

Tesis de Licenciatura

Aislamiento y caracterización de una aminotransferasa con amplia especificidad de sustrato partir de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Vernal, Javier I.

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Vernal, Javier I.. (). Aislamiento y caracterización de una aminotransferasa con amplia especificidad de sustrato partir de promastigotes de *Leishmania mexicana*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000557_Vernal

Cita tipo Chicago:

Vernal, Javier I.. "Aislamiento y caracterización de una aminotransferasa con amplia especificidad de sustrato partir de promastigotes de *Leishmania mexicana*". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000557_Vernal

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas

“Aislamiento y caracterización de una aminotransferasa
con amplia especificidad de sustrato a partir de
promastigotes de *Leishmania mexicana*.”

Autor: Javier I. Vernal

Directora: Dra. Cristina Nowicki

**Instituto de química y fisicoquímica biológicas
(IQUIFIB), Facultad de Farmacia y Bioquímica**

Buenos Aires, Diciembre de 1997

140 557

Agradecimientos:

A mis padres, por quererme y darme tanto.

A mis hermanos Vivi, Pablo y Chris, por cuidarme y quererme mucho.

A la Dra. Cristina Nowicki, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por la generosidad con que encaró el trabajo conmigo.

A mis compañeras de laboratorio, por su compañía y ayuda.

A Mercedes, por las charlas compartidas durante el almuerzo.

A la Dra. Lotti, por sus sugerencias siempre tomadas en cuenta.

A Susana, Evangelina y Leticia, por el cariño con el que siempre me han tratado.

A Osvaldo y Santiago, por las charlas cotidianas.

A toda la gente del IQUIFIB, por la cordialidad de todos los días.

A Brian, por toda la ayuda y por su genial humor.

A Caro, por sus inagotables charlas en el 37.

A Marce, Evelyn, Mara y Leo, por cómo nos divertimos estos años y por ser geniales.

A Dany, por estar siempre ahí donde lo necesitaba y por ser mi amigo.

A Ale, por sus preguntas del millón, por quererme tanto y por ser lo mejor.

A Andy, por estos 19 años juntos, por esos comienzos con el Stryer y por ser la reina.

A Marce, Nano, Leo, Chris, María y Pablo, por los mejores fines de semana y por ser bárbaros.

A mis sobrinos Belén y Martín, por haberme hecho tío y por ser divinos.

A Michi y a Ursula, por no haber dejado que nunca estudiara solo y por su amor incondicional.

A Mike, por el mejor año de mi vida.

INDICE

Resumen	pág. 1
Abreviaturas	pág. 2
Introducción	pág. 4
Proteínas PLP dependientes: aminotransferasas	pág. 5
Catabolismo de aminoácidos aromáticos en trypanosomátidos	pág. 7
<i>Leishmania mexicana</i>	pág. 8
Objetivos	pág. 10
Materiales y Métodos	pág. 11
Resultados	pág. 25
Purificación de la LmTAT	pág. 26
Caracterización estructural de la LmTAT	pág. 31
Caracterización cinética de la LmTAT	pág. 38
Discusión	pág. 41
Referencias bibliográficas	pág. 44

RESUMEN

Con el objetivo de realizar estudios en cuanto al catabolismo de aminoácidos aromáticos en *Leishmania mexicana*, se procedió a la purificación de una aminotransferasa con especificidad para dichos aminoácidos a partir de extractos crudos de este trypanosomátido. El procedimiento involucró la siguiente secuencia de pasos cromatográficos: A) DEAE-celulosa, B) Red120-Sepharosa, C) columna Mono Q y D) Sephacryl-S200. En el último paso se obtuvo una proteína homogénea a juzgar por los geles de poliacrilamida con SDS, donde se observó una única banda de 45 kDa. La enzima nativa presenta una masa molecular de 90 kDa, determinada por cromatografía de exclusión molecular, por lo tanto en condiciones fisiológicas se encontraría formando un dímero de subunidades similares. Los estudios cinéticos realizados demostraron que la enzima purificada podría utilizar casi con la misma facilidad, como sustratos, aspartato y aminoácidos aromáticos, habiéndose obtenido para los mismos un valor de K_m aparente próximo a 1 mM. La enzima transamina con ligeramente menor afinidad leucina y metionina, no pudiendo transaminar isoleucina. Como aceptores de los grupos aminos puede utilizar piruvato, α -cetoglutarato y oxalacetato, prefiriendo a este último, cuyo valor de K_m aparente es de 0.15 mM. Esta enzima no presenta reactividad inmunológica cruzada con la tirosina aminotransferasa de *Trypanosoma cruzi*. Su residuo N-terminal se encuentra bloqueado y los análisis de secuencias de aminoácidos de algunos de sus fragmentos peptídicos permiten relacionarla con diferentes aspartato aminotransferasas de plantas. La amplia especificidad de sustrato sugiere, para la enzima purificada, un origen evolutivo muy primitivo.

Abreviaturas

ACN:	acetonitrilo
ADP:	adenosina difosfato
AHADH:	deshidrogenasa de L- α -hidroxiácidos aromáticos
ALAT:	alanina aminotransferasa
ASAT:	aspartato aminotransferasa
DEAE:	dietil aminoetil
DTT:	ditiotreitól
EDTA:	ácido etilén diamino tetraacético
FPLC:	cromatografía líquida rápida para proteínas
GDH:	glutamato deshidrogenasa
HEPES:	ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N-etansulfónico
HPLC:	cromatografía líquida de alta performance
α -KMB:	α -ceto- γ -metiolbutirato
INT:	sal de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5- feniltetrazolium
LDH:	lactato deshidrogenasa
MDH:	malato deshidrogenasa
NADH:	nicotinamida dinucleótido (forma reducida)
NAD:	nicotinamina dinucleótido (forma oxidada)
PLP:	fosfato de piridoxal
PMSF:	fenil metil-sulfonil fluoruro
PTC:	feniltiocarbamil
PTH:	feniltiohidantoín
SDS:	dodecilsulfato de sodio
TAT:	tirosina aminotransferasa
LmTAT:	tirosina aminotransferasa de <i>Leishmania mexicana</i>
TcTAT:	tirosina aminotransferasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEA:	triethylamina
TFA:	ácido trifluoroacético

TLCK: Na-p-tosil-L-lisina clorometil cetona
Tris: tris(hidroximetil)-aminometano
UE: unidad enzimática

Código de una y tres letras para los aminoácidos:

Ala (A) : alanina
Arg (R) : arginina
Asn (N) : asparragina
Asp (D) : aspartato
Cys (C) : cisteína
Gln (Q) : glutamina
Glu (E) : glutamato
Gly (G) : glicina
His (H) : histidina
Ile (I) : isoleucina
Leu (L) : leucina
Lys (K) : lisina
Met (M) : metionina
Phe (F) : fenilalanina
Pro (P) : prolina
Ser (S) : serina
Thr (T) : treonina
Trp (W) : triptofano
Tyr (Y) : tirosina
Val (V) : valina

Introducción

PROTEINAS PLP DEPENDIENTES: AMINOTRANSFERASAS

Las aminotransferasas son enzimas dependientes de fosfato de piridoxal que catalizan la transferencia reversible de grupos amino utilizando aminoácidos como dadores y α -cetoácidos como aceptores de dichos grupos. La reacción de transaminación transcurre a través de un mecanismo Ping-Pong Bi Bi. Este tipo de reacción enzimática se caracteriza por la liberación de uno de los productos antes que el segundo sustrato se haya unido a la enzima, oscilando esta última entre dos formas enzimáticas estables (Enzima-fosfato de piridoxal, Enzima-fosfato de piridoxamina).

Estas enzimas constituyen solo una de las numerosas superfamilias pertenecientes a la división alfa de enzimas dependientes de fosfato de piridoxal. Hasta 1993 se conocían 150 secuencias aminoacídicas correspondientes a estas enzimas, 51 de ellas pertenecientes a 14 aminotransferasas diferentes (1). Todas las secuencias de las aminotransferasas se alinearon en base a la comparación de estructuras primarias, patrones de hidrofobicidad y predicciones de la estructura secundaria. Basándose en los resultados de este análisis se dividió a la superfamilia de las aminotransferasas en 4 familias (1). La familia I incluye a las aminotransferasas que transaminan aspartato, alanina, tirosina, histidinol fosfato y fenilalanina. Teniendo en cuenta, además, la especificidad de sustrato, en 1996 se realizó una subdivisión de la familia I en diferentes subfamilias (2). Es importante destacar que no existe correlación entre los miembros de una familia y la estructura del α -oxoácido aceptor del grupo amino, siendo utilizado el 2-oxoglutarato por diferentes miembros de las cuatro familias (1).

Todos los miembros de esta superfamilia presentan en general muy poca similitud entre sus secuencias de aminoácidos. Se encontró que la mayoría de los residuos de aminoácidos conservados entre todas las enzimas pertenecen al sitio de unión del fosfato de piridoxal,

siendo mayor la identidad promedio para miembros de una misma familia que entre enzimas de familias diferentes (1).

La familia I parece ser la más versátil de las cuatro ya que sus miembros aceptan como sustrato alanina y aminoácidos dicarboxílicos además de los aromáticos.

La estructura terciaria ha sido resuelta solamente para unas pocas aspartato aminotransferasas (ASATs), habiendo sido reconocidos los aminoácidos involucrados en la unión del cofactor y en la interacción con el sustrato dicarboxílico. Sólo cuatro de un total de alrededor de 400 aminoácidos resultaron ser idénticos para las 51 secuencias conocidas, dos de los cuales serían esenciales para la unión del fosfato de piridoxal: Lys258(385AT) y Asp222(340AT) (3), correspondiendo el número fuera del paréntesis a la estructura de la aspartato aminotransferasa citosólica porcina y el número dentro del paréntesis a la alineación de las aminotransferasas descrita por Mehta *et al.* (1).

Está generalmente aceptado que los organismos ancestrales poseían genomas pequeños capaces de producir menor cantidad de productos génicos a comparación con organismos contemporáneos. Dado que la evolución de alto grado de especificidad es un proceso exigente, las enzimas primitivas seguramente fueron catalizadores de amplia especificidad, utilizando una familia de sustratos relacionados y produciendo una familia de productos relacionados (4). Por lo tanto, eventos de duplicación génica podrían haber facilitado la especialización diferencial en cuanto al sustrato para producir el repertorio expandido de enzimas especializadas observado en organismos contemporáneos (2).

A diferencia de las ASATs, aminotransferasas con otra especificidad de sustrato como alanina y aminotransferasas aromáticas han sido muy poco caracterizadas, la relación estructura-función no está bien comprendida y hasta el momento ninguna de estas enzimas ha sido cristalizada. Las tirosina aminotransferasas (TATs) provenientes de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y de hígado de rata son las dos aminotransferasas aromáticas mejor caracterizadas. La secuencia de aminoácidos de la TAT de *Trypanosoma cruzi* presenta una mayor similitud de secuencia con las TATs de hígado humano y de rata (70%) que con

cualquiera de las ASATs. A diferencia de las TATs de mamíferos, las cuales transaminan solamente tirosina con α -cetoglutarato, la enzima de este parásito utiliza como sustratos el piruvato, el α -cetoglutarato y el oxaloacetato, pudiendo transaminar con igual facilidad los tres aminoácidos aromáticos y la alanina, aunque también utiliza aminoácidos ramificados como la valina y la leucina. En base a los valores obtenidos para las constantes cinéticas, los pares piruvato-tirosina y alanina- α -cetoglutarato parecerían ser los sustratos fisiológicos.

CATABOLISMO DE AMINOACIDOS AROMATICOS EN TRYPANOSOMATIDOS

Es muy escasa la información que se dispone acerca del metabolismo de aminoácidos en trypanosomátidos, y por lo tanto también se desconoce la interrelación de esta vía metabólica con el resto del metabolismo del parásito. En 1975, Stibb y Seeds observaron que animales infectados con *Trypanosoma brucei*, el agente causal de la enfermedad del sueño, presentaban menores niveles sanguíneos de aminoácidos aromáticos y excretaban por orina importantes cantidades de α -hidroxiácidos aromáticos que provendrían de un activo catabolismo de aminoácidos como tirosina, triptofano y fenilalanina (5). Observaciones semejantes fueron realizadas más recientemente por El Sawally y col. en animales infectados por *T. evansi*, agente patógeno para animales domésticos y el ganado (6). En otros trypanosomátidos, como distintas especies de *Leishmania*, algunas de ellas agentes causales de leishmaniasis cutáneas y viscerales en el hombre, también se ha observado no sólo un importante catabolismo de aminoácidos aromáticos sino que se ha postulado que el triptofano sería esencial para el cultivo in vitro de la forma promastigote de este parásito (7).

Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio, utilizando como modelo experimental epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, permitieron purificar y caracterizar las dos primeras enzimas de una vía que comprende el catabolismo de aminoácidos aromáticos y lo interrelaciona con la vía glucolítica del parásito. La primera de ellas es la tirosina aminotransferasa, que transamina aminoácidos aromáticos utilizando el piruvato como aceptor de los grupos aminos formando los correspondientes α -oxoderivados aromáticos (8-9). Estos últimos son sustrato de la segunda enzima, una deshidrogenasa de L- α -hidroxiácidos aromáticos (AHADH), que en una reacción acoplada a la oxidación de NADH transforma los α -oxoderivados aromáticos formados durante la transaminación en derivados aromáticos del ácido láctico como el indol láctico, el p-hidroxifenil láctico y el fenil láctico (10). También se pudo demostrar que los epimastigotes excretan los derivados aromáticos del ácido láctico al medio de cultivo (10). En mamíferos, no se ha detectado la presencia de ninguna enzima con características semejantes a esta deshidrogenasa, solo en algunos microorganismos se ha demostrado la existencia de enzimas con características semejantes a la del parásito.

Le Blancq y Lanham describieron en base a actividades enzimáticas detectadas en geles de poliacrilamida la presencia de una aminotransferasa con amplia especificidad de sustrato en promastigotes de *Leishmania*, pudiendo la misma utilizar como sustratos aspartato, alanina, triptofano y tirosina (11).

LEISHMANIA MEXICANA

La *Leishmania mexicana* es un protozoo, agente etiológico de la leishmaniasis cutánea. Esta enfermedad se distribuye en áreas tropicales y subtropicales. La leishmaniasis cutánea

humana ocurre en las Américas desde el sur de México hasta el norte de la Argentina. En América del Sur, solo Chile y Uruguay están libres del parásito.

Su ubicación taxonómica es la siguiente:

Phylum: *Protozoa*

Subphylum: *Sarcomastigophora*

Superclase: *Mastigophora*

Clase: *Zoomastigophorea*

Orden: *Kinetoplastida*

Suborden: *Trypanosomatina*

Familia: *Trypanosomatidae*

Género: *Leishmania*

Especie: *Leishmania mexicana*

La *Leishmania mexicana* es un protozoo flagelado que se presenta en los vertebrados, incluido el hombre, en forma aflagelada o amastigote, y en los insectos vectores en forma flagelada o promastigote. Los vectores son flebótomos del grupo *Nyssomya*.

En las Américas los reservorios de la leishmaniasis cutánea son los animales silvestres. La infección se transmite de un animal a otro por medio de los flebótomos. El hombre se infecta de modo accidental por picaduras de los mismos al penetrar en las áreas enzoóticas de la selva. Solo el flebótomo hembra transmite el protozoo, infectándose con los parásitos al succionar sangre de un mamífero infectado con el objeto de obtener la proteína necesaria para el desarrollo de sus huevos. El parásito continúa su desarrollo dentro del vector durante un período de 4 a 25 días. Cuando el flebótomo hembra infeccioso se alimenta, inocula el parásito y de esta manera se completa el ciclo de transmisión.

Se ha estimado que cada año ocurren 400.000 nuevos casos de leishmaniasis cutánea. La Organización Mundial de la Salud la ha incluido entre las seis enfermedades tropicales más importantes (12).

OBJETIVOS

Dentro de la familia de los trypanosomátidos existen parásitos patógenos importantes entre los cuales se encuentran el *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, las *Leishmanias*, causantes de diferentes tipos de leishmaniasis y los Trypanosomas Africanos, responsables de la enfermedad del sueño en humanos y patógenos también para el ganado vacuno, caballos y camélidos, causando importantes pérdidas económicas en áreas de restringidos recursos.

Los objetivos de este trabajo son:

- Realizar aportes en cuanto al conocimiento del metabolismo de aminoácidos aromáticos en otro trypanosomátido, la *Leishmania mexicana*.
- Contribuir al conocimiento general de las aminotransferasas, en cuanto a las similitudes estructurales con las proteínas de esta superfamilia y su posible relación evolutiva.
- Buscar diferencias sustanciales con respecto al metabolismo de los mamíferos y así posibilitar, en el futuro, el desarrollo de agentes quimioterápicos selectivos.

Material

y

Métodos

CULTIVO DE LOS PARASITOS

Se utilizaron promastigotes de *Leishmania mexicana* que se cultivaron en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad de General San Martín.

OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO

Las células se cosecharon por centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos, lavándose el sedimento dos veces con el buffer de sonicado, constituido por: buffer de fosfatos 25 mM, pH 7.8, KCl 120 mM, DTT 1 mM, α -cetoglutarato 2.5 mM, PLP 0.2 mM, PMSF 1 mM, TLCK 0.5 mM, leupeptina 5 μ M y pepstatina 2 μ M. Luego se resuspendieron en la solución de sonicado en una relación 0.5 g (peso húmedo) /ml. Se procedió a la ruptura de las células mediante tres ciclos de 15 s, a 4°C, a máximo poder, en un sonicador Branson. El homogeneizado obtenido se centrifugó a 17000 g por 30 minutos, a 4°C. El precipitado se descartó y el sobrenadante se dializó a 4°C contra un buffer de fosfatos 20 mM, pH 7.8, conteniendo DTT 1 mM, EDTA 1 mM y 2-oxoglutarato 2.5 mM (buffer 1). Este extracto crudo se utilizó como fuente de enzima en la purificación posterior.

PURIFICACION DE LA LmTAT

i) Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa

El dializado se sembró en una columna DEAE-celulosa microgranular (2 x 8 cm) equilibrada con el buffer 1. El comportamiento de la enzima en esta cromatografía de intercambio iónico se siguió midiendo la actividad de tirosina aminotransferasa en las fracciones eluidas.

ii) Cromatografía de pseudoafinidad en columna de Red120-Sepharosa

Las fracciones no retenidas provenientes de la cromatografía en DEAE-celulosa que poseían actividad enzimática se sembraron en una columna de Red120-Sepharosa (2 x 8 cm) equilibrada con buffer 1. Una vez concluida la siembra, la columna se lavó con 25 ml de buffer 1 y se eluyó con un gradiente lineal de KCl formado por 50 ml de buffer 1 y 50 ml del mismo buffer conteniendo KCl 300 mM. Se reunieron aquellas fracciones que poseían actividad enzimática de TAT.

iii) Cromatografía de intercambio iónico en FPLC

Las fracciones con actividad enzimática provenientes de la cromatografía en Red120-Sepharosa se dializaron contra buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8.4 (buffer 2) para recromatografiarlas en una columna intercambiadora de aniones Mono Q conectada a un sistema cromatográfico FPLC (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia). La columna se equilibró

con el mismo buffer y una vez realizada la siembra se eluyó con un gradiente lineal de KCl (Figura 2). Se reunieron aquellas fracciones que poseían actividad enzimática de TAT.

iv) Cromatografía de exclusión molecular

Las fracciones con actividad enzimática obtenidas mediante la cromatografía de intercambio iónico en FPLC se concentraron por centrifugación y se sembraron en una columna de Sephacryl-S200, equilibrada con buffer TEA 20mM, pH 7.6, conteniendo DTT 1 mM y EDTA 1 mM. Se registró la absorbancia en 280 nm en forma continua y se midió la actividad enzimática de TAT en cada una de las fracciones eluidas.

ESQUEMA DE PURIFICACION

PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA MEXICANA*



Las células cosechadas fueron:
a) resuspendidas en buffer de sonicado
b) Sonicadas
c) centrifugadas

Sobrenadante de 27.000 x g



DEAE-Celulosa
equilibrada con buffer 1

Fracciones no retenidas



RED-120 Sepharosa
equilibrada con buffer 1
elución: gradiente lineal KCl
(0 -200 mM)

Fracciones con actividad enzimática



Columna Mono Q
equilibrada con buffer 2
elución: gradiente lineal KCl
(0-130 mM)

Fracciones con actividad enzimática



SEPHACRYL S-200
eluido con buffer 2

ENZIMA PURA

DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

i) Determinación de la actividad enzimática de TAT

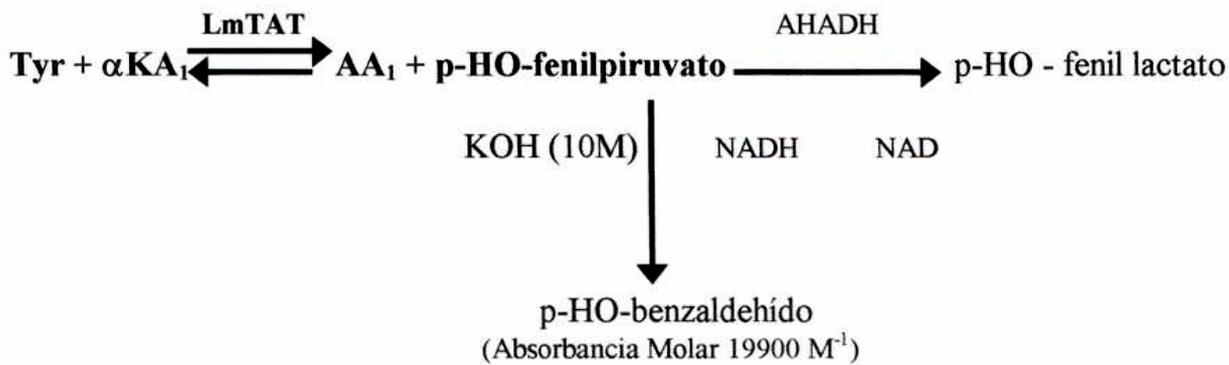
La actividad de TAT se ensayó de acuerdo al método de Diamondstone, T. I. (13), sin el agregado de dietilditiocarbamato, basado en la obtención de p-hidroxibenzaldehído a partir de la decarboxilación oxidativa, en medio alcalino, del p-hidroxifenilpiruvato formado por transaminación de la tirosina con el α -cetoácido correspondiente. La mezcla de reacción contenía buffer Hepes 150 mM, pH 7.0, DTT 0.5 mM, EDTA 1 mM, PLP 26 μ g/ml, L-tirosina 2 mM y α -cetoglutarato 25 mM. La reacción se inició con el agregado de tirosina y la mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se agregaron 0.250 ml de KOH 10 M. La concentración de p-hidroxibenzaldehído formado se determinó midiendo la absorbancia de las muestras en 331 nm y considerando un coeficiente $E = 19900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (figura 1). Se define una unidad de actividad enzimática de TAT como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de p-hidroxifenilpiruvato por minuto en las condiciones de ensayo descriptas.

ii) Determinación de la actividad enzimática de AHADH

La actividad reductora de la AHADH se determinó espectrofotométricamente midiendo la disminución de la absorbancia en 340 nm que indica el consumo de NADH que se produce cuando el p-hidroxifenil piruvato se reduce a p-hidroxifenil lactato. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml, buffer trietanolamina 135 mM, pH 7.5, p-hidroxifenil piruvato 0.5 mM y NADH 0.12 mM. La reacción se inició con el agregado de la enzima y se llevó a cabo en la celda termostatazada a 37°C (figura 1). Se define una unidad de actividad

enzimática de AHADH como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación o la reducción de 1 μmol de NADH por minuto en las condiciones de ensayo descriptas.

Figura 1: Determinación de la actividad enzimática de TAT y AHADH



iii) Determinación de la actividad enzimática de ASAT

La actividad de ASAT se determinó utilizando un método espectrofotométrico basado en la conversión del oxaloacetato formado durante la transaminación del aspartato, en malato por acción de la enzima malato deshidrogenasa con la concomitante oxidación de NADH. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml, buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, L-aspartato 12.5 mM, α -cetoglutarato 1 mM, NADH 0.12 mM y MDH 9.6 unidades enzimáticas. La reacción se inició con el agregado de la enzima y se llevó a cabo a 37°C, registrándose la caída de la absorbancia en 340 nm. Se define una unidad de actividad enzimática de ASAT como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de NADH por minuto en las condiciones de ensayo descriptas.

iv) Determinación de la actividad enzimática de ALAT

La actividad de ALAT se determinó utilizando un método espectrofotométrico basado en la conversión del piruvato formado por la transaminación de la alanina, en lactato por acción de la enzima lactato deshidrogenasa con la concomitante oxidación del NADH. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml, buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, L-alanina 12.5 mM, α -cetoglutarato 1 mM, NADH 0.12 mM y LDH 20 unidades enzimáticas. La reacción se inició con el agregado de la enzima y se llevó a cabo a 37°C, registrándose la variación de la absorbancia en 340 nm. Se define una unidad de actividad enzimática de ALAT como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μ mol de NADH por minuto en las condiciones de ensayo descriptas.

v) Glutamato deshidrogenasa

La actividad enzimática se determinó mediante un método espectrofotométrico basado en la reducción de 2-oxoglutarato a glutamato por la glutamato deshidrogenasa (GDH) de hígado de mamífero en presencia de iones amonio y NADH. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml, buffer TEA 150 mM, pH 7.8, NH₄Cl 90 mM, NADH 0.12mM y 3 unidades enzimáticas de GDH además de 2-oxoglutarato. La reacción se inició con el agregado de enzima y se llevó a cabo a 37°C, registrándose el cambio de absorbancia en 340 nm.

Se consideró una unidad de actividad enzimática de GDH como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μ mol de NADH por minuto en las condiciones ensayadas.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS

Las concentraciones de proteínas se estimaron por el método de Bradford (14), utilizándose una solución de seroalbúmina bovina (1 mg/ml) como solución patrón para realizar la curva de calibración.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se realizó siguiendo el método de Laemmli, U. K. (15), en un sistema discontinuo. Se utilizó una concentración del 10% (P/V) de acrilamida + bisacrilamida en el gel separador y una del 4% (P/V) de acrilamida + bisacrilamida en el gel concentrador. La polimerización se efectuó en soportes planos de vidrio de 7.5 x 8.5 cm, obteniéndose geles de 0.75 mm de espesor. Las muestras se desnaturalizaron por calentamiento durante 60 segundos a 100°C en buffer Tris-HCl 150 mM, pH 6.8, SDS 4% (P/V), β -mercaptoetanol 10% (V/V) y glicerol 20% (V/V) (buffer de siembra), luego se agregó solución saturada de azul de bromofenol en glicerol (aproximadamente 1% del volumen total). La corrida electroforética se realizó en un equipo Mini Protean II -Bio Rad Laboratories, Richmond, CA, USA- a temperatura ambiente. El voltaje se mantuvo constante a 100 V mientras las muestras permanecían en el gel concentrador, elevándose a 180 V al pasar al gel separador. Se dio por finalizada la corrida cuando el colorante marcador alcanzó el extremo inferior del gel. Los geles se colorearon con Coomassie Brilliant Blue R-250 0.125% (P/V), metanol 50% (V/V) y ácido acético 10% (V/V) y se decoloraron mediante sucesivos lavados en metanol 50 % (V/V) - ácido

acético 10 % (V/V) en agua destilada. Se utilizaron como marcadores de peso molecular: seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y tripsinógeno (24 kDa).

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR EN CONDICIONES NATIVAS

Con este fin se utilizó la cromatografía de exclusión molecular empleándose una columna de Sephacryl S-200 HR (120 cm x 0.8 cm) equilibrada con buffer 1. Con el fin de calibrar dicha columna, se utilizaron las siguientes proteínas como marcadores de peso molecular: α -amilasa de batata (200 kDa), alcohol deshidrogenasa de levadura (150 kDa), tirosina aminotransferasa de *Trypanosoma cruzi* (90 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa) y citocromo c (12.4 kDa).

ANALISIS DE AMINOACIDOS Y SECUENCIACION

Análisis de aminoácidos

La composición en aminoácidos se determinó en el LANAIS-PRO, UBA, CONICET, en un analizador de aminoácidos de Applied Biosystems modelo 420A que automáticamente lleva a cabo la hidrólisis, derivatización y separación de los PTC aminoácidos formados.

Secuenciación de proteína y péptidos

La LmTAT purificada (60 µg) se dializó contra AcH 5%, se concentró por evaporación en Speed Vac y se retomó con urea 8 M con el fin de lograr su total redisolución. La muestra se diluyó hasta 2 M urea con bicarbonato de amonio, pH 8, y se digirió con tripsina durante 16 horas a 37°C, en una relación de enzima proteolítica a proteína de 1:50. La digestión se detuvo por agregado de ácido trifluoroacético.

Los péptidos obtenidos se purificaron por HPLC en una columna C18 Vydac (25 x 2.1 cm) conectada a un equipo de Applied Biosystem Modelo 120 provisto de un detector espectral rápido con arreglo de diodos, un registrador y una computadora.

La muestra se sembró en la columna equilibrada con buffer A: ácido trifluoroacético al 0.1% (V/V) en agua. Durante la corrida cromatográfica se utilizó un flujo de 0.2 ml/min y se registró la absorbancia en 220 y 280 nm. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente de acetonitrilo en buffer A.

La degradación de Edman se realizó en un secuenciador de proteínas 477 A (Applied Biosystems), tanto para los péptidos purificados por HPLC que mostraron un adecuado grado de pureza como para la aminotransferasa purificada.

Se realizó una búsqueda informática con las secuencias obtenidas de los fragmentos tripticos en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information, usando el Blast E-mail Server (16).

DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LA LmTAT

La especificidad de sustrato de la LmTAT se determinó de acuerdo al método descrito por Rej, R. (17), quien desarrolló un procedimiento para la determinación de la especificidad de sustrato de cualquier aminotransferasa que utilice 2-oxoglutarato, basado en la siguiente secuencia de reacciones:

- Obtención de L-glutamato formado por transaminación del aminoácido a ensayar con el 2-oxoglutarato.
- Regeneración del 2-oxoglutarato a partir del L-glutamato, reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa, con la concomitante reducción de NAD.
- Oxidación del NADH debido a la reducción del colorante INT, reacción catalizada por la diaforasa, y formación de un cromóforo rojo.

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml, buffer Tris 50 mM, pH 8.0, 2-oxoglutarato 1.6 mM, NAD 5 mM, ADP 4 mM, INT 0.65 mM, glutamato deshidrogenasa 35 U/ml y diaforasa 5 U/ml. La reacción se inició con el agregado del aminoácido y se llevó a cabo a 37°C. Se monitoreó continuamente la absorbancia en 500 nm durante los primeros 4 minutos.

DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA LmTAT

Determinación de los K_m y $V_{m\acute{a}x}$ aparentes

Con este objetivo se obtuvieron los valores de velocidad inicial a distintas concentraciones de sustrato. En todos los casos la reacción se inició por el agregado de la LmTAT purificada a la celda del espectrofotómetro que contenía la mezcla de reacción termostatzada a 37°C. Las mediciones se realizaron mediante un método continuo, utilizando reacciones enzimáticas acopladas que permitieron a su vez seguir la reacción por la disminución de absorbancia en 340 nm debido a la oxidación del NADH.

Se utilizó la deshidrogenasa de α -hidroxiácidos aromáticos dependiente de NADH purificada a partir de *T. cruzi* para la determinación de los K_m s aparentes de los aminoácidos aromáticos (figura 1).

En el caso del aspartato y los α -cetoácidos ramificados, se midió la velocidad de formación de oxalacetato por transaminación del aspartato, por medio de la enzima malato deshidrogenasa.

Las constantes cinéticas de la alanina y del glutamato se determinaron utilizando como enzimas acopladas la lactato deshidrogenasa de músculo de conejo y la glutamato deshidrogenasa purificada a partir de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* respectivamente.

REACTIVIDAD INMUNOLOGICA

Se sembraron en membranas de nitrocelulosa dots conteniendo 10, 50 y 100 ng de TATs puras provenientes de *T. cruzi* y *Leishmania mexicana*. Se incubó la membrana con antisuero de conejo inmunizado con TAT de *T. cruzi* purificado en el laboratorio. Luego se procedió al revelado con anticuerpos de cabra anti inmunoglobulinas de conejo conjugados con fosfatasa alcalina.

Resultados

PURIFICACION DE LA LmTAT

Para la purificación de la enzima se utilizó el sobrenadante obtenido luego de centrifugar el homogeneizado resultante de la sonicación. Dicho sobrenadante se dializó durante una noche a 4°C contra el buffer 1 (ver Materiales y Métodos).

En el extracto crudo no se detectó actividad de AHADH a pesar de las diferentes condiciones experimentales ensayadas.

El dializado se sembró en una columna de DEAE-celulosa, midiendo la actividad de TAT en las fracciones eluidas. Este procedimiento permitió separar la mayor parte de la actividad de ALAT del extracto crudo de la actividad de TAT. Se reunieron las fracciones no retenidas que presentaban la mayor actividad de TAT. Estas últimas se sembraron en una columna de Red120-Sepharosa, tanto en las fracciones no retenidas por la columna como en las eluidas mediante el gradiente lineal de KCl se midió la actividad enzimática de TAT. Se reunieron aquellas fracciones que poseían mayor actividad enzimática.

El conjunto de fracciones con mayor actividad de TAT eluidas de la columna de Red120-Sepharosa se dializó contra buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8.4. El dializado se sembró en una columna Mono Q en un equipo FPLC. Se registró la absorbancia de las distintas fracciones en 280 nm y se midió la actividad de TAT (Figura 2).

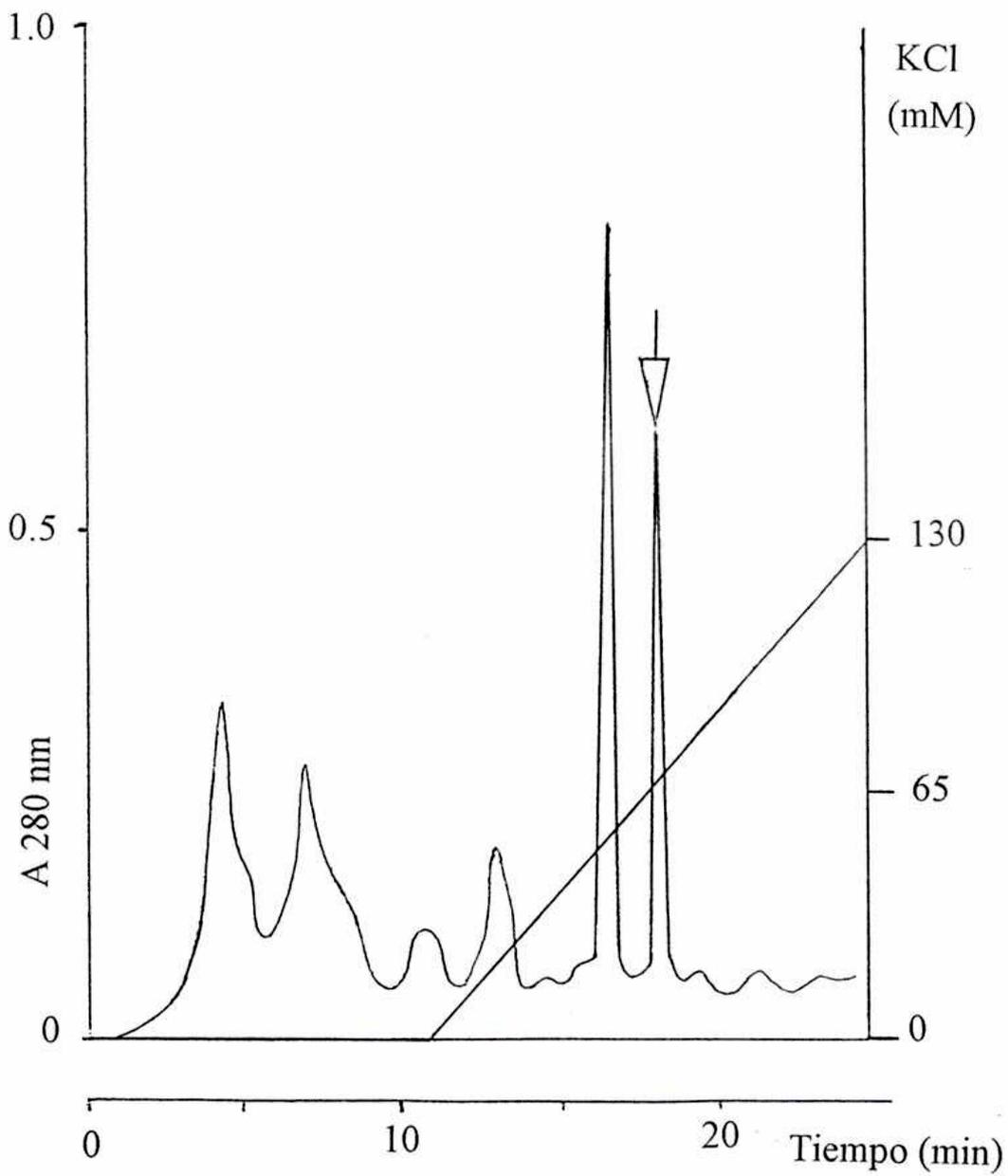
Las fracciones con mayor actividad enzimática obtenidas mediante la cromatografía de intercambio iónico en FPLC se concentraron por centrifugación y se sembraron en una columna de Sephacryl S-200. Se midió la actividad de TAT en cada una de las fracciones eluidas.

Durante todo el proceso de purificación se midió también en las distintas fracciones obtenidas la actividad de ASAT. Las fracciones con mayor actividad de ASAT resultaron ser las mismas que presentaban mayor actividad de TAT, determinándose para todos los pasos de purificación una coelución de ambas actividades.

Los resultados de una purificación tipo se muestran en el cuadro 1.

Como control de la homogeneidad de la enzima obtenida luego de los distintos pasos de purificación, se sometió una fracción de la proteína con actividad de TAT y ASAT (LmTAT) obtenida luego de la cromatografía en Sephacryl-S200 a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Figura 3).

Figura 2: Cromatografía de intercambio iónico en una columna Mono Q HR 5/5 equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8.4 y eluída con un gradiente lineal de KCl a un flujo de 1 ml/min.
Se registró la absorbancia en 280 nm.
La flecha señala la fracción con actividad de TAT y ASAT (LmTAT).



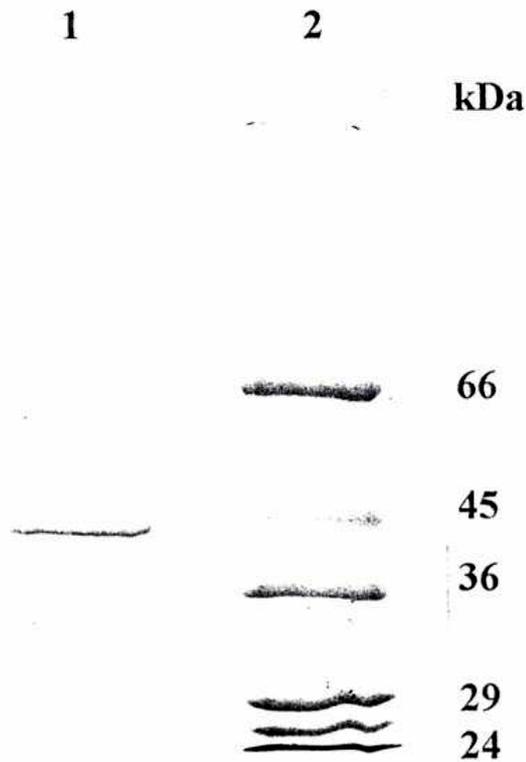
Cuadro 1: Cuadro de purificación de la LmTAT, a partir de 13 g (peso húmedo) de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

ETAPAS	PROTEINAS	ACTIVIDAD ENZIMATICA		RENDIMIENTO	PURIFICACION
		TOTAL	ESPECIFICA		
	mg	UE	UE/mg	%	VECES
EXTRACTO CRUDO	953	130	0.14	100	1
DEAE-CELULOSA	935	125	0.13	96	1
RED - 120 –SEPHAROSA	16.5	72	4.4	55	31
MONO - Q	0.82	17.1	20.8	13	149
SEPHACRYL -S 200	0.24	8.2	34.2	6.3	244

Figura 3: Electroforesis en geles de poliacrilamida de la LmTAT purificada.

La electroforesis se realizó en geles al 13% de acrilamida, en presencia de SDS y de β -mercaptoetanol.

- 1) Muestra proveniente de la cromatografía de exclusión molecular.
- 2) Marcadores de peso molecular: seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y tripsinógeno (24 kDa).



CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LA LmTAT

Determinación del peso molecular de la enzima nativa

El peso molecular de la LmTAT en condiciones no desnaturizantes se determinó mediante exclusión molecular en una columna de Sephacryl S-200 previamente calibrada. Se midió el volumen de elución de las proteínas marcadoras y se graficó el logaritmo del peso molecular de cada una de ellas en función del volumen de elución. Teniendo en cuenta el volumen de elución de la LmTAT, se dedujo un peso molecular de 90 kDa para esta enzima.

Determinación del peso molecular de la enzima desnaturizada

Se determinó el peso molecular de la LmTAT en condiciones desnaturizantes mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, el valor obtenido fue de aproximadamente 45 kDa (figura 3).

Teniendo en cuenta el peso molecular obtenido para la LmTAT en forma nativa, se puede suponer que la enzima se encuentra formada por dos subunidades de igual masa.

Composición en aminoácidos

La composición en aminoácidos obtenida para la LmTAT reducida con DTT y modificada con 4-vinil piridina con el fin de poder cuantificar los residuos de metionina, se muestra en la tabla 1.

Los resultados obtenidos indican la presencia de solo un residuo de metionina por subunidad de LmTAT.

Secuenciación parcial de la LmTAT

Con la intención de obtener la secuencia en aminoácidos a partir del extremo N-terminal de la enzima, 100 pmoles de la LmTAT purificada se sembraron en un filtro de polibreno y se secuenciaron, determinándose previamente la cantidad de muestra a utilizar por composición en aminoácidos.

Sin embargo, no se obtuvieron señales asignables a PTH-aminoácidos. Esto indicaría que el extremo N-terminal se encuentra bloqueado, por lo tanto se procedió a digerir la enzima con tripsina para obtener información acerca de las secuencias internas de la misma.

Digestión trípica de la LmTAT

Los péptidos trípticos resultantes se purificaron por HPLC en fase reversa (figura 4). El material eluido en los picos A, B, C y D se seleccionó para secuenciar por el método de Edman.

En todos los casos se observó una secuencia única, obteniéndose en cada uno de ellos los siguientes resultados:

A) LAHLILSNNELR

B) KEQEAELSAYQGYASGSNDTXAYR

C) LQTPGRWEIVID

D) KAEQLLLDVNLNYLPISGYQPFNDNA

Los fragmentos **B** y **D** presentaron secuencias muy similares a diferentes aspartato aminotransferasas de plantas (figura 5). En cambio, las secuencias de los fragmentos **A** y **C** no mostraron homología con ninguna proteína conocida en el banco de datos utilizado.

Reactividad inmunológica

Los anticuerpos anti TcTAT no reconocieron a la LmTAT. El resultado de este ensayo se muestra en la figura 6.

Figura 4: HPLC de fase reversa de la LmTAT modificada con 4-vinil piridina y digerida con tripsina.

Columna Vydac C18 (25 x 0.2 cm) equilibrada con TFA 0.1% en agua y eluida con gradiente lineal de acetonitrilo.

Se registró la absorbancia en 215 nm.

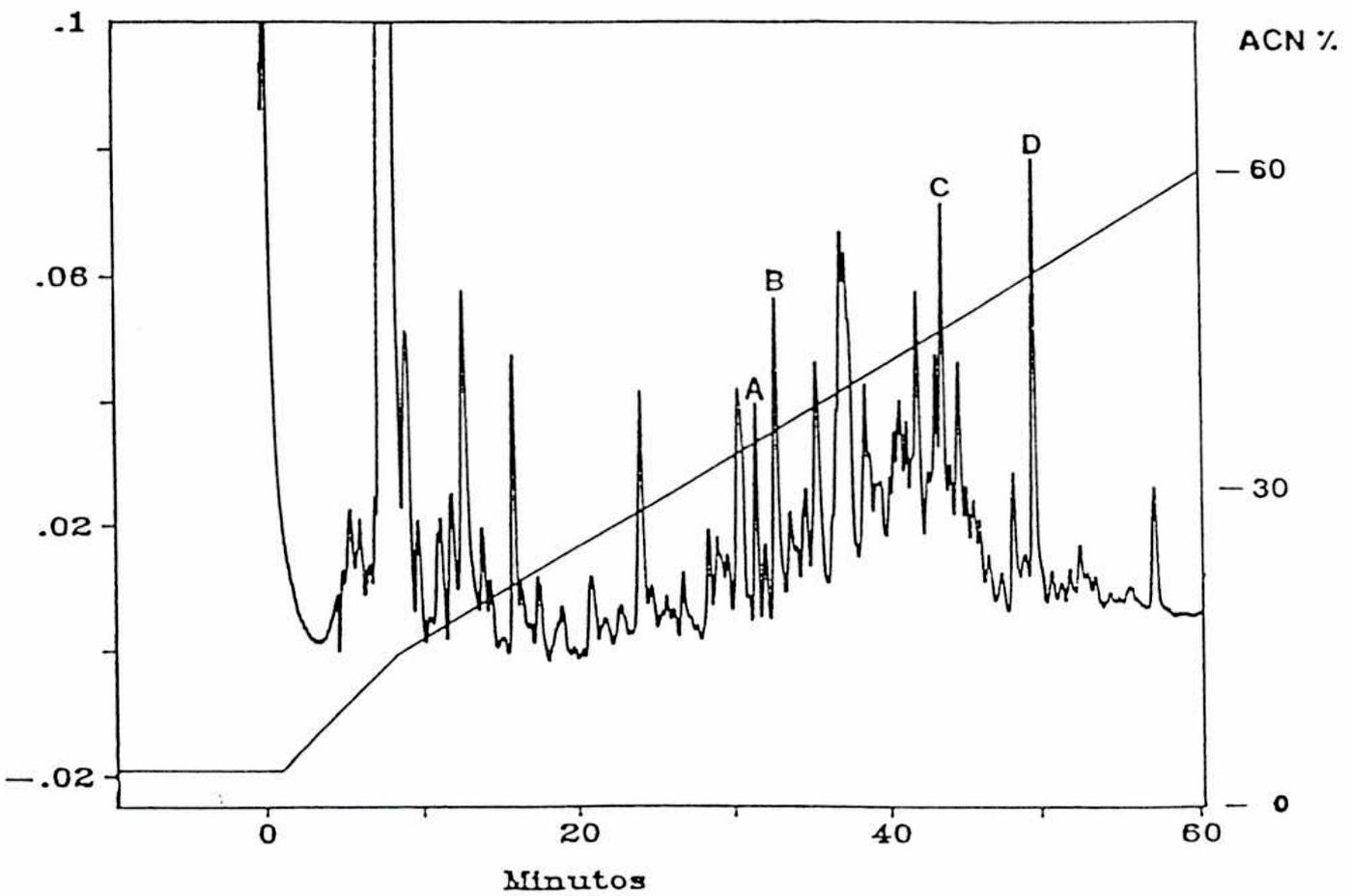


Tabla 1: Composición en aminoácidos de la LmTAT.

Aminoácido	Residuos por subunidad
Asp + Asn	45.4 (45)
Glu + Gln	44.5 (45)
Ser	22.0 (22)
Gly	21.4 (21)
His	11.8 (12)
Arg	23.4 (23)
Thr	24.4 (24)
Ala	46.5 (47)
Pro	18.7 (19)
Tyr	17.8 (18)
Val	19.3 (19)
Met	11.0 (11)
Ile	19.8 (20)
Leu	15.9 (16)
Phe	11.3 (11)
Lys	20.2 (20)
Cys	0.9 (1)
Trp	ND

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

LmTAT **K A E Q L L L D V N — L N Y E Y L P I S G Y Q P F N**

AtASATm **K A E N L M L E R G — D N K E Y L P I E G L A A F N**

MsASATp **K A E N L M L E R G — E N K E Y L P I E G L A A F N**

PmASATp **K A E N L M L E K G — E N K E Y L P I E G L A A F N**

EcASAT **K A E Q Y L L E N E — T T K N Y L G I D G I P E F G**

EcTAT **E A E A R L N A Q P H G A S L Y L P M E G L N C Y R**

TcTAT **K — K L K E A I D S Q E C N G Y F P T V G S P E A R**

LmTAT **K — E Q E A E L S A Y Q G Y A S G S L — D T X A Y R**

AtASATc **K S L L P F F D S A Y Q G F A S G S L — D T D A Q S**

MsASATc **K S L L P F F D V A Y Q G F A S G S L — D A Q P V R**

PmASATp **K K H M P F F D V A Y Q G F A S G S L — D E D A F S**

EcASAT **K G W L P L F D F A Y Q G F A R G L E E D A E G L R**

EcTAT **R E L I P F L D I A Y Q G F G A G M E E D A Y A I R**

TcTAT **R — L P L F S D E I Y A G M V F K G K — D P N A T F**

Figura 5: Comparación de las secuencias de los péptidos obtenidos mediante digestión con tripsina de la TAT de *L. mexicana* (LmTAT) con las ASATs de *Arabidopsis thaliana* (AtASAT), de *Medicago sativa* (MsASAT), de *Panicum miliaceum* (PmASAT) y de *Escherichia coli* (EcASAT) y con las TATs de *Trypanosoma cruzi* (TcTAT) y de *Escherichia coli* (EcTAT). c, citosólica; m, mitocondrial; p, plastídica. Las secuencias se obtuvieron del banco de datos del National Center for Biotechnology Information.

Figura 6: Reactividad inmunológica.

DOTS :	100 ng	50 ng	10 ng	de enzimas puras
<i>T.cruzi</i> TAT	●	●	●	
<i>Lm</i> TAT	○			

CARACTERIZACION CINETICA DE LA LmTAT

Determinacion de la especificidad de sustrato de la LmTAT

Cuando se determinó la especificidad de sustrato para la LmTAT, esta enzima resultó capaz de utilizar tirosina, triptofano, fenilalanina y aspartato con similar facilidad, aunque también puede utilizar leucina, metionina y alanina (Tabla 2).

Determinación de parámetros cinéticos

Se determinaron los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ aparentes para la tirosina, la fenilalanina, el triptofano, el glutamato, la alanina, el aspartato, el piruvato, el oxalacetato, el 2-oxoglutarato, el α -isocaproato y el α -KMB.

La tabla 3 muestra dichos valores para los aminoácidos aromáticos y el glutamato, obtenidos en presencia de una concentración 2 mM de oxalacetato, al igual que los obtenidos para la alanina y el aspartato en presencia de una concentración 9 mM de 2-oxoglutarato. Los valores correspondientes al piruvato, oxalacetato y 2-oxoglutarato se determinaron en presencia de una concentración 5 mM de tirosina y los correspondientes al α -isocaproato y α -KMB en presencia de una concentración 12.5 mM de aspartato.

El cálculo de la relación $V_{m\acute{a}x}/K_m$ para los distintos sustratos indica que el mayor valor es el que se obtiene para el par oxalacetato/tirosina, esto podría sugerir que ambos son los sustratos fisiológicos de la LmTAT en el parásito.

Tabla 2: Determinación de la especificidad de sustrato de la LmTAT.

Aminoácido	Actividad enzimática relativa porcentual
Tirosina	100
Triptofano	92
Fenilalanina	89
Aspartato	85
Leucina	30
Metionina	25
Alanina	15
Valina	NU
Isoleucina	NU
Treonina	NU
Glicina	NU
Prolina	NU
Lisina	NU
Serina	NU
Asparragina	NU
Arginina	NU
Glutamina	NU

NU: No utiliza dicho aminoácido.

Las determinaciones se realizaron utilizando la diaforasa como enzima acoplada con el fin de cuantificar el glutamato formado en la reacción de transaminación.

Tabla 3: Valores de Kms y Vmáx aparentes de la LmTAT.

Co-sustratos (mM)	Sustratos	KmAp (mM)	VmáxAp (UE/mg)
Oxalacetato (2)	Tirosina	1.3 ± 0.2	124.6 ± 4.0
Oxalacetato (2)	Fenilalanina	0.9 ± 0.05	99.1 ± 1.0
Oxalacetato (2)	Triptofano	0.9 ± 0.03	93.4 ± 1.0
Oxalacetato (2)	Glutamato	171.8 ± 34	10.7 ± 2.0
2-Oxoglutarato (9)	Alanina	216.2 ± 11	64.0 ± 2.0
2-Oxoglutarato (9)	Aspartato	2.5 ± 0.10	128.3 ± 1.0
Tirosina (5)	Piruvato	5.6 ± 0.4	19.8 ± 0.4
Tirosina (5)	Oxalacetato	0.12 ± 0.01	86.6 ± 0.8
Tirosina (5)	2-Oxoglutarato	0.71 ± 0.1	39.6 ± 0.4
Aspartato (12.5)	α-isocaproato	1.1 ± 0.1	41.8 ± 1.1
Aspartato (12.5)	α-KMB	1.2 ± 0.1	47.2 ± 1.4

*La concentración de los co-sustratos se indica entre paréntesis.

Discusión

En este trabajo se describió y caracterizó en cuanto a sus propiedades enzimáticas, fisicoquímicas y estructurales una aminotransferasa con amplia especificidad de sustrato a partir de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

En el método de purificación desarrollado el extracto celular soluble se sometió a diferentes pasos cromatográficos: 1) intercambio iónico utilizando DEAE-celulosa, 2) cromatografía de pseudoafinidad empleando Red120-Sepharosa, 3) intercambio iónico utilizando una matriz cromatográfica microparticulada con grupos amonio cuaternarios y 4) exclusión molecular en Sephacryl S-200. De esta manera se logró purificar la LmTAT hasta homogeneidad a juzgar por su comportamiento electroforético en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

La enzima que se purificó unas 244 veces, con un rendimiento del 6.3%, posee una actividad específica de 34.2 UE/mg.

La mayoría de las aminotransferasas están constituidas por dos subunidades iguales de aproximadamente 40 kDa. El peso molecular determinado para la LmTAT en condiciones nativas también es de aproximadamente 90 kDa y para la enzima desnaturalizada es de 45 kDa, tratándose, entonces, de un dímero formado por subunidades de igual masa.

El extremo amino terminal de la LmTAT se encuentra bloqueado, por lo tanto no se pudo secuenciar la proteína a partir de él.

La composición de aminoácidos mostró la presencia de dos residuos de metionina por molécula de LmTAT. Todas las aspartato aminotransferasas conocidas se caracterizan por presentar muy pocos residuos de cisteína en su composición y por carecer de puentes disulfuro. Las aminotransferasas aromáticas se diferencian por poseer, en cambio, un número alto de residuos de cisteína en su composición. Así, la TAT de *T. cruzi* presenta 20 residuos de cisteína por molécula, y la enzima de hígado de rata presentaría 16 residuos de cisteína por molécula sin que se haya detectado la presencia de puentes disulfuro. Por otra parte, las secuencias de aminoácidos de dos fragmentos polipeptídicos permitieron relacionar la LmTAT con el grupo de las aspartato aminotransferasas de plantas (figura 5),

observándose muy poca homología con otras aminotransferasas con capacidad de transaminar aminoácidos aromáticos. Estos resultados indicarían una mayor relación de la LmTAT con el grupo de las aspartato aminotransferasas que con el de las aminotransferasas aromáticas.

La LmTAT al igual que la TAT de *T. cruzi* posee una amplia especificidad de sustrato, sin embargo se diferencia de ella dado que es capaz de transaminar aspartato además de aminoácidos aromáticos y utiliza con mucho menor eficiencia la alanina como sustrato. La amplia especificidad de sustrato de estas TATs sugeriría una relación con un antecesor común de la superfamilia de las aminotransferasas.

Nuestros estudios no permitieron detectar en los promastigotes de *L. mexicana* la capacidad de reducir los productos de transaminación de aminoácidos aromáticos a los correspondientes derivados del ácido láctico. Esto sugiere diferencias en el catabolismo de aminoácidos aromáticos entre ambos parásitos.

Referencias Bibliográficas

-Referencias bibliográficas-

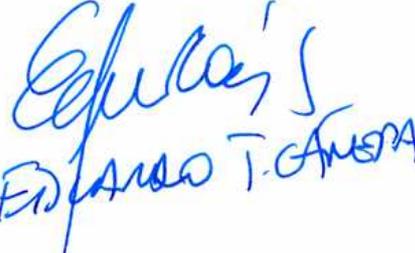
1. Mehta, P. K., Hale, T. I. & Christen, P. (1993) *Eur. J. Biochem.* **214**, 549-561.
2. Jensen, R. A. & Gu, W. (1996) *Journal of Bacteriology* **178**, 2161-2171.
3. Jansonius, J. N. & Vincent, M. G. (1987) *Biological macromolecules and assemblies, active sites of enzymes* **3**, 187-285.
4. Yeas, M. (1974) *J. Theor. Biol.* **44**, 145-146.
5. Stibbs, H. H. & Seed, J. R. (1975) *Int. J. Biochem.* **6**, 197-203.
6. El Sawalhy, A., Seed, J. R., El Attar & Hall, J. E. (1995) *J. EUK. Microbiol.* **42**, 684-690.
7. Eleelayoova, S., Marbury, D., Rainey, P., Mackenzie, N. & Hall, J. (1992) *J. EUK. Microbiol.* **39**, 350-355.
8. Montemartini, M., Santomé, J. A., Cazzulo, J. J. & Nowicki, C. (1993) *Biochem. J.* **292**, 901-906.

9. Montemartini, M., Búa, J., Bontempi, E., Zelada, A., Ruiz, A. M., Santomé, J. A., Cazzulo, J. J. & Nowicki, C. (1995) *FEMS Microbiol. Letters* **133**, 17-20.
10. Montemartini, M., Santomé, J. A., Cazzulo, J. J. & Nowicki, C. (1994) *Mol. Biochem. Parasitol.* **68**, 15-23.
11. Le Blancq, S. M. & Lanham, S. M. (1984) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**, 373-375.
12. Lainson, R. (1981) *Hileia Med.* **3**, 35-40.
13. Diamondstone, T.I. (1966) *Anal. Biochem.* **16**, 395-401.
14. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
15. Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680-685.
16. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

17. Rej, R. (1982) Anal. Biochem. **119**, 205-210.


Dra. CRISTINA NOWICKI
Profesora Adjunta




Eduardo T. AMADOR