1 196



ATR MERTING STERRORMACION

124239



UNIDAD XOCHIMILCO DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



"EXPRESIÓN DEL GEN DE LA TRANSAMINASA DE AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA MITOCONDRIAL EN HEPATOMA AS-30D DE RATA"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

M. S. P. GRACIELA GUADALUPE PEREZ VILLASEÑOR

CO-TUTORES: DR. ARMANDO R. TOVAR PALACIO DR. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ

ASESORA:

DRA. MA. EUGENIA TORRES MARQUEZ

MÉXICO, D.F.

FEBRERO DE 2006

ARCHIVO HISTORICO

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93 El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las

Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

M. S. P. Graciela Guadalupe Pérez Villaseñor

El día 28 de Febrero del año de 2006

Sinodales:

Dr. Humberto González Márquez (Presidente)

Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez (Vocal)

Dr. Armando R. Tovar Palacio (Secretario)

Wels Marg

Dra. Rocío Ortiz Muñiz (Vocal)

Dr. Jaime A. Bustos Martínez (Vocal)

u

COMITÉ TUTORAL:

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Humberto González Márquez

Profesor Titular "C". Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

Dr. Armando R. Tovar Palacio

Investigador Titular "C". Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel III

ASESORA:

Dra. María Eugenia Torres Márquez

Profesor Titular "C". Universidad Nacional Autónoma de México

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II.

SINODALES:

Dr. Jaime A. Bustos Martínez

Profesor Titular "C". Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco

Dra. A. Rocío Ortiz Muñiz

Profesor Titular "C". Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutriología Molecular del Departamento de Fisiología Celular de la División de Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Agradecimientos

Deseo expresar mi gratitud al Dr. Humberto González Márquez por el apoyo y confianza que en todo momento me brindó y en la realización de esta tesis.

Al Dr. Armando Tovar por la acertada dirección en este trabajo de tesis

A la Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez por haberme proporcionado la línea celular y su experiencia en el manejo de estas células.

Gracias al Dr. Javier Pérez Villaseñor por su amor filial y por sus valiosos comentarios, su experiencia y sus consejos en la revisión de esta tesis,.

Al Dr. Manuel Campuzano y al Dr. Ezequiel López Amor quienes con sus consejos y optimismo me llevaron a perseverar en la culminación de mi doctorado.

A los tesistas y asistentes del laboratorio de Nutriología Molecular por haberme habilitado en algunas metodologías y técnicas.

A Juan Carlos Contreras por su asistencia en la realización de los estudios de microscopía inmunoelectrónica

Al personal que labora en el bioterio.

A mis Maestros, que me participaron de sus conocimientos y experiencia A mis hermanos y hermanas políticos por ser parte de la familia. A Mis Sobrinos, por ser ellos Esperanza de Vida A Mis Amigos, por la generosidad de su amistad	travesia por los senderos del saber. Mi Reconocimiento:	A Mi Padre, que en su pronta partida dejó en mí, Vida (<i>in memoriam</i>). A Mi Madre (<i>in memoriam</i>), quien con Amor y Tenacidad me condujo por los caminos de la verdad y del esfuerzo. A Mis Hermanos, quienes con su ejemplo y cariño posibilitaron mi
--	--	---

1. Resumen

La transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (TAACR) es la primera enzima en el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (AACR). A diferencia de otras enzimas catabólicas de aminoácidos presentes en el hígado, la TAACR sólo se expresa en tejidos extrahepáticos, y no se regula por la proteina de la dieta, ni por hormonas como el glucagon o glucocorticoides. Sin embargo, la isoforma mitocondrial (m) de la TAACR se expresa abundantemente en el hígado fetal y disminuye rápidamente después del nacimiento. El propósito de este trabajo fue establecer si las células de hígado bajo condiciones de rápida proliferación celular, como en las células AS-30D de hepatoma de rata y durante la regeneración del hígado posterior a hepatectomía parcial en rata, presentan un aumento en la actividad y expresión de la TAACRm. La actividad de la TAACR en mitocondrias de células AS-30D fue 18.6 mU/mg proteína. Análisis por Western, Northern blot e inmunohistoquímica revelaron que las células AS-30D de hepatoma expresan únicamente TAACRm. La Km aparente de TAACRm en células AS-30D aisladas, para leucina, isoleucina y valina fue 1.0 ± 0.02 , 1.3 ± 0.1 y 2.1 ± 0.1 respectivamente. El hígado, durante la regeneración, mostró actividad de TAACRm a partir del día 3 al día 6, y la actividad máxima (7.0 mU/mg proteína) fué el día 5. Al día 14 posterior a la hepatectomía parcial la actividad y expresión de la TAACRm no se detectó. Interesantemente, hubo una relación entre la actividad de la TAACRm y la Mr (Masa molecular relativa) de la banda inmunoreactiva de la TAACRm. La presencia de una banda de 41kDa se asoció con la actividad de TAACR, mientras que la banda de 43kDa se asocia con la

viii

proteína inactiva. Los resultados de este estudio indican que la actividad de la TAACRm es necesaria bajo condiciones de rápida proliferación celular en el hígado adulto normal, no sólo en el metabolismo energético y en la síntesis de proteínas, sino posiblemente como factor trasncripcional durante la expresión de algunos genes.

Palabras clave: aminoácidos de cadena ramificada, transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada, células AS-30D, hepatectomía, hígado.

2. Abstract

Branched chain aminotransferase (BCAT) is the first enzyme in the catabolism of branched chain amino acids (BCAA). Unlike other amino acid degrading enzymes present in liver, BCAT is only expressed in extrahepatic tissues, and is not regulated by dietary protein, glucagon or glucocoticoids. However, the mitochondrial (m) isoform of BCAT is highly expressed in the fetal liver and rapidly decays after birth. The purpose of the present work was to establish if liver cells under conditions of rapid cell proliferation such as in hepatoma AS-30D cells or during liver regeneration after partial hepatectomy were associated with an increase in the activity and expression of BCATm. BCAT activity in mitochondria of AS-30D cells was 18.6 mU/mg protein. Western, Northern blot, and inmunohistochemical analysis revealed that AS-30D hepatoma cells expressed only BCATm. The apparent Km of BCATm in isolated AS-30D hepatoma cells mitochondria for leucine, isoleucine and valine was 1.0 ± 0.02 , 1.3 \pm 0.1 and 2.1 \pm 0.1 nM, respectively. The regenerated liver showed BCATm activity from day 3 to day 6, having a maximum of (7.0 mU/mg protein) on day 5. By day 14 after partial hepatectomy BCATm activity and expression was almost indetectable. Interestingly, there was a relationship between BCATm activity and the reactive Molecular Mass (Mr) of the inmunoreactive band of BCATm The presence of a 41kDa band was associated with BCATm activity, whereas the 43kDa band with undetectable activity. The results of this sudy indicate that BCATm activity is required in liver cells under conditions of rapid cell proliferation.

Х

Keywords: Branched chain amino acids; Branched chain amino transferase;

AS-30D cells; Hepatectomy; Liver.

3. Índice

1		Resumen	viii
2		Abstract	x
3		ndice	xii
4		Abreviaturas	xv
5		ntroducción y An	tecedentes1
	5.1	Metabolismo	de los aminoácidos de cadena ramificada 2
		5.1.1. Estimulad	ión de la síntesis de proteínas2
		5.1.2. Producció	n de energía2
	5.	2. Donadores d	le nitrógeno de novo para la producción de alanina y
glutan	nin		
	5.	8. Catabolismo	de aminoácidos de cadena ramificada5
	5.	. Aminotransfe	erasa de los aminoácidos de cadena ramificada9
	5.	. Isoformas de	la TAACR10
	5.	6. Especificidad	de sustrato13
	5.	. Genes que c	odifican las isoformas de TAACR14
	5.	. Km de las TA	ACR
	5.	Distribución	de la TAACR en los tejidos15
	5.	0. Estudios sob	re la regulación de la TAACRm en ratas19

5.1	11.	Infecciones o estados catabólicos del organismo2	20
6.	Just	tificación2	26
7.	Hipo	ótesis	28
8.	Obj	etivo General	29
9.	Obj	etivos específicos	29
10.	M	lateriales y Métodos	30
10).1.	Obtención de células AS-30D a partir de líquido ascitis	30
10).2.	Aislamiento de mitocondrias a partir de células AS-30D	30
10).3.	Hepatectomía del 70% parcial en rata	31
10).4.	Actividad de la aminotransferasa de aminoácidos de cader	na
ramificad	la.		31
10).5.	Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS	32
10).6.	Inmunoblot	33
10).7.	Aislamiento de ARN total y análisis Northern blot	33
10).8.	Histología, Inmunohistoquímica y Microscopía inmunoelectrónica.	
			34
10).9.	Análisis estadístico	36
11.	R	esultados	37
11	.1.	TAACRm ARNm y actividad en células AS-30D de hepatoma 3	37

	11.3.3.	Inmunohistoquímica	de	la	TAACRm	del	hígado	en
regene	ración c	lespués del 5º día de o	perac	ción.				45
12.	Discu	sión						. 47
13.	Concl	lusiones						. 50
14.	Persp	ectivas						. 52
15.	Refer	encias						. 54
16.	Artícu	llo						. 65

4. Abreviaturas

	AACR:	Aminoácidos de Cadena Ramificada				
	CACR:	Cetoácidos de Cadena Ramificada				
	TAACR:	Transaminasa de Aminoácidos de Cadena Ramificada				
	TAACRm:	Transaminasa de Aminoácidos de Cadena Ramificada				
Mitod	condrial					
	TAACRc:	Transaminasa de Aminoácidos de Cadena Ramificada				
Citos	ólica					
	DCCR:	Deshidrogenasa de Cetoácidos de Cadena Ramificada				
	ARNm:	Acido ribonuleico mensajero				
	ADNc:	Acido desoxiribonucleico copia				
	BSF:	Buffer salina-fosfatos				
	CHAPS:	3-Cloroamidopropil(dimetilamonio)-1-propansulfonato				
	EGTA:	Etilén Glicol bis-b(aminoetileter-N,N,N, tetra-acetico acido)				
	HSE:	Hepes-Sacarosa-EGTA				
	IgG:	Inmunoglobulina G				
	H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno				
	NH₄CI :	Cloruro de Amonio				
	SDS:	Sodio-dodecil-sulfato				

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de Sodio-dodecil-sulfato-poliacrilamida

- SSC: Solución salina-citratos
- Sm³³: Radioisótopo del Samario

Sm³³ Ab Anti TAACRm: Anticuerpo Anti TAACRm conjugado con Sm³³

5´(α-³²P)dCTP: Desoxicitidina trisosfato marcado con fósoforo 32.

- TRIZsol: Kit de tiocianato de guanidina para obtención de ARN.
- Km: Constante de Michaelis
- Kaf: Constante de afinidad
- P_M: Peso Molecular
- Mr: Masa molecular relativa
- rpm: Revoluciones por minuto
- µM: MicroMolar
- nM: NanoMolar
- Ci/mmol: Curies/milimoles
- MDE: Media de la desviación estándar
- U: µmol (1-¹⁴C)Leu formada/min a 37°C
- mU/mg prot: miliUnidades/mg de proteína. Actividad enzimática
- pb: pares de bases

5. Introducción y Antecedentes

La primera etapa del catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (AACR) es una transaminación reversible catalizada por la enzima transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (TAACR: EC 2.6.1.42). Esta enzima puede aceptar grupos aminos provenientes de leucina, valina o isoleucina y transferirlos al α -cetoglutarato para formar los respectivos α -cetoácidos de cadena ramificada y glutamato. Los α -cetoácidos de cadena ramificada pueden ser re-aminados en la mitocondria para formar sus respectivos aminoácidos (11, 14) o bien pueden ser descarboxilados irreversiblemente por el complejo enzimático de la deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada. Existen dos isoenzimas de la TAACR, las cuales son codificadas por genes separados (38, 42) y son específicos para los tres AACR (4, 8, 26, 45). Una isoforma se localiza en el citosol (TAACRc) y la otra en la mitocondria (TAACRm) (8). La TAACRm se encuentra en la mayoría de los tejidos en rata, excepto en el hígado (8, 11) mientras que la TAACRc se encuentra sólo en cerebro, placenta y ovario

Los AACR son oxidados solamente en el hígado en comparación con el resto de los aminoácidos que principalmente son degradados en este órgano (1). El ARNm de TAACRm se expresa en el hígado fetal de rata al día 17 de gestación y disminuye abruptamente después del nacimiento a niveles indetectables por análisis de Northern blot (67). Sin embargo, análisis por RT-PCR usando ARNm de hígado adulto de rata se obtiene un producto amplificado (67) cuya secuencia es idéntica a la TAACRm de corazón (38), indicando que en hígado adulto de rata es escaso el ARNm de TAACRm. Análisis por Western blot usando un anticuerpo

específico contra la TAACRm de corazón revelan en la mayoría de los tejidos una banda con un P_M de 41kDa (26) que corresponde al tamaño de la TAACRm establecida por la secuencia de su cADN. En el hígado fetal, este anticuerpo detectó una proteína de 43kDa en adición a la proteína de 41kDa. Interesantemente, en hígado adulto solamente se detecta la proteína de 43kDa (67), esto indica que la proteína está inactiva, aunque se sabe que es una enzima constitutiva.

5.1. Metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada.

Los aminoácidos de cadena ramificada (AACR), leucina, isoleucina y valina son esenciales para los seres vivos, por lo que deben obtenerse a través de los alimentos. Estos aminoácidos forman alrededor del 50% de los aminoácidos indispensables provistos por la dieta, de ahí que no existen enfermedades asociadas con su deficiencia. Asimismo, componen aproximadamente el 52 % de las proteínas del músculo (1, 2). Los AACR libres intervienen en diferentes funciones:

5.1.1. Estimulación de la síntesis de proteínas.

El suministro de leucina en animales sometidos a ejercicio exhaustivo o en ayuno (condiciones que favorecen el catabolismo), estimula la síntesis de proteínas (2, 3)

5.1.2. Producción de energía.

El catabolismo de los AACR genera energía, así la leucina y la isoleucina producen 40 moles de trifosfato de adenosina (ATP) por mol de aminoácido,

mientras que la oxidación de la valina genera la mitad. La aportación de energía provista por los AACR es igual a la producida por la tirosina y la fenilalanina (aminoácidos que generan grandes cantidades de ATP), sin embargo, éstos últimos no son tan abundantes como los de cadena ramificada (4). El catabolismo excesivo de AACR puede producir desequilibrios metabólicos que se observan en algunos padecimientos. Por ejemplo, en pacientes con cirrosis hepática la concentración de AACR disminuye en la sangre debido a que el músculo aumenta la degradación de éstos (por la activación de la deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada (DCCR)) para producir más energía, y como consecuencia se puede presentar un desequilibro de neurotransmisores en el cerebro, lo que puede dar origen a un coma hepático (5).

5.2. Donadores de nitrógeno de novo para la producción de alanina y glutamina

Cuando el organismo se encuentra en un estado catabólico, el músculo libera aminoácidos para compensar la pérdida de éstos en otros órganos, principalmente se liberan alanina y glutamina (6). La producción de estos aminoácidos se ha relacionado con los AACR de la siguiente manera: en condiciones catabólicas los AACR son rápidamente transaminados con el α-cetoglutarato para producir glutamato. El glutamato captura amonio por medio de la glutamina sintetasa formando glutamina. Además, el glutamato puede transaminarse con el piruvato para formar alanina. Los aminoácidos liberados en mayor concentración a la circulación sanguínea son la alanina y glutamina, los cuales transportan el nitrógeno al hígado y pueden ser utilizados como fuente de

energía. Asimismo se ha sugerido que la pérdida de glutamina del músculo disminuye la síntesis de proteínas en el hígado (7).

De los 3 aminoácidos de cadena ramificada el más abundante es la leucina (8). La leucina posee características particulares. Por ejemplo se sabe que leucina regula la actividad de la glutamato deshidrogenasa y de la ornitina-cetoácido aminotransferasa, las que regulan la cantidad de α -cetoglutarato y glutamato (9). La isoleucina se ha visto que en menor grado puede regular a la glutamato deshidrogenasa; sin embargo, la leucina y la isoleucina ejercen un efecto aditivo en esta regulación. Además, condiciones de acidez también controlan la actividad de la enzima (10). La leucina incrementa la oxidación de isoleucina y valina, mientras que la isoleucina y valina no afectan la degradación de leucina (11). Este efecto se ha descrito como el antagonismo de los aminoácidos de cadena ramificada aunque su mecanismo no se ha esclarecido completamente. La leucina y su correspondiente cetoácido, el α-cetoisocaproato (CIC), se han asociado con la estimulación de la producción de insulina en las células pancreáticas (12); es importante mencionar que la leucina tiene un mayor efecto sobre la producción de esta hormona que el CIC. Por otro lado, se sabe que en el proceso de degradación de la valina se genera un metabolito tóxico, el metilacrilil-CoA, que reacciona con los grupos tioles libres de proteínas y con el glutatión reduciendo su actividad biológica. Este metabolito se elimina por acción de las enzimas crotonasa y la 3-hidroxiisobutinil-CoA hidrolasa (5). In vitro se ha observado que la deficiencia de AACR afecta a células de la respuesta inmune. Linfocitos B

humanos transformados con el virus de Epstein Barr en ausencia de AACR, detienen su crecimiento en la fase G1 del ciclo celular (13).

5.3. Catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada.

A diferencia del resto de los aminoácidos, los AACR comparten las dos primeras etapas en su ruta de degradación. El primer paso de su catabolismo es una transaminación reversible (11) a sus correspondientes α -cetoácidos de cadena ramificada (CACR), donde el grupo α -amino de los AACR es transferido al carbono α del aceptor fisiológico, el α -cetoglutarato. Aunque también se puede transferir el α -amino al α -ceto β -metilbutirato y al α -cetobutirato (1). Los productos de la transaminación son el glutamato y los correspondientes CACR que son el acetoisocaproato (CIC) en el caso de leucina, el α -ceto β -metilvalerato (CMV) en la isoleucina y el α-cetoisovalerato (CIV) en la valina. Esta reacción es catalizada por la aminotransferasa de los aminoácidos de cadena ramificada (TAACR EC 2.6.1.42) localizada en el citoplasma y mitocondria de órganos extrahepáticos (14, 15). El mecanismo de la reacción de transaminación está clasificado como de ping-pong (16). Este tipo de reacciones ocurren en dos etapas, que a su vez comprenden varias subetapas. En el caso de la TAACR se lleva acabo de la siguiente manera: la lisina del sitio activo de la TAACR se encuentra unida al fosfato de piridoxal (FP) de forma covalente. La unión formada entre el grupo aldehído del FP y el grupo
-amino de la lisina, -CH=N-, se denomina base de Schiff. Cuando un aminoácido sustrato está cerca del sitio activo de la enzima, su grupo amino desplaza al grupo amino de la lisina proveniente de TAACR. En consecuencia se forma la base de Schiff entre el aminoácido sustrato y el FP; a 5

ARCHIVO HISTORICO

esta especie química se le llama aldimina, en la que la doble ligadura está entre el nitrógeno del amino proveniente del aminoácido sustrato y el carbono del grupo aldehído del FP. Posteriormente la doble ligadura de la especie cambia de posición produciendo una cetimida (la doble ligadura está entre el nitrógeno y el carbono del aminoácido sustrato). A continuación se produce la hidrólisis de la cetimida liberando un α-cetoácido y produciéndose un fosfato de piridoxamina. En las siguientes etapas ocurren las reacciones inversas a la formación del cetoácido, puesto que la enzima ahora recibe un cetoácido, para dar origen a un segundo aminoácido.

El objetivo de la reacción de transaminación es transferir los grupos amino de los aminoácidos al α -cetoglutarato para formar L- α -glutamato. El glutamato tiene varias funciones como son: la síntesis de glutamina y aspartato que son importantes aceptores de nitrógeno, la síntesis de monofosfato de adenosina (AMP) y monofosfato de inosina (IMP) a través del ciclo del nucleótido de purina. Además, participa como neurotransmisor para estimular algunos canales iónicos en el cerebro, e interviene en la eliminación del nitrógeno proveniente de los diferentes aminoácidos en forma de urea (17). El glutamato como grupo aceptor se puede originar del α -cetoglutarato, a través de la glutamato deshidrogenasa que se encuentra en la mitocondria. La transaminación en el caso de TAACR se puede considerar importante, ya que por medio de esta reacción se puede controlar la concentración de AACR disponibles (18).

Los CACR pueden ser re-aminados a sus respectivos aminoácidos, o ser descarboxilados irreversiblemente. Los productos de la descarboxilación son

derivados de CoA con un carbón menos debido a la liberación de una molécula de bióxido de carbono. Este paso es catalizado por la DCCR, la cual es un complejo multienzimático que está formado por 3 subunidades catalíticas asociadas por interacciones no covalentes: (A) descarboxilasa de los cetoácidos de cadena ramificada (E1b) formada por dos subunidades α (47 kDa cada una) y dos β (38 kDa cada una), que contienen a la tiamina pirofosfato como grupo prostético; (B) la dihidrolipoil transacilasa (E2b) con lipoato como grupo prostético con una masa de 51 kDa; y (C) la dihidrolipoil deshidrogenasa (E3b) que contiene el dinucleótido de flavina y adenina como grupo prostético localizado en la superficie interna de la membrana mitocondrial, con una masa de 55 kDa (25). Además, existen otros grupos prostéticos que se requieren para la actividad de la enzima, la coenzima A y el dinucleótido de nicotinamida y adenina; también se requiere de calcio y magnesio. La afinidad de la DCCR varia dependiendo del sustrato, el CIC es el este complejo (19). Posteriormente los productos de la más afín a descarboxilación oxidativa por la DCCR siguen diferentes rutas de oxidación, a través de un complejo de enzimas similares a las involucradas en la oxidación de ácidos grasos, donde los productos resultantes se pueden incorporar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (1, 19) Las alteraciones en esta enzima producen la enfermedad llamada "jarabe de arce", que es un error genético caracterizado por la baja o ausencia de actividad de DCCR. En el padecimiento de jarabe de arce se acumulan los AACR y sus cetoácidos correspondientes. Algunos de los síntomas que muestran los pacientes con esta enfermedad son retardo mental y físico que pueden producir coma y la muerte.

En rata la actividad de la DCCR es alta en hígado, intermedia en riñón, estómago y corazón, y baja en músculo esquelético, tejido adiposo y cerebro (1). Por tal motivo, la descarboxilación oxidativa de los CACR principalmente se lleva a cabo en el hígado de este organismo (20).

La regulación de la DCCR es más compleja en la etapa adulta debido a cambios hormonales y cambios en la dieta (21). Uno de los principales mecanismos de regulación de la DCCR es la fosforilación de la enzima, específicamente en los residuos de serina 293 y serina 303 de la subunidad E1b. Cuando la DCCR está fosforilada es inactiva mientras que desfosforilada es activa. La enzima encargada de la fosforilación es la cinasa de la DCCR (22). La cinasa se encuentra en altas concentraciones en la mitocondria de músculo esquelético adulto en rata y ratón, mientras que en hígado la cantidad de esta cinasa es muy baja, y en corazón, riñón y cerebro se presenta una cantidad intermedia. La cinasa es inhibida por el α -cetoisocaproato, el α -cloroisocaproato y el clofibrato, y es activada por potasio y fosfato inorgánico (23).

Las concentraciones elevadas de NADH, de los tioésteres de CoA y ATP, una dieta baja en proteínas, la carencia de AACR y los productos de la deshidrogenación regulan negativamente a la DCCR. Mientras que factores como los glucocorticoides la regulan positivamente. El sexo del organismo así como el ritmo diumo tienen efecto sobre la enzima. Por ejemplo durante el día, la DCCR es activa en hembras y machos, mientras que en la noche la enzima en hembras es inactiva y en machos es activa (13, 19, 24, 25).

Los dos productos finales de la degradación de la leucina son el acetoacetato y la acetil-CoA, los cuales permiten considerar a este aminoácido como cetogénico. Los productos de la degradación de la isoleucina son la propionil CoA y la acetil CoA. La propionil CoA es el único producto de la degradación de la valina, y se transforma a succinil CoA por medio de la metilmalonil CoA mutasa. La succinil CoA se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos para producir posteriormente oxaloacetato, el cual, por medio de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa, es convertido en fosfoenolpiruvato y así entra a la vía de la gluconeogénesis. Por lo tanto la isoleucina es un aminoácido cetogénico y gluconeogénico, mientras que la valina es sólo gluconeogénico (17).

5.4. Aminotransferasa de los aminoácidos de cadena ramificada.

La TAACR se encuentra en las diferentes especies, en donde la mayoría de los casos conserva el patrón de distribución de ésta. Muchas de las características de distribución, actividad y estructura de la enzima varían entre las especies (26-30), por ejemplo la actividad de TAACR en rata es 10 veces más alta que en humano como se muestra en la Tabla 1. (20). Es importante mencionar que el músculo esquelético de rata es el principal órgano donde se lleva a cabo la transaminación de los AACR, aun cuando la actividad de la enzima es baja en el músculo. Este hecho tiene su explicación en la masa corporal de este órgano (el músculo representa alrededor del 40% de la masa corporal). Hay autores que consideran la disponibilidad de la enzima (31). Igual que para el caso de la DCCR, existen reportes de variaciones en la actividad de la TAACR asociadas con

el sexo del organismo; por ejemplo, en músculo esquelético de machos la actividad de TAACR es más alta que en hembras (32).

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

Tabla 1. Distribución de la actividad de TAACR en Rata, Humano y Mono (U/ g de peso húmedo)

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

5.5. Isoformas de la TAACR

Los primeros reportes de la transaminación de aminoácidos de cadena ramificada fueron en extractos de bacteria (33), donde la enzima interviene en la biosíntesis de los AACR y en su degradación. A partir de *Salmonella typhimurium* se cristalizó la TAACR, y se observó que la estructura de la enzima es un hexámero. En *Escherichia. coli* existen varias transaminasas denominadas A (sustrato: leucina y aminoácidos aromáticos), B (sustrato: AACR) y C (sustrato: valina y piruvato) (34, 35). En la transaminación se obtienen productos que sirven para la generación de energía metabólica, regulación de la relación NADH/ NAD⁺ y el reciclaje de glutamato a partir de α -cetoglutarato (36).

Como se mostrará a continuación en el caso de los mamíferos, la TAACR posee diferentes características de su homóloga en bacterias. En 1966 se purificó

la proteína, y en un principio se determinó la presencia de 3 isoformas de TAACR designadas como I (mitocondrial), III (citosólica) y II. La enzima II se localizaba exclusivamente en el hígado adulto y sólo utilizaba como sustrato a la leucina con una Km de 25mM lo que indicaba una baja afinidad de la enzima por el sustrato. La Km representa la concentración de sustrato a la cual una enzima alcanza la mitad de la velocidad máxima. Su significado biológico está asociado con la afinidad de la enzima por los sustratos, así si una enzima tiene un Km pequeño para cierto sustrato, el sustrato es muy afín a la enzima, y ocurre lo contrario si la Km es grande. Posteriormente se ha demostrado que la isoenzima II no existe, y que posiblemente la actividad de transaminación de AACR se debiera a que otra enzima pudiera utilizar estos aminoácidos como sustratos con muy baja afinidad. Actualmente sólo se reconocen dos isoformas, la mitocondrial y la citosólica. Las proporciones de las dos isoformas de TAACR varían de tejido a tejido (1). La secuencia madura de TAACR mitocondrial en rata conserva un porcentaje de identidad de 82%, 95% y 45% con la de humano, el ratón y eucariontes más sencillos, respectivamente (29, 30, 37, 38). Aunque en la actualidad no se tiene claro por qué se requiere de dos isoenzimas, algunos autores consideran las siguientes funciones de cada una de las isoformas. La TAACRm es empleada en el metabolismo oxidativo, ya que está en el mismo lugar que la DCCR (en mitocondria).

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

que al introducir la enzima de TAACRm en las mutantes, Bap2, se restablece la actividad de transportador ABC. Por otro lado, estudios sobre el transportador de CACR que está en mitocondria de corazón de rata, han mostrado que el transportador comparte algunas de las características con la TAACRm, por lo que se sugiere que estas dos proteínas son la misma. Se ha demostrado que las cisteínas son esenciales tanto para la actividad enzimática de TAACRm como para el transporte de CACR a la mitocondria (39). En el caso de la TAACR citosólica solo posee la actividad de transaminación, y en el cerebro se ha asociado con el balance de nitrógeno (40).

La proteína de TAACRm en rata tiene 365 aminoácidos. La longitud total de ARN mensajero es 1.7 kb, asimismo posee 27 aminoácidos que codifican una secuencia que permite su direccionamiento hacia la mitocondria. El corte de esta secuencia de direccionamiento ocurre entre una cisteína y una valina que es precedida por una arginina en la posición -2. El peso molecular de la proteína madura calculado a partir de su ADN complementario (ADNc) es de 41.3 kDa, que coincide con el peso de la proteína aislada del extracto mitocondrial de corazón de rata determinado por SDS-PAGE (41,500 Da) (41, 42). El peso molecular de la enzima no procesada es de 43 kDa. La enzima pertenece al grupo de enzimas dependientes de fosfato de piridoxal que incluyen a la 4-amino-4-desoxicorismato liasa y a la D-aminoácido transferasa (D-AAT) (38). En el caso de la TAACRc, ésta contiene 410 aminoácidos con un peso molecular de 46 kDa (42).

En lesiones de cerebro, específicamente en la sustancia nigra, se ha visto un aumento en la expresión de la TAACRc y se ha postulado que la expresión de

esta enzima está asociada con una etapa inicial en la apoptosis, aunque no ha sido confirmado (40, 43, 44).

5.6. Especificidad de sustrato.

Los sustratos de la TAACRc y la TAACRm son semejantes (19). En concentraciones iguales de AACR las tasas de transaminación son: la leucina mayor que la isoleucina y, esta última, mayor que la valina (Leu > Ile > Val). Otros sustratos de las TAACR's son la L-treoisoleucina que es preferida sobre la L-aloisoleucina, norleucina y norvalina. La metionina no es un buen sustrato de la enzima, ya que sólo transamina menos del 10% comparada con leucina. La TAACRm acepta también como sustratos al α -aminobutirato y α -aminoadipato (15, 45). En la Tabla 2 se muestran los diferentes sustratos de las isoformas de TAACR.

Aminoácido	TAACRo	TAACBm	Cetoácido	TAACBo	TAACBm
Ammoduluo			Celuacido		
	(%)	%		%	%
Leucina	100	100	CIC	100	100
Valina	71 <u>+</u> 3	88 <u>+</u> 4	CIV	82 <u>+</u> 4	64 <u>+</u> 3
L-	136 <u>+</u> 7	128 <u>+</u> 5	CMV	54 <u>+</u> 5	68 <u>+</u> 1
Treoisoleucina					
L-Aloleucina	52 <u>+</u> 2	39 <u>+</u> 1	α-	76 <u>+</u> 4	68 <u>+</u> 4
			cetoglutarato		
D-Isoleucina	5+1	1+1	α-	43+4	44+2
	_	_	cetocaproato	—	_
Glutamato	29 <u>+</u> 3	29+1	α-cetovalerato	58 <u>+</u> 4	56 <u>+</u> 1
Norleucina	24+3	21 <u>+</u> 1	α-cetobutirato	22+4	20+3
Norvalina	27+1	37+1	α-ceto-β-	36+1	40+3
	-	—	metilbutirato	—	—
Metionina	8+1	6+1	Piruvato	6+2	6+1
Triptofano	2+1	1+0	Fenilpiruvato	4+2	6+1

Tabla 2. Tasas de transaminación de TAACRc y TAACRm expresadas en relación a leucina en rata.

Tomado de Hall et al, 1993. La TAACRc (79.3 µmol de leucina formada/ mg de proteína/ min) y la TAACRm (86.7 µmol de leucina formada/mg de proteína/ min).

5.7. Genes que codifican las isoformas de TAACR.

En el genoma de la rata las isoformas de transaminasa se encuentran localizadas en los siguientes cromosomas: en el cromosoma 1 se ubica la isoforma mitocondrial, mientras que en el cromosoma 4 está la isoforma citosólica (26, 38). En cuanto a la estructura del gen de la TAACRm, se sabe que posee 9 exones separados por 8 intrones, como se muestra en la Figura 1 y se tienen las medidas de algunos intrones. En el caso del gen de TAACRc tiene 11 exones y 8 intrones. Los arreglos de los genes se muestran en la misma Figura 1.



TAACEm

Figura 1. Estructura del gen de TAACRm (A) y del gen TAACRc (B) en rata. Los cuadros representan a los exones y las líneas corresponden a los intrones.

5.8. Km de las TAACR.

La TAACRm se purificó a partir de mitocondrias de corazón de cerdo, mientras que la citosólica se purificó del sobrenadante de cerebro de cerdo, sobrenadantes de hígado y hepatoma de rata (46, 47). Existen diferencias entre las isoformas en su afinidad por los sustratos, estas diferencias se pueden observar al analizar las Km. La Km de la TAACRm es de 0.4 a 0.8 mM para la leucina e isoleucina y de 1.2 a 2.5 mM para la valina; mientras que para la TAACRc es aproximadamente 2 veces más bajo que la de TAACRm. Estos valores son de 2 a 6 veces la concentración fisiológica de leucina e isoleucina

5.9. Distribución de la TAACR en los tejidos.

La TAACRm es una enzima ampliamente distribuida en los órganos extrahepáticos, mientras que la TAACRc su distribución es restringida a cerebro, ovario y placenta. La actividad de la TAACRm en rata es variable dependiendo del órgano, por ejemplo el corazón y el páncreas son los órganos de mayor actividad, mientras que el hígado adulto tiene la actividad más baja como se muestra en la Tabla 3 (14, 48).

Estudios recientes (49) de la localización de las isoformas en ratas muestran que la TAACRm se encuentra en el tubo digestivo, incluyendo esófago, duodeno y glándulas salivales (la actividad fue entre 24 y 40 % comparándola con la de páncreas), las células epiteliales que revisten el estómago poseen grandes cantidades de la TAACRm; mientras que la actividad más baja fue encontrada en yeyuno, ileon y colon, los cuales presentan del 5 a 8 % de los niveles

pancreáticos. Considerando los tipos celulares que poseen la transaminasa, los autores sugieren que la enzima se encuentra en células que producen enzimas. Se examinó la presencia de TAACRm en otros órganos como corazón (microfibras), riñón (células epiteliales de la corteza con altas concentraciones de la enzima, y glomérulos con baja concentración), páncreas (alta concentración en células acinares, y menor en islotes), testículos (células de Leydig), vaso, útero (células epiteliales secretoras), pulmón (epitelio alveolar y bronquial), timo, tracto reproductivo femenino (en los folículos ováricos). Por otro lado, en este estudio se pensaba que la TAACRc, se encontraba distribuida en otros órganos. Al emplear anticuerpos específicos para la isoforma citosólica, se observó, por ejemplo, que el estómago tiene la TAACRc, específicamente en los nervios que lo irrigan. Lo mismo ocurrió para otros órganos que presentaban la isoforma. Con estas investigaciones se corrobora que la TAACRc solo está en las neuronas del tejido cerebral(49).

Tabla 3. Actividad de la TAACRc y la TAACRm en mitocondria y citosol de

los diferentes órganos y células.

Tejido	Actividad TAACR	Efecto de anticuerpo en la		
	(nmol/mg de	actividad de TAACR		
	proteína/min	TAACRm y TAACRc		
		% de actividad permanente		
Mitocondria				
Corazón	748 <u>+</u> 15	0 100		
Mezcla de músculo	334 <u>+</u> 35	0 100		
Riñón	411 <u>+</u> 6	0 100		
Páncreas	5055 <u>+</u> 505	0 100		
Hígado adulto	1 <u>+</u> 0	3 100		
Hígado fetal	264 <u>+</u> 15	0 100		
Cerebro	73 <u>+</u> 6	68 33		
Placenta	180-215	0 100		
Ovario	191-216	0 92		
Citosol				
Cerebro	75 <u>+</u> 8	100 0		
Cerebro fetal	25-31	NM		
Placenta	8-9	100 14		
Ovario	51-60	79 26		
Células				
Cortical primario	64-72	NM		
Astrocitos tipo I	95	NM		
Hepatocitos	0.15 <u>+</u> 0.01	NM		
Hepatoma	6.67 <u>+</u> 1.04	0 100		

En la tabla se presenta la actividad de la enzima en los órganos y células, la cual se verifica con el uso de anticuerpos específicos para cada isoforma. NM: No medido

La TAACRc se creía que era la única isoforma de transaminasa existente en cerebro, sin embargo, en estudios realizados con astrocitos se detecta la presencia de la TAACRm, ambas con actividad específica similar Además se sabe que la entrada de leucina a cerebro es mayor que la de otros aminoácidos. Cuando entra la leucina a los astrocitos se libera glutamina, este intercambio es importante en el ciclo de la glutamina/glutamato en cerebro. Como los AACR en

astrocitos son principalmente transaminados más que oxidados, se les ha considerado como donadores de nitrógeno (50). La interacción entre los astrocitos y las neuronas es de la siguiente manera: los AACR entran a los astrocitos, donde sufren una transaminación (TAACRm) y su grupo amino es enviado al αcetoglutarato para dar origen al glutamato, que posteriormente se transforma en glutamina. Ya que los cetoácidos formados son pobremente oxidados en células astrocíticas, éstos son enviados a las neuronas junto con la glutamina formada. En este tipo celular, la glutamina se desamina por acción de la glutaminasa produciendo glutamato, el cual (solo una parte) junto con los α-cetoácidos de cadena ramificada son transaminados (TAACRc) dando origen a los respectivos AACR. El a-cetoglutarato producido en las neuronas experimenta una aminación reductiva a glutamato via glutamato deshidrogenasa. Los AACR y el glutamato restante son posteriormente enviados a astrocitos. El astrocito de nueva cuenta enviará la glutamina y el α -cetoácido de cadena ramificada a las neuronas (44). Los intercambios de aminoácidos entre los dos tipos celulares se han asociado con el ciclo de glutamato/ glutamina. El glutamato es un aminoácido excitatorio, de tal manera que es liberado por las neuronas dentro del espacio sináptico durante la actividad neuronal, el glutamato es rápidamente removido por astrocitos cercanos para producir glutamina. La glutamina de los astrocitos es posteriormente enviada a las neuronas, y así mantener la poza metabólica de glutamato en estas células (40, 51).

Existen reportes sobre la presencia de TAACR tanto mitocondrial como citosólica en células espermatogénicas y espermatozoides de ratones. Montamat

apoya la evidencia de que la transaminasa puede funcionar como un sistema de transporte de α-cetoácidos del citosol a la mitocondria en las células espermáticas (52).

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

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

Disponibilidad de sustratos. La actividad de transaminasa según algunos investigadores era modificada de acuerdo a la concentración de AACR y de los cetoácidos que aceptan el grupo amino de los aminoácidos (1, 14). En experimentos de riñón prefundido con 2mM de α -cetoisocaproato de sodio, un ceto análogo de leucina, produjo un incremento en la actividad de TAACR a los 5 minutos alcanzando un máximo a los 15 minutos (53). Esto llevó a pensar que la enzima podía ser regulada por la dieta; estudios realizados por Chan y Walser (54) mostraron que en ratas con una dieta en CACR se incrementaba la actividad de transaminasa en diferentes órganos.

El efecto de la dieta. La regulación de la transaminasa es controvertido. Estudios recientes (55) en ratas con diferentes concentraciones de proteína demuestran que la dieta no tiene un efecto importante en la regulación del gen de TAACRm, y sólo en músculo se observó un ligero incremento de la actividad y
cantidad de ARNm de TAACRm con una dieta conteniendo 50% de caseína. Las hormonas como el glucagon (control: 8.1 ± 0.7 y hormona: 9.3 ± 0.5 mU/ mg de proteína) y la hidrocortisona (control: 9.1 ± 0.8 y hormona: 9.3 ± 1.0 mU/ mg de proteína), tampoco muestran un incremento en la expresión de la enzima.

5.11. Infecciones o estados catabólicos del organismo.

El tratamiento con endotoxina (lipopolisacárido de *S. enteritidis*) induce la producción de citocinas (después de una hora), las cuales afectan el metabolismo de la mayoría de los tejidos y órganos. Cuando se suministró endotoxinas a las ratas, la actividad de TAACR se incrementó en diversos órganos, mientras que la de DCCR disminuyó en hígado (4, 56). Por otro lado, en ratas bajo condiciones de ayuno prolongado, la actividad de TAACR en cerebelo aumenta (57).

En enfermedades renales se han reportado alteraciones en el metabolismo de aminoácidos. Por ejemplo, en ratas que desarrollan síndrome nefrótico inducido a través del aminonucleósido de puromicina, la actividad de la TAACRm disminuye en riñón. Esto se correlaciona con una disminución de la concentración del ARNm de la TAACRm (58). Por otro lado, en un modelo de hepatitis inducido por la D-galactosamina, la actividad de TAACR en mitocondria de hígado y corazón aumenta.

En la cetoacidosis diabética y uremia existe un desequilibrio en el metabolismo de AACR, lo que implica un aumento en la degradación de proteínas en músculo, como consecuencia de la estimulación de la DCCR, y la disminución de la concentración de AACR en plasma. Se propone que durante la acidosis aumenta la cantidad de glucocorticoides, y éstos contribuyen a la activación de la 20

DCCR. Al medir la actividad para transaminar leucina de TAACRm se observa un aumento de 263 ± 17 nmol/ g. h (control) a 448 ± 23 nmol/ g .h (acidosis), como consecuencia del incremento en la disponibilidad de aceptores de aminos, α -cetoglutarato y piruvato, en el músculo de las ratas con acidosis (8).

Procesos tumorales. Niwa identificó un ADNc de ratón que denominó ECA 39, el cual proviene del ARNm sobreexpresado en la línea celular de un teratocarcinoma de ratón PCC4 Aza 1. Estudios posteriores revelaron que ECA39 presenta una alta homología con la TAACRc de humano y rata. Posteriormente se reportó en el ratón, que el gen de la TAACR citosólica es blanco de la regulación por c-Myc (59, 60). La oncoproteína c-Myc se ha asociado con la proliferación celular y la apoptosis. En levadura el homólogo de ECA39 está involucrado en la proliferación celular, específicamente en la transición de G1 a S. Por otro lado, ECA40 (homólogo de TAACRm) se expresa en la fase estacionaria de crecimiento (60-63).

Los estudios de Ogawa e Ichihara (64) en hepatomas, mostraron cambios en la actividad de las isoformas de TAACR. En células tumorales de hígado se encuentran las isoformas mitocondrial y citosólica; en mayor proporción la TAACRc que la TAACRm (48). En estadios tumorales avanzados las isoformas de TAACR son claramente detectadas. Por otro lado, en estudios *in vitro* con carcinomas de músculo esquelético de rata, específicamente carcinoma Walker-256, se observó un aumento en el metabolismo de AACR, lo que implicó un incremento tanto en transaminasa (de aproximadamente 70%) como en deshidrogenasa (65, 66). Aun cuando en los anteriores experimentos se

presentaron condiciones que regularían al gen de TAACRm, en la mayoría de los casos el aumento tanto en la actividad como en la cantidad de proteína es modesto. El gen de la transaminasa se le puede considerar como un gen constitutivo, sin embargo existen ciertas condiciones bajo las cuales la enzima aumenta su expresión más de 10 veces, como ocurre en el tejido mamario de rata lactante (33) y, en el hígado fetal (33, 46, 67, 68) A continuación se mostrarán las 2 primeras situaciones.

A. Glándula mamaria de rata lactante. En la rata virgen la actividad de la TAACRm (única isoforma presente en este órgano) es 2.8 veces más alta que la del hígado y 3.5 veces más baja que la del músculo esquelético. Cuando en la rata se inicia el proceso de gestación, la glándula mamaria se prepara para la producción de leche que ocurrirá en la etapa de la lactancia, aumentando su tamaño (incrementa la proliferación celular). En este periodo los niveles de actividad, proteína y ARNm de la TAACRm van aumentando en forma proporcional, hasta llegar a 8 veces más que en la rata virgen. En el periodo de lactancia la expresión de la enzima continua incrementándose hasta llegar a 15 veces en el día 12 de esta etapa. Esta actividad de la TAACRm en glándula mamaria es comparable con las actividades de TAACRm en corazón y riñón. La posible explicación del aumento de la enzima está asociada con la producción de la leche, ya que en el proceso de degradación de la leucina se producen componentes importantes para la síntesis de lípidos que forman parte de la leche; considerando lo anterior, la actividad de la DCCR también se incrementa. En la lactancia la TAACRm se localiza en las células epiteliales de los alvéolos, células

productoras de la leche (69). Por otro lado, se sabe que la síntesis de proteínas en la lactancia también es favorecida. Al analizar la actividad de re-aminación de la enzima, se observa que ésta aumenta permitiendo así que los AACR puedan formar parte de las proteínas, ver figura 2 (68). La expresión de la TAACRm comienza a decaer después del destete (69).



Figura 2. Comportamiento de la TAACRm en la glándula mamaria de rata en las etapas de gestación, lactancia y destete. La figura muestra el comportamiento de la enzima en cuanto a actividad

B. En el hígado fetal se ha detectado la presencia de TAACRm, la cual tiene una alta actividad, de 7.28 mU/ mg de proteína/min, a diferencia del hígado adulto, 0.38 mU/ mg de proteína/min. En trabajos sobre el comportamiento de la enzima en el hígado fetal y adulto, se ha visto que TAACRm en el día 17 del feto posee cierta actividad, la cual comienza a decaer cuando el organismo está próximo a nacer, y del día cero al día 21 postnatal el decaimiento continua hasta llegar a los 23 niveles que se encuentran normalmente en adulto (ver figura 3). De igual manera como en glándula mamaria de rata lactante la actividad y la cantidad de ARN están relacionados (67). La presencia de la TAACRm en hígado fetal se ha asociado con la producción de glutamato en el feto, importante para la síntesis de proteínas, producción de energía, como fuentes de nitrógeno y carbón. Sin embargo, los aminoácidos no son oxidados, ésto ocurre sólo bajo ciertas condiciones de malnutrición. Por otro lado, los AACR específicamente la leucina e isoleucina son importantes en la regulación de insulina, hay reportes de que esta hormona controla el intercambio de gases, como oxígeno, entre la madre y el feto. Por tal motivo debe existir un control de estos aminoácidos en el feto.



Fig. 3. Actividad de la TAACR en hígado fetal durante la gestación, al momento de nacer y posterior al nacimiento

Existe evidencia de que la TAACR se regula de diferente manera que el resto de las enzimas degradadoras de aminoácidos. La TAACRm no se regula por hormonas o por manipulaciones en la dieta (55), sin embargo la expresión de la TAACRm es regulada positivamente en la glándula mamaria lactante (69) y en 24

hígado fetal (67). No se sabe si las células de hígado durante condiciones de rápido crecimiento celular regulan la expresión de la TAACRm.

6. Justificación

La TAACRm es una enzima degradadora de aminoácidos cuya actividad y expresión no se ve afectada por la dieta o por la presencia de hormonas, en especial por el glucagon y los glucocorticoides como ocurre con el resto de las enzimas degradadoras de aminoácidos. En todos los estudios que se han realizado, su actividad es prácticamente indetectable en el hígado adulto de varias especies incluyendo el de la rata. No se conoce en la actualidad el mecanismo de regulación de la expresión de la TAACRm. Sin embargo, existen algunas datos en el hígado fetal o en la glándula mamaria durante la lactancia, que aumentos significativos en su actividad se asocian con cambios en los niveles de su ARNm específico. También existe evidencia de que en algunas líneas celulares tumorales como son las células de hepatoma de Morris y el hepatoma de Erhlich, se incrementa la actividad de esta enzima, aunque no se han realizado estudios moleculares para conocer su patrón de expresión. En estos tejidos y células, el común denominador es un aumento en el proceso de duplicación celular. Por lo que se requiere establecer si esta condición predispone a que se produzca un incremento en la expresión de esta enzima.

Se requiere estudiar los cambios del patrón de expresión de la TAACRm en modelos en donde ocurra un incremento en la duplicación celular como es el caso de las células AS-30D de hepatoma de rata, o cambios durante la regeneración del hígado después de hepatectomía parcial.

Estos estudios permitirán conocer si el patrón de expresión del gen de la TAACRm se asocia con el patrón de la presencia de la proteína y su actividad, ya 26 que no existen reportes a nivel molecular al respecto. En estudios posteriores estos resultados serán básicos para futuras líneas de investigación.

Las células AS-30D de hepatoma de rata son células de rápido crecimiento (aumento en la duplicación celular o proliferación), que contienen un número elevado de mitocondrias y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) está aumentado; el colesterol forma parte de la membrana citoplásmica y está en mayor proporción que en células normales, características que las hacen interesantes para estudios bioquímicos y moleculares. Su cultivo *ex vivo* en rata presenta ventajas importantes con relación al cultivo *in vitro*. Estas ventajas son: manejo de los animales de experimentación en condiciones normales de bioterio; obtención del hepatoma por eyección con jeringa hipodérmica, en el peritoneo; Viabilidad de las células aproximadamente del 100%; el rendimiento del hepatoma es de 70 ml; el destino final de los animales de experimentación sacrificados, es destrucción por incineración de acuerdo a la norma NOM ISO 2001.

7. Hipótesis

La rápida proliferación celular conllevará a la expresión de la TAACRm asociada con un péptido de 41 kDa en modelos como el hepatoma AS-30D de rata ex vivo y en hígado de rata en regeneración.

8. Objetivo General

Determinar el patrón de expresión de la TAACRm en células de hepatoma AS-30D de rata, (71), y durante la regeneración del hígado posthepatectomía parcial en rata, momento en que ocurre un incremento en la duplicación celular.

9. Objetivos específicos

- Determinar en células de Hepatoma AS-30D de rata
- El patrón de la presencia de la proteína de la TAACR determinada por Western blot
- la actividad de la TAACRm.
- Caracterización bioquímica de la TAACRm en mitocondrias aisladas de células AS-30D de hepatoma de rata: Km, Kaf.
- Identificación in situ de la proteína de la TAACRm por microscopía electrónica
- Determinar en células de hígado en regeneración y en hígado remanente
- la actividad enzimática de la TAACR.
- El patrón de expresión del gen por Noerthern blot
- El patrón de la presencia de la proteína por Western blot.

• Identificación in situ de la proteína por inmunohistoquímica.

10. Materiales y Métodos

10.1. Obtención de células AS-30D a partir de líquido ascitis.

Las células se obtuvieron del líquido de ascitis de ratas hembra Wistar con un peso aproximado de 250g que previamente fueron inoculadas con 2ml de células AS-30D de hepatoma, proporcionadas por la Dra. M. E. Torres-Márquez (71). La línea celular se mantuvo por transplantes sucesivos en la cavidad peritoneal de la rata. Nueve días después del transplante del hepatoma, las ratas forman líquido intraperitoneal (70 ml) que se extrajo con una jeringa hipodérmica. El líquido intraperitoneal que contiene las células AS-30D se lavó dos veces con una solución de NH₄Cl 0.83% fría (1:4) para remover los eritrocitos. Las células se centrifugaron a 150xg durante dos minutos a 4ºC. Posteriormente el sobrenadante se desechó, y el paquete celular fue resuspendido por 20 min en una solución buffer de HSE (Hepes, sacarosa, EGTA) fría conteniendo 250 mM sacarosa y 1 mM EGTA en 5 mM de buffer HEPES a pH 7.2. Subsecuentemente, las células se centrifugaron a 150 xg durante 2 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el paquete celular fue resuspendido en una solución buffer fría de HSE. La viabilidad de las células AS-30D se determinó con una solución 0.01% de azul de tripan, y presentaron una viabilidad del 90-95%.

10.2. Aislamiento de mitocondrias a partir de células AS-30D.

Una suspensión de 1-3 X 10⁹ células AS-30D/ml fue sonicada por un minuto a 360db con una frecuencia de salida de 5 seg. Las células rotas se diluyeron con

15ml de solución buffer HSE. La suspensión se centrifugó a 875 x g durante 10 min a 4°C, y el sobrenadante se desechó, el paquete fue resuspendido con 15 ml de solución HSE y se centrifugó a 1,250 xg durante 10 min a 4 °C. El paquete mitocondrial se almacenó a -70°C hasta la medición de la actividad de la enzima.

10.3. Hepatectomía del 70% parcial en rata.

La hepatectomía parcial se realizó en ratas macho Wistar con un peso de 250 g. Las ratas se mantuvieron en cajas metabólicas individuales con un ciclo luz-oscuridad de 7:00-19:00 h a 22°C. Las ratas fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta comercial Purina chow y con libre acceso al agua. La remoción del 70% del hígado se realizó bajo anestesia con éter, usando el procedimiento de Higgins y Anderson (72). Los animales se sacrificaron en los tiempos establecidos después de la cirugía.

10.4. Actividad de la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada.

La actividad de la TAACR se determinó en el paquete mitocondrial, con el método previamente descrito por Hutson (14, 55). El control respiratorio se midió para cada preparación mitocondrial de acuerdo a lo descrito previamente (73). La actividad se midió a 37° C en una solución buffer 50mM de fosfato de potasio, pH7.8 conteniendo 50µM de fosfato de piridoxal y 4g/L CHAPS. Cincuenta µI de sobrenadante se adicionaron a la solución de ensayo y la reacción se inició con la adición de una mezcla conteniendo 1.0 mM α -ceto (1-¹⁴C)isocaproato/12mM

isoleucina. El α-ceto (1-¹⁴C)isocaproato radiactivo se sintetizó a partir de (1-¹⁴C)Leucina descrito por Rûdiger et al. (1972). La L-(1-¹⁴C)Leucina fue de Amersham. La actividad específica para el α-ceto (1-¹⁴C)isocaproato fue de 200 d.p.m./nmol. La reacción se detuvo después de 5 minutos por la adición de 500µl 2M de acetato de sodio pH 3.4. El α-ceto (1-¹⁴C)isocaproato remanente no transaminado, fue descarboxilado químicamente adicionando 250 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. Una alícuota de 250 µl de la mezcla de reacción se añadió a un vial, se le adicionaron 10ml del de líquido de centelleo (BCS, Amersham) y las muestras se colocaron en un contador de centelleo (Wallac, Turku, Finland). Cada prueba se hizo por duplicado. Una unidad de actividad se definió como 1µmol (1-¹⁴C)Leucina formada /min a 37°C. La actividad específica de la TAACR se expresó como mUnidades (mU)/(mg de proteína).

Se midió la actividad enzimática en corazón como control positivo, y como control negativo se determinó en hígado adulto, ambos órganos en rata adulta.

10.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS.

Para la separación de las proteínas, se utilizó SDS-PAGE que se realizó de acuerdo con Laemmli en geles al 10% (74). Cuarenta µg de proteína de la suspensión mitocondrial AS-30D, sobrenadantes de hígado adulto e hígado fetal de rata, hepatocitos cultivados de rata y sobrenadante de corazón de rata se sometieron a electroforesis. Previo a la electroforesis, todas las muestras se sometieron a ebullición por 5 min en la presencia de 4% de SDS, con 2% de 2-mercaptoetanol. Se usaron marcadores de masa molecular para proteínas, para la determinación de la masa molecular (Boehringer Mannheim).

10.6. Inmunoblot.

Para la detección de las proteínas, los geles con las proteínas en SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF para Western blot (Boehringer Mannheim GMBH, Germany). La transferencia se realizó en una unidad de electroforesis Transphor (Hoefer Scientific Instruments) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las membranas de PVDF fueron tratadas con 1.5% de gelatina/1.5% de albúmina por 2 h a 37° C e incubados con IgG fracción específica anti-TAACR de rata (1:2500) durante 1.5 h a temperatura ambiente. Las bandas de proteína inmunoreactivas fueron visualizadas usando un anticuerpo anti-conejo marcado con peroxidasa de cabra (1:6000) después de la oxidación con luminol como sustrato luminiscente. La emisión de luz fue detectada por una corta exposición a una película de autoradiografía (ECL, Amersham Life Science). El anticuerpo anti- TAACR med rata fue proporcionado por la Dra. Hutson. (26). El análisis del Inmunoblot usando mitocondrias o extractos de varios tejidos, muestra una sola banda con un P_M de 41 kDa, indicando que el anticuerpo no cruza con otras proteínas y que reconoce los epítopes de TAACRm (26, 69).

10.7. Aislamiento de ARN total y análisis Northern blot.

El ARN total fue aislado de células AS-30D de hepatoma e hígado de rata, riñón y corazón de acuerdo a Chomczinsky, utilizando tiocianato de guanidina (TRIZsol) (**7**5). Para el análisis de Northern, 30 µg de ARN se sometieron a

electroforesis en un gel al 1.5% de agarosa conteniendo 37% de formaldehído y filtros de membrana de nylon Hybond-N⁺ (Amersham, transferido а Buckinghamshire, UK) y ligados mediante luz UV (Amersham). La prueba fue un fragmento de 900 pb Pst1-EcoR1 del cADN de rata de la TAACRm clonado en pT7 bluescript (38) y marcado con deoxicitidina 5'(α -³²P)dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham) usando el sistema rediprime ADN marcador (Amersham). Los filtros fueron prehibridizados con amortiguador rapid-hyb (Amersham) a 65°C por 45 min, y posteriormente hibridizados con el marcador prueba por 2.5 h a 65°C. Las membranas se lavaron una vez con 2X SSC (1X SSC= 0.15M de cloruro de sodio y 15M de citrato de sodio)/0.1% SDS a temperatura ambiente por 20 min y enseguida lavado dos veces con 0.1X SSC/0.1% SDS a 65°C por 15 min cada vez. Las imágenes digitalizadas y la cuantificación de la radioactividad de las bandas se efectuó usando el sistema de autoradiografía electrónica Instant Imager (Packard Instrument, Meriden, CT). Las membranas también se expusieron a películas Extascan (Kodak) a -70°C.

10.8. Histología, Inmunohistoquímica y Microscopía inmunoelectrónica.

Para la microscopía óptica, los cortes de hígado en regeneración e hígado remanente de rata, se fijaron por inmersión en etanol absoluto por 24 hr. Después de la inmersión en parafina, el tejido hepático fue cortado en secciones de 5 µm y teñido con hematoxilina y eosina para su análisis histológico. La detección inmunohistoquímica de la TAACRm se realizó con un anticuerpo específico de 34

conejo policional. Antes de la incubación con el anticuerpo primario, la actividad endógena de peroxidasa fue inhibida con 0.032% de H₂O₂ en metanol absoluto, las secciones de hígado se incubaron con el anticuerpo primario diluido 1/500 en buffer salino-fosfatos durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo unido se detectó con Ig G anti conejo marcado con peroxidasa diluido 1/100 en BSF y diaminobenzidina. Los controles negativos consistieron en reemplazar el anticuerpo primario por suero normal de conejo.

Para los estudios de microscopía inmunoelectrónica, las células de hepatoma se cultivaron como se describió anteriormente, Después de la centrifugación, se desechó el sobrenadante y la solución fijadora (4% paraformaldehído disuelto en buffer de Sorensen) se añadió para fijar las células por 2 h a 4°C. Posteriormente, las células se resuspendieron y se lavaron extensivamente con buffer de Sorensen, los grupos aldehído libres se bloquearon con una solución al 0.5% M NH₄CI en buffer salino-fosfatos por una hora y las células se deshidrataron en alcohol etílico graduado y embebidas en resina blanca L_R. Secciones delgadas de suspensiones de células de 70 a 90 nm se colocaron en rejillas de níquel. Las rejillas se incubaron con el anticuerpo policional de conejo anti-TAACRm diluido 1/100 en BSF con 1% se albúmina sérica bovina y 0.5% de Tween. Después de lavar repetidamente las rejillas con BSF, éstas fueron incubadas con IgG de cabra anti-conejo conjugado a 5 nm de partículas de oro diluido 1/20 en el mismo buffer. Las rejillas se tiñeron con sales de uranio y se examinaron en un microscopio electrónico Zeiss EM10.

10.9. Análisis estadístico.

Los resultados se presentaron como la media ± DSM (media de la desviación estándar). El análisis estadístico se realizó por la prueba de T no pareada. Las diferencias se consideraron significativas a P< 0.05 (Programa de análisis estadístico V.4.5 Abacus Concepts, Berkeley, CA).

11. Resultados

11.1. TAACRm ARNm y actividad en células AS-30D de hepatoma.

La actividad de la TAACR en el hígado adulto de rata fue casi insignificante, y las células AS-30D de hepatoma presentaron baja actividad de TAACR (2.4 mU/mg de proteína), la cual aumentó significativamente en la fracción enriquecida de mitocondrias aisladas (18.5 mU /mg de proteína) de las mismas células de hepatoma (Fig. 4). El homogenado de corazón de rata mostró 6.3 veces más actividad de TAACR que las células AS-30D de hepatoma. La actividad del hígado en regeneración después de hepatectomía parcial, al igual que la actividad del hígado fetal fue aproximadamente 2 veces más que la actividad medida en las células AS-30D de hepatoma. No se detectó actividad de TAACR en la fracción citoplasmática de las células AS-30D, indicando que la actividad solamente se localizó en la mitocondria. Este hallazgo se confirmó por Northern blot, que revela que las células AS-30D solamente expresan TAACRm, mientras que el ARNm TAACRc no se detectó Adicionalmente, la proteína de la TAACRm fue detectada por Western blot en homogenados y en mitocondrias de las células AS-30D de hepatoma, asimismo al utilizar Ab anti TAACRc no se detectó ninguna banda (Fig. 4A). Interesantemente el anticuerpo contra TAACRm detecta dos bandas de 41 y 43 kDa en células AS-30D de hepatoma. Sin embargo, en la preparación enriquecida de mitocondria, solamente se detecta una banda de 41kDa similar a la de corazón de rata. En hígado adulto como en hepatocitos recién aislados se detectó una proteína de 43kDa que no mostró actividad de TAACR. Se llevó a cabo análisis de cinética: la Km aparente que se obtuvo para leucina, isoleucina y 37

valina fue 1.0 \pm 0.02, 1.3 \pm 0.1 y 2.1 \pm 0.1 mM respectivamente, indicando que la TAACR en células AS-30D mostró afinidad por leucina e isoleucina sobre valina, como sustratos, lo que se ha observado en otros tejidos. (Fig. 5) y la cinética usando mitocondrias aisladas a partir de células AS-30D (Fig. 6).



Fig. 4. Análisis de Western blot de la TAACRm y actividad de la TAACRm en diferentes tipos de células y tejidos de rata. El panel A muestra la presencia de la TAACRm en 1) corazón, 2) mitocondrias de células AS-30D, 3) hepatocitos, 4) células AS-30D, 5) hígado en regeneración, 6) hígado fetal e 7) hígado adulto. El panel B muestra la correspondiente actividad específica de la TAACR en el mismo tipo de células y tejidos anteriormente mencionados. Los datos son expresados como la media \pm MDE; n=5.



Fig. 5. Análisis cinético de la TAACRm en mitocondrias aisladas de células AS-30D de hepatoma. Los experimentos se realizaron usando concentraciones graduales de valina, isoleucina o leucina. Los datos son expresados como la media ± MDE; n=3



Fig. 6. Cinética enzimática de la TAACRm en mitocondrias aisladas de células AS-30D de hepatoma. Los experimentos se realizaron por duplicado.

11.2. Microscopía Inmunoelectrónica de la TAACRm en mitocondrias de células AS-30D.

Para determinar la localización intracelular de la TAACRm en células AS-30D de hepatoma, se realizó el análisis por microscopía inmunoelectrónica usando un anticuerpo monoclonal anti-TAACRm de rata. Los resultados revelan que a nivel ultraestructural, las partículas de oro se localizaron específicamente en las mitocondrias. Partículas de oro se encontraron ocasionalmente en el citoplasma o en pequeñas vacuolas localizadas cerca del retículo endoplásmico, asociadas posiblemente a la proteína de 43kDa. No se observó marcaje en los núcleos (Fig 7). Estos datos confirman que la TAACRm se presenta exclusivamente en las mitocondrias.



Fig. 7. Detección de la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada mitocondrial (TAACRm) por inmunoelectromicroscopía en la línea celular AS-30D de hepatoma. Se presenta inmunomarcaje en mitocondrias (asteriscos) y en menor proporción en el citoplasma (x 40,000).

11.3. Actividad de la TAACR y su expresión durante la regeneración del hígado posterior a la hepatectomía.

Para establecer si las condiciones de rápido crecimiento celular en las células del hígado se asocian con la expresión de la TAACRm y la actividad de TAACR, la proteína de la TAACRm y las concentraciones de ARNm se midieron durante la regeneración del hígado posterior a la hepatectomía parcial. Interesantemente, aunque la actividad de la TAACR es casi indetectable en hígado adulto de rata, la actividad de la TAACR aumenta en la porción regenerada del hígado alrededor del día 3 al día 6 después de la hepatectomía (P<0.05). Después del día 7, la actividad de la TAACR disminuye progresivamente hasta llegar al día 14, en el que se observa una actividad igual a la del hígado adulto (Fig. 8). La actividad de la TAACR no cambia significativamente en la porción remanente del hígado. La actividad de la TAACR también se midió en riñón y corazón, sin cambio significativo observado durante los primeros14 días de la regeneración hepática. El promedio de la actividad en riñón y corazón fue 13.9 ± 1.3 mU/mg de proteína y 22.5 ± 2.3 mU/mg de proteína, respectivamente. Aunque el hígado en regeneración mostró actividad de TAACR, el ARNm de TAACRm fue escasamente expresado del día 3 al día 5 después de la hepatectomía comparado con el riñón y corazón que se usaron como controles (Fig. 8).



Fig. 8. Actividad de la TAACR en hígado en regeneración de rata posterior a hepatectomía parcial. Los homogenados del los lóbulos remanentes y regenerados del hígado se obtuvieron a diferentes tiempos después de la hepatectomía parcial. Los datos son expresados como la media ± MDE; n=10.

11.3.1. Análisis por Northern blot de la expresión de la TAACRm durante la regeneración del hígado posterior a hepatectomía parcial.

Para determinar la expresión del gen de la TAACRm en hígado durante la regeneración posterior a hepatectomía parcial, se hicieron análisis de Northern blot a partir del día 0, en que se realizó la hepatectomía, hasta el día 7 posterior a hepatectomía y se observó que en los días 0,1, 2 y 3 aparecía una banda muy tenue y en los días 4 y 5 se obtuvo una banda con mayor intensidad de 1.7 kb 43

que nos indica una mayor expresión del gen. Las bandas fueron reconocidas por la sonda de 900 pb marcada con deoxicitidina 5'(α-³²P)dCTP del ADNc de la TAACRm. Como controles positivos se utilizó el ADN de corazón y de riñón de rata.(Fig. 9).



Fig. 9. Análisis por Northem blot de la expresión de la TAACRm en hígado en regeneración posterior a hepatectomía parcial en rata (A) y tinción con bromuro de etidio de los geles usados para la hibridación por northern blot (B) a diferentes días después de la cirugía.

11.3.2. Análisis por inmunoblot de la TAACRm durante la regeneración del hígado posterior a hepatectomía parcial.

Para determinar si los cambios de actividad de la TAACR se asocian con diferentes tamaños de la proteína de la TAACRm, se realizaron análisis por Western blot que revelaron la presencia de una banda de 43 kDa en el hígado adulto de rata o en ratas con operación simulada (Fig. 10). El antisuero anti TAACRm detectó dos bandas de 41 y 43kDa en hígado fetal. Durante la regeneración, el hígado remanente mostró siempre la presencia de la banda de 43 kDa. En el hígado en regeneración hubo un aumento de la banda de 41 kDa del día 4 al día 6. Después de 14 días de regeneración del hígado, la única banda detectable corresponde a la de 43 kDa. La aparición de la banda de 41 kDa se asoció con la actividad de la TAACR, mientras que la banda de 43 kDa no se asocia con actividad alguna de la TAACR.



Fig. 10. Análisis por Western blot de la TAACRm en los lóbulos de hígado remanente (r) y en regeneración (R) a diferentes días después de la hepatectomía parcial.

11.3.3. Inmunohistoquímica de la TAACRm del hígado en regeneración después del 5° día de operación.

Se realizó un análisis por inmunohistoquímica para determinar la localización específica de la TAACRm en el hígado durante la regeneración. La mayor inmunodetección de TAACRm se localizó principalmente en la zona de regeneración del hígado. En el área de necrosis no hubo detección de la TAACRm. Las regiones distales de la zona de máxima regeneración del hígado mostraron sólo una modesta inmunoreactividad. (Fig. 11). Los análisis inmunohistoquímicos sugieren que la expresión de la TAACRm está asociada con el área de regeneración activa en el hígado posterior a parcial hepatectomía.



Fig. 11. Detección de la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada mitocondrial (TAACRm) por inmunohistoquímica en tejido de hígado después de cinco días de la hepatectomía parcial en rata. Existe una inmunotinción fuerte y selectiva de la TAACRm en células de hígado en regeneración (flechas), mientras que en tejido necrótico (asteriscos blancos) y en el hígado normal distal, son negativos (100x).

12. Discusión.

Los resultados del presente estudio muestran que las células AS-30D de hepatoma de rata tienen actividad de TAACR la cual se localiza exclusivamente en la mitocondria. Los análisis por Western blot y Northern blot revelan que la única isoforma presente en las células AS-30D es la TAACRm, evidenciándose por la presencia de dos bandas de 41kDa y 43kDa que corresponden respectivamente, a la forma activa e inactiva de la TAACRm, y que de igual manera se confirma por la presencia de una banda de 1560 pb. Además los datos muestran que la actividad enzimática en estas células es comparable con la actividad en corazón, por lo que predomina la forma activa de la proteína. En este caso solamente se encuentra la isoforma mitocondrial a diferencia de otros hepatomas que expresan ambas isoformas, la mitocondrial y la citosólica, como es el hepatoma de Morris (64).

Por otro lado, el hígado durante la regeneración después de la hepatectomía parcial muestra la aparición de actividad de la TAACR del día 3 al día 6 después de la cirugía, y la actividad disminuye progresivamente hasta el día 14, cuando es casi indetectable. La actividad de la TAACR durante la regeneración del hígado está asociada con la TAACRm. Los análisis por Western y Northern blot solamente detectan la presencia de la TAACRm.

Varios estudios han establecido que la actividad de la TAACR está presente en la mayoría de los tejidos, pero es casi indetectable en hígado adulto de rata (55). Sin embargo, durante la vida fetal, el hígado expresa TAACRm y declina a

niveles no detectables después del nacimiento (67). El presente estudio demuestra que las células del hígado en estadios de rápida proliferación celular, como son las células AS-30D de hepatoma de rata o las células de hígado durante la regeneración hepática posterior a hepatectomía parcial, también expresan la TAACRm. Estudios previos en levaduras identifican que la expresión de la TAACRc y la TAACRm son reguladas por el oncogen *c-myc* (59, 60) y sugieren que esta enzima tienen un papel adicional en la regulación de la proliferación celular. Hasta el momento no existe información acerca del control transcripcional del gen de la TAACRm que pueda explicar la aparición de la TAACRm bajo estas condiciones.

No obstante la expresión de la TAACRm que aumenta tanto en el hígado fetal como durante la regeneración del hígado, la actividad y expresión de la segunda enzima del catabolismo de los AACR, la deshidrogenasa de α-cetoácidos de cadena ramificada, se encuentra marcadamente disminuida o ausente en el hígado (77), indicando que la TAACRm es esencial para un proceso diferente no relacionado con la oxidación de los AACR. Se requieren más estudios para establecer el papel de la TAACRm en estos procesos.

Interesantemente, existe una asociación entre la actividad de la TAACR y la presencia de la TAACRm de 41 kDa y la ausencia de la actividad de la TAACR con la aparición de la TAACRm de 43 kDa. La proteína de mayor peso ha sido identificada también en cultivos de hepatocitos (33) y en hígado adulto de rata (67). Después de hepatectomía parcial, los análisis por inmunoblot revelan que durante la regeneración del hígado, el incremento en la actividad de la TAACR

está asociado con la aparición de la banda de 41 kDa detectada con el anticuerpo contra TAACRm, mientras que durante los estadios de baja actividad, el análisis revela una banda de 43 kDa. No se conoce el mecanismo por el cual el cambio entre ambas formas de la TAACRm ocurre. La banda de 43 kDa muestra una débil señal en el hígado adulto por Western blot, indicando escasez de esta proteína. La baja expresión de esta proteína en el hígado adulto de rata puede asociarse a un control transcripcional tejido específico o a un estado específico de metilación de la secuencia del ADN de este gen en el hígado. Ambas posibilidades están bajo estudio en nuestro laboratorio.

No existe información acerca de la utilización de los AACR por las células AS-30D. En este estudio demostramos que las células AS-30D solamente expresan la TAACRm. Los estudios cinéticos muestran que los valores de la Km aparente para los tres AACR son similares a los estimados en otros tejidos. Las células AS-30D son células tumorales de rápido crecimiento con alta velocidad de síntesis de proteínas y una alta velocidad de transporte activo iónico que incrementa los requerimientos de ATP (71). Los AACR deben ser oxidados para suministrar sustratos para el ciclo de los ATC y aumentar la producción de ATP. Sin embargo, se requieren más investigaciones para establecer el papel de la TAACRm en células AS-30D.



13. Conclusiones

La Transaminasa de Aminoácidos de Cadena Ramificada identificada por el patrón de expresión de genes en condiciones de rápida proliferación celular, en células AS-30D de hepatoma de rata y en células de hígado en regeneración posterior a hepatectomía parcial corresponde predominantemente a la isoforma mitocondrial.

La detección de la proteína de la TAACR en las células AS-30D de hepatoma de rata, muestra dos bandas que corresponden a la forma activa e inactiva de la isoforma mitocondrial ya que exclusivamente reacciona con Ab anti TAACRm, mientras que en las mitocondrias aisladas solamente muestran la banda que corresponde a la forma activa de la TAACRm.

En el hígado en regeneración posterior a hepatectomía parcial, las células hepáticas expresan únicamente la banda correspondiente al ADN de la isoforma mitocondrial y por Western blot sólo se observa una banda que corresponde a la proteína activa de esta isoforma, (a diferencia de las células AS-30D de hepatoma de rata en la que están presentes las dos bandas correspondientes a la forma activa e inactiva de la enzima). Es importante aclarar que la expresión y presencia de la proteína, en el hígado en regeneración tienen su óptimo a los 5 días posteriores a la hepatectomía parcial del 70%. Igualmente la actividad de la TAACR disminuye considerablemente después del 5° día de la hepatectomía parcial.

Los estudios de inmunohistoquímica revelan que en el hígado en regeneración de rata, la proteína de la TAACR se encuentra presente en la porción del hígado en regeneración, no así en porciones de tejido necrosado o no regenerado, y que corresponde exclusivamente a la isoforma mitocondrial.

En procesos en los que se establecen condiciones de rápida proliferación celular en el hígado de rata se expresa la Transaminasa de Aminoácidos de Cadena Ramificada Mitocondrial como es el hepatoma AS-30D y durante la regeneración hepática posterior a hepatectomía parcial. Estos hallazgos son los primeros reportados bajo estas condiciones, a diferencia del hígado adulto normal de rata que no se expresa la TAACRm y que existe una banda con señal muy débil correspondiente a la proteína de 43kDa. Por lo que la TAACRm posiblemente tenga otras funciones en el ciclo celular en el tejido hepático en rápida proliferación celular, pudiendo ser un factor transcripcional o bien un cofactor transcripcional, pues pertenece a la misma clase de proteínas de "zipper" de leucina, en la que se encuentran algunos factores transcripcionales.

14. Perspectivas

El hígado adulto de rata, desde el punto de vista fisiológico, presenta similitud con el hígado de humano. Bioquímicamente la TAACRm de rata y la TAACRm de humano tienen la misma actividad de transaminación de los AACR. A nivel molecular el ARNm y el péptido activo de la TAACRm en rata tienen una homología del 82% con la TAACRm de humano.

Por los resultados obtenidos en esta investigación, está confirmado que la TAACRm se expresa y está activa en el hígado adulto de rata bajo condiciones de alta duplicación celular, particularmente en células cancerosas.

Atendiendo a que el cáncer de hígado es una enfermedad degenerativa y mortal, sería interesante investigar si durante la hepatocarcinogénesis en rata esta enzima podría ser un biomarcador *in situ* en el hígado.

Ya que no se encuentra circulando en sangre, sería necesario obtener Ab anti TAACRm y conjugar este anticuerpo con un radionucleido como es el Samario (Sm33: está reportada su biodistribución en tejidos de rata con hepatoma AS-30D), lo que nos permitiría detectar la presencia de la proteína por centelleo y asociarla con alta duplicación celular en el hígado, lo que sería de valor diagnóstico en el caso del hepatocarcinoma celular, sea primario o secundario.

Durante la hepatocarcinogénesis en rata, se investigaría a la TAACRm como biomarcador de hepatocarcinoma celular, considerando:

> La cinética de absorción y distribución del conjugado Sm33 anti TAACRm en tejidos de rata y especialmente en el hígado.

- El estudio temporal de hepatocarcinogénesis en rata
- Utilización del conjugado Sm33Ab anti TAACRm durante la hepatocarcinogénesis en rata
- La detección del proceso de hepatocarcinogénesis por centelleo.

También sería interesante el secuenciamiento de la región promotora del gen de la TAACRm en rata, lo que nos permitiría identificar:

- Las secuencias consenso
- La secuencia o elemento responsivo a factores transcripcionales
- El sitio de iniciación de la transcripción.

Conociendo a nivel molecular estos tres aspectos, nos permitiría entonces, estudios posteriores para aplicarlos en medicina genómica.

Analizar la posibilidad de que la proteína sea un factor transcripcional estudiando sus posibles interacciones con elementos reguladores de otros genes. Esto se podría hacer mediante técnicas de retardo en la migración electroforética de la proteína purificada con secuencias reguladoras.

15. Referencias

1. Harper AE, Miller RH, Block KP. Branched-chain amino acid metabolism. Ann. Rev. Nutr. 1984;4:409-54.

2. Layman DK. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. J Nutr. 2003;133:261S-267S.

3. Hamel GF, Upward LJ, Siford LG, Duckorth CW. Inhibition of proteasome activity by selected amino acids. Metabolism 2003;52(7):810-814.

4. Ichihara A. BCA; HGF and proteasomes. Biochem Biophys Res Comm 1999;266:647-651.

5. Taniguchi K, Nonami T, Nakao A, Horada A, Kurokowa T, Sugiyama S, Fujitsuka N, Shimomura Y, Hutson SM, Harris RA, Takagi H. The valine catabolic pathway in human liver: effect of cirrhosis on enzyme activities. Hepatology 1996;24:1395-1398.

6. Holecek M, Sprong L, Tilse I. Metabolism of branched-chain amino acids in starved rats: the role of hepatic tissue. Physiol Res 2001;50:25-33.

7. Gore CD, Wolfe RR. General supplementation fails to affect muscle proteins kinetics in critically ill patients. J Parenteral Nutr 2002;26:342-350.

8. May RC, Hara Y, Kelly RA, Block KP, Buse MG, Mitch WE. Branched-chain amino acid metabolism in rat muscle: abnormal regulation in acidosis. Am J Physiol 1987;252:E712-E718.

9. Ikeda T, Konishi Y, Ichihara A. Transaminase of branched-chain amino acids: Leucine (methine) transaminase of rat livers mitochondrial. Biochim Biophys Acta 1976;445:622-631.

10. Zhou X, Thompson JR. Regulation of glutamate dehydrogenase by branched-chain amino acids in skeletal muscle from rats and chicks. Int J Biochem Cell Biol 1996;28:787-793.

11. Torres N, Tovar AR, Harper AE. Metabolism of valine in rat skeletal muscle mitochondrial. J Nutr. Biochem 1993;4:681-689.

12. Panten U, Kriegstein E, Poser W, Schonborn J, Hasselblatt A. Effects of L-leucine and alfa-ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. FEBS Lett 1972;20:225-228.

13. Doering CB, Danner DJ. Amino acid deprivation induces translation of branched-cahin alfa-ketoacid dehydrogenase kinase. Am J Physiol Cell Physiol 2000;279:C1587-C1594.

14. Hutson SM. Subcellular distribution of branched-chain aminotransferase activity in rat tissues. J. Nutr. 1988;118:1475-1481.

15. Hall TR, Wallin R, Reinhart GD, Hutson SM. Branched chain aminotransferase isoenzymes. J Biol Chem 1993;268:: 3092-3098.

16. Sugio S, Petsko GA, Manning JM, Ringe D. Crystal structure of a Damino acid aminotransferase: how the protein controls stereoselectivity. Biochem J 1995;34:9661-9669.
Nelson L. D, Cox M M. In Lehninger A. I.Principles of Biochemistry.
3a. ed. Worth Publishers. 2000:623-654.

18. Shirai A, Ichihara A. Transaminase of branched-chain amino acids. J. Biochem. 1971;70:741-748.

Harper AE. Biological factors influencing the utilization of amino acids
In: Velázquez A, Bourges H, eds. Genetic factors in nutrition. 1st ed. Orlando, Fla
1984;: Academic Press.:243-278.

20. Suryawan A, Hawes JW, Harris RA, Shimomura Y, Jenkins AE, Hutson SM. A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. Am J Clin Nutr 1998;68:72-81.

21. Doering CB, Coursey C, Splanger W, Danner DJ. Murine branchedchain alfa-ketoacid dehydrogenase kinase: cloning, tissue distribution, and temporal expression during embrionic developmente. Gene 1998;212:213-219.

22. Damuni Z, Reed LJ. Purification and properties of the catalytic subunit of the branched-chain alfa-keto acid dehydrogenase phophatase from bovine kidney mitochondrial. J Biol Chem 1987;262:5129-5132.

23. Harris RA, Popov HM, Zhao Y, Shimomura Y. Regulation of branched-chain amino acid catabolism. J Nutr. 1994;124:1499S-1502S.

24. Harris RA, Kobayashi R, Murakami T, Shimomura Y. Regulation of branched-chain alfa-keto acid dehydrogenase kinase expression in rat liver. J Nutr. 2001;131:841S-845S.

25. Harris RA, Han AC, Goodwin GW, Kuntz MJ, Paxton R. Regulation of the activity state of rat liver branched-chain a-keto acid dehydrogenase (BCKDH) by branched-chain alpha-ketoacids (BCKAs). Federation Proc 1986;45:233.

26. Wallin R, Hall TR, Hutson SM. Purification of branched chain aminotransferase. J. Biol. Chem. 1990;265:6019-6024.

27. Papet I, Grizard J, Bonin D, Arnal M. Regulation of branched chain amino acid metabolism in ruminants. Diabetes Metab. 1992;18(1-Pt2):122-28.

28. Ooiwa T, Goto M, Tsukamoto Y, et al. Regulation of valine catabolism in canine tissues: tissue distributions of branched-chain aminotransferase ando 2oxo acid dehydrogenase complex, methacrylyl-CoA hydratase and 3hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase. Biochim Biophys Acta 1995;1243:216-220.

29. Faure M, Glomot F, Bledsoe RK, Hutson S, Papet I. Purification and cloning of the mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase fron sheep placenta. Eur J Biochem. 1999;259:104-111.

30. Bonfils J, Faure M, Gibrat JF, Glomot F, Papet I. Sheep cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase: cDNA cloning, primary structure and molecular modelling and its unique expression in muslces. Biochim Biophys Acta 2000;1494:129-136.

31. Frick P, Blinder L, Goodman M. Transamination and oxidation of leucine and valine in rat adipose tissue. J Biol Chem 1988;263:3245-3249.

32. Yang Q, Birkhahn RH. Branched-chain transaminase and keto-acid dehydrogenase activities in burned rats: evidence for a differential adaptation according to sex. Nutrition 1997;13:640-645.

33. Hutson SM, Wallin R, Hall TR. Identification of mitochondrial branched chain aminotransferase and its isoforms in rats tissues. J. Biol. Chem 1992;267:15681-15686.

34. Ichihara A. Transaminases. En Christen P. y Metzler D. E. Biochemistry. A series of monographs. 1985; Wiley-Interscience Publication. New York:430-439.

35. Atiles WM, Dudley EG, Steele LJ. Gene cloning, sequencing, and inactivation of the branched-chain aminotransferase of Lactococcus lactis LM0230. App. Envir. Micro. 2000;66:2325-2329.

36. Kagamiyama H, Hayashi H. Branched-chain amino acid aminotransferase of *Escherichia coli*. Method Enzymolo 2000;324:103-113.

37. Goodwin GW, Gibboney W, Paxton R, Harris RA, Lemons JA. Activities of branched-chain aminotransferase and branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex in tissues of maternal and fetal sheep. Biochem J. 1987;242:305-308.

38. Bledsoe RK, Dawson PA, Hutson SM. Cloning of the rat human mitochondrial branched chain aminotransferases (BCATm). Biochim. Biophys. Acta 1997;1339:9-13.

39. Drown PM, Torres N, Tovar AR, Davoodi J, Hutson SM. Use of reagents to investigate branched-chain alfa-keto acid transport in mitochondria. Biochim Biophys Acta 2000;77926:1-12.

40. Bixel MG, Hutson SM, Hamprecht B. Cellular distribution of branchedchain amino acid aminotransferase isoenzymes among rat brain glial cells in culture. J. Histochem Cytochem 1977;45:685-694.

41. Hutson SM, Hall TR. Identification of the mitochondrial branched chain aminotransferase as a branched chain alpha-keto acid transport protein. J Biol Chem. 1993;268:3084-91.

42. Hutson SM, Berkich D, Drawn P, Xu B, Aschner M, Lanove KF. Cloning and expression of the mammalian cytosolic branched chain aminotransferase isoenzyme. J Biol Chem 1995;270:30344-52.

43. Kholodilov NG, Neystat M, Oo TF, Hutson SM, Burke RE. Upregulation of cytosolic branched chain aminotransferase in substantia nigra following developmental striatal target injury. Brain Res Mol Brain Res 2000;75:281-6.

44. Hutson SM, Berkich D, Drown P, Xu B, Aschner M, LaNoue KF. Role of branched-chain aminotransferase isoenzymes and gabapentin in neurotransmitter metabolism. J Neurochem. 1998;71:863-874.

45. Taylor RT, Jenkins WT. Leucine aminotransferase. II. Purification and characterization. J. Biol. Chem. 1966;241:4396-4405.

46. Kadowaki H, Knox E. Cytosolic and mitochondrial isoenzimes of branched-chain aminotransferase during development of the rat. Biochem. J. 1982;202:777-83.

47. Conway ME, Hutson SM. Mammalian branched-chain aminotransferases. Method Enzymoloy 2000;324:355-365.

48. Goto M, Shinno H, Ichihara A. Isozyme pattern of branched-chain amino acid transaminase in human tissues and tumors. Gann 1977;68:663-667.

49. Sweatt AJ, Wood M, Suryawan A, Wallin R, Willingham MC, Hutson SM. Branched-chain amino acid catabolism: unique segregation of pathway enzymes in organ systems and peripheral nerves. Am J Physiol Endocrinol Metab 2004;286:E64-E76.

50. Zielke HR, Collins RMJ, Baab PJ, Huang Y, Zielke CL, Tildon JT. Compartmentation of [14C]glutamate and [14C]glutamine oxidative metabolism in the rat hippocampus as determined by microdialysis. J Neurochem. 1998;71:1315-1320.

51. Bixel MG, Shimomura Y, Hutson SM, Hamprecht B. Distribution of key enzymes of branched-chain amino acid metabolism in glial and neuronal cells in culture. J Histochem Cytochem 2001;49:407-418.

52. Montamat EE, Vermouth NT, Blanco A. Subcellular localization of branched-chain amino acid aminotransferase and lactate dehydrogenase C4 in rat and mouse spermatozoa. Biochem J 1988;255:1053-1056.

53. Mitch WE, Chan W. Alfa-ketoisocaproate stimulates branched-chain amino acid transaminase in kidney and muscle. Am J Physiol 1979;236:E514-E518.

54. Chan W, Walser M. Effect of branched-chain keto-acids and dietary protein content on the activity of branched-chain amino acids transferase in rat tissues. J Nutr. 1978;108:40-45.

55. Torres N, López G, De Santiago S, Hutson SM, Tovar AR. Dietary protein level regulates expression of the mitochondrial branched chain aminotransferase in rats. J. Nutr. 1998;128:1368-1375.

56. Holecek M, Sprong L, Tichy M, Pecka M. Leucine metabolism in rat liver after a bolus injection of endotoxin. Metab 1998;47:681-685.

57. Rao TI, Rao GN, Swamy M, Sadasivudu B. Studies on metabolism of branched-chain amino acids in brain and other tissues of rat with special reference to leucine. J Neurosci Res 1982;7:387-395.

58. Ascencio C, Torres N, Sandoval RL, Cruz C, Pedraza-Chaverri J, Tovar AR. Reduced kidney branched-chain aminotransferase expression in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. Life Science 1997;61:2407-2415.

59. Kispal G, Steiner H, Court DA, Rolinski B, Lill R. Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the cmyc oncogene-regulated Eca39 protein. J Biol Chem 1996;271:24458-64.

60. Eden A, Simchen G, Benvenisty N. Two yeast homologs of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. J. Biol. Chem. 1996;271:20242-20245.

61. Weggen S, Preuss U, Pietsch T, Hilger N, Klawitz I, Scheidtmann KH, Wisterlo D, Bayer A. Identification of amplified genes from SV40 large T antigeninduced rat PNET cell lines by substractive cDAN analysis and radiation hybrid mapping. Oncogene 2001;20:2023-2031.

62. Eden A, Benvenisty N. Involvement of branched-chain amino acid aminotransferase (Bcatl/Eca39) in apoptosis. FEBS Lett 1999;457:255-261.

63. Ben-Yosef T, Eden A, Benvenisty N. Characterization of murine BCAT genes: Bcat, a c-Myc target, and its homolog Bcat2. Mamm Genome 1998;9:595-597.

64. Ogawa K, Ichihara A. Isozyme patterns of branched-chain amino acid transaminase in various rat hepatomas. Cancer Res 1972;32:1257-1263.

65. Siddiqui RA, Williams JF. The regulation of fatty acid and branchedchain amino acid oxidation in cancer cachectic rats: a proposed role for a cytokinase, eicosanoid, and hormone trilogy. Biochem Med Metab Biol 1989;42:71-86.

66. Argiles JM, J. L-SF. The enzymatic activities of branched-chain amino acid catabolism in tumour rats. Cancer Lett 1992;61:239-242.

67. Torres N, Vargas C, Hernandez-Pando R, Orozco H, Hutson SM, Tovar AR. Ontogeny and subcellular localization of rat liver mitochondrial branched chain amino-acid aminotransferase. Eur. J. Biochem. 2001;268:6132-6139.

68. De Santiago S, Torres N, Suryawan A, Tovar AR, Hutson SM. Regulation of branched-chain amino acid metabolism in the lactating rat. J. Nutr. 1988;128:1165-1171.

69. Tovar AR, Becerril E, Hernandez-Pando R, Lopez G, Suryawan A, DeSantiago S, Hutson SM, Torres N. Localization and expression of BCAT during pregnancy and lactation in the rat mammary gland. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2001;280:E480-E488.

70. Dietzen DJ, Davis EJ. Oxidation of pyruvate, malate, citrate, and cytosolic reducing equivalents by AS-30D hepatoma mitochondria. Arch Biochem Biophys 1993;305:91-102.

71. Rodriguez-Enriquez S, Torres-Marquez ME, Moreno-Sanchez R. Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. Arch. Biochem. Biophys. 2000;375:21-30.

72. Higgins GH, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver in the white rat following partial surgical removal. Arch. Pathol. 1931;12:186-202.

73. Hutson SM. Branched chain a-keto acid oxidative decarboxylation in skeletal muscle mitochondria. J. Biol. Chem. 1986;261:4420-4425.

74. Laemmli UK. Clevage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.

75. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 1987;162:156-159.

76. Hutson S. Structure and function of branched chain aminotransferases. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 2001;70:175-206.

77. Zhao Y, Denne S, Harris RA. Developmental pattern of branchedchain 2-oxo acid dehydrogenase complex in rat liver and heart. Biochem. J. 1993;290:395-399.

16. Artículo



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE d direct

Life Sciences

www.elstwier.com/locate/lifescie

Life Sciences 78 (2005) 334 - 339

Mitochondrial branched chain aminotransferase gene expression in AS-30D hepatoma rat cells and during liver regeneration after partial hepatectomy in rat

Graciela Pérez-Villaseñor^{a,d}, Armando R. Tovar^a, Ana H. Moranchel^a, Rogelio Hernández-Pando^b, Susan M. Hutson^c, Nimbe Torres^{a,*}

* Depto, Finidogia de la Nutrienan Mexico, DF, México

^b Depto de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencus Médicas y Nutricion Salvador Zubran, México, DF México Department of Biochemistry, Wake Forent University Medical Center, Winston-Salen, North Carolina, USA ^d Depto de Mencion a la Salud, Universitad Autônomo Metropolinia-Noc, Programa de Doctorado en Ciencias Biológucus, México, DF, México

Received 17 March 2005 accepted 22 April 2005

Abstract

Branched chain ammotransferase (BCAT) is the first enzyme in the catabolism of branched chain amino acids (BCAA). Unlike other amino acid demailing enzymes present in liver. BCAT is only expressed in extrahepatic tissues, and is not regulated by dietary protein, glucagon or glucocorticoids. However, the mitochondrial (m) isoform of BCAT is highly expressed in the fetal liver and rapidly decays after birth. The purpose of the present work was to establish if twee cells under conditions of rapid cell proliferation such as in hepatoma AS30D cells or during liver regeneration after partial hepatectomy were associated with an increase in the activity and expression of BCATm. BCAT activity in mitochondria of AS30D cells was 18.6 mU/mg protein. Western, Northern blot, and immunohistochemical analysis revealed that AS30D hepatoma cells expressed only BCATm. The apparent Km of BCATm in isolated AS30D cells mitochondria for leucine, isoleucine and value was 1.0 ± 0.02. 1.3 ± 0.1 mM, respectively. The regurerated hiver showed BCAT activity from day 3 to day 6, and the maximal BCAT activity of 0 mU/mg protein) was on day 5. By day 14 after partial hepatectomy BCAT activity and expression was almost undetectable. Interestingly, there was a relationship between BCAT activity and the Mr. of the immunoreactive band of BCATm. The presence of a 41 kDa hand was associated with BCAT activity, whereas the 43 kDa band with ondetectable activity. The results of this study indicate that BCATm activity is required in liver cells under conditions of rapid cell proliferation.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords Branched chain amino acuts; Branched-chain amino transferanc; A\$30D cells. Hepatectomy, Liver

Introduction

The first step of BCAA catabolism is a reversible transamination catalyzed by the enzyme branched chain aminotransferase (BCAT; EC 2.6.1.42). This enzyme can accept an amino group from leucine, valine and isoleucine and transfer it to α ketoglutarate to form the respective branched chain α -keto acids and glutamate. The branched-chain α -keto acids can be rearminated in the mitochondria to their respective amino acids (Hutson et al., 1988, Torres et al., 1993) or irreversibly decarboxylated by the branched-chain α -keto acid dehydrogenase enzyme complex. There are two BCAT isoenzymes, which are coded by separate genes (Bledsoc et al., 1997; Hutson et al., 1995), and are specific for the three BCAA (Hall et al., 1993; Ichihara and Koyama, 1966; Taylor and Jenkins, 1966). One is located in the cytosol (BCATe) and the other in the initochondria (BCATm) (Hall et al., 1993). BCATm is found in most rai tissues, with the exception of liver (Hall et al., 1993; Torres et al., 1998), whereas BCATe is only found in brain, placenta, and ovary (Hall et al., 1993).

BCAA are barely oxidized in the liver in comparison with the rest of the amino acids that are mainly degraded in this organ (Harper et al., 1984) BCATm mRNA is expressed in rat fetal

Corresponding author Instatute Nacional de Cycucan Médicas y Nutrición, Depte Essialegía de la Nutrición. Vasco de Quitoga No 15. Tlabpan. México, D. F., 1400P. Mexico Tels: +52.5.6553038, Ins. +52.5.6553038.

L-most addresses mimberial querzal inner inx. (N. Torreis).

^{6024-2205-5 -} see from matter © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved, doi:10.0206/j.05.2005.04.079

liver on day 17 of gestation and decreases sharply after birth to undetectable levels by Northern blot analysis (Torres et al., 2001) However, analysis by RT-PCR using adult rat liver mRNA amplified a product (Torres et al., 2001) whose sequence is identical to heart BCATm (Bledsoe et al., 1997), indicating that adult rat liver has very low abundance of BCATm mRNA. Western blot analysis using a specific antibody against heart BCATm revealed in many tissues a band with a Mr. of 4) kDa (Wallin et al., 1990) that corresponds to the size of BCATm established by its cDNA sequence. In the fetal liver, this antibody detected a protein of 43 kDa in addition to the protein of 41 kDa. Interestingly, in adult liver only the protein of 43 kDa is detected (Torres et al., 2001).

There is evidence that BCATm is regulated in a different manner than the rest of the amino acid degrading enzymes. BCATm is not regulated by hormones or dietary manipulations (Torres et al., 1998), however BCATm expression is upregulated in lactating mammary gland(Tovar et al, 2001) and fetal liver (Torres et al. 2001). It is not known if liver cells during conditions of rapid cell growth regulate the expression of BCATm Therefore, the purpose of the present work was to study if rat hepatoma cells AS-30D, a fast growth tumor cells rich in mitochondria characterized by an accelerated tricarboxvlic acid cycle (Dietzen and Davis, 1993) and an extensive catabolism of some amino acids (Rodriguez-Enroquez et al., 2000), and in liver during regeneration after a partial hepatectomy are associated with changes in BCATm expression. Additionally, to evaluate if BCATm activity is related with the appearance of 41 kDa BCATm protein.

Materials and methods

AS-30D cell obtention from ascites fluid

Cells were obtained from ascites fluid Wistar female rats with a body weight of around 250 g that were previously inoculated with 2 inl of AS-30D hepatoma eells kindly provided by Dr M. E. Torres-Marquez (Rodriguez-Enriquez et al., 2000). The cell line was maintained by successive transplantation into rat peritoneal eavity. Nine days after transplantation of the hepatoma, rats produced intrapentoneal fluid (70 ml) that was extracted with a syringe. The fluid containing the AS30D cells was washed twice with cold 0 83% NH₄Cl solution (1:4) to remove erythrocytes. Cells were centrifuged at 150 × g for 2 mm at 4 °C. Then, supernatant was discarded, and the cell pellet was resuspended for 20 min in ice cold HSE buffer containing 250 mM sucrose and 1 mM EGTA in 5 mM HEPES buffer pH 7.2. Subsequently, cells were centrifuged at 150 ×g for 2 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended in 3 ml of ice cold HSE buffer. The AS-30D cell viability was tested with 0.01% trypan blue, and cells maintained 90 - 95% viability.

AS-30 D mitochondria isolation

The AS-30D cell suspension containing $1-3 \times 10^9$ eells/ ml was sonicated for 1 min at 360 db with an output frequency of 5 s. Disrupted cell suspension was diluted with 15 ml HSE buffer. The suspension was centrifuged at 875 $\times g$ for 10 min at 4 °C, the supernatant was discarded, the pellet was resuspended with 15 ml of HSE buffer, and then centrifuged at 10,000 $\times g$ for 10 min at 4 °C. The mitochondrial pellet was stored at -70 °C until measurement of enzyme activity

Rat 70% partial hepatectomy

Partial hepatectomy was performed on male Wistar rats with a weight of 250 g. Rats were maintained in individual metabolic cages with a light-dark cycle 0700-1900 at 22 °C. Rats were fed ad libitum with commercial chow diet and had free access to water. Removal of 70% of the liver was performed under other anesthesia, using the procedure of Higgins and Anderson (Higgins and Anderson, 1931). Animals were killed at the indicated times after surgery

Branched chain aminotransferase activity

BCAT activity was assayed in the mitochondrial pellet as described previously (Hutson, 1988, Torres et al., 1998). The respiratory control was measured for each mitochondrial preparation as described previously (Hutson, 1986). Activity was measured at 37 °C in 50 mM potassium phosphate buffer. pH 7.8, which contained 50 µM pyridoxal phosphate and 4 g/L CHAPS. Fifty µl of supernatant was added to the assay, and the reaction was initiated by addition of a mixture containing 1.0 mM $\alpha\text{-keto}$ [1-14C] isocaproate/12 mM-isoleucine. The radioactive α -keto [1-¹⁴C] isocaproate was synthesized from [1-14C]Leucine as described by Rüdiger et al. (Rüdiger et al., 1972). L-[1-14C]Leucine was obtained from Amersham. The specific activity for α -keto $[1-^{14}C]$ isocaproate was 200 d.p.m nmol⁻¹. After 5 min the reaction was stopped by addition of 500 µl of 2 M sodium acetate pH 3.4. The remaining a-keto[1-14C] isocaproate not transaminated was ehemically decarboxylated by adding 250 µl of 30% hydrogen peroxide. A sample of 250 µl of the reaction mixture was added to a scintillation vial. Then 10 ml of liquid scintillation eocktail (BCS, Amersham) was added and samples were counted (Wallac, Turku, Finland). Each assay was done by duplicate. A unit of activity was defined as 1 µmol [1-11C] leucine formed min⁻¹ at 37 °C. BCAT specific activity was expressed as mUnits (mU) (mg protein)

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

SDS-PAGE was carried out according to Laemnili in 10% gels (Lacmnili, 1970). Forty µg of protein from samples of AS-30D mitochondrial suspension, rat adult liver and rat fetal liver supernatants, cultured rat hepatocytes, and rat heart supernatant were subjected to electrophoresis. Prior to electrophoresis, all samples were boiled for 5 min in the presence of 4% SDS, with 2% 2-mercaptoethanol. Premixed protein molecular weight markers (low range) were used for molecular mass determination (Boehringer Mannheim).

Immunoblotting

Proteins in SDS-PAGE gels were transferred to PVDF Western blotting membranes (Boehringer Mannheim GmbH, Germany). The transfer was carried out in a Transphor electrophoresis unit (Hoefer Scientific Instruments) following the manufacturer instructions. The PVDF membranes were treated with 1 5% gelatin /1.5% albumin for 2 h at 37 °C and incubated with anti-rat BCATm-specific lgG fraction (1:2500) for 1.5 h at room temperature. Immunoreactive protein bands were visualized using horseradish peroxidase-labeled goat antirabbit antibody (1:6000) after the oxidation of luminol as luminescent substrate. The light emission was detected by a short exposure to autoradiography film (ECL_Amersham Life Science) Anti-rat BCATm antibody was obtained as described previously (Wallin et al., 1990). Immunoblot analysis using mitochondral or tissue extracts from several tissues have shown only a single band with a Mr. of 41 kDa, indicating that the intibody does not cross react with other proteins and that recognizes BCATm epitopes (Hutson et al., 1992; Tovar et al. 20011

Isolation of total RNA and Northern blot analysis

Total RNA was isolated from AS-30D hepatoma cells and rat liver, kidney, and heart according to Chomezinsky (Chomczyaski and Sacchi, 1987). For Nonhem analysis, 30 ing of RNA was subjected to electrophoresis in a 1 5% agarose gel containing 37% formaldehyde and transferred onto a nylon membrane filter Hybond-N*, (Amersham, Buckinghamshire, UK) and cross-linked with a UV crosslinker (Amersham) The probe was a 900 bp Psil-Eco R1 fragment of the rat BCATm cDNA cloned in pT7 Bluescript (Bledsoe et al., 1997) and labeled with deoxycytrdine 5[a-32P] dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham) using the rediprime DNA labehing system (Amersham). Filters were prehybridized with rapid-hyb buffer (Aniersham) at 65 °C for 45 min, and then hybridized with the labeled probe for 2.5 h at 65 °C. Membranes were washed once with 2X SSC (1X SSC = 0.15 M sodium chloride and 15 M sodium citrate) 0 1% SDS at room temperature for 20 min and then washed twice with 0.1X SSC/0.1% SDS at 65 °C for 15 min each. Digitized images and quantification of radioactivity of the bands were done by using the Instant Imager electronic autoradiography system (Packard Instrument, Meriden, CT1 Membranes were also exposed to Extascan film (Kodak) at - 70 °C with an intensifying screen.

Histology, immunohistochemistry and immunoelectroamicroscopy.

For light microscopy, liver slices were fixed by immersion in absolute ethanol for 24h. After paraffin embedded, the hepatic tissue was sectioned at 5 μ m, and stained with hematoxylm and cosin for histological analysis. Immunohistochemical detection of BCATm was performed with a polyclonal rabbit specific antibody. Before incubation with the primary antibody, the endogenous activity of peroxidase was quenched with 0.03% H₂O₂ in absolute methanol, liver sections were incubated with the primary antibody diluted 17 500 in PBS overnight at 4 °C. Bound antibodies were detected with goat anti-rabbit IgG labeled with peroxidase diluted 17100 in PBS and diaminobenzidine. Negative controls consisted in replacing the primary antibody by normal rabbit sera.

For immunoelectronmicroscopy studies, hepatoma cells were grown as described above. After centrifugation, the supernatant was discarded and the fixative solution (4% paraformaldehyde dissolved in Sorensen's buffer) was added and fixing them for 2 h at 4 °C. Then, the cells were resuspended and extensively washed with Sorensen's buffer, free aldehyde groups were blocked in 0.5% M NHCl₄Cl in PBS for one hour and dehydrated in graded ethyl alcohol and embedded in L-R White resin. Thin sections of cell suspensions from 70 to 90 nm were placed on nickel grids. The grids were incubated with the rabbit anti-BCATm polyclonal antibody diluted 17100 in PBS with 1% boving serum albumin and 0.5 in Tween. After repeatedly rinsing with PBS, the grids were incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated to 5 nm yold particles diluted 1/20 in the same buffer. The grids were stained with uranium salts and examined in a Zeiss EM10 electron microscope.

Statistical analysis

The results are presented as mean \pm SLM. Statistical analysis was done by unpaired *t*-test. Differences were considered significant at $P \le 0.05$ (Statview statistical analysis program, V.4.5, Abacus Concepts, Berkeley, CA).

Results

BCATm mRNA and activity in AS-30D hepatomic cells

BCAT activity in adult rat liver was almost negligible. A\$30D hepatoma cells showed low BCAT activity (2.4 mU/mg protein), which was significantly increased in the chriched fraction of isolated mitochondria (18.5 mU/mg protein) of the same hepatoma cells (11g, 1B). Rat heart homogenate showed 6.3-fold higher BCAT activity than AS30D hepatoma cells. The BCAT activity of regenerated liver after partial hepatectomy, as well as the activity of fetal liver was approximately 2fold higher than the activity measured in AS30D hepatoma cells. There was no measurable BCAT activity in the cytoplasmic fraction from AS30D hepatoma eells, indicating that activity was only localized in the mutochondria. This finding was confirmed by Northern blot analysis that revealed that AS30D cells only expressed BCATm, whereas BCATe mRNA was undetectable (Data not shown). In addition, BCATm protein was detected by Western blot analysis in homogenates and mitochondria of AS30D hepatoma cells (Fig. 1A). Interestingly, the antibody against BCATm detected two bands of 41 and 43 kDa in AS30D hepatoma cells. However, the enriched mitochondria preparation showed only the 41 kDa band similar to rat heart. In adult liver as well as in fresh isolated hepatocytes was detected a protein of 43 kDa that did



Fig. 1. BCATm Western blot analysis and BCAT activity in different type of cells and tissues of the rat. Panel A shows the presence of BCATm in 1) heart. 2) AS 30 D cells mitochondria, 3) hepatocytes, 4) AS30 D cells, 5) regenerated liver, 6) fetal liver and 7) adult liver. Panel B shows the correspondent BCAT specific activities in same type of cells and tissues as above. Data are expressed as mean± SEM; *u*=5

not show BCAT activity. A kinetic analysis was performed using isolated mitochondria from AS30D cells (Fig. 2). The apparent Km obtained for leucine, isoleucine and value was 1.0 ± 0.02 , 1.3 ± 0.1 and 2.1 ± 0.1 mM, respectively, indicating that BCATm in AS30D cells prefers leucine and isoleucine over value as substrates as has been observed in other tissues (Hotson, 2001).

BCATM immunoclectronmicroscopy in mitochondria from AS30D cells

To further assess the intracellular localization of BCATm in AS-30D hepatoma cells, an immunoelectronmicroscopy analysis was performed using a monoelonal antibody anti-rat



Fig. 2. Kinetic analysis of BCAThe in isolated mitochondria of AST0 \mathbb{D} hepatoma cells, Experiments were carried our using graded concentrations of value, isoleucine or leucine. Date are expressed as mean ± SEM; n = 3,



Fig. 3 Detection of mitochondrial branched chain aminotransferase (BCAT) by immunoelectronmicroscopy in the AS-30D hepatoma cell line. There are immunolabeling in mitochondria (asterisks), and in lesser proportion in the cytoplasm (\times 46,3000).

BCATm The results showed that at the ultrastructural level, immunogold particles were specifically located in the mitochondria. Occasional gold particles were found free in the cytoplasm or in small vacuoles located near to endoplasmic reticulum perhaps associated with the 43 kDa protein No labeling was observed in the nuclei (Fig. 3). These data confirmed that BCAT was present exclusively in the mitochondria.

BCAT activity and expression during liver regeneration after portial hepatectomy

To establish if conditions of rapid cell growth in liver cells were associated with BCATm expression, BCAT activity, BCATm protein and mRNA concentration during liver regeneration after partial hepatectomy were measured. Interestingly, despite BCAT activity was almost negligible in adult rat liver, BCAT activity increased in the regenerated portion of the liver around day 3 and 6 after hepatectomy (P < 0.05). After day 7, BCAT activity decreased progressively until day 14 reaching the activity observed in adult liver (Fig. 4). BCAT activity did not change significantly in the remanent portion of



Fig. 4 BCAT activity in regenerated that liver after partial hepatectomy Homogenetics from the remanent and regenerated liver lobules were obtained at different times ofter partial hepatectomy. Data are expressed as mean SEM: n = 10. Asteriks indicate a significant difference (P < 0.05).



Fig. 5. Northern blot analysis of BCATm expression in regenerated liver after partial hepatectomy in the rat (A) and ethidium bromide statisting of the gels used for Northern blot hybridization (B) at different days after surgery.

the liver. BCAT activity was also measured in kidney and heart, and no significant change was observed along the 14 days of liver regeneration. The average activity in kidney and heart was 13.9 ± 1.3 inU/mg protein and 22.5 ± 2.3 inU/ mg protein, respectively. Despite the regenerated liver showed BCAT activity, BCATm mRNA was barely expressed from day 3 to 5 after hepatectomy (Fig. 5) compared with kidney and heart used as controls.

BCATm immunoblotting analysis during liver regeneration after partial hepatectomy

To assess if changes y BCAT activity were associated with different sizes of BCATm protein. Western blot analysis revealed the presence of a band of 43 kDa in the liver of adult rats or sham operated rats (Fig. 6). BCATm antiserum detected two bands of 41 and 43 kDa each in fetal liver. During regeneration, remanent liver showed always the presence of the 43 kDa band. In the regenerated liver, there was an increase of the 41 kDa band from day 4 to day 6. After 14 days of liver regeneration the only band detectable corresponded to that with a Mr. of 43 kDa. The appearance of the 41 kDa band was associated with BCAT activity, whereas the band of 43 kDa was associated with none BCAT activity,

BCATm immunohistochemistry of liver regeneration after 5 days of surgery

An immunohistochemistry analysis was performed to determine the specific localization of BCATm in the liver during regeneration. The greatest BCATm immunodetection was located mainly in the zone of liver regeneration. In the necrosis area there was no detection of BCATm. Distal regions from the maximal zone of liver regeneration showed only



Fig. 7. Detection of mitochondrial branched chain aminorransferase (BCAT) by immunohistochemisity in layer tissue after five days of partial hepatectomy. There is selective and strong BCAT minimunostaining in regenerated liver cella (armos), while the neurotic tissue (white asturisk) and the normal distal liver are negative (100×).

modest immunoreactivity (Fig. 7) The immunohistochemical analysis suggests that the expression of BCATm is associated with the active regeneration area.

Discussion

The results of the present study showed that hepatoma AS30D cells had BCAT activity, and it is exclusively localized in the mitochondria. Western and Northern blot analysis revealed that the only isoform present in AS30D cells is BCATm. On the other hand, the liver during regeneration after partial hepatectomy showed the appearance of BCAT activity from days 3 to 6 after surgery, and the activity progressively decreased until day 14, when it was negligible. BCAT activity during liver regeneration was associated with BCATm, since Western and Northern blot analysis only detected the presence of BCATm.

It has been established by several studies that BCAT activity is present in most tissues but is almost undetectable in rat adult liver (Torres et al. 1998). Nonetheless, during the fetal life, the liver expresses BCATm and then decline to almost undetectable levels after birth (Torres et al., 2001). The present study showed that liver cells in a stage of high rate of cellular proliferation, such as the hepatoma AS30D cell line, or liver cells during hepatic regeneration after partial hepatectomy also expresses BCATm. Previous studies in yeast identified that BCATe and BCATm expression are regulated by the oncogene c-mye (Eden et al., 1996. Kispall et al., 1996) and it was suggested that these enzymes have an additional role in



Fig. 6. BCATm Westion han analysis of terminion (i) and regenerated (#) liver lemiles at different days after partial hepatecome.

regulation of cell proliferation. At the present time there is no information about transcriptional control of BCATm gene that can explain the appearance of BCATm under these conditions.

Despite the expression of BCATm in the fetal liver and during liver regeneration, the activity and expression of the second enzyme of BCAA catabolism, the branched chain αketo acid dehydrogenase, is markedly diminished or absent (Zhao et al., 1993), indicating that BCATm is essential for a different process onrelated with BCAA oxidation. More studies are required to assess the role of BCATm in these processes.

Interestingly, there was an association of BCAT activity with the presence of the 41 kDa BCATm and the absence of BCAT activity with the appearance of the 43 kDa BCATm. The latue form of BCATm has been identified also in cultured hepatocytes (Hutson et al., 1992) and adult rat liver (Torres et al., 2001). After partial hepatectomy, the immunoblot analysis revealed that during liver regeneration the increase in BCAf activity was associated with the appearance of the band of 41 kDa detected with the antibody against BCATm, whereas during the stages of low activity, the analysis revealed a hand of 43 kDa. It is not known the mechanism by which the change between both forms of BCATm occurs. The 43 kDa hand showed a weak signal in the adult liver Western blot analysis indicating low abundance of this protein. The low expression of this protein in the liver of adult rats might be associated to tissue specific transcriptional control, or a specific methylation state of the DNA sequence of this gene in the liver. Both possibilities are under study in our laboratory

There is no information about the utilization of BCAA by AS-30D cells. In this study we demonstrated that AS-30D cells expresses only BCATm. Kinetic analysis showed that the apparent Km values of BCATm for the three BCAA are similar to those estimated in other tissues (Hutson, 2001). AS-30D cells are fast-growth tumor cells with a high rate of protein synthesis but also a high rate of active ion transport that increases their requirement of ATP (Rodriguez-Enriquez et al., 2000) BCAA might be oxidized to provide substrates for the TCA cycle to increase ATP production. However, more research is needed to assess the role of BCATm in AS30D cells.

Acknowledgements

We are grateful to Juan Carlos Contreras for assistance in performing the immunoelectron microscopy studies

References

- Bledson, R.K., Dworam, P.A., Hutson, S.M., 1997. Coming of the rat human intochondrial branched chain animotransferases (BCATin). The Journal of Hiological Chemistry, 1339 (1), 9 – 13.
- Chomczynski, P., Saechi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by incid guasidimum shloryanan-phenol-chloroform extraction. Analytical Blochemistry 162 (1), 156-159.
- Dutzen, D.J., Davis, F.J., 1993. Oxidation of gynavate, realistic citrate, and cytosolic reducing equivalents by AS-30D hepatoma mitochondria. Archives of Biochemistry and Biophysics 305 (1), 91–102.

- Eden, A., Simchen, G., Benvenisty, N. (1996). Two yeast homology of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and introduced branchedchain amino acid aminormisferences. The Journal of Biological Chemistry 271 (34), 20242 - 20245.
- Hall, T.R., Wallin, R., Reinhart, G.D., Hurson, S.M., 1993. Branched chain aminotransferance isoenzymes. The Journal of Biological Chemistry 268 [5], 3092–3098.
- Harper, A.E., Miller, R.H., Black, K.P., 1984. Branched-chain animo acid metaboliam. Annual Review of Nutrition 4, 409–454.
- Huggins, G.H., Anderson, R.M., 1931. Experimental pathology of the liver. Restoration of the lo er in the white nat following partial surgical terms val. Archives of Pathology 12 (2), 186–302.
- Hutson, S.M., 1986. Branched chain o-kelo neid exidance decarboxylation in theletal muscle mitochondria. The Journal of Biological Chemistry 261 (10), 4420–4425.
- Hutton, S.M., 1988. Subcellular distribution of branched-chain annuotransferase activity in rat tissues. Journal of Nutrition 118 (12), 1475–1481, Hutton, S., 2001, Structure and function of branched chain anniotransferases.
- Progress in Nucline Acid Research and Molecular Biology 70: 175–206. Hutson, S.M., Fenstemracher, D., Mahar, C. 1988. Role of minochordriat transamination in hemiched chilin ansites sciel metabolism. The Journal of Biological Chemistry 263 (8): 3618–3625.
- Hutsen, S.M., Wallin, P., Hull, T.R., 1992. Identification of inductiondrial branched chain animotinus/ferase and its proforms in rate tissues. The Journal of Biological Chemisity 267 (5), 15681–15686.
- Hutson, S.M., Bledsoe, R.K., Hall, T.R., Dawson, P.A., 1995. Cloning and expression of the manifold expression branched chain annaotransferase intensymte. Journal of Nutrition 270 (51), 30344–30352.
- Ichihura, A., Koyama, E., 1966. Transammuse of branched chain amino acids Journal of Biochemistry 59 (2), 160-169.
- Kuspal, G., Steiner, H., Court, D.A., Rohnski, B., Lill, R., 1996. Matchandrul and cytosolic branched-chain minino acid transaminases from yeast, homologis of the onyc oncogene-regulated. Eca39 protein, The Joannal 63 Biological Chemistry 271 (40), 24458 – 24464.
- Laeminh, U.K., 1970. Clevage of structural proteins during the assertibily of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (259), 680–685.
- Rodriguez-Enriquez, S., Torves-Marquez, M.F., Moreno-Sanchez, R., 2000. Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. Archives of Biochemistry and Biophysics 375 (1), 21–30.
- Riidiger, H.W., Langenbeck, U., Goedde, H.W. 1972. A samplified method for the preparation of 14C labelled branched-chain α-oxo acids. The Biochemical Journal 126 (2), 445 - 446.
- Taylot, R.T., Jonkins, W.T. 1966. Leucine annihilamiferase: II. Purification and characterization. The Journal of Biological Chemistry 241 (19), 4396–4405.
- Torres, N., Löpez, G., De Santiago, S., Hutson, S.M., Tovar, A.R., 1998 Dietary protein level regulates expression of the mitochondrial branched chain aminotransferase in rats. Journal of Nutrition 128 (8), 1368–1378.
- Totres, N., Tovar, A.R., Harper, A.E., 1993. Metabolism of value in rat skeletal muscle mitochondria. Journal of Nutritional Biochemistry 4, 681–689.
- Torrus, N., Vargan, C., Hernandez-Pondo, R., Orozeo, H., Hutson, S.M., Tovar, A.R. 2001. Ontogeny and subcultular localization of rat liver minichondrial branched chain amino acid aminiotransferase. European Journal of Biochemistry 268 (23), 6132–6139.
- Tovar, A.R., Becerril, E., Hernandez-Pando, R., Lopez, G., Suryawan, A., DeSantiage, S., Hurson, S.M., Torres, N., 2001. Localization and expression of BCAT during pregnancy and lactuiton in the rat mammary glaud. American Journal of Physiology Endocrimology and Metabolism 280 (3), E480–E488.
- Wallin, R., Hall, T.R., Hutsen, S.M., 1990. Purification of branched chain aminomars/erase. The Journal Biological Chemistry 265 (11), 6019 - 6024.
- Zhao, Y., Dunne, S., Harris, R.A., 1993. Developmental pattern of branchedchain 2-oxo axid dehydrogenaic complex in rat liver and heart. The Biochemical Journal 290 (2), 395 - 399.