteína es baja. Sin embargo, en la actualidad pocos estudios se han enfocado sobre los mecanismos de regulación de expresión génica de enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos. Entre estos la histidina es un aminoácido indispensable en ratas y en individuos en crecimiento.

Una de estas enzimas es la histidasa (Hal) que se encuentra localizada en el citoplasma la cual cataliza la desaminación oxidativa de la histidina para formar ácido urocánico.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la concentración de la proteína dietaria sobre la regulación de la expresión génica de la histidasa hepática en la rata.

Para tal propósito se siguió la siguiente estrategia: 1) Estudiar el efecto del contenido de proteína dietaria sobre la actividad enzimática de la Hal y las constantes cinéticas de la Hal. 2) Purificar la histidasa hepática de rata para producir anticuerpos anti Hal y así poder estudiar el efecto de la proteína dietaria sobre la concentración de la enzima. 3) Estudiar si cambios en la actividad y concentración de la Hal por la proteína dietaria estaban asociados a cambios en la expresión del RNAm específico para la Hal y si este era un efecto específico de tejido. 4) Evaluar el efecto de altas concentraciones de histidina (4 veces el requerimiento de histidina para la rata) como posible mediador de la expresión génica de la histidasa y 5) Determinación de la vida media de la actividad y de la concentración del RNAm de la Hal después de un estímulo con una dieta alta en proteína.

Los resultados mostraron que tanto la actividad enzimática de la Hal se incrementó al incrementar el contenido de proteína en la dieta ($r=0.986$) y este cambio se asoció con un cambio significativo en la V_{max} sin cambio en la K_m . La enzima Hal se purificó 498 veces con actividad biológica con un peso molecular de 72 Da en gel de SDS-PAGE. Esta proteína se utilizó para la obtención de anticuerpos contra la histidasa. Los anticuerpos antiHal neutralizaron la actividad de Hal 90% y reconocieron específicamente una banda de 71.7 kDa. El incremento en la actividad de Hal por la proteína dietaria se acompañó de un incremento significativo en la cantidad de la proteína Hal y en la concentración de RNAm para la misma. La actividad de Hal en ratas alimentadas con 50% de caseína fue 6.9 veces más alta que en los grupos de ratas alimentadas con 0% de caseína. La respuesta tanto de actividad, concentración de proteína y RNAm de Hal fue más pronunciada en ratas alimentadas con dietas con un contenido por arriba de 18% de caseína. La regulación por proteína dietaria fue específica del hígado ya que la histidasa de la piel no presentó cambio alguno. Por otro lado, el grupo de ratas

alimentadas con 12% de caseína suplementada con 1.25% de histidina no afectó la actividad o concentraciones de RNAm para la Hal comparado con las ratas que fueron alimentadas con 12% de caseína, indicando que la expresión de Hal no es modificada por su sustrato. La vida media aparente de la histidasa hepática en ratas alimentadas con una dieta libre de proteína previamente alimentadas con una dieta al 80% de caseína fue de 2.8 días mientras que la vida media del RNAm-Hal fue de 17 h. Los resultados de estos estudios indican que la expresión génica de la Hal es regulada por la proteína dietaria a nivel pretraduccional y que esta regulación es específica de tejido.

ABSTRACT

The amino acids coming from the dietary protein have several functions. Among these functions, amino acids are important for protein synthesis, synthesis of dispensables amino acids and synthesis of other nitrogen compounds (hormones, neurotransmitters, nitrogen bases). Unlike carbohydrates and lipids, amino acids can not be stored, therefore the excess of these amino acids must be degraded to avoid toxicity.

The mechanism for which the excess of amino acid is oxidized is through amino acid degrading enzymes. There is one enzyme for each amino acid with exception of the branched chain amino acids. These enzymes play an important role in the nitrogen conservation in situations where the protein intake is low, and to eliminate the excess of amino acids when the protein intake is high. However, few studies have been conducted to understand the regulation of the expression of enzymes involved in the catabolism of amino acids.

One of these amino acid degrading enzymes is histidase which is located in the cytoplasm. This enzyme catalize the oxidative deamination of histidine to form urocanic acid. Histidine is an indispensable amino acid in rats and in growing individuals.

Thereby, the purpose of the present work was to study the effect of dietary protein concentration on the regulation of hepatic histidase gene expression in the rat. To accomplish this objective, the next strategy was followed: 1) To study the effect of dietary protein content on the Hal activity and the kinetic constants of Hal. 2) Purification of rat liver histidase to obtain antibodies anti-Hal to study the effect of dietary protein on the concentration of Hal. 3) To study if changes in the dietary protein on Hal activity and Hal concentration were associated to

changes in the expression of Hal-mRNA, and if they were tissue specific. 4) To evaluate the effect of high histidine concentrations (4 times the histidine requirement for the rat) as a possible mediator of Hal gene expression. 5) To determine the half life of the enzyme activity and Hal-mRNA concentration after the ingestion of a high protein diet.

The results showed that Hal activity increased as the dietary protein increased ($r=0.986$), and this change was associated with a significant change in V_{max} without changes in K_m . Histidase was purified 498 times with biological activity and it showed in a SDS-PAGE a molecular mass of 72 KDa. The purified protein was utilized to obtain antibodies against histidase. Antibodies anti-Hal were able to neutralize Hal activity by around 90%, and recognized specifically one band of 71.7 KDa. The increase in Hal activity by dietary protein was associated with an increment in the amount of protein Hal measured by Western blot and also by the concentration of Hal-mRNA. Hal activity in rats fed 50% casein was 6.9 fold higher than the groups of rats fed 0% casein diet. The increase in Hal activity, Hal protein concentration and Hal-mRNA was more pronounced in rats fed with diets containing more than 18% casein. The regulation of histidase by dietary protein was specific of liver since skin Hal activity and Hal-mRNA did not show changes. On the other hand, the group of rats fed 12% casein supplemented with 1.25% histidine did not affect Hal activity or the concentrations of Hal-mRNA compared with rats fed 12% casein diet, indicating that the expression of Hal is not modified by its substrate. The apparent half life of Hal activity of rats fed a protein free diet previously fed with a 80% casein diet was 2.8 days whereas the half life of Hal-mRNA was 17 h. The results of all these studies indicate that the expression of Hal is regulated by dietary protein at pretranslational level and is tissue specific.

INTRODUCCION

Control del metabolismo de aminoácidos.

La degradación de aminoácidos en el hígado y en otros tejidos está controlada por varios factores. Primero, debido a que las enzimas degradadoras de aminoácidos en el hígado son de relativa baja afinidad y alta capacidad, es decir, que tiene valores de K_m altos en relación con la concentración del aminoácido específico (sustrato), las velocidades de degradación están influenciadas por las concentraciones de aminoácidos en los tejidos [1]. Por lo tanto, un incremento en la cantidad de aminoácidos que entra al hígado provenientes de la sangre portal incrementará su oxidación, dando como resultado un mecanismo eficiente a corto plazo que contribuye a la estabilidad de las concentraciones en la sangre y en los tejidos en situaciones donde exista un aporte variable de aminoácidos como lo sería después de una comida. Un mecanismo a largo plazo para el mantenimiento de las concentraciones de aminoácidos en los tejidos después de la ingestión de una comida o por cambios hormonales se basa en la inducción o represión de genes de enzimas degradadoras de aminoácidos [2]. A diferencia de los cambios en la velocidad de oxidación producidos por el sustrato, la dieta y hormonas provocan que la actividad enzimática permanezca alterada por el tiempo que el estímulo esté presente. Estas respuestas pueden resultar en cambios a largo plazo en la capacidad metabólica para oxidar aminoácidos. Por ejemplo, después de la adaptación a la alimentación con una dieta alta en proteínas, la concentración de la mayoría de los aminoácidos indispensables permanecen

dentro de los valores normales aún cuando el consumo de proteína por el animal se incremente varias veces.

Con algunas excepciones, para cada aminoácido existe una ruta catabólica específica. Cada una de estas rutas tiene varios pasos enzimáticos, existiendo una enzima que es el paso limitante que controla el flujo de la degradación de cada aminoácido. A esta enzima se le denomina enzima degradadora de aminoácidos. La mayoría de estas enzimas se encuentran localizadas en el hígado con excepción de la enzima que degrada los aminoácidos de cadena ramificada [3].

Histidina a monio- liasa (Histidasa).

La histidina se degrada en los mamíferos por dos rutas (Fig 1). Los productos de la ruta principal, vía histidasa (L-histidina a monio-liasa, EC 4.3.1.3) son el ácido glutámico y un fragmento de 1 carbono. La histidasa (Hal) es una enzima citoplásmica, la primera y limitante en la ruta catabólica de la histidina en el hígado, que cataliza la deaminación no oxidativa irreversible [4] de la L-histidina, generando ácido urocánico y a monio [5]. La histidasa se ha estudiado en una variedad de especies de bacterias [6-9] así como en mamíferos [10, 11].

La actividad enzimática de la histidasa se ha encontrado exclusivamente en el hígado y la piel [12]. En el hígado, el ácido trans-urocánico se metaboliza a ácido glutámico por una serie de reacciones iniciadas por la urocanasa. Sin embargo, la urocanasa no está presente naturalmente en la piel, y consecuentemente el ácido urocánico se acumula en la epidermis, por lo que se considera un protector de la radiación ultravioleta [13]. La otra ruta importante en la degradación de la histidina es la de la histidina piruvato transaminasa. Los productos de la ruta de la aminotransferasa son

imidazolpiruvato, imidazolactato e imidazolacetato; los primeros dos pueden ser reconvertidos a histidina o excretados en la orina.

Características de la Histidasa

La histidasa de mamíferos tiene un peso molecular de alrededor de 200 KDa [14, 15] y parece ser que consiste de tres subunidades idénticas de alrededor de 75 KDa cada una [15-17]. El DNAc de la histidasa de hígado de rata contiene un marco de lectura abierto de 1971 pares de bases que se traduce en un polipéptido de 657 aminoácidos, con una masa molecular de 72,165 Da [18]. La histidasa de rata tiene 41 y 43 % de identidad de aminoácidos con histidasa de P. putida y B. subtilis, respectivamente. Estudios por medio de mapeo de restricción y análisis por Southern blots revelaron que el gen de la histidasa humana consiste de una sola copia, conteniendo 21 exones. Esta región cubre un total de 25 kb. El exón 1 codifica únicamente para la secuencia no traducida del RNAm de la histidasa y la codificación de la proteína comienza en el exón 2. La región 5' del gen de la histidasa humana se encuentra a 610 pb del sitio de iniciación de la transcripción. Una caja TATA y una caja CAAT se encuentran en las posiciones -25 a -31pb y de -85 a -92 pb, respectivamente. También se han descrito secuencias homólogas a varios factores de transcripción específicos de hígado, incluyendo C/EBP, NFIL6, HNF5 que se encuentran entre -50 y -200 pb. Elementos cis adicionales que corresponden a AP1, AP2/KER1. ATF, GATA, MNF y GRE se encuentran en la región de -35 a -535 pb [19].

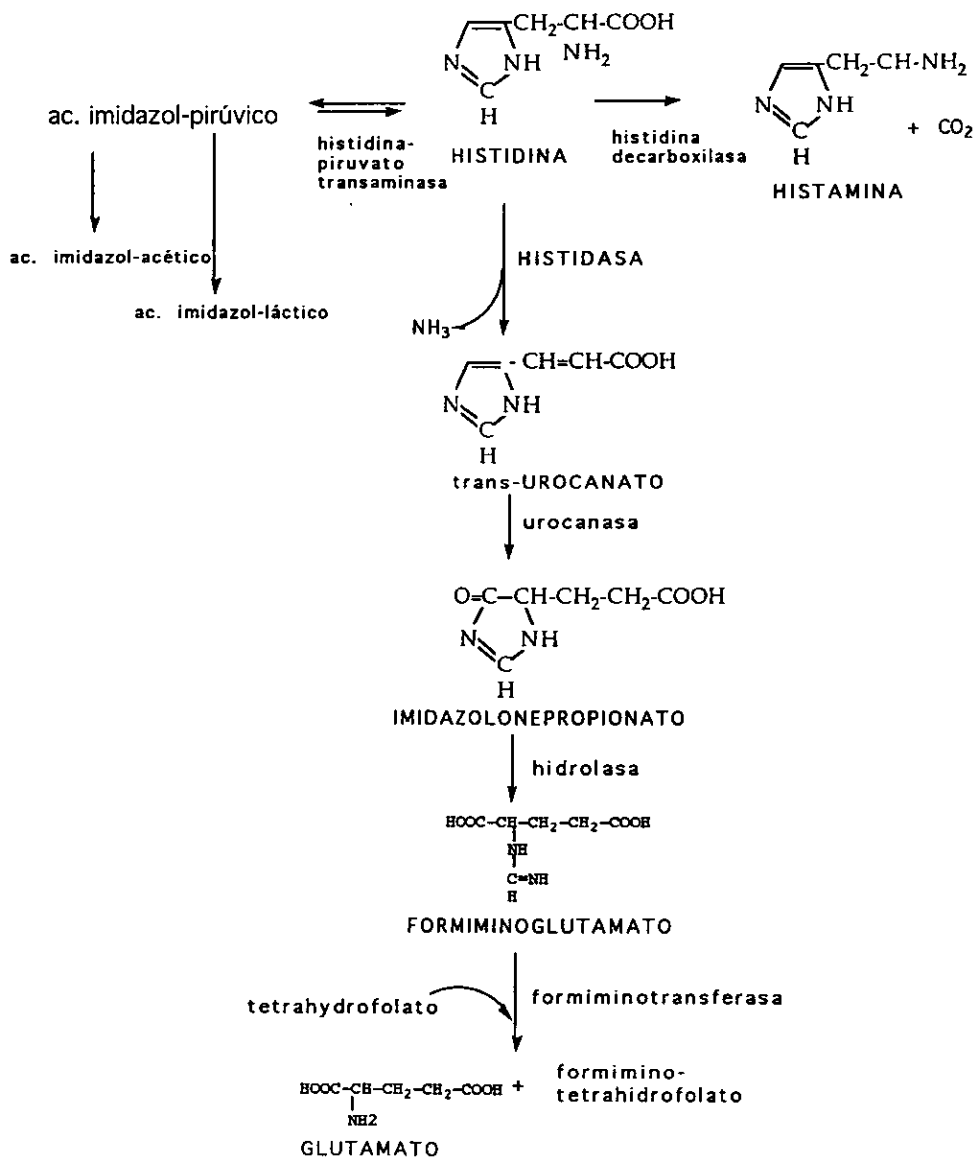


Figura 1. Principales rutas de degradación de la histidina

Regulación de la Histidasa.

El programa de desarrollo de la histidasa de la piel difiere del de la enzima hepática. La actividad de la histidasa en la epidermis de la rata tiene su máximo alrededor de seis días después del nacimiento, declinando después de dos a tres semanas al nivel encontrado en los adultos [20]. Por el contrario, la actividad de histidasa en el hígado se encuentra hasta el cuarto día de nacimiento incrementándose gradualmente hasta la pubertad. La maduración sexual en ratas hembras está asociada con un pronunciado incremento en la síntesis de histidasa hepática, debido a la inducción por estrógenos. Como resultado, las ratas hembras tienen dos veces más histidasa hepática que las ratas macho [21, 22]. La actividad de la histidasa del hígado se induce en ratas alimentadas con una dieta alta en proteína o en ratas inyectadas con glucagon o glucagon y cortisol [23], y es inhibida *in vivo* por la inyección con ácido α -hidrazinoimidazolilpropiónico. La histidina-piruvato aminotransferasa no se induce en ratas alimentadas con una dieta alta en proteína pero responde más en ratas tratadas con glucagon o cortisol [24, 25].

Histidasa de la epidermis

Una característica principal de la regulación de la histidasa de la epidermis es que la actividad es detectable únicamente en la capa exterior de la piel, la stratum corneum [26]. Ya que las células de esta capa han perdido su núcleo, el RNAm para la histidasa (RNAm-Hal) debe ser sintetizado en una de las capas de células interiores, como la stratum granulosum o stratum

spinosum, por lo que, hasta que se forma el stratum corneum, el RNAm-Hal no se traduce o el péptido de la Hal es inactivo. Análisis por Northern blot del RNA total de piel no revela diferencias aparentes en el tamaño del RNAm de la Hal [18]. La evidencia genética indica que la Hal se expresa del mismo gen en ambos tejidos, sugiriendo que si hay cualquier variación entre la enzima de la piel e hígado puede deberse a un rompimiento alterno que no es detectable en los Northern blots, o a diferencias en las modificaciones post-traduccionales de la proteína. Las diferencias en actividad enzimática entre el hígado y la piel puede deberse también a que la Hal permanece inactiva en las capas inferiores de la epidermis con la subsecuente activación de la enzima con la formación de la capa córnea.

La histidasa posee un residuo de dehidroalanina en el centro electrofílico del sitio activo de la histidasa de mamíferos, el cual participa en el proceso de deaminación, aparentemente en una manera análoga al cofactor piridoxal fosfato. La formación postraducciona de la dehidroalanina es importante en la conversión del polipéptido a la forma catalítica y podría controlar la aparición de actividad de histidasa en la epidermis. El papel de la dehidroalanina en la catálisis parece ser la activación del grupo amino de la histidina favoreciendo la eliminación del grupo NH_3^+ . Se ha demostrado que el sitio probable de modificación de la histidasa de rata es la serina 254 que sería el precursor del residuo de dehidroalanina [27]. La única otra enzima conocida que tiene en su sitio activo dehidroalanina es la fenilalanina amonio-liasa de plantas [28].

Histidinemia .

El perfil bioquímico de la histidinemia en seres humanos consiste en un aumento de histidina e histamina y disminución de ácido urocánico en la epidermis [29] y deficiencia de la actividad de histidasa [30, 31]. En pacientes con histidinemia se presenta retardo mental, dificultad para hablar, anormalidades del sistema nervioso, infecciones recurrentes y anormalidades congénitas múltiples [13]; sin embargo, muchos individuos con histidinemia son clínicamente normales [31]. La diversidad e inconsistencia en el fenotipo patológico ha sido un problema para asociar estos datos clínicos a la histidinemia. Los pacientes con histidinemia [29] excretan cantidades considerables de varios derivados de imidazol lo que indica que existe una ruta alterna para la degradación de histidina [30]. A pesar de la mayor capacidad de la ruta de la aminotransferasa, la mayoría de la histidina seguramente es canalizada a través de la ruta de la histidasa in vivo, pues de otra manera el imidazol sería un constituyente normal de la orina.

La histidinemia se considera una enfermedad metabólica benigna que no requiere de tratamiento [32]. Los niños con histidinemia alimentados con dietas bajas en histidina no mejoran su estado. Los cultivos de células del fluido amniótico presentan alta actividad de histidasa en células epiteliales pero no en fibroblastos, lo que constituye la base de la técnica para la detección intrauterina de histidinemia [33]. La histidasa se inactiva in vivo por tratamiento con nitrometano produciendo un modelo para estudiar la histidinemia genética humana [10].

Acido urocánico como un protector de la radiación ultravioleta .

El ácido urocánico protege al DNA de mutagénesis, ya que el espectro de absorción de los isómeros cis y trans se superpone con el espectro de absorción del DNA [34]. La capacidad del ácido urocánico de proteger la piel de quemaduras del sol ha sido demostrado por varios investigadores [35-37]. La alta sensibilidad de quemaduras de sol en dos pacientes histidinémicos sugiere un aumento en la sensibilidad a la radiación ultravioleta [38].

Acido Urocánico como un inmunoregulador inducido por la radiación ultravioleta.

El ácido urocánico en la piel puede actuar como un mediador de la inmunosupresión inducida por radiación ultravioleta. La presencia de ácido urocánico inmunosuprime al huésped y por lo tanto suprime la respuesta a la hipersensibilidad retardada después de la aplicación de un antígeno, o incrementa la sobrevivencia de tumores. Sin embargo, la aplicación de ácido urocánico ayuda a que el rechazo de injertos sea menor [39]. El mecanismo por el cual el ácido urocánico es un inmunosupresor no está bien elucidado. Ciertos datos experimentales sugieren que el ácido urocánico disminuye la función de las células que presentan a los antígenos, las cuales posteriormente pueden tener efecto sobre las células T [40].

Regulación de la expresión génica por nutrimentos

Nimbe Torres¹, Héctor Bourges² y Armando R. Tovar³

Dpto. de Fisiología de la Nutrición. Instituto de la Nutrición «Salvador Zubirán» México, D.F.

RESUMEN. Los nutrimentos pueden, de manera directa o indirecta, regular la vía de expresión de genes que codifican para proteínas, principalmente enzimas involucradas en las rutas metabólicas relacionadas con la utilización de hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos. Estos nutrimentos pueden actuar directamente o generar un estado hormonal específico en el organismo que regulen algunos genes. La presente revisión tiene como objetivo mostrar ejemplos específicos de regulación dietaria y hormonal de genes de enzimas involucradas en el metabolismo de hidratos de carbono (fosfoenol piruvato carboxiquinasa), lípidos (enzima málica) y aminoácidos (serina deshidratasa).

SUMMARY. Regulation of gene expression by nutrients. Nutrients can regulate, directly or indirectly, the pathway of expression of genes coding for enzymes involved in metabolic pathways related to the utilization of carbohydrates, lipids and amino acids. On the other hand, nutrients such as carbohydrates, lipids or amino acids can generate an specific hormonal state in the organism, and hormones are the mediators throughout which some genes are activated. The objective of the present review is to show some specific examples of dietary and hormonal regulation of enzyme genes involved in the metabolism of carbohydrates (phosphoenol pyruvate carboxykinase), lipids (malic enzyme) and amino acids (serine dehydratase).

INTRODUCCION

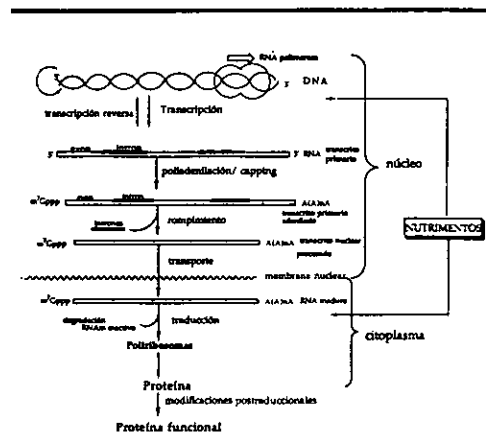
La forma en que se expresa un gen es el resultado de una continua interacción entre la información genética y el ambiente (1). Esta interacción es muy variable en un individuo dado ya que, si bien la información genética no cambia, el ambiente sí lo hace y en forma pronunciada, particularmente en lo que se refiere a la dieta cuya variabilidad en composición, cantidades y horarios es enorme. Los alimentos ingeridos se digieren y los nutrimentos se absorben, se distribuyen en el organismo, se metabolizan en cada célula y sus derivados o los mismos nutrimentos se excretan; todos estos procesos (digestión, absorción, transporte, metabolismo y excreción) están controlados a nivel genético en el que a su vez existe variación entre individuos y entre poblaciones con diferente trasfondo evolutivo (2). No obstante, se observa generalmente una misma respuesta metabólica, común para la especie, que hace posible la homeostasis. Es por lo tanto necesario conocer en detalle los mecanismos de interacción directa entre los nutrimentos y los genes y de la interacción indirecta que puede ocurrir a través de cambios hormonales originados por la dieta, conocimiento indispensable para el avance de la nutriología y, por supuesto, para diseñar intervenciones frente a problemas metabólicos.

Con los avances recientes de la Biología Molecular se ha desarrollado una nueva área de Nutrición denominada «Nutriología Molecular», cuyos objetivos son: 1) estudiar los sitios específicos en los cuales los nutrimentos afectan la vía de expresión génica (Figura 1) de proteínas importantes en la regulación del metabolismo, 2) conocer cuales son los mecanismos de regulación de algunos genes

por nutrimentos y 3) definir las necesidades de nutrimentos, así como determinar las consecuencias en la ingestión excesiva o deficiente de un nutrimento. Actualmente el conocimiento sobre la regulación de la expresión de genes por nutrimentos es una nueva frontera para la siguiente generación de nutriólogos.

FIGURA 1

Secuencia de eventos para la síntesis de una proteína; a) Transcripción del gen por la RNA polimerasa, b) Procesamiento del RNA mediante la adición de metil guanidina (m⁷Gppp) en la posición 5' (capping) y adenilación múltiple en la posición 3'. c) Rompimiento del RNAm para eliminar intrones, d) Transporte del RNAm maduro hacia el citoplasma y e) Traducción del RNAm para sintetizar una proteína.



- 1 Investigador del Dpto. de Fisiología de la Nutrición. Área de Nutriología Molecular
- 2 Sub-Director General de Nutrición Experimental y Ciencia de los Alimentos
- 3 Investigador del Dpto. de Fisiología de la Nutrición. Área de Nutriología Molecular

Actualmente existen técnicas de Biología Molecular específicas que nos permiten estudiar la respuesta de los genes a cambios en el patrón dietético y el efecto de esta respuesta sobre la regulación del metabolismo. El paso inicial en el estudio del efecto de un nutrimento sobre la vía de expresión génica de una enzima es el conocer si éste produce un cambio en la actividad enzimática el cual este relacionado con un cambio concomitante en la concentración de enzima. Si existe un cambio en la concentración de la enzima es importante el conocer si éste es debido a un cambio en la concentración del ARNm específico, el cual puede cuantificarse por medio de la técnica de Northern-blot (3) en donde se hibridiza el ARN total aislado de un tejido con una hebra de ADN complementario (ADNc) marcada radioactivamente. La detección de especies de ARNm que existen en baja abundancia se puede hacer por medio de TR-PCR (transcriptasa reversa-reacción en cadena de polimerasa) utilizando la enzima transcriptasa reversa para sintetizar la hebra de ADNc a partir de ARN y después el ADN se amplifica con sondas específicas (primers) por medio de PCR (4). Si existe un aumento en la abundancia del ARNm se dice que la regulación dietaria de una enzima ocurre principalmente a nivel pretraduccional.

La regulación de la expresión génica a nivel pretraduccional puede ocurrir a diferentes niveles de la vía de expresión génica: la iniciación, la elongación o terminación de la transcripción, la unión del fosfato de GTP con una guanina metilada a la base terminal de la región 5' del ARNm (capping), la adición de ácido poliadenílico a la región terminal 3' del ARN (poliadenilación) después de la transcripción, el procesamiento del transcrito primario en el núcleo, el editamiento de la secuencia, el transporte del ARNm maduro del núcleo al citoplasma, y la degradación del ARNm maduro en el citoplasma (5). Algunos de estos procesos pueden estar regulados por los nutrimentos, pero aun poco conoce acerca de sus mecanismos moleculares.

La concentración de un ARNm en la célula va a ser el producto de la síntesis y la degradación de este, por lo que es necesario el estudiar si la velocidad de transcripción correlaciona con las concentraciones de ARNm, o si la estabilidad del ARNm ha cambiado dando como consecuencia un aumento o una disminución en la velocidad de degradación del ARNm. Para cuantificar la velocidad de transcripción se hace uso del ensayo denominado «run-on» el cual mide la elongación de transcritos pre-existentes en núcleos aislados del órgano de interés y nos da una medida relativa del número de moléculas de RNA polimerasa involucradas en la transcripción a un tiempo dado. Si la iniciación de la transcripción es el paso limitante, el número de ARN polimerasa II a lo largo de un segmento de ADN deberá ser proporcional a la velocidad de la iniciación de la transcripción (6). Sin embargo si no hay cambio en la velocidad de transcripción pero si un aumento en los niveles de ARNm, la regulación de la abundancia de los ARNm ocurre probablemente a nivel de la estabilidad del mensaje.

Si se identifica que la regulación génica se localiza a nivel de la transcripción, el siguiente paso es analizar la región o regiones dentro de ese gen que son de algún modo activadas por la presencia de un nutrimento y a su vez son responsables de la correcta iniciación de la transcripción o de su potenciación; a estas regiones se les denomina elementos responsivos o elementos que actúan en cis (5). Estos elementos responsivos son activados cuando se unen a estas proteínas específicas que son necesarias ya sea para la iniciación o la potenciación de la transcripción denominada factores de transcripción. Sin embargo estudios recientes muestran que no sólo son proteínas las que se unen a los elementos responsivos de los genes, sino que

compuestos tales como la glucosa (7) o los ácidos grasos poliinsaturados (8) son reconocidos por estos fragmentos de DNA para potenciar la transcripción de algunos genes.

Para identificar el significado funcional de secuencias que actúan en cis involucradas en el control de la transcripción se utiliza un ensayo funcional en el cual los supuestos elementos regulatorios de DNA se unen a una secuencia estructural de un gen reportero cuyo producto puede ser fácilmente evaluado como es el gen de la cloranfenicol transacetylase (CAT) o el de la luciferasa formando un gen quimérico (9). Este gen quimérico se introduce a células eucarióticas por medio de transfección, electroporación, transferencia de genes mediada por liposomas o infección viral. Para identificar que esta secuencia específica responde a un nutrimento u hormona, se determina la actividad del producto del gen reportero en las células eucarióticas cultivadas en presencia del nutrimento o de la hormona en estudio. Si la secuencia a prueba responde a la presencia del factor en estudio, entonces es indicativo de que esta contiene un elemento que actúa en cis. Para determinar la presencia de factores transcripcionales específicos se utilizan pruebas como el análisis de «foot printing», en donde se identifica la región específica en el DNA a la cual se le une una proteína regulatoria.

Por otra parte si lo que se quiere estudiar es la función y regulación de genes de importancia metabólica, se ha hecho uso de los llamados animales transgénicos que se producen introduciendo un gen dentro de un animal intacto el cual es incorporado dentro de su genoma para observar los efectos del gen específico sobre un proceso metabólico o para modificar una ruta metabólica (10).

El ARNm por otro lado también puede estar regulado controlando su estabilidad o su traducción. Nutrimentos como el hierro ejercen su efecto a estos niveles y de esta manera controla la traducción del RNAm de ferritina sin cambiar los niveles de RNAm para esta proteína (11).

Por otra parte, algunos nutrimentos como las vitaminas y minerales que funcionan como cofactores o componentes de cofactores están involucrados en al menos un sistema postraduccional. Las modificaciones postraduccionales incluyen modificaciones covalentes como la formación de nuevos aminoácidos por modificación de las cadenas laterales, reacciones con grupos α -amino o ω -carboxilos libres al final de las cadenas polipeptídicas y modificación o rompimiento de uniones peptídicas (3).

Todos los pasos de la vía de expresión génica antes mencionados se afectan de diferente manera dependiendo del tipo de nutrimentos que provienen de los alimentos y de la respuesta hormonal que estos desencadenan, de manera que las vías centrales en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos se verán afectadas por la regulación de los genes que codifican para los diferentes enzimas claves de una vía metabólica específica.

Regulación de la expresión génica de enzimas involucradas en el metabolismo de hidratos de carbono: La glucólisis, que se lleva a cabo en el hígado, es la ruta metabólica que convierte glucosa a piruvato y lactato y produce 2 moléculas de ATP y NADH por molécula de glucosa. El piruvato formado es usado principalmente para la síntesis de ácidos grasos. Por otra parte la gluconeogénesis proceso a través del cual se sintetiza glucosa a partir de compuestos que no son hidratos de carbono, es responsable de proveer glucosa a la sangre durante el ayuno, el ejercicio y durante el consumo de una dieta baja en hidratos de carbono.

Las rutas de la glucólisis y la gluconeogénesis tienen la mayoría de sus enzimas en común. Estas enzimas catalizan reacciones

reversibles y sus velocidades están controladas por la concentración de sus sustratos y productos. El flujo a través de las enzimas de estas vías se modula por mecanismos regulatorios: 1) a corto plazo; y 2) a largo plazo; dentro de los primeros mecanismos se tiene modificaciones covalentes como es la fosforilación y por otro lado a los efectores alostéricos, mientras que en los segundos mecanismos los cambios en la actividad enzimática involucran cambios en la expresión de genes y síntesis de proteínas (12). Hormonas como la insulina y el glucagón están involucradas en la activación de estos mecanismos regulatorios. El glucagón estimula la glucogénesis, la gluconeogénesis y la lipólisis e inhibe la síntesis de glucógeno, la glucolísis y la lipogénesis mientras que la insulina tiene efectos opuestos.

Las alteraciones en la dieta tienen un efecto notable sobre la expresión de varios genes de enzimas que regulan el metabolismo de hidratos de carbono en los vertebrados por medio de interacciones entre factores trans-activadores y secuencias en cis de un gen. Un ejemplo típico es la fosfoenol piruvato carboxinasas.

Fosfoenol piruvato carboxinasas (PEPCK): La PEPCK (EC 4.1.32) es una enzima que regula la gluconeogénesis y está involucrada en la interconversión de piruvato a fosfoenol-piruvato siendo este un paso limitante en la síntesis de glucosa. En la mayoría de los mamíferos no existe gluconeogénesis antes del nacimiento ya que la glucosa es proporcionada a los fetos a partir de la glucosa presente en la circulación de la madre. La PEPCK aparece inmediatamente después del nacimiento ya que durante el desarrollo del feto se encuentran niveles altos de insulina en la circulación fetal, lo cual reprime la transcripción del gen de la PEPCK en el hígado antes del nacimiento (13). En el hígado de rata la PEPCK es principalmente una enzima citosólica, aunque está distribuida en mitocondria y citoplasma en borregos, monos y humanos mientras que en el hígado de pájaros se encuentra solamente en la mitocondria y en el riñón, en la mitocondria y el citoplasma. A pesar de que el gen para la PEPCK citosólica en hígado de pollo no se expresa, la administración de Bt_2 AMPc (butiril AMPc) a estos animales estimula la producción del RNAm de esta enzima, lo que indica que el hígado contiene un gen funcional para la enzima que puede ser activado (14) y que probablemente su estimulación dependa del balance que exista entre las concentraciones de insulina y glucagón para que, de esta manera, se controlen los niveles de AMPc en el hígado. El gen de la PEPCK se expresa en hígado, riñón y tejido adiposo y en menor grado en el epitelio intestinal, glándula mamaria, colon, corazón, músculo esquelético, ovario y pulmón (12).

El gen de la PEPCK codifica para un RNAm que contiene 2.6 kb. La adición de alrededor de 200 residuos adenilados a la región 3' produce un RNAm de alrededor de 2.8 kb (15). El gen para la PEPCK consta de 6.0 kb y contiene 10 exones, 9 intrones y un promotor (12). La secuencia de la caja TATA se encuentra localizada a -30 pb y la caja CAAT entre los nucleótidos -63 y -68.

Existen elementos cis en la región 5' del gen de la PEPCK que permiten que su transcripción se lleve a cabo en algunos tejidos (16). La región de 460 pb de la región promotora-regulatoria del gen de la PEPCK hace que la expresión del gen quimérico PEPCK/bGH sólo se presente en el hígado y en el riñón (17).

Control para la dieta: La concentración de PEPCK y los niveles de RNAm de PEPCK citosólica están incrementados en animales en inanición (14), y en aquellos alimentados con una dieta baja en

hidratos de carbono pero alta en proteína (17); también los glucocorticoides y la hormona tiroidea estimulan la velocidad de la transcripción del gen de la PEPCK, y rápidamente se produce una inhibición de la transcripción en animales realimentados con una dieta rica en hidratos de carbono o en animales diabéticos inyectados con insulina (18, 19), debido a que la vida media del RNAm de la PEPCK es de 30 min y por lo tanto se produce una rápida caída en síntesis de la PEPCK del hígado.

Durante el ayuno los glucocorticoides ayudan a mantener la glicemia ejerciendo un efecto permisivo sobre el glucagón que actúa vía AMPc y que promueve la gluconeogénesis produciendo una mayor captura de aminoácidos por el hígado y aumentando la actividad de la PEPCK en este tejido. Por el contrario, durante el estado postprandial, los glucocorticoides ayudan a guardar la glucosa como glucógeno y a desechar el exceso a través de la glucolísis. Los efectos de la dieta son mediados principalmente por hormonas aunque se ha demostrado que la adición de glucosa por sí misma produce una disminución en la estabilidad del RNAm y en la transcripción del gen de la PEPCK (19).

Control por hormonas: La concentración de PEPCK y los niveles de RNAm de PEPCK citosólica están incrementados en animales diabéticos, en animales tratados con glucagón o AMPc (14). Originalmente se había demostrado que el gen de la PEPCK estaba controlado a nivel transcripcional ya que el AMPc rápidamente inducía la velocidad de transcripción del gen de la PEPCK; sin embargo la velocidad de transcripción aumentaba temporalmente mientras que el RNA para la enzima continuaba acumulándose en el citoplasma. Estos resultados sugirieron que el control de la expresión del gen para la PEPCK se lleva a cabo tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. El glucagón a través de AMPc regula la abundancia del RNAm de la PEPCK por medio de un efecto inmediato el cual involucra un incremento en la velocidad de transcripción de un gen y un efecto a largo plazo que tiene lugar principalmente a través de la estabilización del RNAm de la PEPCK evitando su degradación (20).

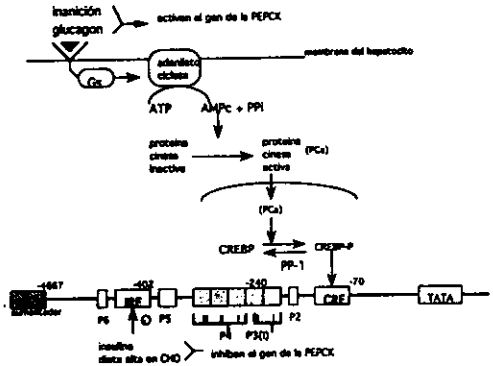
Se han identificado secuencias cis que confieren especificidad hormonal, y éstas se han demostrado por medio de genes quiméricos formados por 620 pb del DNA de la región 5' del gen de la PEPCK unidas al gen estructural de la timidina cinasa. Cuando este gen quimérico se transfecta dentro de células de hepatoma de rata deficientes en timidina-cinasa, la expresión del gen PEPCK se estimula en presencia de AMPc (21) y de glucocorticoides, mientras que la insulina inhibe su transcripción.

La región promotora del gen de la PEPCK (Figura 2) muestra la presencia de diferentes elementos cis en el gen de la PEPCK específicos para diferentes hormonas. El gen de la PEPCK presenta una región a -410 pb del sitio de iniciación de la región promotora de este gen denominada «elemento que responde a insulina» (IREs). La expresión de este gen se inhibe rápidamente por insulina sin importar la presencia o ausencia de glucosa y esta inhibición no es bloqueada por ciclohexitimida (19) ni por la ingestión de una dieta rica en hidratos de carbono.

El gen de la PEPCK también presenta una secuencia de bases denominada «elemento que responde a AMP cíclico» (CRE) localizado en la posición -70 del sitio de iniciación de la transcripción. Esta región es activada por una proteína (CREBP) que se une al elemento que responde a AMPc siguiendo el mecanismo mostrado en la Figura 2.

FIGURA 2

Mecanismos de activación o inhibición del gen de la fosfoenolpiruvato carboxinasas por medio de las hormonas para desencadenar la activación de factores transactivadores que reconocen a los diferentes elementos cis en la región promotora del gen de la PEPCK PP-1= fosfatasa P 1; CREBP= proteína que une al elemento que responde a AMPc; CRE= elemento que responde a AMPc; IRE= elemento que responde a insulina; P1 a P6= elementos que responden también a AMPc.



Existen otras 6 secuencias o elementos que se unen también a AMPc denominados elementos P. Los elementos CRE y P4 son los más potentes en la estimulación de la transcripción. El sitio P3 (-231 a -260) se une a una proteína que está presente en altas concentraciones en el núcleo del hepatocito y es un buen candidato para ser un elemento específico del hígado (16).

El gen de la PEPCK presenta dos unidades reguladoras que enlazan glucocorticoides (GRU) que estimulan la transcripción del gen de la PEPCK en presencia de glucocorticoides y un elemento respondedor a hormona tiroidea (TRE). T3 estimula la transcripción del gen de la PEPCK alrededor de 3 veces cuando se une al receptor para hormona T3 y este complejo se une a una secuencia localizada alrededor de -332 a -308 pb del sitio de iniciación de la transcripción.

Se han identificado varios factores transcripcionales (C/EBPα, C/EBPβ, DBP, HNF-1, HNF-4 y probablemente HNF-3 (12) que reconocen la región promotora de la PEPCK y que se unen a los diferentes elementos que actúan en cis para activar la región promotora de la PEPCK.

Regulación de la expresión génica de enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos: Existe un gran interés público en lo que se refiere a lípidos, debido a su alto consumo en la dieta ocasionando un incremento de obesidad, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Esto ha dado lugar a un aumento en las investigaciones relacionadas con el metabolismo de lípidos, específicamente a su biosíntesis.

Muchos de los componentes que regulan los genes lipogénicos están involucrados en la regulación de la división celular, por lo que la regulación nutricia de estos genes es importante para el entendimiento del crecimiento excesivo del tejido adiposo causado por la obesidad.

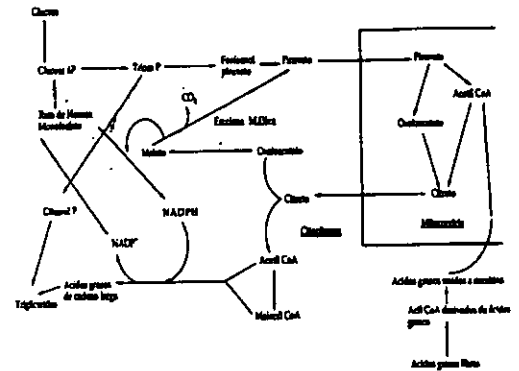
La biosíntesis de ácidos grasos endógena es un proceso altamente

regulado, en donde algunas enzimas involucradas en esta vía metabólica están reguladas a nivel de la expresión génica como es el caso de la enzima málica o de la sintetasa de los ácidos grasos (22).

Enzima málica (ME): La enzima málica (EC 1.1.1.40) cataliza la descarboxilación oxidativa de malato a piruvato y CO₂ generando NADPH el cual se usa principalmente para la síntesis de novo de ácidos grasos de cadena larga (Figura 3). La enzima málica citosólica se expresa principalmente en el hígado y a niveles muy bajos, en riñón, cerebro y corazón. Los bajos niveles de la enzima en estos órganos se correlacionan también con una baja velocidad de transcripción del gen de la enzima málica (23).

FIGURA 3

La enzima málica cataliza la formación de piruvato a partir de malato produciendo NADPH que es utilizado por la sintetasa de los ácidos grasos para formar ácidos grasos de cadena larga. La otra fuente de obtención de NADPH proviene de la ruta de hexosa monofosfato. El citrato mitocondrial es transportado al citoplasma y es la fuente de producción de malato citoplásmico a través del oxaloacetato.



Control por dieta: Las concentraciones de RNA_m y la actividad enzimática de la enzima málica en el hígado de rata lactante son muy bajas sin importar la dieta de la madre, y esto es probablemente debido a que ingieren exclusivamente leche la cual tienen un contenido relativamente elevado en grasas y bajo en hidratos de carbono. La expresión del gen aumenta alrededor de la semana 4-6 y después disminuye a un 40-60% de los niveles máximos. La expresión del gen de la enzima málica después del destete está sujeta a regulación nutricia ya que las ratas empiezan el destete consumiendo una dieta que es alta en hidratos de carbono y baja en lípidos. Los niveles de RNA_m para la enzima málica se ven aumentados por el consumo de una dieta libre de lípidos o de ácidos grasos saturados, pero no se encuentran muy elevados en ratas alimentadas con una dieta basada en aceite de maíz o de pescado (24). La dieta no afecta la expresión del gen de la enzima málica en tejidos extrahepáticos, lo que indica que la regulación nutricia de la expresión del gen de la enzima málica es específica del hígado; sin embargo, la expresión de este gen no está restringida únicamente a este tejido.

La actividad de la enzima málica en el hígado de rata está disminuida durante la inanición (25,26), pero cuando los animales se alimentan con dietas altas en hidratos de carbono y bajas en grasa presentan un incremento de 25 veces en la actividad enzimática y un aumento de alrededor de 20 veces en los niveles del RNAm para la enzima málica (27), aumento que se debe tanto a un incremento de 2 a 3 veces en la velocidad de transcripción como a una disminución de un 65-80 % en la degradación de su RNAm (28).

La alteración en la vida media del RNAm de la enzima málica ha sido también observada en hígado de patos y se ha determinado que ésta es de 3 horas cuando los animales son alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono, mientras que la vida media del RNAm para esta enzima en patos en inanición es de 1h (27).

Estudios con ratones alimentados con dietas altas en hidratos de carbono han demostrado que la inducción del gen de la enzima málica presenta una respuesta temporal y posicional; esto significa que entre las 6 y 12 h. después de que estos animales son alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono, el gen de la enzima málica se expresa principalmente en los hepatocitos periportales para después abarcar los hepatocitos pericentrales (29).

Por otro lado estudios con hepatocitos de rata en cultivo han mostrado que la glucosa, la fructosa y otros monosacáridos estimulan la acumulación de enzimas lipogénicas; sin embargo, en hepatocitos de aves ni la glucosa ni la fructosa aumentan la concentración de enzima málica.

El contenido de lípidos en la dieta reduce la actividad y la concentración del RNAm de la enzima málica, pero su velocidad de transcripción no disminuye, lo que indica que los lípidos pudieran regular la enzima málica a nivel post transcripcional. Por el contrario, los lípidos en la dieta tienen poco efecto en la enzima málica del hígado de aves.

Control por hormonas: La insulina y el glucagón son las principales hormonas que regulan el flujo de los esqueletos carbonados provenientes de la glucosa para la síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga modulando la actividad y la expresión génica de algunas de las enzimas involucradas en el proceso de biosíntesis de ácidos grasos. Además, la 3,5',5-triiodo-L-tironina (T3) es el principal regulador de la actividad de la enzima málica. La insulina amplifica la respuesta a T3 y el glucagón completamente bloquea a los efectos estimulatorios de T3 e insulina (26). La inyección de T3 (50 µg/100 g/día) a ratas por 4 días produce un aumento de 2 a 3 veces en la concentración de RNAm de la enzima málica sin importar el tipo de dieta, lo que indica que la T3 incrementa la velocidad de transcripción de esta enzima independientemente de la regulación por nutrientes (30). La concentración de la enzima málica se encuentra disminuida en animales diabéticos y tiroidectomizados, y regresa a sus valores normales después de la administración de insulina y T3 (31), respectivamente.

El glucagón, por su parte, causa una disminución de la vida media del RNAm de la enzima málica de alrededor de 1.5 h, lo que indica que el AMPc puede actuar a nivel posttranscripcional debido a que incrementa la velocidad de degradación del RNAm de la enzima málica (28). El glucagón, por medio del AMPc, bloquea la inducción de la enzima málica y de su RNAm producido por la adición de insulina y T3 en hepatocitos en cultivo. La hormona de crecimiento y el factor de crecimiento epidérmico inhiben también la acumulación de enzima málica en hepatocitos en cultivo. Los cambios en la enzima málica inducidos por hormonas son debidos principalmente a cambios en las velocidades de síntesis y concentración de RNAm,

lo que indica que la regulación es a nivel pretraduccional.

La administración de T3 produce un aumento en la concentración de RNAm de aproximadamente 14 veces mientras que solamente produce un aumento de 2 veces en la velocidad de transcripción. Lo que indica que la regulación de este gen por T3 es principalmente a nivel posttranscripcional.

Regulación de la expresión génica de enzimas degradadoras de aminoácidos: Cuando se consume una dieta con un alto contenido de proteína, la concentración de aminoácidos en la sangre de la vena porta y en el hígado aumenta lo cual, aunado al incremento de algunas hormonas, produce dos efectos importantes que alteran la regulación de genes específicos y controlan la concentración de aminoácidos en la circulación general: 1) un aumento en el tamaño del hígado y los riñones debido a un aumento en la síntesis de DAN, RNA y un aumento en la actividad de las enzimas necesarias para la síntesis de constituyentes celulares, y 2) un aumento en la concentración de las enzimas necesarias para catabolizar el exceso de aminoácidos ya que no existe un reservorio de proteínas en el organismo. Si la capacidad de estas respuestas es rebasada temporalmente, se presenta una disminución en la ingestión de alimentos probablemente debido a cambios en la concentración de algunos neurotransmisores lo cual permitirá mantener una homeostasis en animales alimentados con dietas altas en proteínas (22, 32).

El efecto que ejerce el sustrato específico de cada enzima degradadora de aminoácidos y el de una dieta en conjunto, son en parte diferentes. El efecto del sustrato está asociado con cambios estructurales en la enzima que de esta manera adquiere una mayor estabilidad como es el caso de la triptófano oxigenasa o la tirosina aminotransferasa (33,34), o también por un aumento en la velocidad de reacción hasta alcanzar su velocidad máxima (35). La dieta en conjunto puede ocasionar un cambio hormonal provocando así la inducción del gen que codifica para la enzima degradadora de aminoácidos específica a través de un aumento en la síntesis de RNA lo que se traduce en un aumento en la síntesis de la enzima correspondiente.

La proteína en la dieta tienen una acción opuesta a la de los hidratos de carbono sobre la síntesis de enzimas involucradas en el catabolismo de aminoácidos. El ayuno y el consumo de dietas con alto contenido de proteína producen un aumento en las enzimas degradadoras de aminoácidos para convertir los aminoácidos a precursores de la síntesis de glucosa y ácidos grasos, o para su oxidación completa. Por el contrario, una dieta con alto contenido de hidratos de carbono, disminuye la actividad de enzimas que participan en la gluconeogénesis y en el catabolismo de aminoácidos. Sin embargo, el efecto de la dieta sobre la expresión génica de las enzimas degradadoras de aminoácidos es diferente en cada órgano o tejido y dependerá de factores tales como la duración del tiempo de ayuno, la composición de la dieta o la adaptación a una dieta previa. En nuestro laboratorio hemos demostrado (datos no publicados) que animales que han sido entrenados a consumir una dieta con un exceso de proteína (50 %) por un período de 7 horas al día durante 10 días, mantienen las concentraciones constantes de RNAm para la tirosina amino transferasa (TAT) a pesar de que las ratas sean mantenidas por un período de inanición de 17 h y vuelvan a consumir una dieta con 50 % de proteína, lo que indica que los animales se adaptaron a la dieta anterior a la cual habían sido entrenados y, a pesar de seguir consumiendo un exceso de proteína, no necesitan inducir nuevamente el gen, mientras que si las ratas son adaptadas a consumir una dieta con un contenido adecuado de proteína (18 %) y después son

cambiadas a consumir una dieta con 50 % de proteína se presenta un aumento en la concentración de RNAm para la TAT. Lo anterior indica que bajo estas condiciones, se requiere una inducción de este gen para eliminar el exceso del aminoácido. Por el contrario, si a estas ratas se les cambia de una dieta del 18 % de proteína a una dieta con bajo contenido de proteína (6 % de caseína), el gen para esta enzima se reprime tal vez para conservar el nitrógeno del organismo. No se ha estudiado la respuesta de todos los genes de las enzimas degradadoras de aminoácidos a la proteína dietaria; sin embargo, se ha obtenido abundante información sobre las enzimas serina deshidratasa y tirosina aminotransferasa las cuales están involucradas en la degradación de serina y treonina la primera, y de tirosina la segunda.

Serina deshidratasa (SDH): La L-serine deshidratasa (L-serina hidrolasa (desaminasa), EC 4.2.1.13) cataliza la α , β -eliminación de la L-serina para producir piruvato para la gluconeogénesis y amonio. Esta enzima también cataliza la conversión de L-treonina a α , ceto-butirato. La SDH tiene un peso molecular de 38,000 (36) y se expresa principalmente en el hígado adulto pero no en el hígado fetal (37). Se ha informado que el gen clonado de la SDH está compuesto de 9 exones y ocho intrones con una longitud de 7.5 kb. El codón de iniciación ATG para la traducción se localiza en el exon 3, y el codón de terminación y la señal poly(A)+ (AATAAA) se encuentran localizados en el exon 9 (37). La terminación 5' del RNAm de la SDH está localizada 148 nucleótidos antes del codón de iniciación, ATG.

La región 5' del gen de la SDG no presenta cajas «TATA» y «CAAT» típicas, pero contiene las cajas «ATA» (AATAAA) y «CAT» que son variaciones de las primeras y están localizadas en las posiciones -25 y -54, respectivamente. Existen varias cajas «GC» río arriba de la secuencia AATAAA con homología a algunas reportadas para el sitio de unión del factor de transcripción Sp1. El gen de la SDH genera 2 clases de RNAm en el hígado para lo cual utiliza diferentes modos de rompimiento y procesamiento. El principal RNAm, que representa el 95 % de la suma de los dos RNAs es traducido a SDH con un peso molecular de 34.5 kDa; el otro RNAm codifica para un polipéptido de 8.9 kDa. Los dos tipos de RNAm desaparecen cuando las ratas son alimentadas con una dieta libre de proteína. La vida media de la SDH es de 8-10 h y la de su RNAm es de 5-10 h. Después del nacimiento aumenta rápidamente la expresión del gen de la SDH hasta alcanzar los niveles de enzima del adulto a las 2 semanas, y se ha observado que los niveles de RNAm en hígado para esta enzima siguen el mismo patrón que la actividad enzimática de la SDH. Este rápido incremento en la SDH se debe a un aumento en la concentración de AMPc producido por disminución de la insulina en el plasma y aumento de la concentración de glucagón (38). Las concentraciones de RNAm de la SDH son altas en el hígado, bajas en el riñón e indetectables en el cerebro y el pulmón (39). En el hígado existen secuencias específicas que son exclusivas para la expresión de gen de la SDH en este órgano y están localizadas entre las posiciones -62 y +10, pero este gen también posee una región promotora distal entre -133 y -63 pb que contiene elementos cis que regulan la expresión del gen de una manera que no es específica de este tejido (40).

Control por la dieta: La actividad enzimática (32) y los niveles de RNAm de la SDH se ven afectados por el contenido de proteína en la dieta. El RNAm de la SDH en hígado de ratas alimentadas con 0% de proteína no es detectable, mientras que el RNAm de hígado de ratas alimentadas con 60% (36) o 91 % de proteína se encuentra incrementado varias veces en el hígado, así como también la activi-

dad de la enzima (39). En ratas que habfan sido alimentadas previamente con dietas que contenían una elevada concentración de proteína y posteriormente fueron alimentadas con dietas libres de proteínas, se ha observado una reducción rápida en un período de 18 h de los niveles de RNAm de la SDH (39). El DNA genómico aislado de núcleos de ratas alimentadas con dietas libres de proteínas o con un exceso en el contenido de proteína muestran una diferente sensibilidad a la DNasa I sobre el gen de la SDH, las regiones II (-3050 y -3180) y III (-3600 a -3850) de la cromatina de ratas alimentadas con un alto contenido de proteína son más susceptibles a la acción de la DNasa I, mientras que la región I (-100) de la cromatina de ratas alimentadas con una dieta libre de proteínas es más sensible a la acción de la DNasa I; esto implica que la regulación nutricional de la expresión del gen de la SDH se asocia con un cambio en la estructura de la cromatina alrededor de las regiones I-III, correspondiente a una región de 800 pb (39). Por otro lado, ratas alimentadas con hidrolizados de caseína sin glucosa muestran un aumento en la actividad de la enzima 6h después de haber empezado a ingerir la dieta, pero la adición de glucosa a esta dieta disminuye la actividad enzimática de la SDH (41). Se ha demostrado que dietas con alto contenido en hidratos de carbono reprimen la inducción de varias enzimas que catabolizan aminoácidos. Esta acción de la glucosa se ve contrarrestada cuando se inyecta cortisona intramuscular a estos animales, aunque la cortisona por sí sola no ejerce ninguna inducción sobre la SDH. El efecto represivo que ejerce la glucosa sobre los niveles de RNAm de SDH es mayor que el que ejerce sobre la actividad enzimática de la SDH lo que indica que la vida media de la enzima es mayor que la de su RNAm y que, además, la glucosa suprime la inducción de la SDH a nivel de la transcripción (42). Las dietas libres de proteína tampoco activan la SDH aun en la presencia de cortisona (43).

Por otro lado, la inanición incrementa alrededor de 25 veces la actividad enzimática de la SDH con respecto a ratas normales. Este aumento resulta también en un incremento en la cantidad de la enzima, en la cantidad del RNAm y en la velocidad de transcripción del gen de la SDH. Estos resultados indican que la inducción de este gen se controla a nivel de la transcripción en hígados de ratas en inanición (42).

Control por hormonas: La inyección de tiroxina en animales alimentados con una dieta alta en proteína produce una disminución en la actividad de la SDH (44), mientras que la administración de glucagón aumenta la actividad de la SDH 100 veces, especialmente en ratas alimentadas con una dieta libre de proteínas y es un mejor inductor de la SDH que la administración de una dieta alta en proteínas que que induce a la SDH alrededor de 7 veces (45); esto sugiere que el glucagón es la principal hormona que interviene en la regulación de la SDH. La notable capacidad inductiva del glucagón se ha confirmado con la administración de Bt_2 -cAMP el cual incrementa la velocidad de transcripción del gen de la SDH tanto en ratas en inanición, como en las alimentadas con glucosa y también en ratas diabéticas tratadas con insulina (42). Esto indica que la inducción de la SDH está controlada principalmente a nivel de la transcripción por la acción del glucagón a través de AMPc.

Los glucocorticoides son hormonas que promueven un marcado incremento en la síntesis de algunas enzimas catabólicas en el hígado incluyendo a la SDH. Tanto los glucocorticoides como el glucagón se requieren para inducir la síntesis de la SDH y actúan como co-inductores del gen de la SDH, efecto que se ve suprimido por la presencia de insulina.

La manera como las hormonas esteroides regulan la transcripción

es por medio de receptores específicos que, después de que se unen a su ligando, los receptores interactúan como secuencias regulatorias de genes responsables, llamadas «elementos que responden a hormonas». Existen tres posibles elementos que responden a glucocorticoides (GREs), los cuales tienen la secuencia consenso 5' GGTACANNNTGTCT 3' y están ubicados en las posiciones -388, -411 y -2098 (37).

A pesar de que el B₂-cAMP incrementa la velocidad de transcripción en ratas diabéticas, la diabetes por sí misma causa un aumento en la actividad enzimática de la SDH y en la cantidad de enzima pero no aumentan en la misma proporción que lo hacen las concentraciones de su RNAm y su velocidad de transcripción en comparación con los valores producidos por efecto de la inanición. Estos resultados sugieren que la inducción de la SDH bajo estas condiciones se lleva a cabo por un mecanismo traduccional o post-traduccional. La administración de insulina a ratas diabéticas causa una rápida disminución de los niveles de RNAm y de su velocidad de transcripción en ratas tratadas con B₂-cAMP indicando que esta hormona probablemente también ejerce su mecanismo de regulación a nivel transcripcional (42).

Comentarios finales: Los anteriores ejemplos permiten apreciar las enormes perspectivas que se abren para la investigación básica en nutrición y aunque escapa a los objetivos de la presente revisión existen grandes implicaciones prácticas en diversas áreas de la nutrición, así como también un gran potencial de aplicación a la resolución de problemas metabólicos específicos. El estudio de estas tres enzimas nos dan una idea de los diferentes mecanismos de regulación de la expresión de genes por nutrimentos y hormonas, de los diferentes niveles en la vía de expresión génica donde pueden actuar los nutrimentos, la secuencia de eventos y de factores que son activados por los nutrimentos u hormonas para la expresión de un gen así como las secuencias específicas en un gen que responde a un nutrimento específico. El estudio de las bases moleculares de la regulación de genes de enzimas importantes en el metabolismo nos ayudará a conocer los defectos regulatorios causados por un exceso o una disminución en la ingesta de nutrimentos específicos y el papel específico que juegan los nutrimentos en la regulación de la expresión génica.

REFERENCIAS

- Aebi HE & Berger EG. Nutrition and enzyme regulation. *Curr. Prot. Clin Biochem.* 10:10-13, 1980.
- Simopoulos AP. Genetics and Nutrition: Or what your genes can tell you about nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 63:25-34, 1990.
- Rucker R. & Tinjer D. The role of nutrition in gene expression: A fertile field for the application of molecular biology. *J. Nutr.* 116:177-189, 1986.
- Hengen PN. Quantitative PCR: An accurate measure of mRNA. *TIBS* 20:476-477, 1995.
- Lewin B. *Genes V.* New York, Oxford University Press, 1994.
- Lamers WH. cAMP stimulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver nuclei. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 70:5137-5141, 1982.
- Chen R., Doiron B. & Kahn A. Glucose responsiveness of a reporter gene transduced into hepatocytic cells using a retroviral vector *FEBS Lett.* 365:223-226, 1995.
- Clarke SD & Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu. Rev. Nutr.* 14:83-98, 1994.
- Nordee SK. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* 6:454-457, 1988.
- McGrane M., Yun JS., Patel Y. & Hanson RW. Metabolic control of gene expression: in vivo studies with transgenic mice. *TIBS* 17:40-44, 1992.
- Klausner RD & Harford JB. Cis-trans models for post-transcriptional gene regulation. *Science* 246:870-872, 1989.
- Lemaigre FP & Rousseau GG. Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem. J.* 303:1-14, 1994.
- Grünner D., Andreone T., Sasaki K. & Beale E. Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin. *NATURE* 305:549-551, 1983.
- Hod Y., Morris SM. & Hanson RW. Induction by cAMP of the mRNA encoding the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from the chicken. *J. Biol. Chem.* 259:15603-15608, 1984.
- Hod Y., Warren Y. & Hanson RW. The gene encoding the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from the chicken. *J. Biol. Chem.* 259:15609-15614, 1984.
- McGrane MM, Yun JS., Moorman AFM, Lamers WH., Hendrick GK., Arafah BM., Park EA., Wagner TE & Hanson RW. Metabolic effects of developmental, tissue-, and cell-specific expression of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) bovine growth hormone gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 265:22371-22379, 1990.
- McGrane MM., de Vente J., Yun J., Bloom J., Park E., Wynshaw-Boris A., Wagner T., Rottman FM., & Hanson RW. Tissue-specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase during glucose repression in liver. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71:1304-1308, 1974.
- Tilghman Ss.M., Hanson R.W., Reshef L., Hopgood M.F. & Ballard F.J. Rapid loss of translatable messenger RNA of phosphoenolpyruvate carboxykinase during glucose repression in liver. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 1304-1308, 1974.
- Vaulont S. & Kahn A. Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB J.* 8:28-35, 1994.
- Hod Y., Hanson RW & Cyclic AMP stabilizes the mRNA for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) against degradation. *J. Biol. Chem.* 263:7747-7752, 1988.
- Wynshaw-Boris A., Lugo TG., Short JM., Fournier REK. & Hanson WR. Identification of a cAMP regulatory region in the gene for rat cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *J. Biol. Chem.* 259:12161-12169, 1984.
- Hillgartner FB, Salati LM & Goodridge AG. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol. Rev.* 75:47-76, 1995.
- Ma X., Salati LM., Ash SE., Mitchell DA., Klautky SA., Fantozzi DA. & Goodridge AG. Nutritional regulation and tissue-specific expression of the malic enzyme gene in the chicken. *J. Biol. Chem.* 265:18435-18441, 1990.
- Intani N., Fukuda J. & Marsumura Y. Lipogenic enzyme gene expression in rat liver during development after birth. *J. Biochem* 113:519-525, 1993.
- Intani N., Nagashima K., Fukuda H., Katsurada A. & Tanaka T. Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver. *J. Nutr.* 116:190-197, 1986.
- Goodridge AG., Crish F., Hillgartner B. & Wilson B. Nutritional and hormonal regulation of the gene for avian malic enzyme. *J. Nutr.* 119:299-308, 1989.
- Goldman MJ., Back DW., & Goodridge AG. Nutritional regulation of the synthesis and degradation of malic enzyme messenger RNA in duck liver. *J. Biol. Chem.* 260:4404-4408, 1985.
- Goodridge AG. Dietary regulation of gene expression: Enzymes involved in carbohydrate and lipid metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* 7:157-85, 1987.
- Cochary EF., Kikinis Z. & Paulson EK. Positional and temporal regulation of lipogenic gene expression in mouse liver. *Gene Expression* 3: 265-277, 1993.
- Katsurada A., Intani N., Fukuda H., Noguchi T. & Tanaka T. Influence of diet on the transcriptional and post-transcriptional regulation of malic enzyme induction in the rat liver. *J. Biochem.* 168:487-491, 1987.

31. Mariashi CN., McSwigan CR., Towle HC., Schwartz HL. & Oppenheimer JH. Glucose and triiodothyronine both induce malic enzyme in the rat hepatocyte culture. *J. Clin. Invest.* 68:1485-1490, 1981.
32. Anderson HL., Benevenga NJ. & Harper AE. Associations among food and protein intake, serine dehydratase, and plasma amino acids. *Am J. Physiol.* 214:1008-1013, 1968.
33. Kenney FT. Hormonal regulation of synthesis of liver enzymes. *Ea: Mammalian protein metabolism.* H.N. Munro (Ed.). New York, Academic Press. p.131-176, 1970.
34. Hargrove JL. & Liu C. Destabilization of tyrosine aminotransferase by amino acids. *Aminoacids* 7:279-289, 1994.
35. Harper AE. Control mechanism in amino acids metabolism. University Park PA., The Pennsylvania State University Press, 1974.
36. Ogawa H., Miller DA., Dunn T., Su Y., Burcham JM., Peraino C., Fujioka M., Babcock K. & 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.
37. Noda C., Ohguri M., Marrsuda K., Nakamura T., Hasegawa A., Yagi S. & Ichihara A. Organization and structure of the 5' flanking region of the rat serine dehydratase gene. *J. Biochem.* 108:622-628, 1990.
38. Noda C., Ohguri M. & Ichihara A. Developmental and growth-related regulation of expression of serine dehydratase mRNA in rat liver. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 168:335-342, 1990.
39. Ogawa H., Fujioka M., Su Y., Kanamoto R. & Pitot HC. Nutritional regulation and tissue-specific expression of the serine dehydratase gene in rat. *J. Biol. Chem.* 266:204412-20417, 1991.
40. Su Y., Kanamoto R., Ogawa H. & Pitot HC. Regulatory elements for the tissue-specific expression of the rat serine dehydratase-encoding gene. *Gene* 120:301-306, 1992.
41. Peraino C., Lamar C. & Pitot HC. Studies on the Induction and repression of enzymes in rat liver. *J. Biol. chem.* 241:2944-2948, 1966.
42. Kanamoto R., Su Y. & Pitot H. Effects of glucose, insulin and cAMP on transcription of the serine dehydratase gene in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 288:562-566, 1991.
43. Peraino C. Interactions of diet and cortisone in the regulation of adaptive enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem.* 242:3860-3867, 1967.
44. Ku Y., rogers QR. & Harper AE. Effects of thyroxine and cortisol on liver threonine dehydratase and tryptophan pyrrolase in rats fed a high protein diet. *P.S.E.B.M.* 130:556-563, 1969.
45. Jost JP., Khairallah EA. & Pitot HC. Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem* 243:3057-3066, 1968.

Recibido: 28-04-1995

Aceptado: 11-01-1996

JUSTIFICACION

Estudios previos han revelado que ratas alimentadas con una dieta alta en proteína producen un aumento en la actividad enzimática de la histidasa, mientras que dietas bajas en proteína disminuyen su actividad [41]. Sin embargo, en la actualidad no se conocen los mecanismos que controlan estos cambios en la actividad enzimática de la histidasa. Se ha reportado que la vida media de la histidasa después de la alimentación con una dieta alta en proteína es de 2.5 días [42] pero aún no se conoce que tan rápido es el decaimiento del RNAm de la histidasa de hígado de ratas alimentadas con una dieta libre en proteína. La alimentación de ratas con una dieta alta en histidina directamente aumenta la capacidad de oxidación de histidina sin aumentar la actividad de la histidasa [41].

El conocimiento de la regulación de la expresión génica de las enzimas degradadoras de aminoácidos permitirá entender a nivel molecular como el organismo conserva el nitrógeno corporal en situaciones donde la ingestión de proteína es baja y como se elimina el exceso de aminoácidos cuando la ingestión de proteínas es elevada ya que no existe un reservorio permanente de proteínas. Además el estudio de la regulación de la expresión génica de la histidasa por proteína dietaria nos indicará a que nivel de la vía de expresión génica se lleva a cabo su regulación.

OBJETIVO

El propósito del presente trabajo fué estudiar el efecto de la concentración de proteína en la dieta sobre la actividad, constantes cinéticas, concentración de histidasa y concentraciones de RNAm de la histidasa de hígado de rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar el efecto de dietas conteniendo 0% de caseína (dieta libre de proteínas), 6% de caseína (dieta baja en proteínas), 18% de caseína (dieta que cubre el requerimiento de proteína de la rata), 35% de caseína (dieta alta en proteína) y 50% de caseína (dieta con exceso de proteína) sobre la actividad enzimática de la histidasa hepática de la rata.
2. Estudiar si cambios en la actividad enzimática por la ingestión de la proteína dietaria están relacionados con cambios en las constantes cinéticas de la histidasa (K_m y V_{max}).

3. Purificar la histidasa de hígado de rata y generar anticuerpos policlonales para cuantificar la concentración de histidasa.

4. Determinar si los cambios en la actividad enzimática de la histidasa se relacionan con cambios en la concentración de la histidasa en hígados de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de proteína dietaria.

5. Determinar si los cambios en la actividad y concentración de la histidasa están coordinados con cambios en la expresión del RNAm específico para la histidasa.

6. Estudiar el efecto de altas concentraciones de histidina sobre la expresión génica de la histidasa.

7. Determinar la vida media de la actividad y del RNAm de la histidasa hepática después de un estímulo con una dieta con un exceso de proteína .

8. Estudiar si la regulación de la expresión génica de la histidasa es específica de tejido.

RESULTADOS



THE JOURNAL OF NUTRITION

Official Publication of the American Society for Nutritional Sciences

John W. Suttie, Ph.D., Editor
University of Wisconsin-Madison
College of Agricultural & Life Sciences
Department of Biochemistry
420 Henry Mall
Madison, WI 53706-1569
phone: 608-265-8947 fax: 608-262-9338
email: jnutri@biochem.wisc.edu

January 8, 1998

Dr. Nimbe Torres
Inst. Nacional de la Nutricion
"Salvador Zubiran" Dept. Fis. de la Nutr.
Vasco de Quiroga, No. 15
Tlalpan, Mexico DF 14000

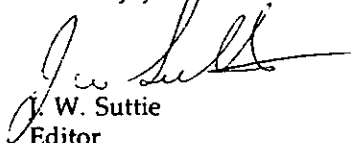
JN ms. no. 97-4015
Torres, N., et al.
"Nutritional Regulation of
Rat Liver Histidase..."

Dear Dr. Torres:

As a follow-up to previous correspondence, I am pleased to inform you that the editorial staff of *The Journal of Nutrition* has found your revised manuscript acceptable with no further changes and has forwarded it for publication. Page proofs will be sent to your office in 4-6 weeks. Please proofread, correct, and return them within 48 hours of receipt.

Again, thank you for submitting your manuscript to *The Journal of Nutrition*.

Sincerely yours,



J. W. Suttie
Editor

JWS/kb

Associate Editors:

Lindsay H. Allen, Univ. California-Davis
John D. Fernstrom, Univ. Pittsburgh
Joanne R. Lupton, Texas A&M Univ.
Joseph R. Prohaska, Univ. Minnesota-Duluth
Peter J. Reeds, Baylor Coll. Medicine
Judith Storch, Rutgers Univ.

Assistant Editor:

Kathryn K. Harden, Univ. Illinois

Biographical & Historical Editors:

Kenneth J. Carpenter, Univ. California-Berkeley
Thomas H. Jukes, Univ. California-Berkeley

**American Society for Nutritional Sciences
(ASNS)**

9650 Rockville Pike
Bethesda, MD 20814-3990
phone 301-530-7050 fax: 301-571-1892
email: jnutrition@asns.faseb.org
online: <http://www.nutrition.org>

**Histidase Expression is Regulated by Dietary Protein at the
Pretranslational Level in Rat Liver¹**

**Nimbe Torres², Laura Martínez, Gabriela Alemán, Héctor Bourges and
Armando R. Tovar.**

Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de la
Nutrición "Salvador Zubiran". México, D. F. 14000, México.

To whom correspondence should be addressed:

Dr. Nimbe Torres-Torres

Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubiran", Depto. Fisiología
de la Nutrición. Vasco de Quiroga No 15, Tlalpan, México, D. F. 14000,
México.

telephone: (525) 5731200 ext. 2802

fax: (525) 6551076

e-mail: nimbet@quetzal.innsz.mx

Page heading: Histidase expression by dietary protein

ABSTRACT

The effect of dietary protein on the expression of histidase (Hal) was investigated to understand the mechanism of induction of histidase by a high protein diet. In the present study we examined 1) the effect of 0, 6, 18, 35 and 50% casein diet on the hepatic and epidermal Hal activity, amount of the enzyme and Hal-mRNA, 2) the effect of a high histidine diet (1.25%) on Hal expression, 3) the response of Hal expression in rats fed 10% casein diet injected with glucagon ($0.6 \text{ mg} \cdot 100\text{g body wt}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) and 4) the half lives of the enzyme and Hal mRNA by feeding rats an 80% casein diet for 7 d followed by a protein-free diet. Hal activity increased as the protein content in the diet increased ($r=0.986$, $p<0.001$) and it was associated with a significant increase in V_{max} without change in K_m . The dietary regulation was liver-specific since skin Hal was unresponsive. Increments in hepatic Hal activity were accompanied by concomitant significant increases in the amount of histidase and its mRNA. The response was more pronounced in rats fed diets containing above 18% casein. Rats fed a 12% casein diet containing 1.25% of histidine did not have different Hal activity and mRNA levels than rats fed 12% casein diet, indicating that Hal expression is not modified by its substrate. Injection of glucagon to rats fed 10% casein diet increased Hal activity 3.0 fold and Hal- mRNA expression 5 fold compared with uninjected rats fed the same diet. The apparent half-life of hepatic histidase in protein-depleted rats previously fed 80% casein diet was 2.8 d whereas the half-life of Hal-mRNA was 17 h. In summary, these data support the hypothesis that Hal expression is regulated by dietary protein at the pretranslational level in rat

liver, and that glucagon is one of the hormones involved in the induction of Hal.

Key words: dietary protein, histidase, histidine, gene expression, rats

Dietary regulation of the gene expression of enzymes involved in the metabolism of carbohydrates and lipids has been extensively studied [43, 44]. However few studies have been conducted to understand the expression of enzymes involved in the metabolism of amino acids. The amounts of most amino acid-degrading enzymes in the liver change in response to changes in protein intake, increasing as protein intake rises and decreasing as protein intake falls. A high protein intake does not lead to accumulation of either body protein or unique storage proteins.

Histidase (Hal, histidine ammonia-lyase EC 4.3.1.3.) is the first enzyme in the degradation of histidine. This cytoplasmic enzyme is widely distributed in vertebrates and catalyzes the irreversible non-oxidative deamination of L-histidine generating urocanic acid and ammonia [4,5]. Hal plays an important role in directing histidine toward glutamate and 1-carbon fragment synthesis, and regulates the concentration of histidine in plasma which in turn, as precursor of histamine, is involved in the control of food intake [45]. The absence of histidase results in histidinemia, a benign inherited metabolic disease [32], characterized by elevated plasma histidine and histamine concentrations and low amounts of urocanic acid [31]. Histidase activity has been only found in liver and skin [12].

Hal has a molecular mass of about 200 kDa [14, 15] and appears on SDS-PAGE to consist of three identical subunits [16] of 72 kDa [15]. Rat liver histidase cDNA contains an open reading frame of 1971 bp, translated into a polypeptide of 657 amino acids with a molecular mass of 72,165 Da [18].

Human histidase cDNA exhibits an homology of 87% [11] with rat Hal and is a single copy gene of 25 kb containing 21 exons [19].

Histidase activity increases in the liver in response to an increase in protein intake and falls to low activity if protein intake is low [41]. However, feeding rats with a high histidine diet stimulates histidine oxidation without increasing histidase activity unless it is accompanied by a high protein diet [2]. We have been interested in identifying the mechanism underlying induction of the hepatic histidase; thereby, the present studies were designed to examine first whether hepatic and skin Hal activity, amount of Hal enzyme, and Hal mRNA expression are affected by the concentration of dietary protein or by a high histidine diet. We studied the effect of glucagon as a possible mediator in the regulation of histidase expression. It has been reported that glucagon increases after the ingestion of a protein meal [46], and it is a potent stimulator of the activity of some amino acid degrading enzymes [24, 47]. However, there is not direct evidence on the mechanism of this reported effect. Therefore we also studied the effect of glucagon as a possible mediator on Hal expression. Finally this study was designed to assess how rapidly the Hal activity and the corresponding mRNA disappear from liver in rats switched from a high protein to a protein-free diet.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and chemicals. Glucagon was purchased from Eli Lilly and Co (Indianapolis, IN). Vitamin-free casein, mineral mix and vitamin mix were purchased from Teklad Test Diets, Madison, WI. Goat anti rabbit IgG gamma-chain specific affinity purified antibody conjugated to horse radish peroxidase was obtained from KPL, Inc. (Gaithersburg, MD) and the nitrocellulose membranes were from Bio Rad. (Hercules, CA). Nylon membrane filters

triphosphate (110 TBq/mmol) were purchased from Amersham (Buckinghamshire, U.K) and Gene Clean II kit from Bio 101(La Jolla, CA).

Animals, diets and treatments. Male Wistar rats (80-90 g) obtained from the Experimental Research Department and Animal Care Facilities at the National Institute of Nutrition, Mexico D. F., were housed individually in wire stainless steel cages at 22°C with a 12 hour light-dark cycle and different groups of rats were used for one of the following four experimental protocols. The protocols used in these experiments were approved by the Animal Care Committee of the National Institute of Nutrition, México, D.F.

Experiment 1. Effect of dietary protein. To study the pattern of changes in histidase expression a dietary regimen of a meal-restricted schedule was selected to synchronize the rats feeding behavior. Rats were fed an 18% casein diet for 1 day to adapt the animals to the powder diet and then were randomly assigned to one of 5 experimental groups (24 rats/group) with free access to diets containing 0, 6, 18, 35, or 50% casein for an acclimation period of 2 d. Next, the rats were fed in a restricted schedule of 7 h (900 to 1600 h) with free access to water for 10 d. On d 10, six rats per group were anesthetized with carbon dioxide and killed by decapitation at 0900, 1200, 1600, and 2100 h. This corresponded to 17 h of food deprivation, 3 and 6 h into the feeding period and after 5 h of food deprivation. Liver and skin were dissected immediately, and a tissue sample was frozen in liquid nitrogen for RNA extraction and the rest was used for western blot analysis and measurement of enzyme histidase activity.

The composition of the powdered diets is shown in table 1. The 6% casein diet was supplemented with 0.2% L-methionine and 0.4% L-threonine to improve the nutritional quality .

Experiment 2. High histidine diet. We examined whether histidine, as substrate, stimulated Hal activity and mRNA in a similar manner as observed in rats fed a high protein diet. Another group of rats was fed a 12% casein diet supplemented with 1.25% of histidine (equivalent to the amount of histidine in a 50% casein diet) and its control group that was fed a 12% casein diet described in table 1.

Experiment 3. Glucagon treatment. To study the effect of glucagon on liver histidase, rats with free access to a 10% casein diet (table 1) were injected intraperitoneally with glucagon ($0.6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g body wt}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) as described previously [24, 25, 48, 49] divided in 3 equally spaced doses over a 4 day period. The last day, groups of 3 rats were killed 3, 6 and 12 h after the last dose to find the optimal response. Livers were immediately removed and used as above for northern blot analysis and measurement of Hal activity. Control rats were fed a 10% casein diet injected intraperitoneally with saline.

Experiment 4. Half life estimation. The apparent half life of histidase activity was estimated by feeding rats an 80% casein diet (table 1) for 7 d followed by a protein-free diet for 5 d according to [42, 49]. To estimate the rate of disappearance of Hal mRNA rats were killed at short intervals according to [50]. Livers were removed at 0, 6, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 h after initiation of the protein-free diet. The half lives of the enzyme and Hal mRNA were estimated by the method described in [42].

Histidase Activity and kinetic constants. Liver or skin (1 g) were washed with ice-cold saline, blotted and homogenized in 4 mL of an ice-cold solution containing 5 mmol/L NaOH in 14 mmol/L KCl with a polytron (PT2000 Kinematica, Lucerne, Switzerland) at the lowest setting. The homogenates were centrifuged for 60 min at 105,000 x g, and the clear supernatant was stored at -80°C before measuring histidase activity. The activity was assayed as described [51]. The method is based on the spectrophotometric measurement of the appearance of urocanic 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 of urocanic acid / min. The protein concentration was measured by Biuret assay with bovine serum albumin standards. The apparent kinetic constants of Hal were determined in high speed liver supernatants of rats fed 6, 18 or 50% casein diets. Values for Km and Vmax were determined using the kinetic package in the DU640 spectrophotometer (Beckman, Palo Alto, CA)

Purification of histidase and preparation of antibodies. Histidase was purified from adult female rat liver according to the protocol of Brand and Harper (1976) by ammonium sulfate precipitation followed by DEAE-Sephadex and QAE-Sephadex chromatographies. On SDS PAGE gel electrophoresis, the final protein fraction exhibited a single band of 72.2 kDa with biological activity and was purified around 500-fold. Purified homogenous histidase (200 µg) was emulsified in an equal volume of complete Freund's adjuvant. This suspension was injected subcutaneously into a rabbit and was followed by a second injection 2 wk after the first with the same concentration of protein mixed with incomplete Freund's adjuvant; one booster injection was applied

two weeks later. Blood was collected 2 wk after the last immunization [52]. The immunoglobulin fraction of the antiserum was partially purified by the procedure of [53] and this fraction recognized a single band of 72 kDa in Western blot and neutralized more than 90% of histidase activity in liver cytosolic samples.

Immunoblot analysis. To establish if the increase in Hal activity in response to dietary protein was proportional to the amount of Hal protein, the concentration of Hal in liver supernatants of rats fed 0, 6, 18, 35 and 50% casein was measured by western blotting. Fifty μg of protein from high speed liver supernatants were subjected to a 7.5% (w/v) acrylamide gels (SDS-PAGE) as described previously [54]. For immunoblotting, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane as described by [55]. Membranes were blocked with 10% skim milk in PBS-0.05% Tween buffer, pH 7.2 and incubated with a polyclonal antibody raised in rabbits against purified histidase (dilution 1:100). Protein bands were visualized by using horse radish peroxidase-labeled goat anti-rabbit antibody according to the manufacturers instructions (Bio-rad). Quantitation of the bands was done by densitometry using a Bio Rad densitometer model GS 670 (Bio Rad, Hercules, CA).

Northern blot analysis. Total RNA was isolated from liver and skin according to Chomczynski and Sacchi (1987). For Northern analysis, 20 μg of RNA was electrophoresed in a 0.8 % agarose gel containing 37% formaldehyde, transferred to a nylon membrane filter (Hybond-N⁺) and cross-linked with a UV crosslinker (Amersham, UK). The cDNA probe was a 1.95 Kb PCR product amplified from rat liver histidase cDNA kindly provided by Dr. R.R.McInnes of The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario [18]. The forward and reverse primers used for

the PCR reaction were 5'ATGCCTAGGTACACGGTGC3' and 5'TTAAAGATCGTCAGACTCTG 3', respectively. The PCR product was purified with Gene Clean and labeled with Redivue [α - 32 P] dCTP (110 TBq/mmol) using the Rediprime DNA labeling kit. Membranes were prehybridized with rapid-hyb buffer (Amersham, Buckinghamshire, UK) at 65°C for 30 min, and then hybridized with the cDNA probe (53.3 MBq/L) for 2.5 h at 65°C. Membranes were washed once with 2X SSC (1X SSC = 0.15 mol/L sodium chloride/15 mol/L sodium citrate)/0.1% SDS at room temperature for 20 min and then twice for 15 min with 0.1X SSC/0.1% SDS at 65°C. Digitized images and quantification of radioactivity (cpm) of the bands were done by using the Instant Imager (Packard Instrument, Co. Meriden, CT). Membranes were also exposed to Extascan film, (Kodak) at -70°C with an intensifying screen.

Statistics. Values are means \pm SEM. Analysis of significant differences among groups and over time was done by 2- way ANOVA followed by Scheffé's test (Statview statistical analysis program, V.4.5, Abacus Concepts, Inc, Berkeley, CA). The effect of histidine was analyzed by Student's test and the glucagon effect by one-way ANOVA followed by Scheffe's test. Differences with a P value of 0.05 or less were considered significant.

TABLE 1

Composition of diets containing different concentrations of protein

Ingredient	% protein							
	0	6	10	12	18	35	50	80
	g/kg diet							
Casein ¹	0.0	60.0	100.0	120.0	180.0	350.0	500.0	800.0
Cornstarch ¹	445.0	412.0	395.0	385.0	355.0	270.0	255.0	90.0
Cellulose ¹	445.0	412.0	395.0	385.0	355.0	270.0	255.0	90.0
Corn oil	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral mixture ²	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Vitamin mixture ³	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
L-methionine ⁴		2.0						
L-threonine ⁴		4.0						

¹ Teklad Test diets, Madison, WI

² Rogers-Harper, Teklad Test diets, Madison, WI (Rogers and Harper. 1965)

³ Vitamin mix, Teklad 40060 (mg/kg diet): p-aminobenzoic acid, 110; ascorbic acid, 991; biotin, 0.4; vitamin B12, 30; calcium pantothenate 66; choline dihydrogen citrate, 3497; folic acid, 2; inositol, 110; menadione, 50; niacin, 99; pyridoxine HCl, 22; riboflavin, 22; thiamin HCl, 22; vitamin A palmitate, 40; cholecalciferol, 4; vitamin E acetate, 242.

⁴ Sigma, St. Louis, MO

RESULTS

Effect of diet on weight gain. Rats from all the groups gained weight when they were allowed free access to the experimental diets (Fig. 1). By d 1, after

introduction of the 7 h meal feeding schedule, all the rats lost weight. By d 2, rats fed 18, 35 or 50% casein diet began to gain weight, whereas rats fed 6% casein diet did not gain weight until three days after the beginning of the restricted meal feeding schedule, while rats fed 0% casein diet lost weight. Between days 3-10, the weight gains were 5.6 ± 0.3 , 5.9 ± 0.3 , and 5.2 ± 0.3 g/day in the groups fed 18, 35 and 50% casein diet, respectively and rates did not differ significantly. In the protein restricted group (6% casein diet) the weight gain was of 1.1 ± 0.06 g/day. Rats fed a protein free diet (0% casein diet) lost weight continuously (-1.4 ± 0.08 g/day) throughout the 10 day period.

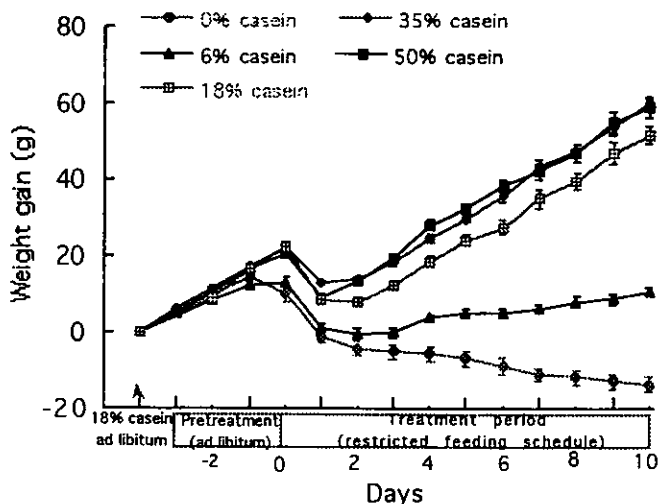


Figure 1. Weight gain of rats fed different concentrations of dietary protein. Values are mean \pm SEM, $n=24$ rats. Plots with different letters have statistically different growth rates ($p<0.05$)

Diurnal variation of histidase. Hal activity was the highest at the end of the food deprivation period (0900 h) in the groups of rats fed 0, 6 or 18% casein diet (Table 2). Feeding resulted in a significant decrease in measurable histidase activity by 3 h in the same groups. After 6 h of feeding or 5 h of food deprivation in rats fed 0, 6, or 18% casein, Hal activity was significantly lower than in rats deprived of food for 17 h, excluding rats fed 18% casein diet for 6 h. Rat fed 35 or 50% casein diets did not show significant differences in Hal activity along day. Northern blot analysis revealed similar pattern (data not shown).

TABLE 2

Diurnal variation of histidase activity in liver supernatants of rats fed different concentrations of protein diet

time of day	Dietary casein (%)				
	0	6	18	35	50
	Histidase activity (nmol urocanic acid/min/mg protein)				
9.00 h (17 hs food deprivation)	0.53 ± 0.02 ^{a,3}	0.64 ± 0.04 ^{a,3}	0.91 ± 0.04 ^{a,3}	2.05 ± 0.09 ²	2.63 ± 0.19 ¹
12.00 h (3 hs feeding)	0.34 ± 0.01 ^{b,3}	0.42 ± 0.03 ^{b,3}	0.72 ± 0.02 ^{b,3}	1.81 ± 0.05 ²	2.54 ± 0.21 ¹
15.00 h (6 hs feeding)	0.34 ± 0.01 ^{b,4}	0.37 ± 0.02 ^{b,4}	0.83 ± 0.03 ^{ab,3}	2.08 ± 0.02 ²	2.70 ± 0.12 ¹
21.00 hs (5 h food deprivation)	0.26 ± 0.02 ^{c,4}	0.34 ± 0.02 ^{b,4}	0.75 ± 0.01 ^{b,3}	2.09 ± 0.07 ²	2.61 ± 0.13 ¹

Results are expressed as means ± SEM; n=6 rats. Values within a column with different letter superscripts (a>b>c) and values within a row with different numbers (1>2>3>4) are significantly different (p<0.05). Statistical analysis was done by two-way ANOVA with % of casein and time of day as independent variables. When a significant interaction was found, differences between groups were determined by Scheffe's test.

Measurement of kinetic constants. The results in Fig. 2 showed a hyperbolic response with an apparent K_m of 5.9 ± 1.9 , 5.9 ± 1.1 and 6.6 ± 1.4 mmol/L for the rats fed 6, 18 and 50% casein respectively, which were not significantly different. V_{max} values were 0.43 ± 0.04 , 0.84 ± 0.05 and 2.5 ± 0.2 nmol of urocanic acid/(min-mg of protein) for the groups fed 6, 18, and 50% of casein respectively. Apparent V_{max} values were 0.95 and 4.7 fold higher ($p < 0.01$) in the 18% and 50% protein groups than in the restricted group .

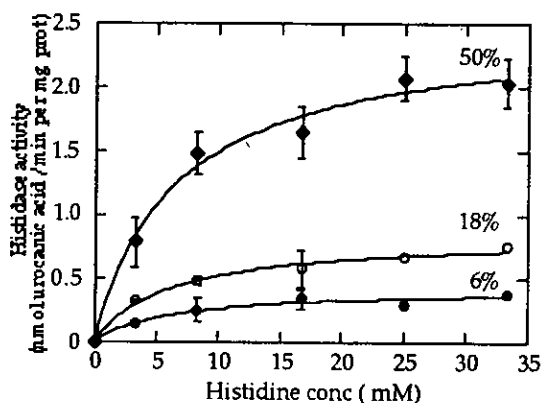


Figure 2. Effect of histidine concentration on histidase activity in liver supernatants of rats fed 6, 18 and 50% casein diet. Values are means \pm SEM, $n=3$. The curve is described by a Michaelis-Menten equation. Kinetic parameters are: $V_{max} = 0.43 \pm 0.04$, 0.84 ± 0.05 , 2.5 ± 0.2 , and $K_m = 5.9 \pm 1.9$, 5.9 ± 1.1 , 6.6 ± 1.4 for rats fed with 6, 18 and 50% casein diet respectively. K_m values among the three groups were not significantly different; V_{max} values were significantly different ($p < 0.05$), $50\% > 18\% > 6\%$.

Effect of dietary protein on Hal activity. Liver Hal activity after 6 hours of feeding increased significantly with increasing dietary protein ($r=0.986$, $p<0.01$). However, there was a biphasic response; when protein intake was between 18% and 50% was 0.49 ± 0.04 nmol/(min·mg protein) the increment in Hal activity in rats fed 0-18% casein in the diet was 0.49 nmol/(min·mg protein), whereas in those fed between 18 and 50% was 1.87 nmol/(min·mg protein). Hal activity in rats fed 50% casein diet was 6.9 fold higher than the group of rats fed 0% casein diet. After 6 h of feeding, skin Hal was not affected by dietary protein, and the mean skin Hal activity was 78% lower than hepatic Hal of rats fed 18% casein diet (Fig. 3A).

Effect of dietary protein on Hal concentration. The amount of histidase was 8.0-fold greater in rats fed 50% casein than in those fed a 6% casein diet (Fig. 3B). However, the increment in the amount of Hal was not proportional to the concentration of protein in the diet. Supernatants of rats fed 0% casein diet had very low concentration of Hal. The concentration of histidase in rats fed 18% casein diet was 1.2 fold higher than in rats fed 6% casein diet; Hal concentration was 2.4 fold greater in livers of rats fed 35% casein compared with the group fed 18% casein diet, and the increase in Hal concentration was only 20% in the group of rats fed 50% casein diet compared with the group fed 35% casein diet. A significant correlation ($r = 0.99$) between Hal activity and Hal concentration was found.

Effect of dietary protein on histidase mRNA concentrations (Hal mRNA). As shown in Fig. 3C, the Hal mRNA concentrations increased with increasing dietary protein. The concentrations of Hal mRNA were 1.0, 2.8, 7.2, and 7.5 fold higher for the groups fed with 6 %, 18%, 35% and 50% than for the group fed a 0%

casein diet. The concentration of the Hal mRNA measured by electronic autoradiography correlated significantly with Hal activity ($r = 0.97$). There was no effect of dietary protein on Hal mRNA expression in skin (not shown).

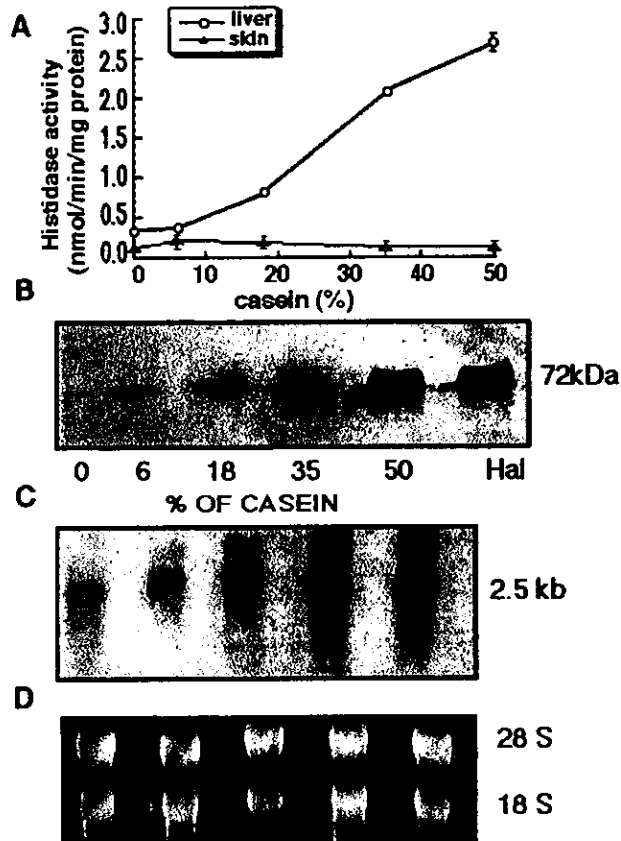


Figure 3. Histidase activity, concentration of enzyme and Hal mRNA levels in liver of rats fed 0, 6, 18, 35 or 50% casein diet. A) Histidase activity was measured in liver and skin high speed supernatants of rats fed for 6 h. Hal activity at different percent of casein in the diet with different letters are significantly different ($p < 0.05$). B) Purified rat liver histidase (Hal) and samples (100 μg of protein) of liver supernatants were electrophoresed in a 7.5% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and probed with histidase antiserum. C) 20 μg of total RNA from livers of rats fed different concentrations of protein were analyzed by northern blot, D) Ethidium bromide stained gels.

Disappearance of histidase activity and mRNA. Fig.4 shows the decay of Hal activity and mRNA after a change of an 80% casein diet to a protein-free diet. On day 1 after the diet change, the mRNA had decrease dramatically, and barely detectable mRNA remained on day 4. A semilogarithmic plot of the concentrations of Hal mRNA expressed as radioactivity from day 0 to day 4 vs time yielded a half life of 17 ± 1.6 h. In contrast, Hal activity was relatively constant for one day and then decreased slowly over the next 3 days, resulting in a half life of 2.8 ± 0.28 d.

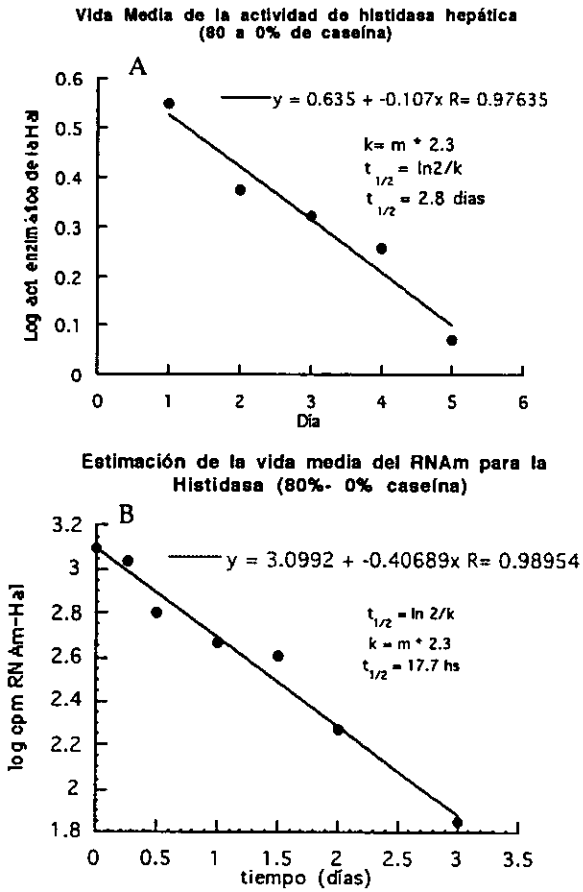


Fig 4.1 Estimación de la vida media de la actividad enzimática de la histidasa (panel A) y del RNAm para la Hal (panel B)

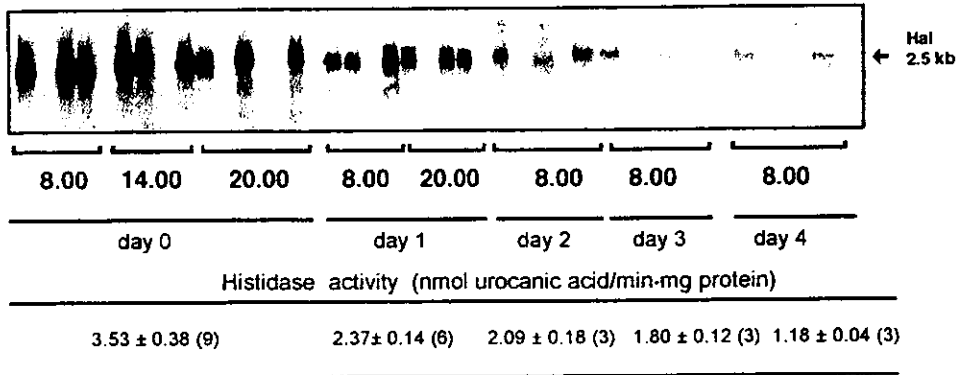


Figure 4. Disappearance of hepatic histidase mRNA and activity as a function of time in rats fed a protein-free diet. Rats that had been maintained on 80% casein diet for 7 d were subjected to feeding with a protein free diet and killed after the period of time indicated. Hal mRNA was analyzed by northern blot and quantified by using electronic autoradiography, each line represents one different rat. Hal activity was measured in high speed liver supernatants, the values are means \pm SEM, the numbers of rats in parentheses. Values of histidase activity with different letter superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

Effect of a high histidine diet on histidase activity and mRNA concentrations. Rats fed a 12% casein diet supplemented with 1.25% histidine showed the same histidase activity and mRNA concentration that rats fed 12% casein diet, indicating that histidine was not able to modify Hal activity and expression of Hal-mRNA, Table 3 and Fig. 5.

TABLE 3
Histidase activity in liver supernatants of rats fed a high histidine diet or treated with glucagon.

Treatment	Hal activity nmol(min ⁻¹ mg protein)
High histidine diet	
12% casein	0.56 ± 0.06
12% casein + 1.25% histidine	0.50 ± 0.05
Effect of glucagon	
10% casein	0.44 ± 0.05 ^b
10% casein + glucagon (3 h)	1.56 ± 0.13 ^a
10% casein + glucagon (6 h)	1.76 ± 0.15 ^a
10% casein + glucagon (12 h)	1.47 ± 0.13 ^a

Values are means ± SEM from 4-6 rats. Rats fed a high histidine diet were fed a 12% casein diet supplemented with 1.25% histidine or fed 12% casein diet (controls). Rats injected with glucagon (3, 6 or 12 h after the last injection) were fed 10% casein diet or injected with saline and fed 10% casein diet (controls). Values with different letter superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Effect of glucagon on histidase activity and mRNA concentration. After 3, 6, and 12 h of the last glucagon injection, Hal activity was stimulated by 2.5, 3.0 and 2.3 fold, respectively, compared with the control group, and there were no significant differences among them (Table 3). The increment in Hal activity after 6 h of the last glucagon injection was accompanied by a 5-fold increment in Hal mRNA concentration (Fig. 5).

DISCUSSION

Histidase is one of the liver amino acid degrading enzymes controlled by dietary protein. When an animal has consumed a low protein diet, the amino acids are preferentially channeled to protein synthesis as an important mechanism for regulation of amino acid concentrations in body fluids, rather than in reactions that shunt them into degradative pathways. After the ingestion of a high protein diet, the excess of amino acids must be degraded for preventing amino acids to accumulate in the body in amounts that might be toxic to the organism due to the lack of a reservoir to store amino acids.

Amino acid degrading enzymes, including histidase, function at their maximum rate when amino acid concentrations are high; however, after adapting rats to a high protein diet, we observed an increment in V_{max} . This increased capacity of the rats to degrade a excess of amino acids. We also found that the stimulation of histidase activity was associated with an increase in the amount and mRNA

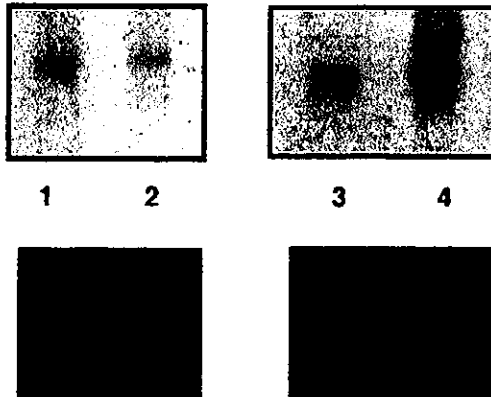


Figure 5. Northern blot analysis of histidase mRNA expression from rats with free access to a high histidine diet and injected with glucagon.

The upper panel shows a representative autoradiogram of a northern blot from 4 independent experiments is shown. A sample of total RNA (20 $\mu\text{g}/\text{lane}$) was isolated from livers of rats with free access to a 10% casein diet (1), 10% casein diet supplemented with 1.25% histidine (2), 12% casein diet (3), and 12% casein diet injected with glucagon ($0.6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g body weight}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) in 3 equally spaced doses over a 4 day period. Panel B shows ethidium bromide stained gels of RNA samples as a control for RNA integrity.

levels of histidase with increasing protein content in the diet, indicating that the nutritional regulation of histidase occurs at pretranslational level. The activity, amount of enzyme and mRNA levels of histidase were low when the dietary protein was below 18%. When ingestion of protein was above 18%, Hal activity increased rapidly, and it was accompanied by an increase in the amount and mRNA levels for histidase. The increased expression of Hal allows to catabolize and eliminate the excess of histidine in the body to maintain adequate plasma levels of this amino acid. These results suggest that induction of histidase occurs after the rat's protein requirement is met. Interestingly, the ingestion of a diet supplemented with 4 times the rats' requirement for histidine did not induce the Hal activity or mRNA, indicating that the nutritional regulation of histidase gene expression is by the dietary protein and not by its substrate. Previous studies in rats [56] have shown that the ingestion of diets supplemented with histidine above its requirement increased histidine oxidation without changing histidase activity. The results in the present and previous studies illustrate that there are two possible mechanisms for regulating histidine catabolism 1) low protein-high histidine diets increase the rate of histidine oxidation without changes in histidase activity and expression since the high K_m of histidase ensures the oxidation of histidine over a wide range of histidine concentrations in the liver, and 2) high protein diets induce histidase expression, as observed in this study, by increasing the amounts of histidase and its mRNA. The latter mechanism might be affected by hormonal changes.

It has been shown that after the ingestion of a high protein diet [57, 58] or administration of an amino acid mixture [59], plasma amino acid concentrations increase and stimulate the secretion of glucagon by the pancreas. Recently it has

been proposed that α -cells of pancreas regulate glucagon in part by an amino acid-dependent mechanism [60]. It has also been demonstrated that the injection of glucagon or dibutyryl cyclic AMP stimulates Hal activity [22, 24]. In the present study, glucagon not only increased Hal activity, but also produced an increase in Hal mRNA, indicating that this hormone is probably a regulator in the control of the transcription of the Hal gene. Recently, the promoter sequence of the human Hal gene was reported, and it has several cAMP responsive cis-acting elements which include consensus sequences for transcriptional factors AP-1 (activator protein-1) and ATF (activating transcription factor) [19]. Even though the cloning of the rat histidase gene has not yet been accomplished, the homology of human histidase cDNA with rat histidase is 87% [11], suggesting that the regulatory elements in the promoter do not differ considerably. Further studies are necessary to establish the complete set of transcriptional factors that modulate the rate of transcription of the Hal gene.

Interestingly, the nutritional regulation of histidase by dietary protein was only seen in liver. Epidermal histidase activity was 80% lower than liver histidase, and no changes in the activity and expression of epidermal histidase occurred in rats fed different concentrations of dietary protein, indicating that the transcriptional control of the Hal gene is liver specific. We have demonstrated that Hal activity and Hal-mRNA is absent in muscle, kidney, heart, brain, intestine, stomach, lung and lactating mammary tissue (unpublished results). The difference in the pattern of Hal expression in liver and skin can be explained by the differences in the catabolism of histidine in both tissues. In the liver, Hal is the first enzyme in the several steps of histidine degradation. However the metabolism of histidine in the epidermis is different. Urocanase, the second enzyme in the metabolism of histidine is not naturally present in the skin, and

consequently, urocanic acid accumulates in the epidermis. Urocanic acid protects DNA from photomutagenesis, since the absorption spectra of both *cis* and *trans* isomers overlap with the absorption spectrum of DNA [13], a function that requires to remain constant, and not be affected by the diet.

The effect of dietary protein on Hal concentration and mRNA levels in the liver depends upon both the rate of synthesis and the rate of degradation, but the time required to approach a new steady state is determined by the rate of degradation, but the time required to approach a new steady state is determined by the rate of degradation. The apparent half-life of hepatic histidase was 2.8 d, comparable to that reported previously [42, 49]. The half life of Hal mRNA estimated in the present work was 17.7 h, 74% shorter than the half life of the enzyme. This may explain why during the first day after the diet change, Hal activity determined at 0900, 1500 and 2100 was relatively constant, while Hal mRNA concentration decayed rapidly. Thus, Hal activity did not show diurnal variation independently of the dietary protein concentration (Table 1). However, rats starved for 17 h showed Hal activities higher than after refeeding. This can be associated that during starvation there is a gradual fall in serum insulin accompanied by a rise in serum glucagon and glucocorticoids, increasing the activity of gluconeogenic enzymes.

The results of the present work clearly establish that Hal expression is controlled by the dietary protein concentration, and presumably is partially regulated by glucagon. Additional studies are required to establish the nature of the transcriptional control of the Hal gene. Such studies are currently under way in our laboratory. In the future, the establishment of the common regulators of the expression of the amino acid degrading enzymes will give information at the molecular level of the basic mechanisms that control body nitrogen.

FIGURE LEGENDS.

Figure 2. Histidase activity, concentration of enzyme and Hal mRNA levels in liver of rats fed 0, 6, 18, 35 or 50% casein diet. A) Histidase activity was measured in liver and skin high speed supernatants of rats fed for 6 h. Hal activity at different percent of casein in the diet with different letters are significantly different ($p < 0.05$). B) Purified rat liver histidase (Hal) and samples (100 μ g of protein) of liver supernatants were electrophoresed in a 7.5% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and probed with histidase antiserum. C) 20 μ g of total RNA from livers of rats fed different concentrations of protein were analyzed by northern blot, D) Ethidium bromide stained gels.

Figure 4. Disappearance of hepatic histidase mRNA and activity as a function of time in rats fed a protein-free diet. Rats that had been maintained on 80% casein diet for 7 d were subjected to feeding with a protein free diet and killed after the period of time indicated. Hal mRNA was analyzed by northern blot and quantified by using electronic

autoradiography, each line represents one different rat. Hal activity was measured in high speed liver supernatants, the values are means \pm SEM, the numbers of rats in parentheses. Values of histidase activity with different letter superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

Figure 5. Northern blot analysis of histidase mRNA expression from rats with free access to a high histidine diet and injected with glucagon.

The upper panel shows a representative autoradiogram of a northern blot from 4 independent experiments is shown. A sample of total RNA (20 $\mu\text{g}/\text{lane}$) was isolated from livers of rats with free access to a 10% casein diet (1), 10% casein diet supplemented with 1.25% histidine (2), 12% casein diet (3), and 12% casein diet injected with glucagon ($0.6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g body weight}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) in 3 equally spaced doses over a 4 day period. Panel B shows ethidium bromide stained gels of RNA samples as a control for RNA integrity.

TEXT FOOTNOTES

¹ This work was supported by grants from the National Council of Science and Technology (CONACYT), and by the PADEP, UACPyP-CCH Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México (to N.T).

² To whom correspondence should be addressed.

CONSIDERACIONES GENERALES

La regulación de las concentraciones de aminoácidos en el plasma es muy precisa. Se ha demostrado que después del consumo de dietas con un alto contenido de proteína, las concentraciones de aminoácidos aumentan para luego regresar a sus valores normales en unas cuantas horas. Por otro lado durante periodos cortos de ayuno las concentraciones de aminoácidos permanecen relativamente constantes y aún en inanición prolongada, la concentración de aminoácidos disminuye en un 25-30% de los niveles normales manteniéndose constante por un periodo considerable. Estas observaciones indican que existe un mecanismo de regulación para mantener la homeostasis de las concentraciones de aminoácidos.

Los sitios potenciales de regulación para mantener las concentraciones de aminoácidos dentro de los límites normales son 1) a nivel del transporte de aminoácidos hacia los tejidos [61], 2) por medio de enzimas que controlan la síntesis de proteínas y de enzimas degradadoras de aminoácidos y 3) por medio de neurotransmisores que controlan la ingestión de alimentos.

Desde el punto de vista metabólico, los puntos de regulación más importantes son a nivel de las enzimas que controlan el flujo en las rutas del catabolismo de aminoácidos. El mecanismo por el cual se sintetiza más enzima degradadora no se conoce totalmente, pero existe evidencia de que algunos nutrimentos inducen o reprimen genes a diferentes niveles en una

REFERENCIAS

1. Krebs, H.A., *Some aspects of the regulation of fuel supply in omnivorous animals*. Adv. Enz. Regul., 1972. 10 : p. 397-420.
2. Harper, A.E., *Biological factors influencing the utilization of amino acids, in Genetic factors in nutrition*, A. Velázquez and H. Bourges, Editors. 1984, Academic Press: New York. p. 243-267.
3. Torres, N., A.R. Tovar, and A.E. Harper, *Metabolism of valine in rat skeletal muscle mitochondria*. J. Nutr. Biochem, 1993. 4 : p. 681-689.
4. Peterkofsky, A., *The mechanism of action of histidase: Amino-enzyme formation and partial reactions*. J. Biol. Chem, 1962. 237 (3): p. 787-795.
5. Mehler, A.H. and H. Tabor, *Deamination of histidine to form urocanic acid in liver*. J. Biol. Chem., 1953. 201 : p. 775-784.
6. Chasin, L.A. and B. Magasanik, *Induction and repression of the histidine-degrading enzymes of Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem., 1968. 243 (19): p. 5165-5178.
7. White, P.J. and K.E. Kendrick, *Inactivation of histidine ammonia-lyase from Streptomyces griseus by dicarbonyl reagents*. Biochim. Biophys. Acta, 1993. 1163 : p. 273-279.
8. Kaminskas, E. and B. Magasanik, *Sequential synthesis of histidine-degrading enzymes in Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem., 1970. 245 (14): p. 3549-3555.

9. Kimhi, Y. and B. Magasanik, *Genetic basis of histidine degradation in Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem., 1970. 245 (14): p. 3545-3548.
10. Givot, I.L. and R.H. Abeles, *Mammalian Histidine Lyase*. J. Biol. Chem., 1970. 245 (12): p. 3271-3273.
11. 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.
12. La Du, B.N., *L-histidine ammonia-lyase (Human stratum corneum)*. Meth. Enzymol., 1971. 17B : p. 891-897.
13. 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.
14. Okamura, H., T. Nishida, and H. Nakagawa, *L-histidine ammonia-lyase in rat liver. I Purification and general characteristics*. J. Biochem, 1974. 75 : p. 139-152.
15. Brand, L.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.
16. Cornell, N.W. and C.A. Villie, *Purification and properties of rat liver histidase*. Biochim. Biophys. Acta., 1968. 177 : p. 172-178.
17. Dhanam, M. and A.N. Radhakrishnan, *Comparative studies on histidase: Distribution in tissues, propierties of liver histidase abd its development in rat*. Indian. J. Exp. Biol., 1976. 14 : p. 103-106.
18. 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.

19. 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.
20. Bhargava, M.M. and M. Feigelson, *Studies on the mechanisms of histidase development in rat skin and liver. I Basis for tissue specific developmental changes in catalytic activity*. *Develop. Biol.*, 1976. 48 : p. 212-225.
21. Feigelson, M., *Multihormonal regulation of hepatic histidase during postnatal development*. *Enzyme*, 1973. 15 : p. 169-197.
22. 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.
23. Morris, M.L., S. Lee, and A.E. Harper, *Influence of differential induction of histidine catabolic enzymes on histidine degradation in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 1972. 247 (18): p. 5793-5804.
24. 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.
25. Morris, M.L., S. Lee, and A.E. Harper, *A comparison of the responses of mitochondrial and cytosol histidine-pyruvate aminotransferases to nutritional and hormonal treatments*. *J. Biol. Chem.*, 1973. 248 (4): p. 1459-1465.
26. Scott, I.R., *Factors controlling the expressed activity of histidine ammonia-lyase in the epidermis and the resulting accumulation of urocanic acid*. *Biochem. J.*, 1981. 194 : p. 829-838.
27. Taylor, R.G. and R.R. McInnes, *Site-directed mutagenesis of conserved serines in rat histidase*. *J. Biol. Chem.*, 1994. 269 (44): p. 27473-27477.

28. Hanson, K.R. and E.A. Havir, *L-phenylalanine ammonia-lyase. IV. Evidence that the prosthetic group contains a dehydroalanyl residue and mechanism of action.* Arch. Biochem. Biophys, 1970. 141 : p. 1-17.
29. Holton, J.B., *Skin L-histidine ammonia-lyase activity in the family of a child with histidinaemia.* Clin. Chim. Acta, 1964. 11 : p. 193-194.
30. Virmani, K. and K. Widhalm, *Histidinemia: A biochemical variant or a disease.* J Am. Coll. Nutr., 1993. 12 (2): p. 115-124.
31. Levy, H.L., R. Taylor, and R. McInnes, *Disorders of histidine metabolism, in The metabolic and molecular bases of inherited disease., C.R. Scriver, et al., Editors.* 1995, McGraw-Hill, Inc.: New York. p. 1107-1123.
32. 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.
33. Melancon, S.B., S.Y. Lee, and H.L. Nadler, *Histidase activity in cultivated human amniotic fluid cells.* Science, 1971. 173 : p. 627-628.
34. Morrison, H., D. Avnir, and T. Azrella, *Z/E photoisomerization of urocanic acid.* Photochem. Photobiol., 1980 a. 32 : p. 711-714.
35. Everett, M.A., J.H. Anglin, and A.T. Bever, *Ultraviolet induced biochemical alterations in skin. I Urocanic acid.* Arch. Dermatol., 1961. 84 : p. 717-719.
36. Baden, H.P. and M.A. Pathak, *The metabolism and function of urocanic acid in skin.* J. Invest. Dermatol., 1967. 48 : p. 11-17.
37. Morrison, H., D. Avnir, and T. Azrella, *Analysis for Z and E urocanic acid by high pressure liquid chromatography.* J. Chromatogr., 1980b. 183 : p. 83-86.

38. Baden, H.P., Y. Hori, M.A. Pathak, and H.L. Levy, *Epidermis in histidinemia*. Arch. Dermatol., 1969b. 100 : p. 432-435.
39. De Fabo, E.C. and F.P. Noonan, *Further evidence that the photoreceptor mediating UV-induced systemic immune supresion is urocanic acid*. J. Invest. Dermatol., 1983. 80 : p. 319.
40. Ross, J.A., S.E. Howie, M. Norval, J. Maingay, and T. Simpson J., *Two phenotypically distinct T cells are involved in ultraviolet-irradiated urocanic acid-induced supresion of the efferent delayed-type hypersensitivity response to herpes simplex virus, type 1 in vivo*. J. Invest. Dermatol., 1987. 89 : p. 230-233.
41. Kang-Lee, Y.A. and A.E. Harper, *Effect of Induction of histidase on histidine metabolism in vivo*. J. Nutr., 1979. 109 : p. 291-299.
42. Schirmer, M.D. and A.E. Harper, *Adaptive responses of mammalian histidine-degrading enzymes*. J. Biol. Chem., 1970. 245 (5): p. 1204-1211.
43. Clarke, S.D. and S. Abraham, *Gene expression: nutrient control of pre- and posttranscriptional events*. FASEB J, 1992. 6 : p. 3146-3152.
44. Hillgartner, F.B., L.M. Salati, and A.G. Goodridge, *Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis*. Physiol. Rev., 1995. 75 (1): p. 47-76.
45. Vaziri, P., K. Dang, and H. Anderson, *Evidence for histamine involvement in the effect of histidine loads on food and water intake in rats*. J. Nutr., 1997. 127 : p. 1519-1526.
46. Charlton, M.R., D.B. Adey, and K.S. Nair, *Evidence for a catabolic role of glucagon during an amino acid load*. J. Clin. Invest., 1996. 98 (1): p. 90-99.
47. Jost, J.P., E.A. Khairallah, and H.C. Pitot, *Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver. V. Regulation of the rate of synthesis*

- and degradation of serine dehydratase by dietary amino acids and glucose.* J. Biol. Chem., 1968. 243 : p. 3057-3066.
48. Pestaña, A., *Dietary and hormonal control of enzymes of amino acid catabolism in liver.* European J. Biochem., 1969. 11 : p. 400-404.
49. 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.
50. 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.
51. Spolter, P.D. and R.C. Baldrige, *The Metabolism of histidine. V. On the assay of enzymes in rat liver.* J. Biol. Chem., 1963. 238 (6): p. 2071-2074.
52. Lane, D., *Antibodies. A Laboratory Manual.* 1988, Cold Spring Harbor Laboratory.
53. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology.* 1995 ed. Vol. 2. 1995, USA: John Wiley & Sons, Inc. 11.13.1 - 11.13.4.
54. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning. A laboratory manual.* second edition ed. ed. N. Ford. Vol. 3. 1989, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
55. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1979. 76 (9): p. 4350-4354.
56. Kang-Lee, Y.A. and A.E. Harper, *Effect of histidine intake and hepatic histidase activity on the metabolism of histidine in vivo.* J. Nutr., 1977. 107 : p. 1427-1443.

57. Munro, H.N., *Free amino acids pools and their role in regulation.*, in *Mammalian protein metabolism*. 1970, Academic Press: New York. p. 299-386.
58. Hoffer, L.J., *Starvation*, in *Modern Nutrition in Health and Disease*, M.E. Shils, J.A. Olson, and M. Shike, Editors. 1994, Lea & Febiger: Philadelphia. p. 927-949.
59. 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.
60. Shay, N.F., T.M. Ponder, A. Reddy, B.A. McCracken, and H.R. Gaskins, *Regulation of glucagon synthesis by nutrients in the α TC9 pancreatic alpha cell line*. *FASEB J.*, 1994. 8 (4): p. A55.
61. Tovar, A. and N. Torres, *Amino acid transport: regulation, characterization and factors affecting the amino acid transport systems*. *Rev. Inv. Clin.*, 1992. 44 : p. 427-439.
62. Torres, N., G. López, S. DeSantiago, S.M. Hutson, and A.R. Tovar, *Expression of mitochondrial branched chain aminotransferase in rat tissues: effect of diet and hormones*. enviado al *J. Nutr*
63. Crowell, P., N. Torres, and A.E. Harper, *Response of rat liver branched-chain α -keto acid dehydrogenase (BCKAD) to a meal and changes in dietary protein*. *FASEB J.*, 1988. 2A : p. 1090.
64. Chinsky, J.M., L.M. Bohlen, and P.A. Costeas, *Noncoordinated responses of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase subunit genes to dietary protein*. *FASEB J.*, 1994. 8 : p. 114-120.
65. Rychlik, W., *OLIGO Primer analysis software* 1996, National Biosciences, Inc.: Plymouth, MN.

66. Smith, L.S., B. Lewis, and S.M. Matsu, *Increased yield of small DNA fragments purified by silica binding*. *Biotechniques*, 1995. **18** (6): p. 970-974.
67. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977. **74** : p. 5463-5467.

APENDICE**OTROS RESULTADOS**

Distribución del RNAm-Hal en diferentes tejidos. Para determinar la expresión del RNAm-Hal en los diferentes tejidos, el RNA total fue extraído de hígado y piel de rata macho y hembra, de tejido mamario de rata lactante, de riñón, corazón, cerebro, intestino, estómago, pulmón y músculo. Se realizaron Northern blots con 20 µg de RNA total de cada uno de los tejidos y se hibridaron con la sonda preparada por PCR. La presencia de una sola banda de 2.5 kb correspondiente al RNAm-Hal se detectó exclusivamente en hígado y piel y estuvo ausente en el resto de los tejidos. La abundancia del RNAm-Hal fue 2 veces mayor en el hígado que en la piel. Taylor [18] reportó que la abundancia del RNAm para Hal era 10 veces más alta para el hígado que para la piel, estas diferencias pueden ser debido al método de cuantificación.

Cornell y Villie sugirieron [16] que existía una diferencia en la actividad de la histidasa dependiendo del sexo de la rata siendo más alta para ratas hembra. Posteriormente Okamura y col. [14] pensaron que los esteroides femeninos estimulaban la actividad de la Hal mientras que los masculinos podrían inhibirla; sin embargo, la adición de esteroides in vitro como el estradiol, progesterona y testosterona no afectaron la actividad de la histidasa demostrando que estas hormonas no eran inhibidores de la histidasa. En el presente trabajo se midió la concentración RNAm-Hal en hígado de rata

macho y hembra de aproximadamente 80 gs (joven) y resultó similar, 602.62 cpm para rata macho y 534 cpm para hígado de rata hembra y de 321 cpm para piel de rata macho y de 415 cpm para piel de hembra lo cual indica que la expresión del gen de la histidasa en ratas de este peso no cambia con el sexo. Se ha sugerido que la actividad de la histidasa después del nacimiento aumenta dependiendo del sexo, siendo más alta en ratas hembras adultas que en machos adultos y que esto puede ser debido a la acción de hormonas como el estradiol, glucagon y cortisol que regulan la actividad de la Hal en etapas postnatales específicas antes de que la rata alcance su madurez [22]. Por otra parte, las diferencias en el nivel de expresión del gen de la histidasa en hígado y en piel pueden ser debido a diferencias entre los programas de desarrollo de la histidasa en hígado y en piel lo cual refleja diferencias en el metabolismo del ácido urocánico en estos dos tejidos. En el hígado, el ácido urocánico es un intermediario en la conversión de histidina a ácido glutámico, mientras que en la epidermis, éste se acumula y puede ser protector de la luz ultravioleta e inmunoregulador. Existe evidencia que la histidasa se expresa en el mismo gen para la enzima del hígado que para el de la piel [31] y que el RNAm en ambos tejidos es de 2.5 kb como se ha visto en este estudio y en otros [18].

Producción de histidasa recombinante

Paralelamente a la purificación bioquímica de la histidasa hepática se procedió a la producción de la histidasa recombinante como una proteína de fusión utilizando el vector pRSET. La proteína de fusión tiene un segmento de polihistidina lo que permite su purificación a través de una columna que contiene níquel.

Para iniciar la expresión de la histidasa recombinante se requirieron de varios elementos:

- I. El cDNA de la histidasa subclonado en un vector (plásmido).
- II. Oligonucleótidos que reconocen la región inicial y final de la secuencia codificante de la histidasa con la inserción de secuencias que sean reconocidas por enzimas de restricción específicas y secuencias GC para permitir el anclamiento de las enzimas de restricción.
- III. El producto de la región codificante del DNAC de la histidasa amplificado por PCR que será clonado en el vector de expresión pRSET.
- IV. El vector de expresión pRSET que contiene una región promotora que es reconocida por la RNA polimerasa T7 para expresar el producto del gen de interés como una proteína de fusión.
- V. El bacteriófago M13 que contiene el gen para la RNA polimerasa T7 y se introduce e infecta a la célula al tiempo de la inducción y de esta manera activa la región promotora del vector de expresión pRSET que contiene el inserto de la Hal estimulando su transcripción y la síntesis de la proteína.
- VI. La cepa de E. coli JM109 como medio para producir grandes cantidades de proteína.

Procedimientos Experimentales

I. El plásmido de Histidasa (pHAL) tiene como inserto el DNAC de histidasa de rata que contiene la secuencia codificante completa y poly A (2,179 bp), clonada de una biblioteca de DNAC de hígado de rata en el bacteriófago λ gt11 y subclonada en el sitio Eco RI del sitio de clonamiento múltiple de Bluescript, con una orientación de manera tal que el final de la región 5' del cDNA este adyacente a el promotor T7 del Bluescript. Este plásmido fue

donado por el Dr. McInnes, R.R.[18]. El plasmido fue amplificado introduciendo el pHAL en células E. coli XL1 azul competentes tratadas con CaCl₂ [54]. A partir de las colonias blancas positivas (que insertaron el pHAL) se aisló el pHAL utilizando tratamiento por lisis alcalina (miniprep)

II. *Diseño y síntesis de oligonucleotidos.* Para amplificar por PCR el inserto de Hal que se pueda unir al vector de pRSET, se diseñaron un par de oligonucleótidos que reconocieran la secuencia inicial y final codificante del DNAC de la Hal. A esta secuencia de nucleotidos se le adicionaron nucleotidos adicionales al final de la región 5' que permiten la creación de dos sitios únicos de restricción para la unión del inserto al vector pRSET y de esta manera poder crear una proteína de fusión en marco de lectura abierto. Finalmente se añadió una secuencia GCG al final de la región 5' que ayuda a que la enzima de restricción se asiente correctamente y rompa adecuadamente.

De la secuencia de DNA completa de la histidasa de rata descrita por Mc Innes [18] se localizaron la región de inicio y la región terminal de la secuencia codificante.

Región de inicio ATG CCT AGG TAC ACG GTG C

Región terminal CAG AGT CTG ACG ATC TTT AA

Posteriormente, se buscaron las enzimas que cortan en sitios únicos de la secuencia del sitio de clonamiento múltiple (MCS) del vector pRSET donde se insertó la secuencia codificante de Hal, sin cortar esta secuencia. Estas enzimas fueron Hind III, Pst I, Bgl II y Bam H I. Se eligieron 2 enzimas la Bam HI y Hind III. La Bam HI corta entre G[^]GATCC y Hind III corta entre A[^]AGCTT. Al introducir la secuencia Hal en la correcta dirección y en el correcto marco de lectura en el vector pRSET, el codón inicial ATG de la

secuencia de Hal estaba adyacente a la secuencia que codifica para el sitio de rompimiento por la enterocinasa en el vector pRSET.

De los dos sitios de restricción que se eligieron en el MCS, el sitio BamH I se encuentra más cercano a la región de rompimiento de enterocinasa. Por lo que se determinó añadir al oligonucleótido de la región inicial un sitio de restricción Bam HI, quedando la secuencia de la siguiente manera:

5' GGATCC ATG CCT AGG TAC ACG GTG C

Posteriormente se añadió la terminación GCG para el correcto posicionamiento de las enzimas de restricción, ya que después de la amplificación del producto por PCR y su posterior tratamiento con las enzimas Bam HI y Hind III se producen terminaciones cohesivas para que se una correctamente al vector pRSET, quedando de la siguiente manera:

5' GCG-GGATCC-ATG CCT AGG TAC ACG GTG C

(oligonucleotido 1)

De la secuencia de la región 3' terminal se obtiene su secuencia complementaria y de esta se obtiene la secuencia antiparalela para la realización del PCR

3' CAG AGT CTG ACG ATC TTT AA

GTC TCA GAC TGC TAG AAA TT

TTA AAG ATC GTC AGA CTC TG

Se le añadieron las siguientes bases para ser reconocida por la enzima Hind III

AAG CTT-TTA AAG ATC GTC AGA CTC TG

y se le añadieron igualmente que al oligonucleotido 1, la terminación GCG

GCG-AAG CTT-TTA AAG ATC GTC AGA CTC TG (oligonucleotido 2).

Estos oligonucleótidos fueron sintetizados en un sintetizador de oligonucleotidos Oligo 1000, Beckman.

La concentración del oligonucleótido 1 fue de 137.13 μM y la del oligonucleótido 2 de 66.16 μM .

III. Construcción de Histidasa recombinante por medio de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Con los oligonucleotidos sintetizados se procedió a amplificar la región codificante del Hal utilizando como templado el plasmido PHal. Las condiciones óptimas para la realización del PCR se obtuvieron por medio del programa OLIGO 5.0 [65] y fueron las siguientes: 94°C, 1 min, 52.5°C, 1 min y 72°C, 1min 10 sec. por 25 ciclos. Al final se permitió extender todas las hebras a 72°C, 7min. La concentración final de los oligonucleótidos para el PCR fue de 0.5 μM y la concentración del plásmido Hal fue de 0.5 μg . La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el estuche de GeneAmp PCR reagent con AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus). El producto de PCR mostró una sola banda en un gel de agarosa y su tamaño aproximado fue 1.95 kb que indica el tamaño correcto del producto de PCR. El producto de PCR se purificó con gene clean II, Bio 101 (La Jolla, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante con las modificaciones descritas en [66].

IV. El vector de expresión pRSET. El vector pRSET esta diseñado para una elevada expresión de proteínas de genes que son clonados en E. coli. Estos niveles de expresión son posibles debido a la presencia del promotor T7 en el vector. El inserto de DNA de Hal se clonó en la dirección 5'a 3' en marco de lectura abierto junto con la secuencia que codifica para el segmento de fusión amino terminal. La secuencia de este segmento incluye un codón de

iniciación de la traducción ATG, una serie de 6 residuos de histidina que funciona como un dominio que une metales en la proteína traducida, una secuencia estabilizadora del transcrito proveniente del gene 10 del fago T7, y una secuencia de reconocimiento para el rompimiento por la enterocinasa. El vector pRSET así como el producto de PCR de Hal se digirieron con las enzimas de restricción Bam HI y Hind III. El vector digerido fue defosforilado con fosfatasa alcalina para evitar su recircularización. El producto de PCR de la Hal se ligó al vector PRSET utilizando la T4 DNA ligasa. Para confirmar la correcta construcción del plásmido pRSET A-Hal se llevó a cabo un análisis con diferentes enzimas de restricción y un secuenciamiento nucleotídico del vector construido.

V.Transformación de las células de E.coli con el vector pRSET A-Hal. Se transformaron células E. coli JM109 competentes con el vector pRSET-Hal utilizando choque térmico.

Expresión de la Histidasa recombinante. El vector con el DNA insertado se propaga en una cepa de E. coli la cual no contiene la T7 RNA polimerasa que es necesaria para la expresión de la proteína codificada por el vector. En el momento de la expresión, la E. coli se infecta con el fago M13 que contiene el gen de la RNA polimerasa T7 cuya expresión esta regulada por el promotor lac. La infección se lleva a cabo en la presencia de IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) el cual induce el promotor lac y por lo tanto induce la expresión de la RNA polimerasa T7 del fago M13/T7. En la presencia de IPTG y el fago M13/T7, las células contienen altos niveles de RNA polimerasa T7 y por lo tanto permite la transcripción del vector pRSET lo que a su vez permite la expresión de la proteína recombinante que esta dirigida por el promotor T7.

ESTO ES UN DOCUMENTO
SALVO EN EL ARCHIVO

Cinética de inducción de la expresión de la histidasa. Con el objeto de obtener el tiempo óptimo de inducción para la máxima expresión de la histidasa se llevó a cabo una cinética de inducción. Primero se creció una colonia de *E. coli* recombinante (que contienen el pRSET A-Hal) en 2 ml de SOB + ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 37°C por toda la noche y después se tomaron 0.2 ml de este cultivo y se inocularon en 50 ml de SOB + ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Este cultivo se incubó a 37°C con agitación vigorosa hasta alcanzar una $\text{OD}_{600} = 0.3$. Se toma una alícuota de células antes de la inducción con IPTG y se centrifuga, el botón se congela a -20°C (tiempo cero). Se añadió IPTG a una concentración final de 1mM y se dejó crecer el cultivo en presencia de IPTG por una hora adicional determinando la OD_{600} . Posteriormente, las células se infectaron con el fago M13/T7 a una relación de 5pfu/célula basado en el título del fago determinado anteriormente. Se tomaron muestras de 1 ml a intervalos de 1 hora por 5 horas. Se centrifugó cada muestra y se guardó tanto el sobrenadante como el botón a 4°C. Después cada botón se resuspendió en 100 μl de amortiguador de fosfatos 20 mM a pH neutro y se congeló en metanol/hielo seco para posteriormente descongelarlo a 42°C. Se repitió este procedimiento por tres veces más. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a la máxima velocidad en una microcentrífuga. Los botones se resuspendieron en 100 μl de amortiguador de Laemmli y a 100 μl de los sobrenadantes se le añade el mismo volumen de amortiguador de Laemmli para determinar la cinética de expresión y la solubilidad de la proteína recombinante. Se corrió una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10%. Se tiñó el gel con azul Coomassie y se observó si aumentaba la intensidad en una banda que correspondiera al peso molecular de la histidasa. Al realizar la electroforesis se encontró que había una baja concentración de

proteínas presentes en los sobrenadantes pero era elevada en el precipitado. En la electroforesis de las proteínas insolubles a diferentes tiempos después de la inducción con IPTG se observó un aumento en la concentración de una proteína con el tiempo siendo máxima a las 5 horas de inducción. Esta proteína presentó un peso molecular de 49.5 kDa que es muy diferente al de la histidasa que es de 71.7 kDa. Con el objeto de ver si esta proteína era reconocida por el anticuerpo anti-Hal, se realizó una electroforesis de las proteínas insolubles a los diferentes tiempos de inducción, incluyendo tanto albumina e histidasa puras y después se llevó a cabo una transferencia en una membrana de nitrocelulosa como se describió anteriormente. Para verificar que la transferencia fuera completa se tiñó el gel con azul coomasie después de la transferencia. El anticuerpo anti-Hal no reconoce ninguna proteína del peso molecular de la histidasa en los diferentes tiempos de inducción y tampoco reconoce a la proteína que aumentó su concentración ninguno de los tiempos de inducción, sin embargo si reconoce a la histidasa nativa de hígado pura como a sus productos de degradación y además a una proteína de 62.5 kDa correspondiente a la histidasa recombinante, nueve kilodaltons menor que el peso molecular esperado de la histidasa. Estos resultados nos indican que probablemente la proteína histidasa sea tóxica para la E.coli y por lo tanto no la pueda expresar completamente ya que el anticuerpo anti-Hal si la reconoce. Además, ésta proteína mostró actividad biológica de histidasa, lo que indica que la síntesis de la histidasa recombinante incluye el residuo de dehidroalanina en su sitio catalítico ya que este residuo es esencial para la actividad de histidasa [27].

Purificación de la Histidasa recombinante. Para la purificación de la histidasa se utilizó una resina Probond (Invitrogen, Co) que contiene níquel

al cual se le unen los residuos de histidina de la proteína de fusión en un amortiguador de fosfatos 20 mM, 500 mM NaCl, 8 M Urea pH 7.8, mientras que la mayoría de las otras proteínas de la célula no se unen a esta resina. A continuación, las proteínas celulares se remueven con amortiguadores conteniendo urea 8 M, Na₂PO₄ 20 mM y NaCl 500 mM un pH de 6.0 a 5.5 mientras que la proteína recombinante se recupera por elución con el mismo amortiguador a pH 4.0.

En síntesis estos resultados sugieren que la proteína recombinante sufrió proteólisis endógena. El análisis de la electroforesis después del tratamiento de la región codificante de histidasa del pRSETA-Hal con enzimas de restricción y el secuenciamiento de esta región verificó la presencia de la secuencia correcta y también que el producto de PCR fue clonado en el marco de lectura abierto correcto.

A pesar de la carencia de un fragmento de 9.2 kDa de la región C-terminal, la proteína obtenida presentó actividad enzimática. La proteína recombinante perdió aproximadamente los últimos 83 aminoácidos los cuales representan 249 pb de la secuencia codificante. Estos resultados nos indican que esta porción de la proteína no es esencial para la actividad de la histidasa. Se ha reportado que la presencia de un residuo de dehidroalanina derivado de una serina localizada en la posición 254 de la secuencia de aminoácidos de la histidasa es esencial para la actividad de esta enzima [27], sin embargo, este residuo no se perdió en la histidasa recombinante truncada ya que esta serina se encuentra 321 aminoácidos arriba del sitio de rompimiento. La arginina 208 ha sido también potencialmente implicada como esencial para la actividad de histidasa y tampoco se perdió en esta proteína recombinante. En conclusión, la histidasa sobrepresada truncada con un peso molecular de 62.5 kDa fue reconocida por un anticuerpo específico contra la histidasa nativa pura,

manteniendo su actividad biológica a pesar de que pierde aproximadamente 12.6% de los aminoácidos en la región C-terminal indicando que esta porción de la proteína no es aparentemente esencial para su actividad enzimática.