

T 9/25

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE
LA PIRUVATO CARBOXILASA DE RATA POR
GENERACIÓN DE DIFERENTES ISOFORMAS
DE RNA MENSAJERO**

**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA**
N.º Documento 614988069
N.º Copia 16264940



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 05-06-03
ENTRADA NUM. 1948

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Granada**

DADDAOUA, ABDELALI

**Tesis Doctoral
Granada, 2003**

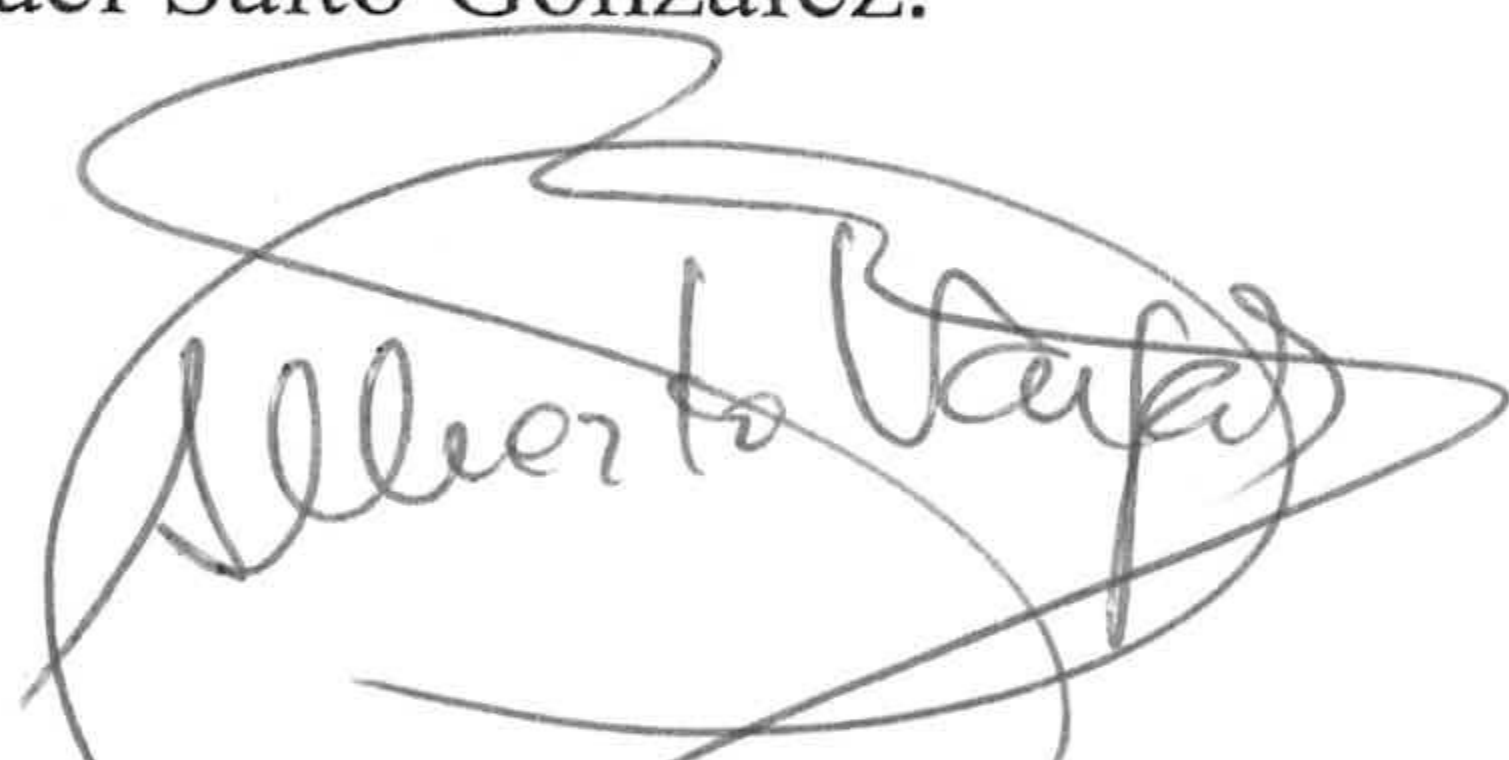
UNIVERSIDAD DE GRANADA
29 Mayo 2003
COMISION DE DOCTORADO

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA
PIRUVATO CARBOXILASA DE RATA POR GENERACIÓN DE
DIFERENTES ISOFORMAS DE RNA MENSAJERO**

Memoria presentada para aspirar al
Grado de Doctor en Ciencias
Biológicas por el Licenciado Abdelali
Daddaoua.



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular de la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Granada, bajo la dirección de
los Doctores Alberto Manuel Vargas Morales y
Rafael Salto González.



Alberto M. Vargas Morales
Catedrático de la Universidad de Granada



Rafael Salto González
Profesor Titular de la Universidad de Granada

III.1.2.2. Células eucariotas	59
III.1.2.3. Bacterias	59
III.1.2.4. Vectores de DNA	59
III.1.2.5. Oligonucleótidos	60
III.1.2.6. Productos para manipulación de DNA o RNA	62
III.1.2.7. Medios de cultivo de células eucariotas	63
III.1.2.8. Otros reactivos	63
III.2 METODOS	64
III.2.1. Cultivos de bacterias	64
III.2.2. Transformación	64
III.2.2.1. Preparación de células competentes	64
III.2.2.2. Transformación mediante choque térmico	65
III.2.2.3. Transformación por electroporación	65
III.2.3. Aislamiento y purificación de DNA plasmídico	66
III.2.3.1. Método de la Lisis alcalina	66
III.2.3.2. Método "Concert prep" para purificación de plásmidos a pequeña escala	67
III.2.3.3. Método "Maxiprep" para purificación de plásmidos a gran escala	67
III.2.4. Digestión con enzimas de restricción	68
III.2.5. Electroforesis de DNA	68
III.2.5.1. Electroforesis horizontal en gel de agarosa	68
III.2.5.2. Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida	69
III.2.5.3. Electroforesis capilar	69
III.2.6. Recuperación de fragmentos de DNA de gel de agarosa	69
III.2.7. Ligación de DNA	70
III.2.8. Extracción y cuantificación de RNA total en tejidos	70
III.2.8.1. Extracción de RNA	70
III.2.8.2. Determinación de la concentración de RNA	71
III.2.9. <i>Northern-blot</i>	72
III.2.9.1. Separación electroforética de RNA	72
III.2.9.2. Transferencia de RNA a membrana de Nylon	72

III.2.9.3. Marcaje de sondas de DNA con nucleótidos radioactivos	72
III.2.9.4. Hibridación	73
III.2.10. Transcripción inversa (RT)	74
III.2.11. Secuenciación de DNA	74
III.2.12. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	74
III.2.13. Extensión de cebadores (Primer extension)	75
III.2.13.1. Marcaje de oligonucleótidos y de marcadores de tamaño	76
III.2.13.2. Hibridación de oligonucleótidos y extensión	76
III.2.14. Southern-blot	76
IV. RESULTADOS	79
IV.1. ESTUDIO DE LAS ISOFORMAS DE RNA MENSAJERO DE LA PIRUVATO CARBOXILASA EN RATA.	79
IV.1.1. Región codificante del mRNA	79
IV.1.2. Estudio del extremo 3' del mRNA	81
IV.1.3. Estudio del extremo 5' del mRNA	83
IV.2. PAPEL DE LOS DIFERENTES 5'-UTRS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA	91
IV.2.1. Construcciones moleculares	91
IV.2.1.1. Clonación de las isoformas 5'-UTR de ambos promotores	91
IV.2.1.2. Inserción de las isoformas 5'-UTR en el vector pEGFP-N2	94
IV.2.2. Efecto de los 5'-UTRs de la piruvato carboxilasa sobre la expresión de la proteína fluorescente verde	96
IV.2.2.1. Cultivo, transfección y selección de células hepáticas C9	97
IV.2.2.2. Localización subcelular de la proteína fluorescente verde	97
IV.2.2.3. Efecto de los 5'-UTRs de la piruvato carboxilasa sobre la intensidad de fluorescencia	101
IV.3. EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PIRUVATO CARBOXILASA EN RATA	108
IV.3.1. Diseño de herramientas	108

IV.3.1.1. Herramientas para el estudio de los diferentes 5'UTRs	108
IV.3.1.2. Herramientas para el estudio del uso diferencial de promotores	112
IV.3.2. Expresión de isoformas en tejidos	113
IV.3.2.1. Efecto del ayuno sobre la cantidad de mRNA para piruvato carboxilasa en diferentes tejidos de rata	113
IV.3.3. Efecto del ayuno en la expresión de isoformas de la piruvato carboxilasa en hepatocitos de rata	117
IV.3.3.1. Efecto del ayuno sobre el estado ácido-básico en rata.	117
IV.3.3.2. Expresión de PC en hepatocitos periportales y perivenosos.	118
V. DISCUSIÓN	123
VI. CONCLUSIONES	143
VII. BIBLIOGRAFÍA	145

I.- ANTECEDENTES

I.- ANTECEDENTES

I.1.- REACCIÓN GENERAL CATALIZADA POR LA PIRUVATO CARBOXILASA

La carboxilación directa del piruvato hacia oxalacetato fue ya postulada en 1940 como un posible mecanismo para la formación de ácidos dicarboxílicos mediante la fijación de CO₂ (Wood & Werkman, 1940). En 1960, Woronick y Johnson comunicaron la formación de aspartato y malato a partir de piruvato, CO₂ y ATP en extractos de *Aspergillus niger* y tres años más tarde, Utter y Keech detectaron en un concentrado de mitocondrias hepáticas de pollo un enzima que catalizaba la carboxilación directa del piruvato para dar oxalacetato. Al enzima se le ha dado el nombre trivial de piruvato carboxilasa y es designado como piruvato: CO₂ ligasa (ADP), EC 6.4.1.1.

El enzima cataliza la reacción:



La reacción tiene lugar en presencia de Mg²⁺ y de un catión monovalente (típicamente K⁺). Además es necesaria la presencia de un acil-CoA que principalmente es el acetil-CoA (Warren & Tipton, 1974a).

La reacción está desplazada hacia la derecha y éste es el sentido en el que transcurre normalmente en la mayor parte de los organismos y tejidos estudiados, constituyendo una excepción los reticulocitos de conejo, en los que realmente existe una reversibilidad funcional del enzima (Müller *et al.*, 1974).

Este enzima está ampliamente distribuido en las diferentes especies, habiendo sido detectada su actividad en la mayoría de los tejidos de los vertebrados, aunque su mayor capacidad catalítica (expresada por miligramo de proteína) aparece en hígado, corteza renal y tejido adiposo de mamíferos. La vasta distribución del enzima refleja los múltiples papeles que desempeña en el metabolismo: gluconeogénesis a partir de precursores de tres

carbonos, síntesis anaplerótica de oxalacetato, glicérogénesis y lipogénesis y, por último, también es importante en el metabolismo de ciertos aminoácidos (Figura 1.1).

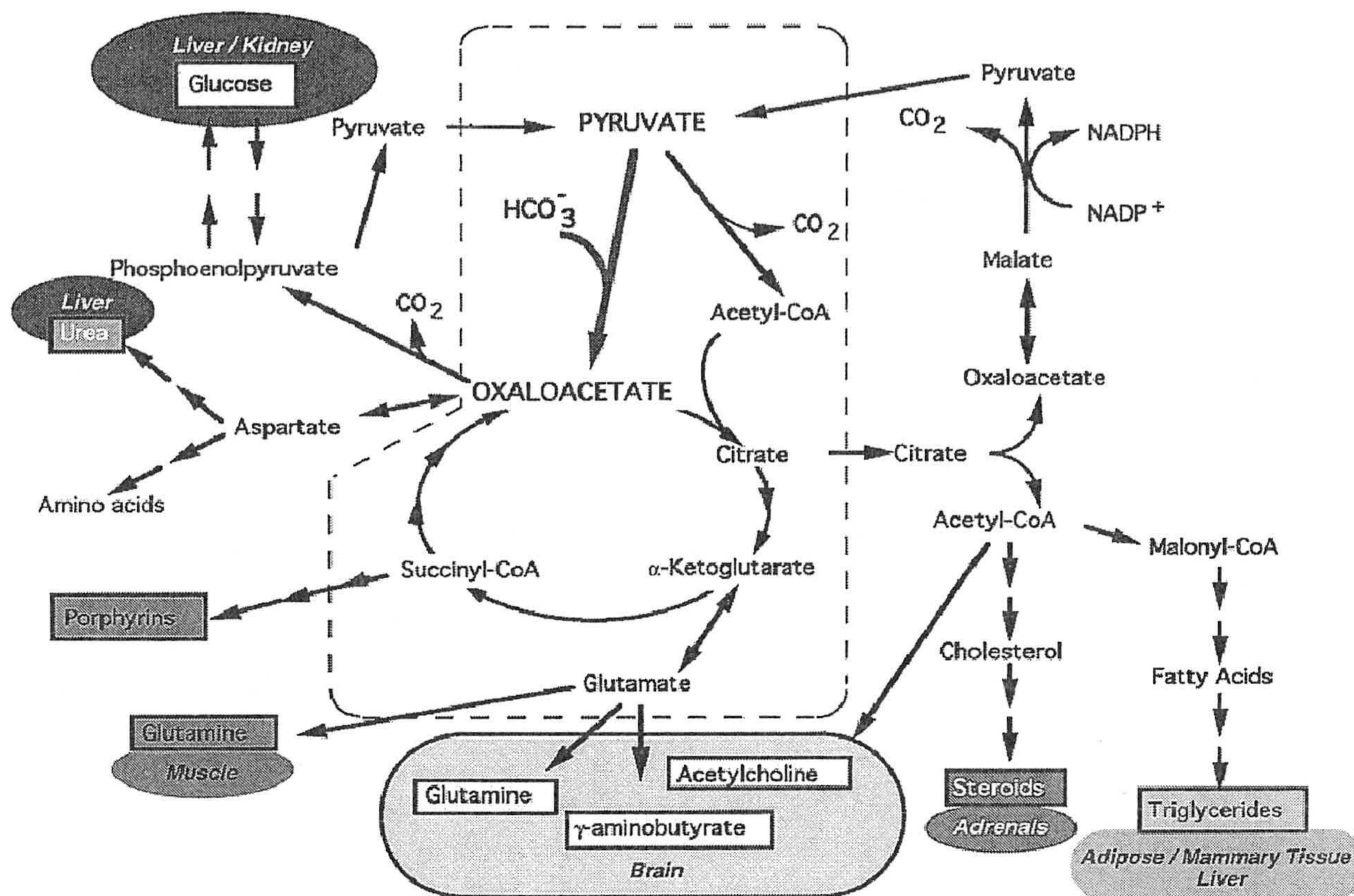


Figura 1. 1.- Representación esquemática de las funciones anapleróticas de la piruvato carboxilasa en mamíferos. Se han resaltado en color las rutas metabólicas de especial relevancia en ciertos tejidos. Mediante una línea de puntos se indica la localización mitocondrial de algunas de las reacciones señaladas.

La estequiometría de la reacción de la piruvato carboxilasa fue estudiada por Utter y Keech (1963), cuyos resultados mostraban: a) equimolaridad entre el piruvato utilizado y el oxalacetato formado; b) el ADP y el Pi son los productos de la utilización del ATP, y c) el acetil-CoA juega sólo un papel catalítico en la reacción. También hallaron que el CO_2 incorporado se une al carbono metílico del piruvato. La piruvato carboxilasa presenta un mecanismo de reacción similar al de los demás enzimas dependientes de biotina.

I.2.- ENZIMAS BIOTINICOS

I.2.1.- Reacciones catalizadas por los enzimas biotínicos

La biotina fue identificada como un factor de crecimiento para las levaduras en 1935 y desde entonces su papel biológico, estructura y mecanismo de acción han sido estudiados ampliamente. La biotina es un cofactor esencial para un pequeño número de enzimas que realizan diferentes funciones metabólicas (Tabla 1.1). En general la biotina actúa como un transportador de grupos CO_2 , unidos de manera covalente, en aquellas reacciones en las que el CO_2 es fijado a un aceptor (Carboxilasas), un grupo carboxilo es transferido de un donador a un aceptor (Transcarboxilasas) o bien un grupo carboxilo es eliminado como CO_2 de un donador (Decarboxilasas).

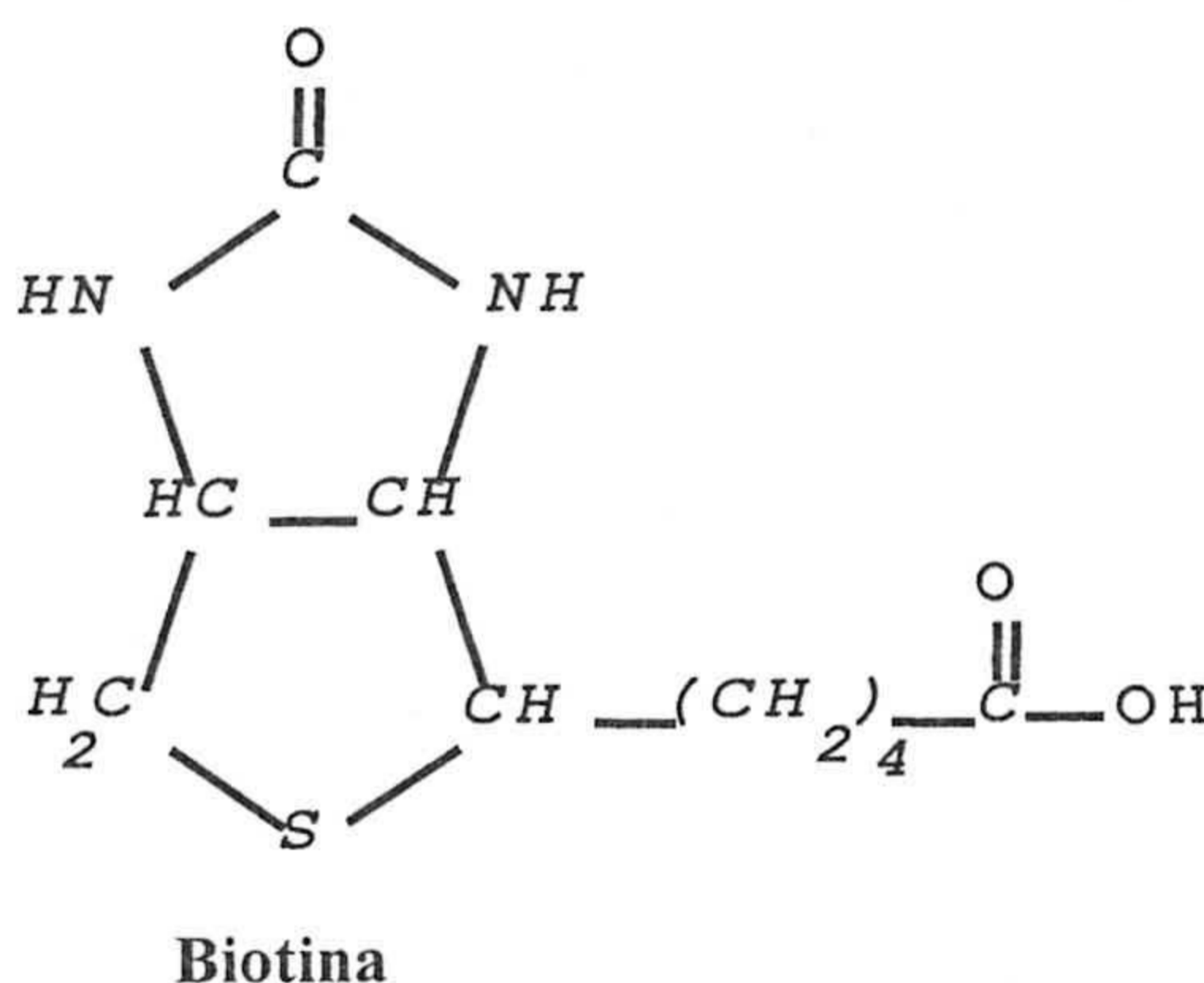


Figura 1.2. Estructura de la D-(+)-Biotina

Existe una amplia evidencia (Wood & Barden, 1977) de que la reacción catalizada por los enzimas que presentan biotina en su estructura tiene lugar por medio de dos reacciones parciales:



En la transcarboxilasa, un donador de carboxilos (Metilmalonil-CoA) reemplaza al ATP y CO_3H^- en la reacción parcial *1a*. En la decarboxilasa, la reacción parcial *1b* tiene lugar hacia la izquierda seguida de la descomposición de la biotina carboxilada para dar CO_2 . Cada reacción parcial (tanto la reacción *1a* como la *1b*) tiene lugar en un dominio diferente del enzima, siendo el papel esencial de la biotina en la catálisis la transferencia del CO_2 fijado como grupo carboxilo entre los dos dominios.

Tabla 1.1. Enzimas Biotínicas

EC	NOMBRE	FUNCIÓN
EC 2.1.3.1	Transcarboxilasa	Regulador de la fermentación de ciertos carbohidratos a propionato en las propionibacterias
EC 6.4.1.1	Piruvato carboxilasa	Cataliza la primera reacción de la gluconeogénesis. Tiene un papel anaplerótico y de relleno de los niveles de oxalacetato del ciclo de Krebs.
EC 6.4.1.2	Acetil-CoA carboxilasa	Cataliza la reacción que une unidades de acetato en la biosíntesis de ácidos grasos.
EC 6.4.1.3	Propionil-CoA carboxilasa	Es un enzima esencial de la ruta por la que el propionato entra al ciclo de Krebs en forma de succinato, convirtiéndose por tanto el propionato en un sustrato gluconeogénico.
EC 6.4.1.4	3-Metilcrotonil-CoA carboxilasa	Este enzima está implicado en la catálisis de la leucina y de ciertos compuestos isoprenoides.
EC 6.4.1.5	Geranil-CoA carboxilasa	Se encuentra en microorganismos que catabolizan compuestos isoprenoides como el citronelol.
EC 6.3.4.6	Urea carboxilasa	Aparece en microorganismos que crecen en medios con urea como única fuente de nitrógeno y que carecen de ureasa.
EC 4.1.1.41	Metilmalonil-CoA decarboxilasa	Cataliza uno de los pasos finales en la fermentación del lactato en <i>Micrococcus lactiticus</i> .
EC 4.1.1.3	Oxalacetato decarboxilasa	Se encuentra en el <i>Aerobacter aerogenes</i> en medios que presentan citrato como única fuente de carbono.

La estructura cuaternaria de los enzimas biotínicos ha sido muy investigada en los últimos años y en particular los casos de la transcarboxilasa, piruvato carboxilasa y acetil-CoA carboxilasa. Todos los enzimas estudiados presentan una estructura oligomérica. No obstante, a pesar de que la reacción general catalizada por los enzimas que contienen biotina es muy similar, se ha observado una considerable variedad en su estructura y, así, varía entre la estructura relativamente simple de la piruvato carboxilasa tetramérica de mamíferos al caso de la transcarboxilasa compuesta por 30 polipéptidos. Esta variabilidad parece ser que refleja diversos estados evolutivos de los enzimas biotínicos (Obermayer &

Lynen, 1976).

Aunque existen nueve enzimas biotínicas, en mamíferos el número de enzimas biotínicos presentes en una célula no es superior a cinco, estando implicados en reacciones claves del metabolismo intermediario de ácidos grasos y del metabolismo glucídico y de aminoácidos (Figura 1.3)

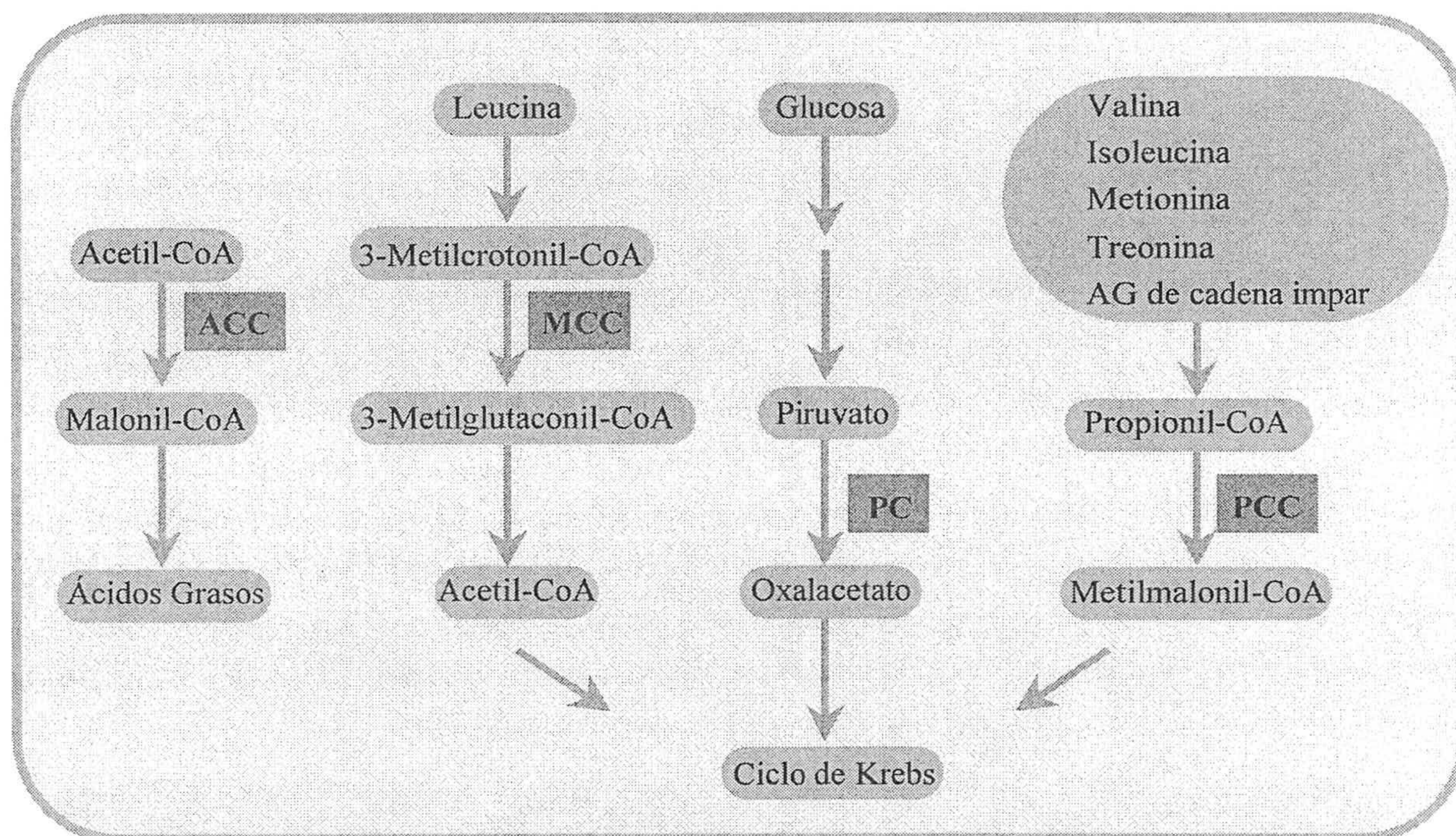


Figura 1. 3.- Papel de las carboxilasas dependientes de biotina en el metabolismo humano. ACC: Acetil-CoA carboxilasa; MCC: 3-Metilcrotonil-CoA carboxilasa; PC: Piruvato carboxilasa y PCC: Propionil-CoA carboxilasa.

I.1.2.- Metabolismo y estructura de los enzimas biotínicos

Es probable que el uso generalizado de tecnologías basadas en la interacción de la biotina con avidina o streptavidina en Bioquímica, Inmunología, Biología celular o Biotecnología oculten el hecho de que la biotina es ante todo una vitamina necesaria para todos los seres vivos. La biotina es sintetizada en plantas, casi todas las bacterias y algunos hongos y tiene un papel central en el metabolismo cuando se encuentra unida a proteínas.

La unión de la biotina a proteínas se establece mediante un enlace covalente en el centro activo de una serie de enzimas, biotin enzimas, que transfieren el dióxido de carbono a partir del bicarbonato a una serie de ácidos orgánicos para originar

intermediarios metabólicos. La mayoría de organismos presenta no más de cinco enzimas biotinilados, indicando esto que la reacción de biotinilización es muy específica. Además, es interesante destacar que en bacterias, la biotinilización tiene un efecto directo sobre la expresión génica.

Los organismos superiores son incapaces de sintetizar la molécula de biotina y por tanto dependen completamente de la pequeña cantidad de esta vitamina presente en los alimentos. Por este motivo, se ha desarrollado un sistema muy eficiente para garantizar la obtención y utilización de esta vitamina de una forma idónea (Figura 1.4) (Pacheco-Alvarez *et al*, 2002). La biotina ingerida en la dieta, al encontrarse unida a proteínas no se encuentra disponible y debe ser liberada previamente. Esta reacción es llevada a cabo por una biotinidasa pancreática que rompe específicamente el enlace entre la biotina y el grupo ϵ -amino de la cadena lateral de lisina a la cual se une la molécula de biotina. La biotina así liberada es activamente absorbida en el intestino y posteriormente en las células es unida a las correspondientes biotin enzimas. Los enzimas biotínicos activos, es decir las holocarboxilasas, son degradados al igual que otras proteínas del organismo en el metabolismo celular normal, a aminoácidos y a biocitina o biotinil-lisina. Para la ruptura de la unión entre la biotina y la lisina es necesaria la presencia de biotinidasas citoplasmáticas o plasmáticas, cuya actividad se relaciona con un reciclaje adicional de la biotina (Figura 1.4). Además, como ya hemos indicado la biotinidasa está implicada en la absorción intestinal de la biotina, ya que ésta normalmente se ingiere unida a proteínas.

Cada uno de los enzimas biotínicos es sintetizado en el organismo en una forma inactiva denominada apocarboxilasa, de manera que llegan a ser metabólicamente activos (holocarboxilasas) cuando se unen covalentemente a la biotina. Probablemente, esta reacción de unión covalente de la biotina a una cadena lateral de lisina del enzima biotínico. sea la reacción más importante de este ciclo y está catalizada por la enzima denominada biotina-proteína ligasa.

La biotinización es una reacción que transcurre en dos etapas en la que se produce la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo de la biotina y el grupo ϵ -amino de la lisina a modificar (Figura 1.5). La reacción es muy similar a la que catalizan las aminoacil-t-RNA sintetasas. Esta reacción se ha conservado evolutivamente y diferentes biotina-proteína ligasas pueden catalizar la unión de biotina a enzimas de otros organismos

alejados evolutivamente. En cada organismo existe una única biotina-proteína ligasa responsable de la unión de la biotina a todos las biotin enzimas celulares (Chapman-Smith & Cronan,1999) .

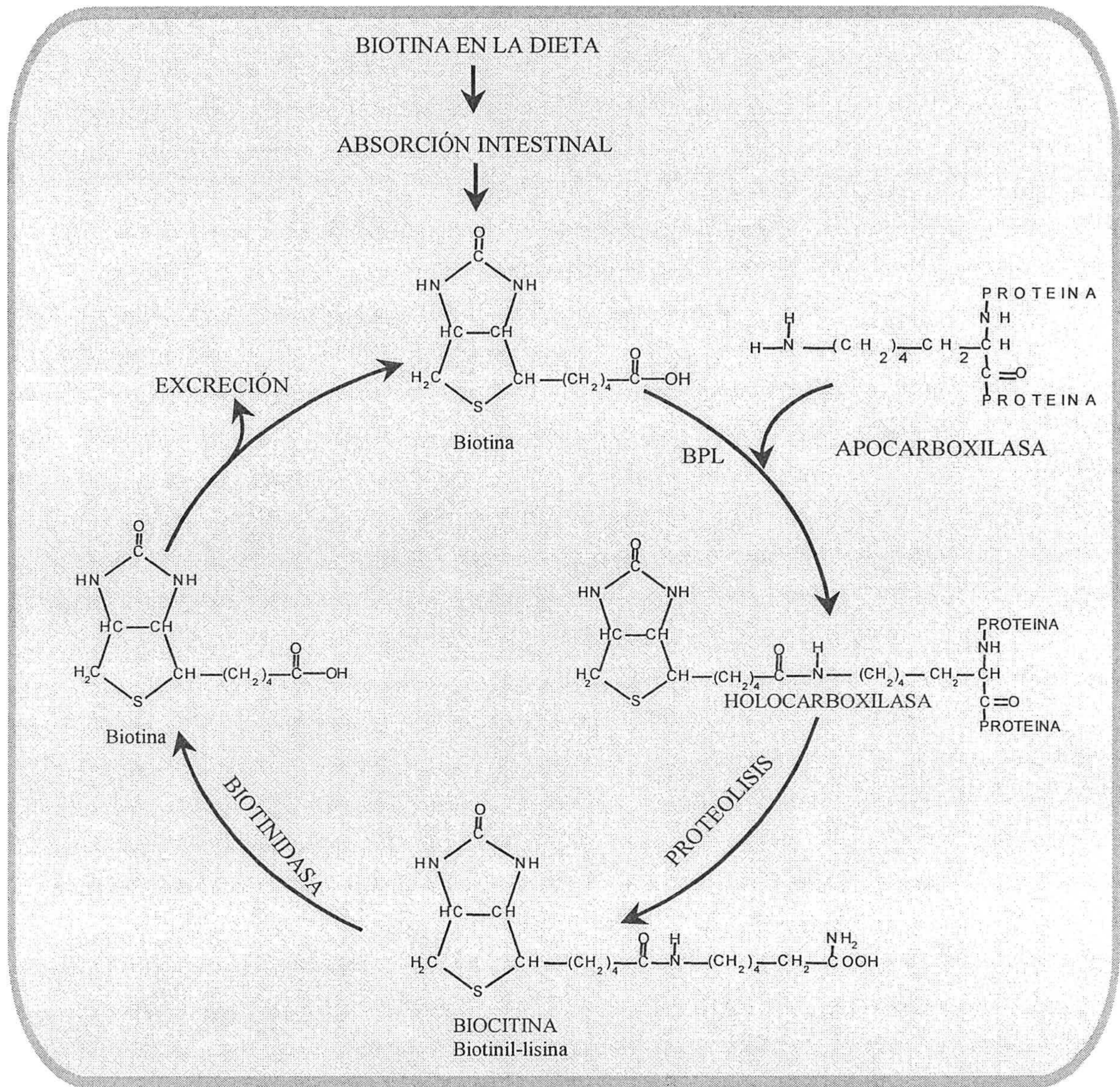


Figura 1. 4. Ciclo de la biotina en los mamíferos.

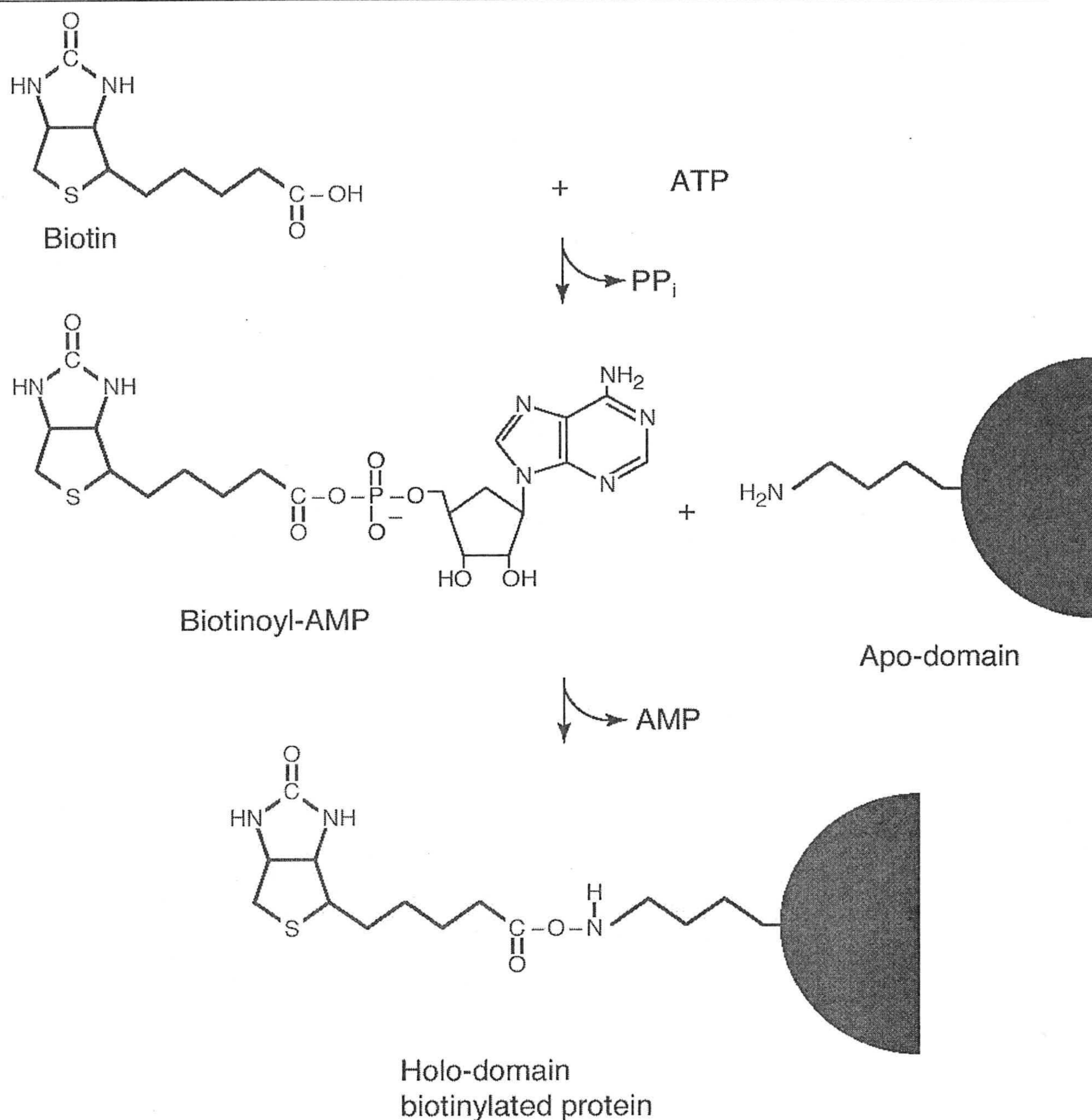


Figura 1. 5.- Reacción catalizada por la biotina-proteína ligasa.

La única biotina-proteína ligasa cuya estructura tridimensional se conoce es BirA. Se trata de una proteína monomérica de 35 kDa responsable de la biotinilización en *E. coli* (Figura 1.6). En la estructura cristalográfica claramente se observa una región expuesta a solventes en la que se localiza la unión de biotini-lisina. Así mismo, se infiere la presencia de un motivo conservado de unión a ATP de secuencia GRGRRG próximo al sitio de unión de la biotina. Curiosamente, esta proteína posee en su extremo amino un dominio hélice giro hélice de unión a DNA ya que en función de su unión a biotinoil-5'-AMP o no,

es capaz de reprimir el operón de síntesis de biotina en *E. coli* por unión directa a la región promotora del mismo (Cronan, J. E., Jr 1989).

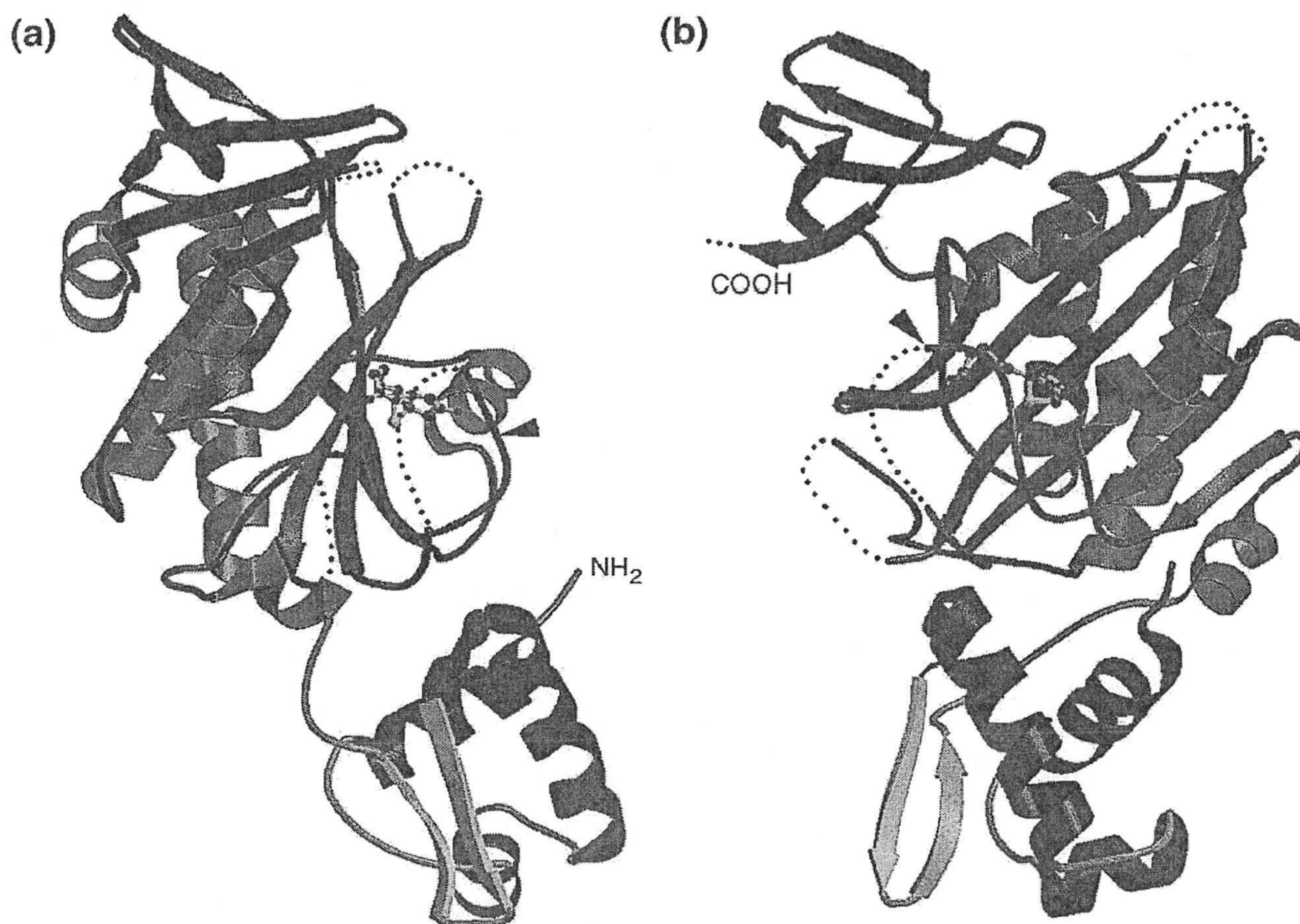


Figura 1. 6.- Estructura de BirA, la biotina-proteína ligasa de *E. coli*. (a) Estructura mostrando la unión de la biotina en el centro activo del enzima. El motivo de unión a ATP se indica por una flecha. (b) Vista de la estructura tras una rotación de 90° en torno al eje y. Basado en Wilson et al. (1992).

Tras la unión de biotina y ATP a las biotina-proteína ligasas, se produce la transferencia del grupo biotínico a la cadena lateral de lisina adecuada de la proteína a biotinilar. El dominio biotinilado de las biotina enzimas suele localizarse en el extremo carboxilo terminal con el grupo biotinil-lisilo dispuesto a unos 35 amino ácidos del extremo carboxilo. Existe una gran semejanza en la secuencia primaria de los dominios biotinilados de todos los enzimas biotínicos. La lisina que es biotinilada aparece siempre formando parte de un tetrapéptido conservado AMKM. Una modificación de esta secuencia, en concreto de las metioninas, aunque no bloquea totalmente la biotinilización, tiene un efecto dramático sobre la misma (Reche et al.1998). A partir de experimentos en los que

se han expresado dominios truncados se confirma que es necesario un mínimo de 35 a 40 aminoácidos conservados flanqueando cada lado del lugar de biotinización para que el péptido sea eficientemente reconocido por la biotina-proteína ligasa. Aparentemente estos aminoácidos contribuyen a la formación de un núcleo hidrofóbico en cuya superficie queda expuesto el lugar de modificación covalente (Athappily & Hendrickson, 1995) como se deduce de una serie de dominios biotinilados cuya estructura tridimensional es conocida (Figura 1.7).

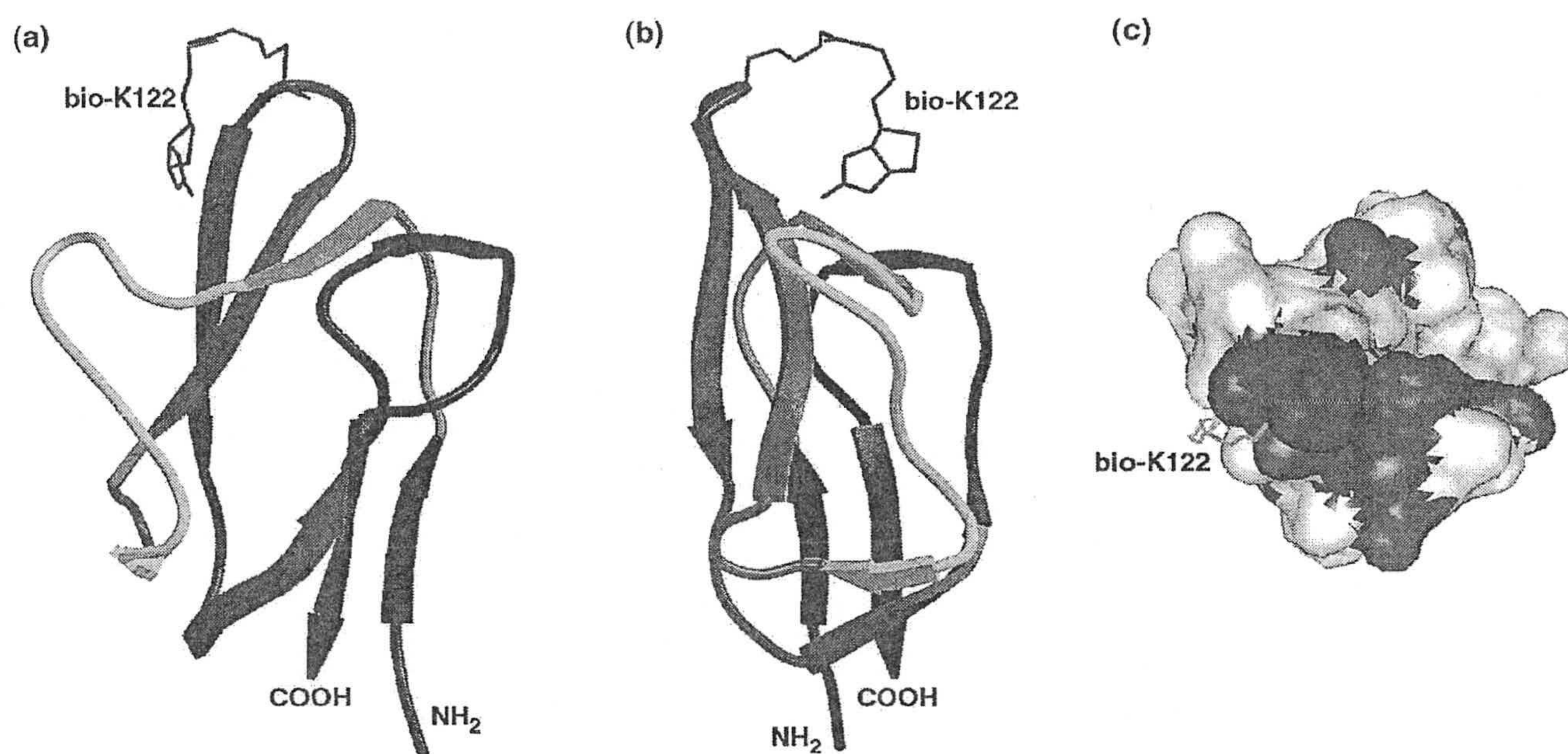


Figura 1. 7.- Estructura del dominio de unión a biotina de la proteína transportadora de biotina perteneciente al complejo de la acetil-CoA carboxilasa de *E. coli*. (a) Plegamiento general de la holoproteína y del grupo prostético unido a la lisina 122. (b) Vista rotada 90° en torno al eje y. (c) Modelo de bolas en la que se indican en azul aquellos aminoácidos esenciales para la biotilización. Vista desde arriba y derecha. Basado en Roberts et al., 1999.

Es razonable suponer que los genes que codifican para las proteínas transportadoras de biotina de los enzimas biotínicos han derivado de un antecesor común de tal forma que tras un proceso de duplicación el gen original haya evolucionado independientemente para codificar para los distintos enzimas biotínicos que tienen diferentes funciones aunque relacionadas entre sí (Lynen, F. 1979). Este posible origen común se pone de manifiesto cuando se analiza la secuencia de aminoácidos del lugar de biotinización. Además de la secuencia conservada MKM, todos los biotin enzimas presentan una secuencia conservada

PXP a 30-35 amino ácidos de lado amino de la lisina biotinilada. Así mismo todos los biotin enzimas tienen numerosas glicocolas y valinas conservadas en posiciones específicas con respecto al sitio de biotinilización (Figura 1.8).

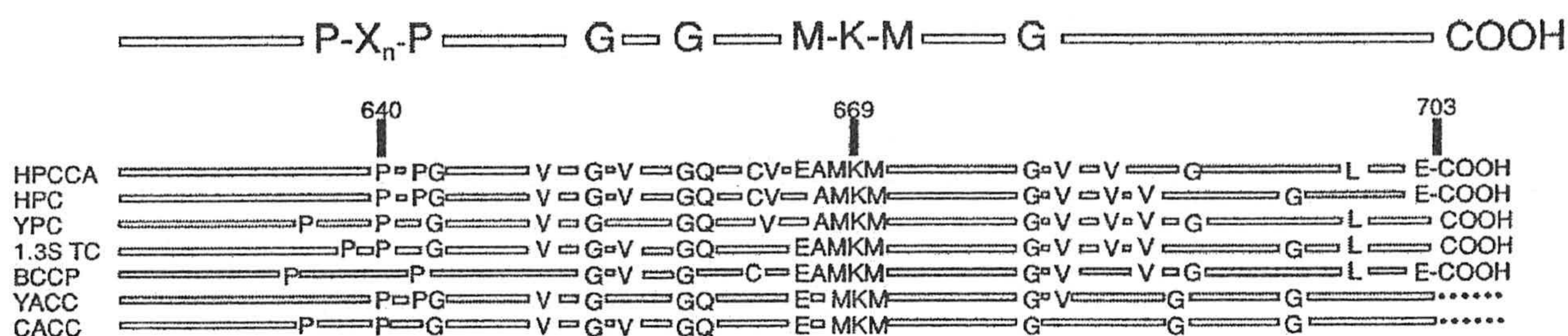


Figura 1. 8.-Secuencias conservadas de amino ácidos en los enzimas biotínicos. La secuencia de aminoácidos de varios enzimas biotínicos se muestra alineada con respecto al lugar de biotinilización. La numeración corresponde a la posición de los aminoácidos en la propionil-CoA carboxilasa. HPCCA, propionil-CoA carboxilasa humana; HPC, piruvato carboxilasa humana; YPC, piruvato carboxilasa de levaduras; 1.3S TC, subunidad 1.3S de la transcarboxilasa de *P. shermanii*; YACC, Acetil-CoA carboxilasa de levadura y CACC, Acetil-CoA carboxilasa de pollo.

I.3.- PIRUVATO CARBOXILASA

I.3.1.- Significado fisiológico de la carboxilación del piruvato

La piruvato carboxilasa está ampliamente distribuída tanto en microorganismos como en vertebrados. En los vertebrados puede ser localizada en una gran diversidad de tejidos, exhibiendo niveles de actividad máxima muy dispares entre unos y otros. Esta extensa distribución del enzima refleja la variedad de funciones metabólicas en las que participa (Scrutton, 1971).

Se ha demostrado que la carboxilación del piruvato es útil como reacción anaplerótica del ciclo de Krebs (Adam & Haynes, 1969). Esta reacción también forma parte de la ruta gluconeogénica a partir de precursores de tres carbonos, lo que está relacionado con los altos niveles de enzima detectados en hígado y corteza renal, dos tejidos de elevada actividad gluconeogénica (Scrutton & Utter, 1968). Así mismo, la

piruvato carboxilasa está involucrada en la biosíntesis de algunos aminoácidos (Forissier & Baverel, 1981) y en la lipogénesis (Ballard & Hanson, 1967a), así como en la síntesis de ciertos metabolitos.

La importancia de la regulación de la actividad de la piruvato carboxilasa destaca si consideramos que el enzima cataliza una reacción común a diversas rutas metabólicas y, que, en tejidos gluconeogénicos es la primera reacción de la secuencia de síntesis a partir de piruvato y, por analogía con otros sistemas, puede ser considerada como una probable etapa reguladora del resto de la ruta metabólica (Barrit *et al.*, 1976). Por otro lado, el enzima exhibe características cinéticas propias de sistemas alostéricos, así como una estructura subunitaria (Valentine *et al.*, 1966; Scrutton & Utter, 1967; Utter & Fung, 1971). Además, su activación por acetil-CoA está acompañada de cambios conformacionales en la proteína (Scrutton & Utter, 1967). Todas las características anteriores son propias de enzimas reguladores.

I.3.1.1.- Anaplerosis

La reacción que cataliza la piruvato carboxilasa es la principal vía anaplerótica del ciclo del ácido cítrico. Este papel metabólico probablemente represente la función original de la piruvato carboxilasa y puede explicar la presencia de este enzima en muchos microorganismos y, en pequeña concentración, en tejidos como el cerebro (Mahan *et al.*, 1975), músculo esquelético (Spydevold *et al.*, 1976), músculo cardíaco (Peuhkurinen & Hassinen, 1982) y mucosa intestinal (Anderson, 1970), en los que las otras funciones de la piruvato carboxilasa no tienen un papel relevante.

La capacidad anaplerótica de la piruvato carboxilasa tiene un extenso apoyo experimental. Ya en 1969, Adam y Haynes incubaron hepatocitos de rata en presencia de piruvato y $^{14}\text{CO}_2$ y observaron que un 80% del radioisótopo fijado aparecía como malato y citrato. Estudiando la anaplerosis inducida por acetato en corazón de rata perfundido con $[1-^{14}\text{C}]$ -piruvato, se ha detectado el ^{14}C en los ácidos intermediarios del ciclo de Krebs, por lo que se puede afirmar que en el miocardio de rata la carboxilación del piruvato hacia intermediarios de cuatro carbonos del ciclo del ácido cítrico sucede bajo condiciones de necesidad de relleno anaplerótico de dicho ciclo (Peuhkurinen & Hassinen, 1982).

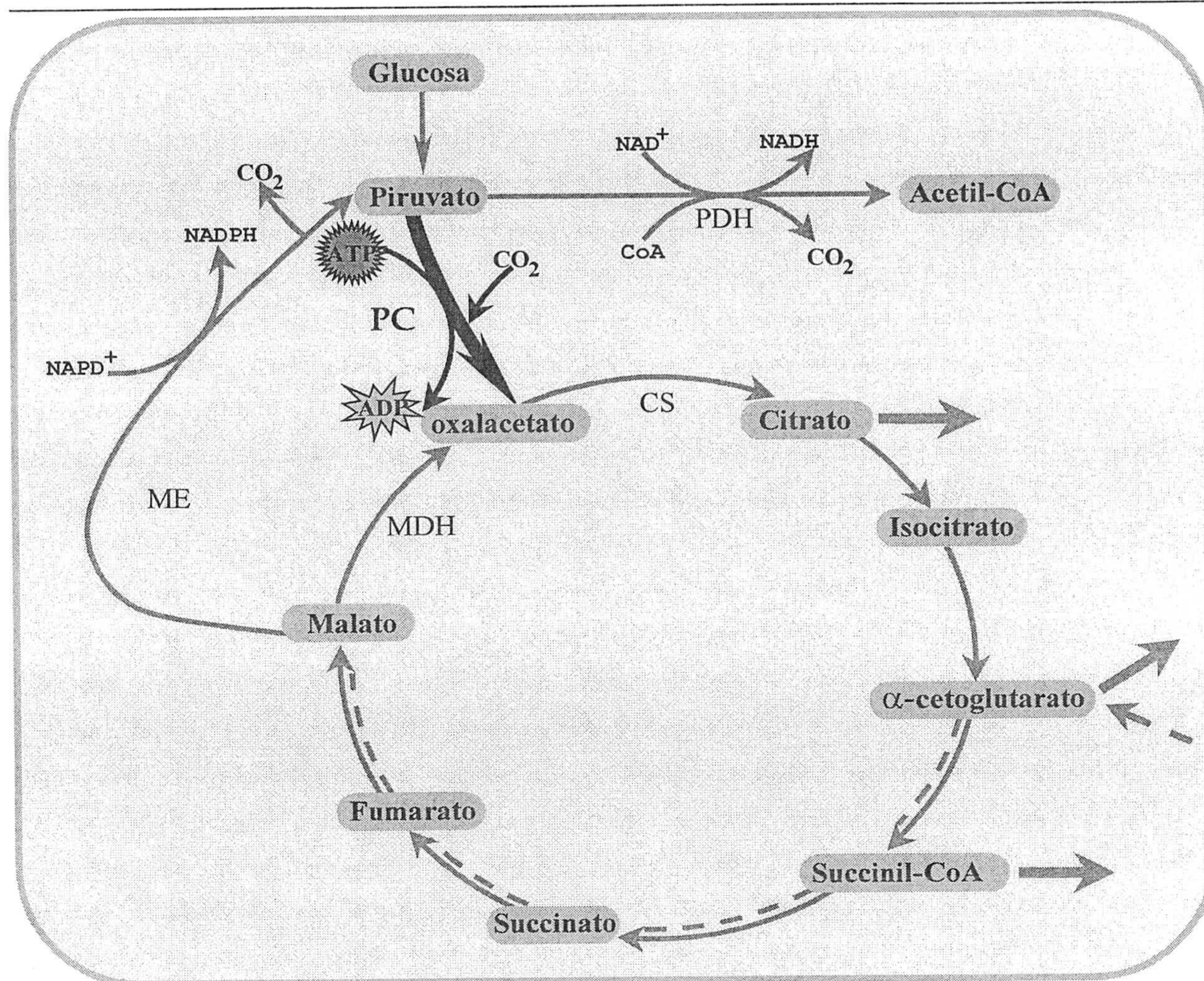


Figura 1. 9.- Papel que desempeña la piruvato carboxilasa en la anaplerosis del ciclo de Krebs. CS: Citrato sintasa; MDH: Malato deshidrogenasa; PDH: Piruvato deshidrogenasa; ME: Enzima málico; PC: Piruvato carboxilasa. Las flechas rayadas indican el relleno del ciclo por reacción anaplerótica, las flechas lisas señalan el vaciado del ciclo y las flechas discontinuas la inclusión y oxidación de productos intermedios, como aminoácidos. (Tomado de Jungermann & Mühler, 1984).

Aunque el oxalacetato es un intermediario del ciclo de Krebs, no se ha detectado oxalacetato marcado debido a la muy baja concentración fisiológica de este metabolito, de manera que cuando se produce la reacción con fines anapleróticos, a medida que es generado el oxalacetato va siendo transformado en citrato por la citrato sintasa, que utiliza el acetil-CoA aportado por el complejo de la piruvato deshidrogenasa. El papel anaplerótico de la piruvato carboxilasa en el ciclo de Krebs está esquematizado en la Figura 1. 9.

En algunos tejidos, como el tejido nervioso el papel anaplerótico de la piruvato carboxilasa es relevante. Aunque no ha sido localizado el enzima en neuronas (Shank *et al.*, 1993), sí se ha localizado la presencia del enzima en astrocitos (Wiesinger *et al.*, 1997). En estas células la función anaplerótica de la piruvato carboxilasa se ha propuesto como imprescindible para la producción de glutamina, mediante el ciclo glutamato/glutamina (Cooper & Plum, 1987) como se indica más adelante. El oxalacetato generado por la piruvato carboxilasa tiene un papel regulador en la síntesis de novo de glutamato por los astrocitos al incrementarse la concentración de intermediarios del ciclo de krebs (Gamberino *et al.*, 1997).

I.3.1.2.- Lipogénesis

Además del hígado y la corteza renal, el único tejido que exhibe una elevada actividad piruvato carboxilasa es el tejido adiposo (Ballard & Hanson, 1967a; Mackall & Lane, 1977), en el que se ha detectado un aumento de actividad del enzima de 18 veces durante el proceso de diferenciación de los preadipocitos 3T3 hasta adipocitos (Mackall & Lane, 1977), por lo que la carboxilación del piruvato es una reacción clave en la lipogénesis. Paralelamente al aumento de la actividad piruvato carboxilasa se produce una acumulación de grasa en la célula y un fuerte aumento en la actividad de la citrato liasa, otro enzima clave en la lipogénesis.

El papel de la piruvato carboxilasa en la lipogénesis está esquematizado en la Figura 1.10. Hemos de considerar que para se produzca la lipogénesis en el citosol es necesario el aporte de unidades de acetilo y un elevado nivel de NADPH citosólico. El transporte de unidades acetilo desde la matriz mitocondrial hasta el citosol se realiza en forma de citrato, el cual es escindido una vez que ha llegado al citosol por la citrato liasa. Por otro lado, aunque el oxalacetato es un intermediario del ciclo de el acoplamiento de los enzimas málico y malato deshidrogenasa proporciona un mecanismo para la génesis de NADPH utilizable en la biosíntesis de ácidos grasos. El piruvato formado reingresa en la mitocondria. Este drenaje de citrato mitocondrial requiere una continua anaplerosis de oxalacetato para que el dispositivo de transporte de acetil-CoA siga funcionando (Ballard & Hanson, 1970; Mackall & Lane, 1977).

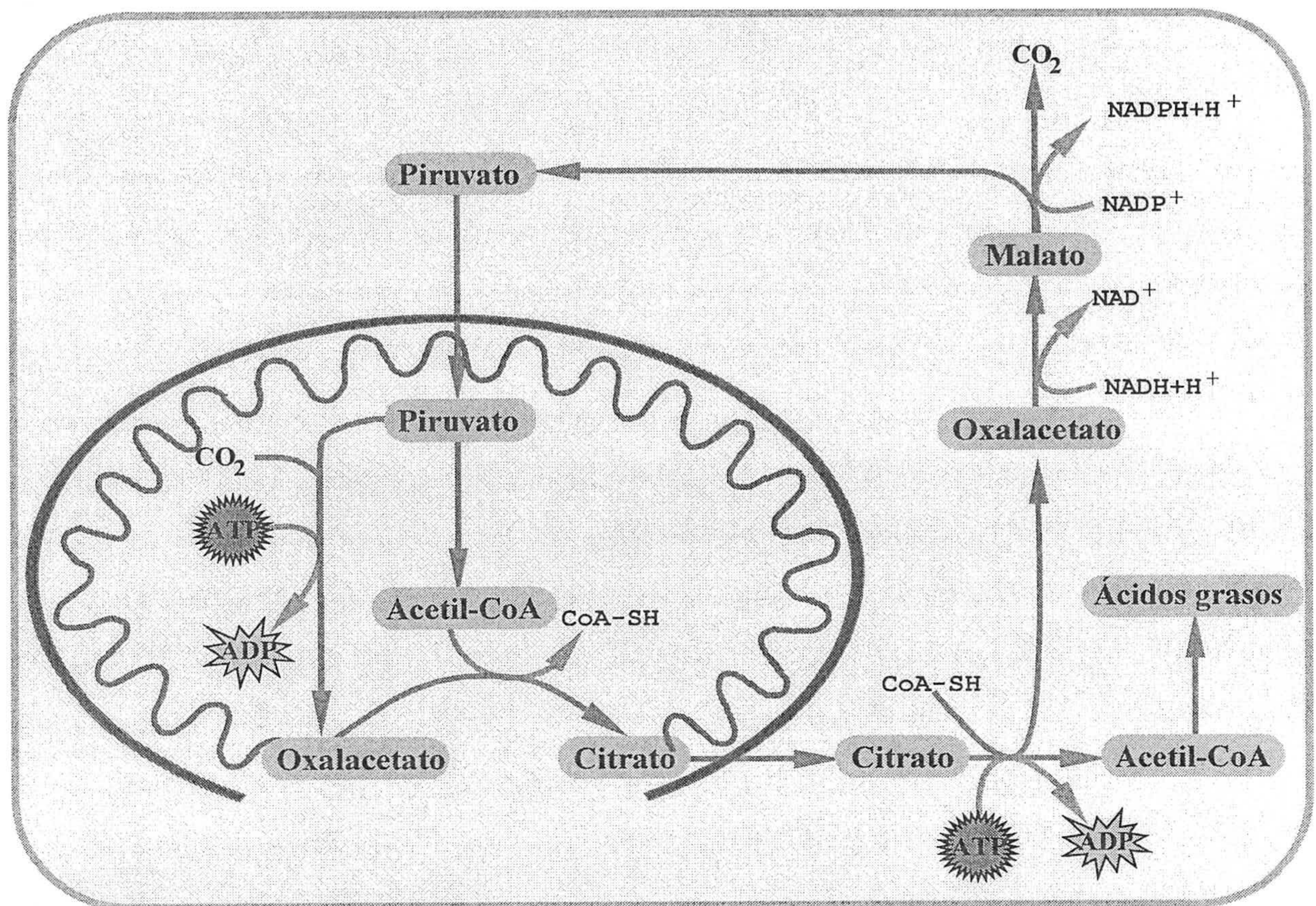


Figura 1. 10. Papel de la piruvato carboxilasa en el transporte intracelular de acetil-CoA y en la provisión de NADPH en la liponeogénesis. CS: Citrato sintasa; CL: Citrato ligasa dependiente del ATP; MDH: Malato deshidrogenasa; ME: Enzima málico; PC: Piruvato carboxilasa; PDH: Piruvato deshidrogenasa. (Tomado de Jungermann & Mühler, 1984).

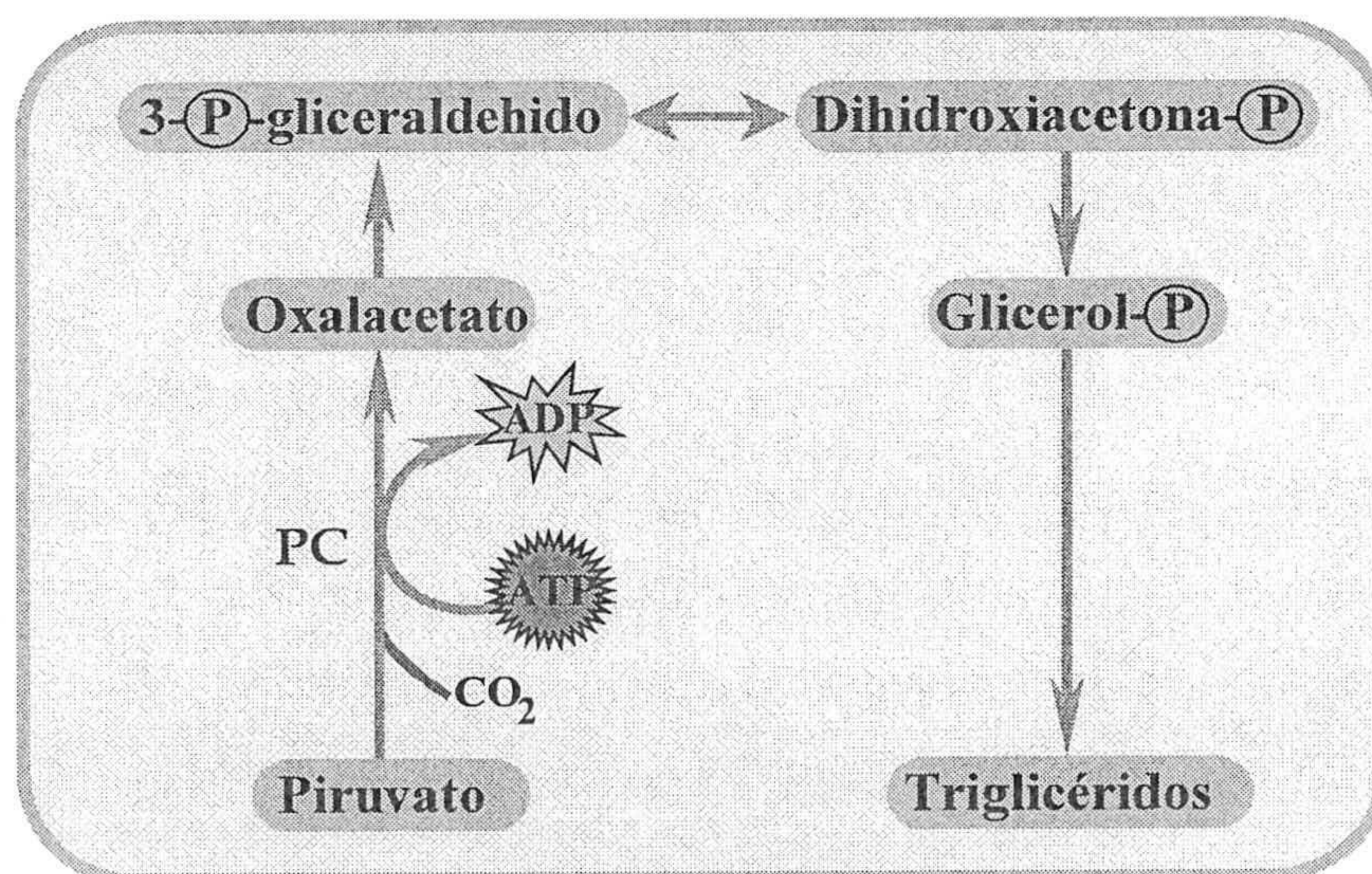


Figura 1. 11. Papel de la piruvato carboxilasa en la síntesis de glicerol.

La piruvato carboxilasa también desempeña esta misión en el cerebro de rata, donde además de utilizarse para la síntesis de ácidos grasos, el acetil-CoA transferido al citosol se usa como precursor de acetilcolina (Patel & Tilghman, 1973).

El otro aspecto de la participación de la piruvato carboxilasa en la biosíntesis de triacilglicéridos es la génesis de glicerol, que está esquematizada en la Figura 1. 11.

I.3.1.3.- Biosíntesis de aminoácidos

La piruvato carboxilasa interviene en la biosíntesis de los esqueletos carbonados del aspartato, glutamato y glutamina. En la corteza renal de cobaya se produce la síntesis de glutamina a partir de alanina (Forissier & Baverel, 1981). En los túbulos renales de este mamífero la glutamina es el principal producto del metabolismo de la alanina. La ruta de biosíntesis de la glutamina a partir de alanina está representada en la Figura 1. 12. Como se ilustra en la figura, la misión de la piruvato carboxilasa es reunir en forma de oxalacetato el esqueleto carbonado completo de una molécula de alanina y un carbono procedente de otra. Los otros dos carbonos que se enlazan posteriormente lo hacen vía citrato sintasa. Tras la descarboxilación del isocitrato ya está ensamblado el esqueleto carbonado de la glutamina. Cada molécula α -cetoglutarato producido se transamina con dos moléculas de alanina para dar glutamina. El balance del proceso, teniendo en cuenta sólo los reactivos y productos que contengan carbono, nitrógeno o ambos elementos es el siguiente:



La fijación del CO_2 juega un papel crítico en este proceso metabólico, observándose un aumento progresivo de la síntesis de glutamina a medida que se aumenta la concentración de bicarbonato en el medio de incubación.

La piruvato carboxilasa también interviene en la biosíntesis de aminoácidos dicarboxílicos (Patel & Tilghman, 1973). Ya en 1960, Woronick y Johnson observaron que los extractos de *Aspergillus niger* forman aspartato a partir de piruvato, CO_2 y ATP. Este proceso ha sido detectado también en reticulocitos de conejo (Müller *et al.*, 1974) y otros tejidos. La síntesis de aspartato y glutamato se produce mediante la transferencia de grupos

amino al oxalacetato y al α -cetoglutarato, respectivamente. El aspartato necesario para la síntesis de urea en la reacción catalizada por la arginina-succinato sintetasa puede verse limitado cuando existe poca actividad piruvato carboxilasa, por lo que también existe un nexo de unión entre este enzima y la ureogénesis hepática, habiéndose demostrado que es necesario un flujo mínimo a través de la piruvato carboxilasa para alcanzar una tasa óptima de producción de urea (Martín-Requero *et al.*, 1987). También tiene un papel importante en la biosíntesis de glutamina a partir de alanina (Forissier & Baverel, 1981), este proceso esta representado en la Figura 1. 13.

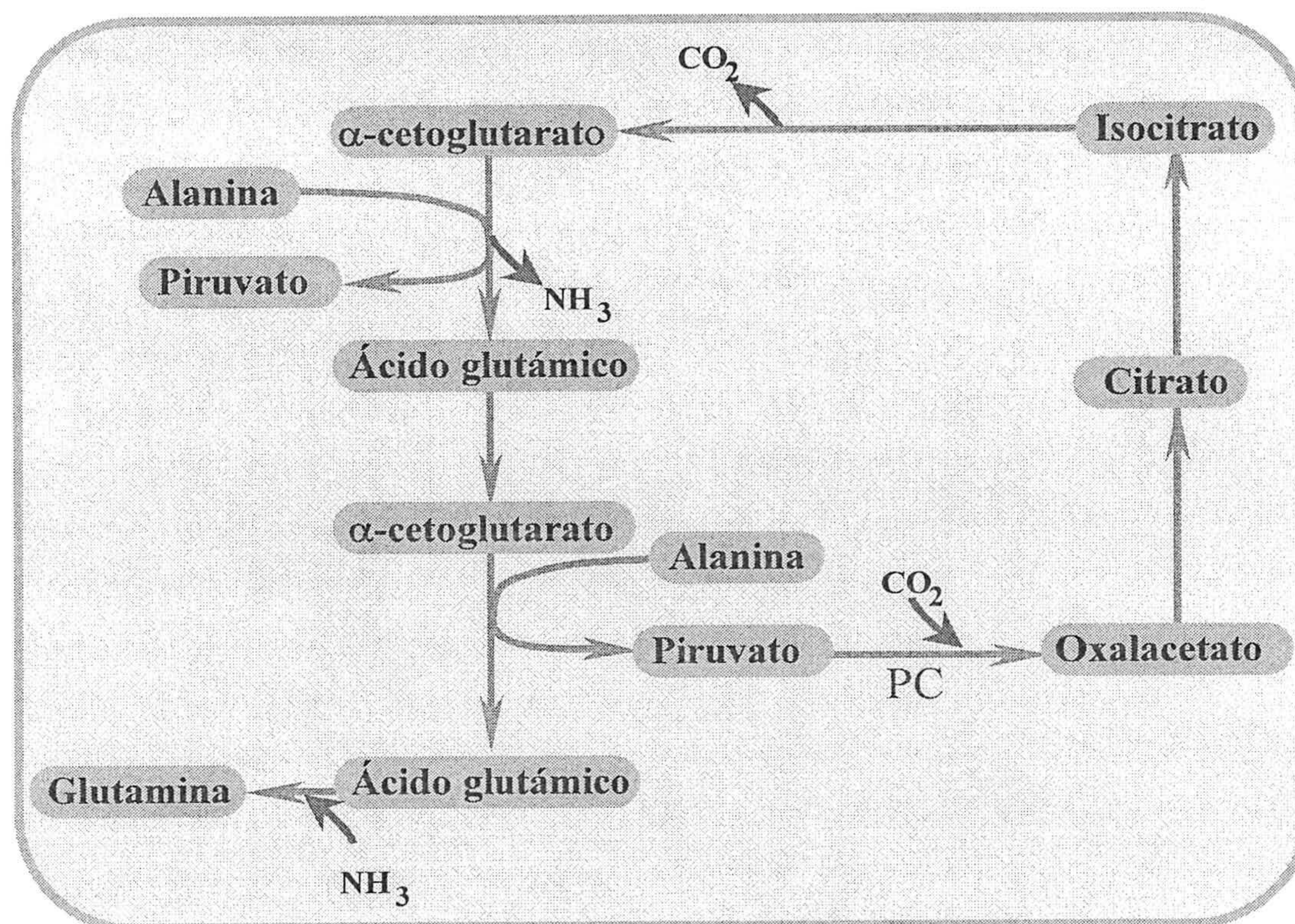


Figura 1. 13. Biosíntesis de glutamina a partir de alanina.

I.3.1.4.- Gluconeogénesis.

La gluconeogénesis es el proceso metabólico por el que se sintetiza glucosa a partir de precursores carbonados no glucídicos. Tiene como finalidad fundamental el mantenimiento de la glucemia en los períodos de ayuno, cuando la glucogenolisis no puede aportar suficiente glucosa a la sangre. De hecho, se considera que en situaciones de ayuno prolongado la gluconeogénesis puede llegar a ser responsable de hasta el 96% de la producción total de glucosa del organismo (Rothman *et al.*, 1991). También es el camino para metabolizar el lactato producido en tejidos glucolíticos, eritrocitos y músculo, en

particular despues del ejercicio intenso. En riñón puede estar relacionada con el mantenimiento del equilibrio ácido-básico del organismo y con la reabsorción de sódio y fosfato. Debido a la enorme importancia de la gluconeogénesis se han publicado magníficas revisiones sobre este tema (Hanson & Mehlman, 1976; Hue, 1981; Hers & Hue, 1983; Friedman, 1984; Moon, 1987; Pilkis *et al.*, 1988; Schoolwerth *et al.*, 1988).

Mientras que en mamíferos la glucolisis (degradación de glucosa hasta piruvato o lactato) puede ser activa en todo tipo de células, la gluconeogénesis queda restringida unicamente al hígado y al riñón, ya que otros órganos o tejidos carecen del equipo enzimático completo para la realización de este proceso. La ruta metabólica (Figura 1.14) no es la inversa a la glucolítica, aunque son compartidos gran cantidad de enzimas que actúan de manera reversible, existen tres barreras termodinámicas desde piruvato a fosfoenolpiruvato, desde fructosa 1,6-bisfosfato a fructosa 6-fosfato y desde glucosa 6-fosfato a glucosa, que son salvadas por la actuación de las enzimas gluconeogénicas piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (EC 4.1.1.32), fructosa 1,6-bisfosfatasa (EC 3.1.3.11) y glucosa 6-fosfatasa (EC 3.1.3.9), respectivamente.

Otra diferencia es que la glucolisis es un proceso integramente citosólico, mientras que para la gluconeogénesis se requiere la actuación de algunas etapas mitocondriales que vienen condicionadas por la localización de la piruvato carboxilasa (Ballard *et al.*, 1970) exclusivamente mitocondrial y de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de la que existen isoenzimas citosólicos y mitocondriales que varían en su distribución de una especie a otra (Nordlie & Lardy, 1963) siendo mayoritariamente citosólica en rata, ratón y hamster, casi exclusivamente mitocondrial en conejo y paloma y presentándose en proporciones semejantes en la mayoría de animales incluido el hombre (Ballard & Hanson, 1969; Bottger *et al.*, 1969; Diesterhaft *et al.*, 1971; Flores & Alleyne, 1971; Hanson & Garber, 1972; Longshaw & Pogson, 1972).

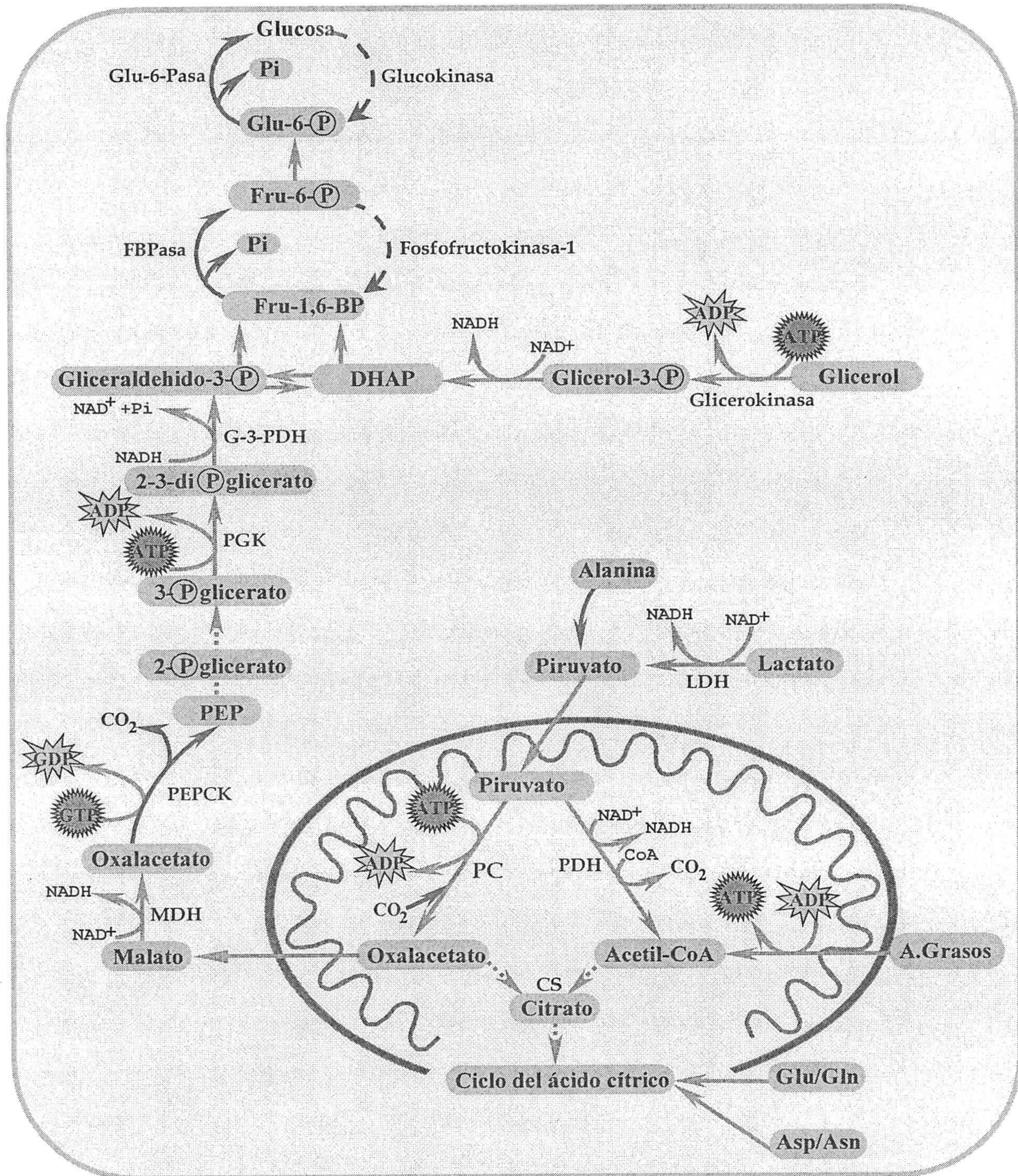


Figura 1. 14. Ruta de la gluconeogénesis. Etapas enzimática generadoras de flujo:
 (1) Piruvato carboxilasa; (2) Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; (3) Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa mitocondrial; (4) Fructosa-1,6-bifosfatasa; (5) Glucosa-6-fosfatasa; (6) Gliceroquinasa; (7) Fructoquinasa; (8) Glutaminasa.

El oxalacetato, producto de la reacción catalizada por la piruvato carboxilasa, no puede atravesar la membrana mitocondrial (Lardy *et al.*, 1965) por lo que para continuar la vía gluconeogénica debe ser descarboxilado en la mitocondria para formar fosfoenolpiruvato, cuando la distribución de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa lo permita, o bien, ser exportado al citosol en forma de malato o aspartato, dependiendo de la concentración relativa de NAD^+/NADH en ambos compartimentos celulares. Por último, otra diferencia es que la glucólisis es un proceso que genera energía y la gluconeogénesis a partir de la mayoría de sustratos requiere la hidrólisis de ATP.

La regulación de la glucólisis y de la gluconeogénesis se puede dividir en tres categorías (Pilkis *et al.*, 1988). El primer mecanismo de regulación implica el control de los niveles de sustratos, ya que en general estos alcanzan los tejidos gluconeogénicos en condiciones subsaturantes. Un segundo mecanismo que actúa en un corto plazo (minutos) regula la ruta mediante cambios en los estados de fosforilación o en los niveles de efectores alostéricos de los enzimas clave del proceso gluconeogénico. Por último, la regulación a largo plazo (horas a días) implica cambios en los niveles de actividad de los enzimas implicados mediante el control de la expresión génica, síntesis de proteínas y/o degradación de las mismas. Como veremos a continuación la piruvato carboxilasa es susceptible de control en los tres niveles implicados y su regulación debe ser fundamental para el normal funcionamiento de la gluconeogénesis a partir de precursores tricarbonados.

La regulación de la gluconeogénesis *in vivo* se produce minuto a minuto por la acción coordinada de numerosas hormonas, habiéndose demostrado que el glucagón, la adrenalina y diferentes efectores α y β -adrenérgicos estimulan la síntesis de glucosa a partir de piruvato o lactato en diversas preparaciones de hígado (Ross *et al.*, 1967; Exton & Park, 1968; Williamson *et al.*, 1969; Johnson *et al.*, 1972; Garrison & Haynes, 1973; Taylor *et al.*, 1983) y riñón (Klahr *et al.*, 1973; Kurokawa & Massry, 1973; Roobol & Alleyne, 1973; Guder & Ruprecht, 1975; McDonald & Saggerson, 1977; Saggerson & Carpenter, 1980; Kessar & Saggerson, 1982; Oliver, 1988). Las hormonas tiroideas y los glucocorticoides también inducen incrementos en la gluconeogénesis en ambos tejidos (Henning *et al.*, 1966; Exton *et al.*, 1970; 1972; 1973; Bartels & Sestoft, 1980; Allan & Titheradge, 1984).

Mientras que es evidente que el glucagon y las catecolaminas estimulan la gluconeogénesis por cambios en la actividad de los enzimas citosólicos fosfofructoquinasa-2-fructosa 2,6-bisfosfatasa, piruvato quinasa, fosfofructoquinasa-1 y fructosa 1,6-bisfosfatasa, también existen cambios persistentes en las mitocondrias aisladas de hígado o riñón expuestos a estas hormonas. Entre ellos, incrementos en la carboxilación del piruvato (Adam & Haynes, 1969; Garrison & Haynes, 1975; Garrison & Borland, 1979; Halestrap, 1978a; Chan *et al.*, 1979; Oliver, 1988), en la oxidación desacoplada de sustratos que producen NADH, de succinato y de acil-CoA (Yamazaki, 1975; Halestrap, 1978b; 1982; Siess & Wieland, 1978; Titheradge *et al.*, 1978; Zammit, 1980), en la relación ATP/ADP (Titheradge & Haynes, 1980; Siess *et al.*, 1977), en el volumen de la matriz mitocondrial (Halestrap *et al.*, 1980; Quinlan *et al.*, 1983; Halestrap *et al.*, 1986) y disminución en los niveles de α -cetoglutarato y glutamato (Siess *et al.*, 1977; Ui *et al.*, 1973a; 1973b), demostrándose que la velocidad de carboxilación del piruvato puede ser limitada por la actividad de la cadena respiratoria (Halestrap & Armston, 1984) y que ésta posee un elevado coeficiente de control de flujo (Halestrap, 1987; Pryor *et al.*, 1987).

Por aplicación del teorema del entrecruzamiento, a la concentración de metabolitos intermediarios, se ha demostrado que la carboxilación del piruvato es una etapa limitante de la velocidad del flujo gluconeogénico y, por tanto, es muy probable que está regulada (Williamson *et al.*, 1969; 1970; Exton & Park, 1969). Todos estos resultados hacen pensar que el control hormonal del metabolismo del piruvato ocurre, al menos en parte, a nivel de la piruvato carboxilasa. El glucagon y las catecolaminas estimulan la oxidación de ácidos grasos lo que se traduce en un incremento en la concentración de acetil-CoA, estimulando al enzima. Además el incremento mitocondrial del Ca^{2+} activa a la α -cetoglutarato deshidrogenasa disminuyendo la concentración de inhibidores glutamato y α -cetoglutarato. El incremento en el volumen de matriz mitocondrial aumenta la velocidad de la cadena respiratoria con lo que se produce más ATP disponible para la carboxilación.

Cuando se aplican los teoremas de Kacser y Burns (1973) y de Heinrich y Rapoport (1974) al estudio del control de flujo de las distintas etapas de la gluconeogénesis se encuentra que la piruvato carboxilasa es el enzima con mayor coeficiente de control para la gluconeogénesis a partir de lactato y piruvato en hepatocitos de rata (Groen *et al.*, 1983; 1986), resultados que también destacan el papel de este enzima.

Por otro lado, con el empleo de inhibidores como el dicloroacetato o el α -hidroxycinamato, que disminuyen el aporte de sustrato a la mitocondria, y el oxamato, que es un inhibidor competitivo de la piruvato carboxilasa, (Goodall *et al.*, 1981) se encuentran disminuciones paralelas en la carboxilación del piruvato y en la gluconeogénesis (Lacey & Randle, 1978; Martín-Requero *et al.*, 1986a; 1986b; Oliver, 1988).

Bannister (1976) ha comprobado que en pollos afectados por el síndrome del hígado y el riñón grasos, debido a la carencia de biotina en la dieta, se produce una gran disminución de la capacidad gluconeogénica y de la actividad piruvato carboxilasa en hígado y riñón, mientras que el resto de los enzimas gluconeogénicos que no dependen de la biotina mantienen actividades similares a las de los animales control.

Respecto a las hormonas tiroideas y glucocorticoides que actúan por incrementos en la velocidad de síntesis de algunas enzimas, se admite que tienen una acción permisiva sobre la gluconeogénesis. La mayoría de los estudios se han centrado sobre la inducción de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, que también resulta inducida por glucagon (Sasaki *et al.*, 1984). Sin embargo, existen suficientes evidencias para pensar que la piruvato carboxilasa también se induce cuando se requiere una adaptación a largo plazo en la gluconeogénesis (Martin & Titheradge, 1984; Martin *et al.*, 1984; Weinberg & Utter, 1979; Joseph & Subrahmanyam, 1972, Salto *et al.*, 1996).

Resumiendo, la carboxilación del piruvato está regulada por los tres mecanismos propuestos por Pilkis *et al.*, (1988), aporte de sustratos, modificación en los niveles de efectores alostéricos y cambios en la concentración de la piruvato carboxilasa, constituyendo por tanto, una etapa crucial en el control de la ruta gluconeogénica.

I.3.2.- Mecanismo de la reacción catalizada por la piruvato carboxilasa

La piruvato carboxilasa presenta un mecanismo de reacción similar al de los demás enzimas dependientes de biotina. Se cree que el centro activo de la piruvato carboxilasa consta de dos centros parciales de reacción separados espacialmente (Easterbrook-Smith *et al.*, 1976a). El brazo biotinil-lisilo transporta grupos carboxilato activados de un centro

catalítico parcial al otro. Como consecuencia de la existencia de estos dos centros catalíticos diferentes, la reacción global de carboxilación del piruvato puede ser descrita como la suma de dos reacciones parciales que representan los procesos que suceden en cada centro. La primera reacción consiste en la carboxilación del resto biotinil-lisilo. La ΔG° de la reacción es negativa debido a que la carboxilación de la unidad de biotina, de por sí endergónica, está acoplada a la hidrólisis del complejo $MgATP^{2-}$ hacia $MgADP^{-}$ y Pi . La segunda reacción es posible una vez que el brazo carboxibiotinil-lisilo se ha translocado hasta el segundo centro parcial. Allí se transfiere el grupo carboxilato al piruvato.

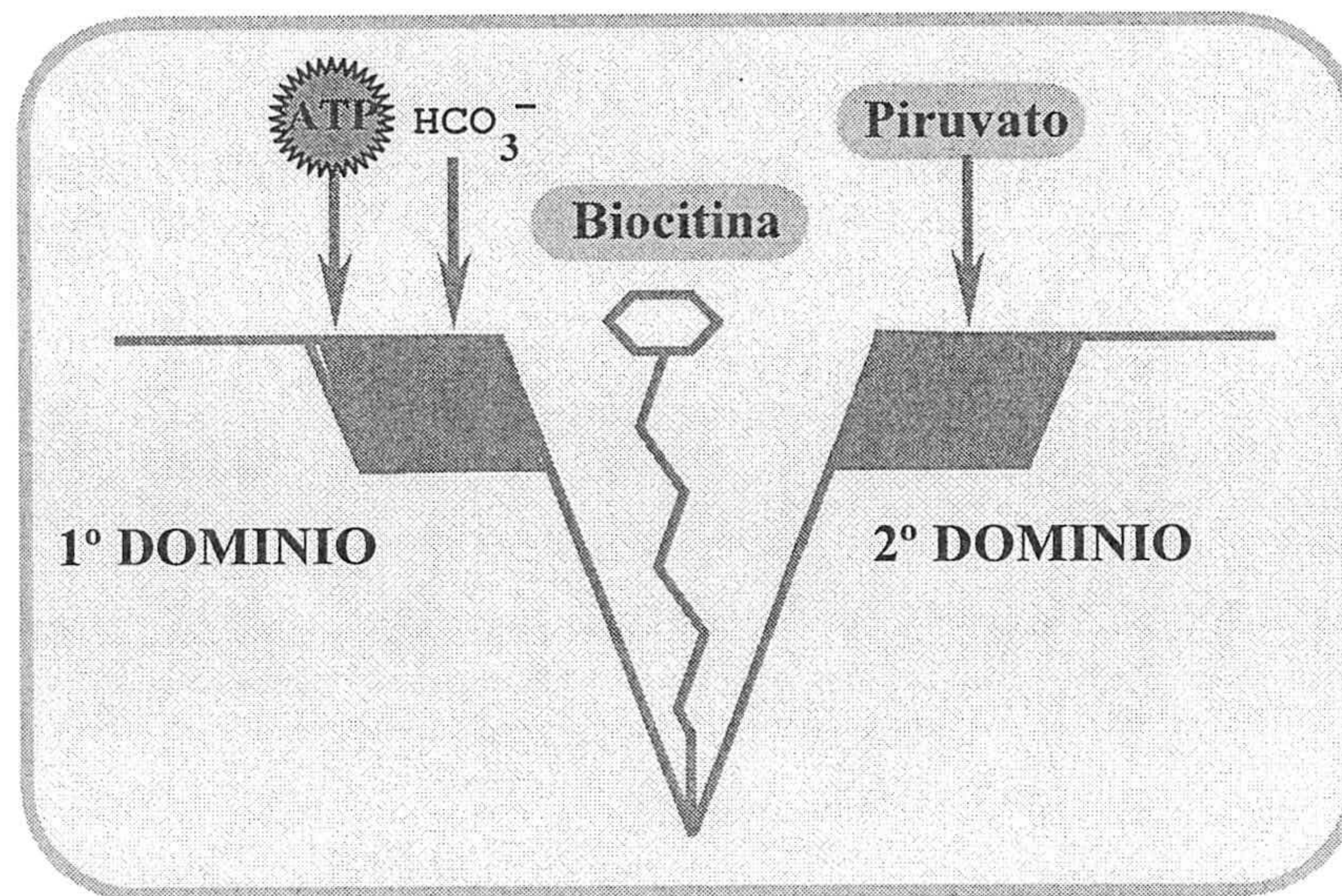


Figura 1. 15. Representación esquemática del centro activo de la piruvato carboxilasa mostrando los dos centros parciales y el brazo que contiene la biocitina (Tomado de Attwood & Keech, 1984).

Hay dos grupos de evidencias experimentales que apoyan este mecanismo enzimático:

1) Tras incubar el enzima con ATP , Mg^{2+} , $[^{14}C]-CO_3H^{-}$ y acetil-CoA se ha podido aislar mediante filtración a través de gel un complejo $Enz-[^{14}C]-carboxibiotina$ relativamente estable. Además, el grupo $[^{14}C]-carboxilato$ de dicho complejo puede ser transferido al piruvato para formar oxalacetato sin ser necesaria la adición de otros reactivos (Scrutton *et al.*, 1965).

2) Todas las piruvato carboxilasas estudiadas hasta la fecha realizan las siguientes reacciones de intercambio isotópico cuando se encuentran en condiciones de equilibrio

(Scrutton *et al.*, 1965; Cazzulo & Stoppani, 1967; McClure *et al.*, 1971c; Bais & Keech, 1972):

- a) intercambio de ^{32}P con ATP
- b) intercambio de $[^{14}\text{C}]\text{-ADP}$ con ATP
- c) intercambio de $[^{14}\text{C}]\text{-piruvato}$ con oxalacetato
- d) intercambio de $[^{14}\text{C}]\text{-CO}_3\text{H}^-$ con oxalacetato

La reacción de intercambio entre ATP y Pi sólo requiere los componentes de la primera reacción parcial, es decir: ADP, CO_3H^- , Mg^{2+} y acetyl-CoA, pero no piruvato ni oxalacetato. De forma similar, la reacción de intercambio entre oxalacetato y $[^{14}\text{C}]\text{-piruvato}$ no requiere ninguno de los componentes de la primera reacción.

El mecanismo molecular concreto que sigue la reacción aún no ha sido establecido de forma inequívoca. Basándose en las reacciones de intercambio isotópico y en las dos reacciones parciales, así como en los dos subsitios de reacción separados espacialmente, se ha propuesto un mecanismo de reacción (Attwood & Keech, 1984) del tipo Ping-Pong Bi-Bi-Uni-Uni no clásico según la terminología de Cleland (1963), (Figura 1.16).

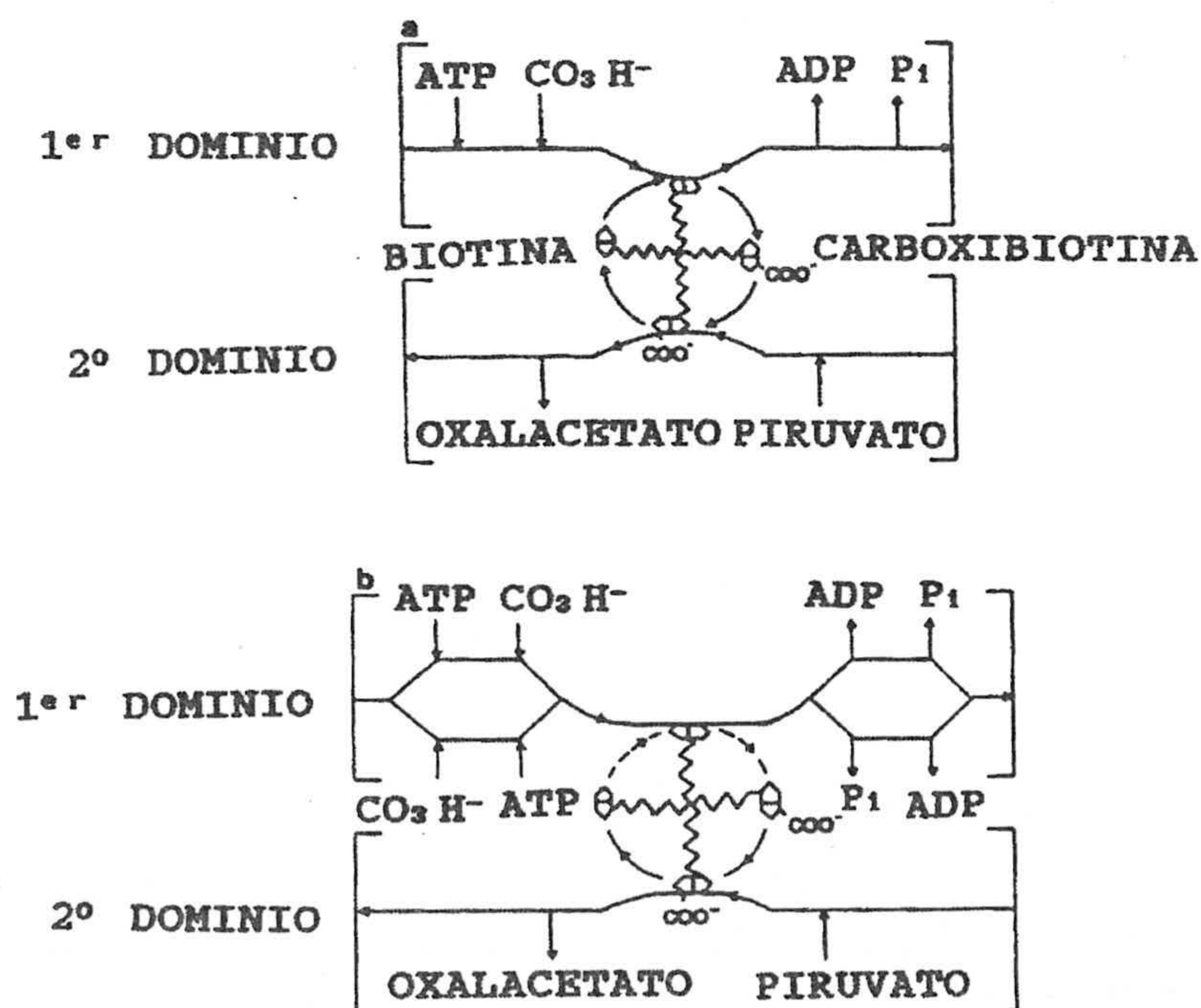


Figura 1. 16. Mecanismo de reacción ping-pong no clásico propuesto para la piruvato carboxilasa. a.- Orden obligatorio b.- adición y liberación de los reactivos del primer centro activo al azar (Tomado de Attwood & Keech, 1984).

Los estudios sobre la velocidad inicial de la reacción parecen indicar que hay una adición al azar del ATP y CO_3H^- más que una adición secuencial.

I.3.3.- Estructura de la piruvato carboxilasa de diferentes orígenes

La mayoría de las piruvato carboxilasas que han sido caracterizadas se encuentran formadas por cuatro subunidades idénticas dispuestas en los vértices de un tetraedro. Cada subunidad de unos 130 kDa contiene como grupo prostético una molécula de biotina que actúa como un transportador de CO_2 entre los dos lugares de semi-reacción del enzima. Hoy día se conoce o se ha deducido a partir de sus correspondientes cDNAs la secuencia de aminoácidos de numerosas piruvato carboxilasas y todas ellas presentan unas analogías en su secuencia y unas características estructurales comunes (Jitrapakdee *et al.*, 1996).

Puesto que la estructura tridimensional de la piruvato carboxilasa no ha sido determinada hasta la fecha se ha propuesto como modelo para el estudio estructural del enzima la estructura de la subunidad biotinilada de la acetil-CoA carboxilasa de *E. coli* (Waldrop *et al.*, 1994). Así, en la piruvato carboxilasa pueden distinguirse tres dominios al igual que en otras carboxilasas: un dominio de carboxilación de biotina, un dominio de transcarboxilación y finalmente un dominio de unión a biotina (Figura 1. 17).

En función de su localización subcelular y propiedades cinéticas pueden distinguirse al menos dos tipos de piruvato carboxilasas: La piruvato carboxilasa de vertebrados que presentan una localización exclusivamente mitocondrial como ya hemos señalado y la piruvato carboxilasa de levaduras que presenta una localización citosólica. Por tanto la piruvato carboxilasa puede ser clasificada en dos tipos en función de su localización, contenido en iones metálicos y respuesta a sus activadores alostéricos derivados de acil-CoA.

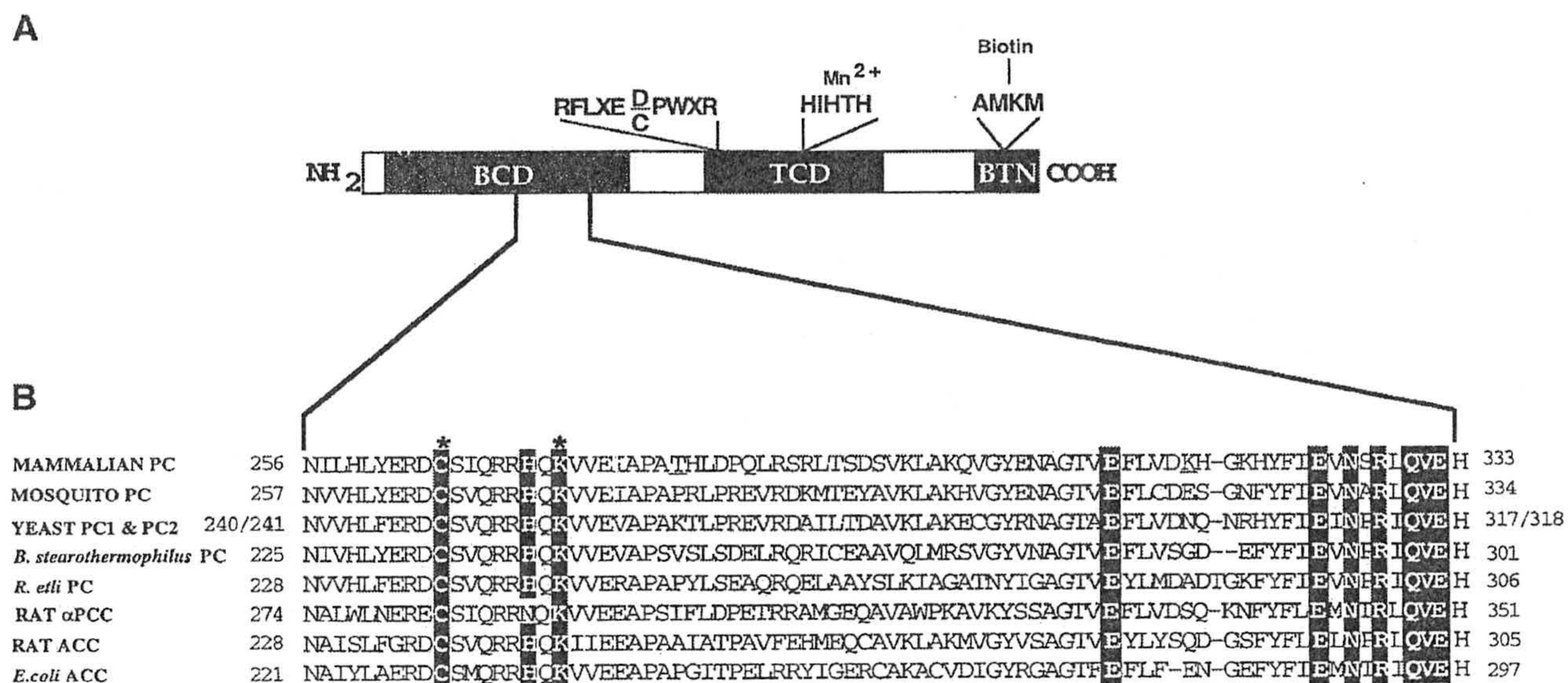


Figura 1. 17.- Esquema de la distribución de dominios de la piruvato carboxilasa.

(A) Representación esquemática de las regiones de la piruvato carboxilasa con homología a los dominios de carboxilación de la biotina (BCD), transcarboxilación(TCD) y el dominio de unión a la biotina (BTN). Algunos motivos conservados como RFLXE(D/C)PWXR (putativo lugar de unión del piruvato), HIHTH (un posible lugar de unión a metales) y AMKM (lugar de unión a biotina) se indican. (B) Alineamiento de secuencias correspondientes al dominio de unión a piruvato en el propuesto centro activo del enzima. Una secuencia conservada de un par de Cys-Lys se destaca mediante asteriscos. PC, Piruvato carboxilasa; α PCC, subunidad α de la propionil-CoA carboxilasa; ACC, acetil-CoA carboxilasa. Basado en Wallace et al., 1998.

El primer tipo está constituido por la piruvato carboxilasa que procede de vertebrados y de *Arthrobacter globiformis* y *Bacillus stearrowthermophilus*. El enzima de este origen está formado por cuatro polipéptidos similares, estando el peso molecular de los mismos comprendido entre los 110.000 y 130.000 daltons, según el origen del enzima (Barden et al., 1975; Cohen et al., 1979b; Attwood & Keech, 1984). El peso molecular de la estructura tetramérica se encuentra comprendido entre los 440.000 y 520.000 daltons.

La microscopía electrónica del enzima de estas fuentes indica que se encuentra constituido por tetrámeros, en los que las cuatro subunidades con forma de lágrima se disponen en los vértices de un tetraedro deformado (Cohen et al., 1979c; Goss et al., 1979; Mayer et al., 1980).

Este primer tipo de piruvato carboxilasa se encuentra activado por un ligando alostérico, un derivado de acil-CoA, con un coeficiente de Hill de al menos 2. Todas las piruvato carboxilasas de este tipo presentan cuatro lugares de unión al ATP, piruvato y acil-CoA por tetrámero así como cuatro moléculas de biotina en su estructura. También presentan iones divalentes, Mn^{2+} , íntimamente ligados a cada una de las subunidades del enzima. Dentro de los derivados de acil-CoA el enzima de vertebrados responde fundamentalmente a la activación por acetil-CoA.

El segundo gran grupo de piruvato carboxilasas está representado por la piruvato carboxilasa de levaduras. Este enzima es menos dependiente de la presencia de acetil-CoA para su activación (Cazzulo & Stoppani, 1968). En este grupo de enzimas han sido incluso descritas piruvato carboxilasas como las de *Pseudomonas citronellolis* (Seubert & Remberger, 1961) o *Aspergillus niger* (Bloom & Johnson, 1962) que son independientes de Acetil-CoA para su activación. En el caso del enzima de levadura, este presenta una elevada actividad basal en ausencia de acetil-CoA y su activador preferente son los derivados de CoA de cadena larga más que el propio acetil-CoA.

Probablemente la piruvato carboxilasa mejor caracterizada cinética y estructuralmente es la piruvato carboxilasa de hígado de rata. A partir de la secuencia de su cDNA (Jitrapakdee *et al.*, 1996) se deduce que el enzima se encuentra formado por cuatro subunidades idénticas de 1178 aminoácidos con un peso molecular de 129848. Puesto que la piruvato carboxilasa es sintetizada en el citosol y posteriormente importada a la mitocondria, el enzima de rata presenta una secuencia señal de importación típica de unos 20 aminoácidos que es rica en aminoácidos cargados positivamente y en aminoácidos hidroxilados (Figura 1.18). Una vez importada la proteína a la mitocondria se procesa esta secuencia señal lo que produce una disminución en el peso molecular del enzima maduro (Srivastava *et al.*, 1983). El procesamiento ocurre entre los aminoácidos Ser²⁰ y Thr²¹ tal y como esta previsto que sucede para la mayoría de secuencias señal de importación a la mitocondria.

En este enzima de rata, al igual que en la mayoría de piruvato carboxilasas, pueden distinguirse tres dominios fundamentales: Un dominio de carboxilación de la biotina, un dominio de transcarboxilación y un dominio de unión a biotina.

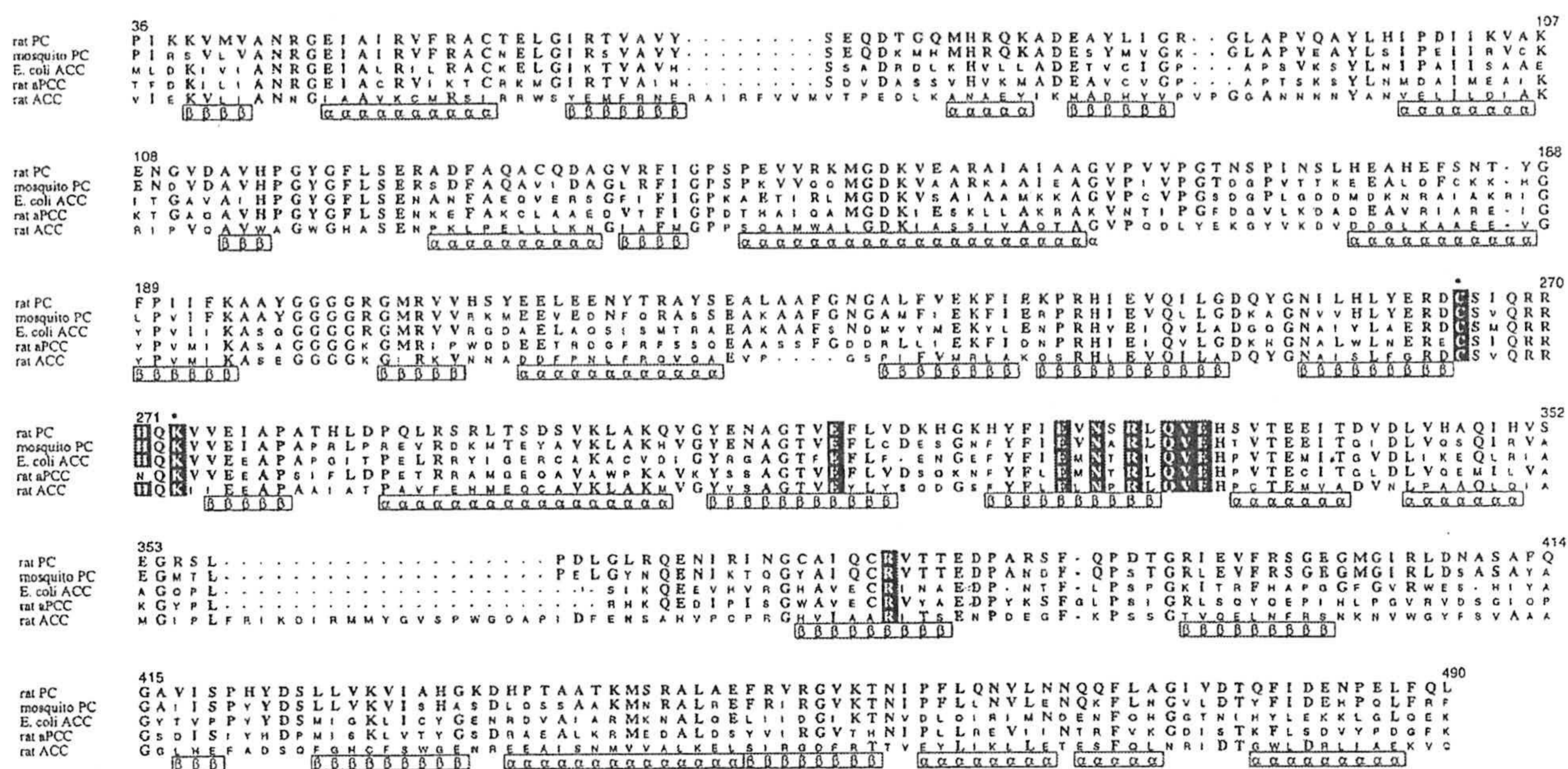


Figura 1.19.- Alineamiento múltiple del dominio de carboxilación de biotina de varios enzimas biotínicos. Se han alineado los 490 aminoácidos correspondientes al extremo amino terminal de la piruvato carboxilasa de rata con las secuencias correspondientes a la piruvato carboxilasa de mosquito (Tu & Hagedorn, 1994) y los dominios de carboxilación de la acetil-CoA carboxilasa de E. coli (Li & Cronan, 1992), la subunidad α de la propionil CoA carboxilasa (Browner et al., 1989) y de la acetil-CoA carboxilasa de rata (Lopez-Casillas et al., 1988). Se indica la estructura secundaria propuesta de alfa-hélices y hojas plegadas beta. Con asteriscos se indican los aminoácidos Cys265 y Lys273 que son modificados covalentemente por o-phtaladehído (Werneberg & Ash, 1993).

El dominio de carboxilación de la piruvato carboxilasa de rata se ha modelado basándose en la estructura cristalográfica del mismo dominio de la acetil-CoA carboxilasa de E. coli (Figuras 1.19 y 1.20). Se trata de un dominio altamente conservado en todas las carboxilasas, responsable de la primera reacción parcial (Lim et al., 1988). En la acetil-CoA carboxilasa se han identificado una serie de cadenas laterales de aminoácidos, conservados en la piruvato carboxilasa, que han sido propuestos como responsables de la interacción del enzima con la biotina o el grupo fosfato del ATP (Figura 1.19). En este dominio también es destacable la presencia de una serie de cadenas laterales de aminoácidos que participan en la primera reacción parcial catalizada por la piruvato

carboxilasa, la carboxilación del piruvato. Se ha propuesto una lisina y una cisteína como componentes de un par iónico que es responsable de esta carboxilación (Jitrapakdee *et al.*, 1996; Werneberg & Ash, 1993). Estos aminoácidos corresponderían con la Cys265 y Lys238 que en el modelo estructural propuesto (Figura 1.20) se encuentran a una distancia de 4.2 Å.

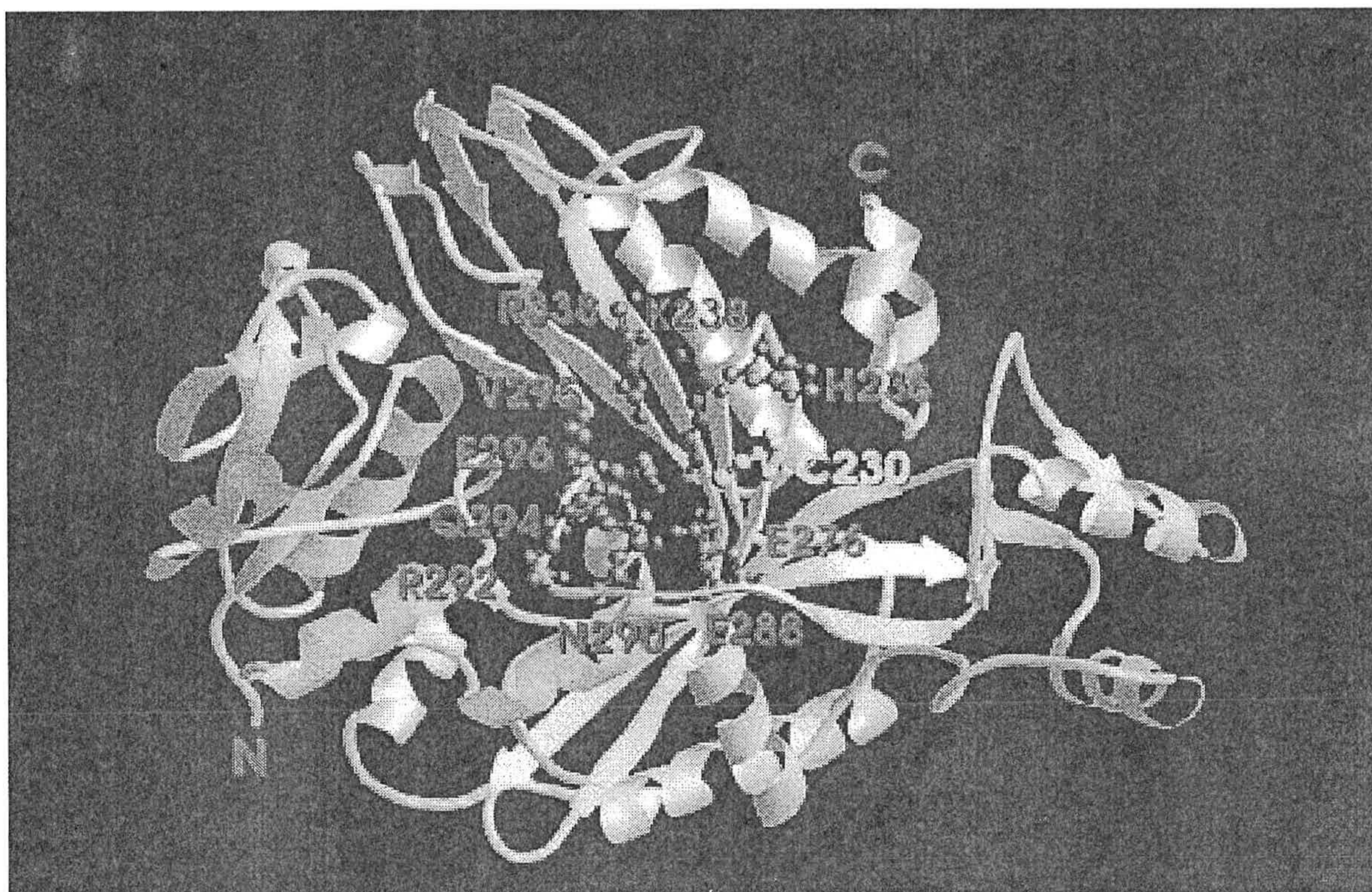


Figura 2.20.- Representación esquemática del dominio de carboxilación de la acetil-CoA carboxilasa de *E. Coli*. Esquema basado en Waldrop *et al.*, 1994. Los aminoácidos implicados en el proceso catalítico y que se encuentran conservados en la piruvato carboxilasa de rata se muestran en azul (His²³⁶, Glu²⁷⁶, Glu²⁸⁸, Asn²⁹⁰, Arg²⁹², Gln²⁹⁴, Val²⁹⁵, Glu²⁹⁶, Arg³³⁸). Se destacan la Lys²³⁸ and Cys²³⁰ que corresponden a los aminoácidos modificados covalentemente por *o*-phtaladehído (Werneberg & Ash, 1993).

De cualquier forma, casi todas las piruvato carboxilasas, como se infiere de su secuencia de cDNA y por tanto de su secuencia deducida de aminoácidos presentan una estructura primaria conservada en la que destacan una serie de cadenas laterales de aminoácidos a los que se les puede asignar una serie de funciones definidas. Así, además del dominio conservado de biotinilización que ya hemos descrito para todos los enzimas biotínicos, todas la piruvato carboxilasas presentan una segunda cadena lateral de lisina que es esencial para el mantenimiento de la actividad enzimática.

La modificación covalente de esta lisina ocasiona la pérdida de la actividad enzimática que se encuentra estimulada por la presencia del activador alostérico acetil-CoA (Scrutton & White, 1973; Ashman *et al.*, 1973). Aunque la comparación de las secuencias de la piruvato carboxilasa con otros enzimas biotínicos dependientes de acetil-CoA como la Acetil-CoA carboxilasa o la propionil-CoA carboxilasa no ha permitido dilucidar donde se localiza el dominio de unión de acetil-CoA de nuestro enzima, es claro que la cadena lateral de lisina forma parte del mismo como se deduce de experimentos de protección de la inactivación en presencia del efector alostérico (Ashman *et al.*, 1973; Chapman-Smith *et al.*, 1991).

En lo referente al dominio de transcarboxilación, existen analogías en las secuencias de levadura (Lim *et al.*, 1988; Stucka *et al.*, 1991), ratón (Zhang *et al.*, 1993), humano (Weler *et al.*, 1994; Mackay *et al.*, 1994) así como con las secuencias de la transcarboxilasa de *Propionibacterium shermanii* (Samols *et al.*, 1988) y la subunidad α de la oxaloacetato descarboxilasa de *Klebsiella pneumoniae* (Schwarz *et al.*, 1988). Quizás uno de los motivos más conservados en este dominio sea un motivo HXHXH que ha sido descrito como un motivo de unión a metales en la piruvato carboxilasa (Jitrapakdee *et al.*, 1996) y otros enzimas (Vallee & Auld, 1990; Jiang & Bond, 1992). Otro aspecto destacado es que este dominio de transcarboxilación se encuentra unido a los dominios de carboxilación y de unión a biotina mediante una serie de regiones ricas en prolina que han sido propuestas como bisagras que permiten la intercomunicación entre dominios.

Finalmente señalar que el dominio de unión a biotina de la piruvato carboxilasa de rata presenta todos aquellos motivos estructurales que hemos señalado en estos antecedentes para los enzimas biotínicos (Samols *et al.*, 1988). A partir de la secuencia de aminoácidos conocida de la piruvato carboxilasa de diferentes orígenes, cabe señalarse que existe una gran semejanza en las proximidades de la unión a la biotina en las piruvato carboxilasas humana, de rata, oveja, pollo, pavo y *Saccharomyces cerevisiae*. En todas las piruvato carboxilasas estudiadas el dominio de la biotina se encuentra próximo al carboxilo terminal, localizándose la biotina a 35 residuos del extremo excepto en el de levadura que se encuentra dispuesto a 44 residuos del carboxilo terminal.

La aparición de la secuencia alanina, metionina, biocitina, metionina en la piruvato carboxilasa así como en el resto de los enzimas que contienen biotina es notable y se

considera que este elevado grado de similitud en este fragmento del péptido puede deberse a que las holocarboxilasa sintetasas que unen la biotina a los enzimas biotínicos requieren un microambiente especial para reconocer qué molécula de lisina debe ser biotinizada. También cabe señalarse que ningún aminoácido aromático se presenta en la secuencia de los enzimas biotínicos próximo al lugar de unión a la biotina.

Otro hecho destacado dentro de la secuencia de aminoácidos de la piruvato carboxilasa es la aparición a una distancia constante (entre 25 y 29 residuos) de la lisina unida a la biotina la secuencia Pro-X-Pro. Se supone que este tripéptido debe actuar como una bisagra que permite que el brazo que contiene la biotina oscile entre los dominios que captan y ceden el CO₂.

I.3.4.- Regulación de la actividad piruvato carboxilasa

La Piruvato carboxilasa es un enzima regulador cuya expresión se encuentra regulada de una manera diferencial en diferentes tejidos de tal forma que las variaciones en su concentración respondan a los estímulos fisiopatológicos que incidan sobre cada tejido en relación con las funciones metabólicas del enzima. Por tanto, un mecanismo de regulación a largo plazo de la actividad del enzima se produce mediante el control de la velocidad de síntesis y degradación del enzima en hígado, riñón y tejido adiposo (Barrit, G. J., 1985). Así por ejemplo, diferentes situaciones fisiopatológicas, como ayuno, desarrollo perinatal, diabetes o intoxicación con tetracloruro de carbono, inducen una expresión diferencial del enzima en tejidos como hígado y riñón (Salto *et al.*, 1996, 1999). Adicionalmente a esta regulación a largo plazo, la piruvato carboxilasa es un enzima regulador con estructura cuaternaria que responde a una batería de reguladores alostéricos, probablemente el más importante el acetil-CoA, que controlan a corto plazo la actividad del enzima en respuesta a diferentes situaciones metabólicas.

I.3.4.1.- Regulación mediante efectores

Aunque la capacidad catalítica máxima de la piruvato carboxilasa varía ligeramente entre diferentes situaciones fisiológicas, parece que, ya que el enzima se encuentra situado en una encrucijada del metabolismo, la regulación de la actividad catalítica real *in vivo* debe ser un factor importante en la regulación del metabolismo intermediario. De hecho, la

capacidad catalítica de la piruvato carboxilasa responde ampliamente, al menos *in vitro*, a las variaciones en la concentración de una gran cantidad de moléculas efectoras.

A.- Regulación por Acetil-CoA y Derivados

Seufert *et al.* (1971) dedujeron basándose en estudios cinéticos de la piruvato carboxilasa de hígado de rata que el mecanismo enzimático se ajusta al modelo de activación alostérica de Koshland. En la mayoría de los estudios que se han realizado sobre el modo que los efectores regulan la actividad del enzima se han utilizado preparaciones purificadas del mismo. Estas observaciones realizadas *in vitro* no se pueden correlacionar directamente con la regulación *in vivo*, debido a que las condiciones normalmente empleadas en estudios cinéticos que usan enzimas purificados guardan poca semejanza con el ambiente molecular *in vivo*. Sin embargo, los datos obtenidos *in vitro* tienen un elevado valor como indicadores de la posible existencia de mecanismos reguladores en la célula.

La piruvato carboxilasa, como ya se ha señalado anteriormente, presenta un requerimiento de un acil-CoA (típicamente acetil-CoA). De los estudios cinéticos llevados a cabo con el enzima de vertebrados y determinados microorganismos, se ha comprobado que la velocidad de reacción en función de la concentración de acetil-CoA muestra un comportamiento sigmoidal (Barrit *et al.*, 1966; Scrutton & Utter, 1967; McClure *et al.*, 1971b; Dugal, 1973b; Wood *et al.*, 1983), presentando un coeficiente de Hill igual o superior a 2 y una K_a que oscila entre 2 y 70 μM .

La forma sigmoidal de la curva de velocidad inicial de reacción frente a la concentración de acetil-CoA ha sido interpretada como una evidencia de que el activador se enlaza al enzima mostrando cooperatividad homotrópica positiva (Barrit *et al.*, 1966; Scrutton & Utter, 1967). Se considera que el centro de activación del acetil-CoA para la piruvato carboxilasa es distinto del centro catalítico del enzima, confirmando así la naturaleza alostérica de la activación del enzima por este efector (Scrutton & White, 1973; Ashman *et al.*, 1972). El acetil-CoA se enlaza al centro alostérico siguiendo un equilibrio químico clásico y una vez enlazado, este efector modifica la conformación del enzima (Scrutton & Utter, 1967), aumentando la velocidad de translocación del residuo carboxibiotinil-lisilo desde el subcentro donde se ha carboxilado hasta el subcentro de carboxilación del piruvato (Goodall *et al.*, 1981).

El acetyl-CoA protege al enzima de diversas procedencias contra la inactivación que producen diversos agentes: trinitrobenzeno sulfonato (que inactiva específicamente la síntesis de oxalacetato dependiente de acetyl-CoA, manteniendo la capacidad de síntesis de oxalacetato no mediada por el activador (Libor *et al.*, 1978)), dilución (Ashman *et al.*, 1972), bajas concentraciones de urea o SDS (Irias *et al.*, 1969) y pH extremos (Libor *et al.*, 1975a). La explicación más aceptada de esta protección es considerar que el efector ocasiona un cambio en la estructura de la proteína hacia una conformación más estable, que como ya se ha señalado coincide con la conformación catalíticamente activa.

Aunque no hay duda de que el acetyl-CoA activa la piruvato carboxilasa purificada de vertebrados, es más difícil demostrar de forma concluyente que esta activación es importante en el control de la actividad del enzima *in vivo*. De hecho se ha calculado la concentración intramitocondrial del efector en el hígado de rata, obteniéndose una serie de valores que oscilan entre 50 y 1000 μM (Barrit *et al.*, 1976). Estos valores son mucho mayores que las K_a aparentes en condiciones óptimas para los enzimas de hígado de pollo (2 μM) y rata (15 μM). Según estos cálculos, la piruvato carboxilasa estaría siempre saturada de acetyl-CoA y no respondería, por consiguiente, a los cambios en la concentración de este metabolito. Sin embargo, hay que considerar que todo el acetyl-CoA mitocondrial no se encuentra disponible para la piruvato carboxilasa sino que parte de él se encuentra enlazado a diferentes proteínas mitocondriales y, por otro lado, la concentración intramitocondrial del enzima es de 40 μM (es decir del orden de unas 4000 veces la empleada en las determinaciones enzimáticas), por lo que la concentración de acetyl-CoA disponible por cada molécula del enzima en la mitocondria puede acercarse al intervalo en el que puede verse regulada su actividad.

El comportamiento de la piruvato carboxilasa frente a los derivados de acil-CoA varía ampliamente según el origen del enzima. De manera que puede realizarse una clasificación del enzima de diferentes orígenes de acuerdo con su comportamiento frente a ellos:

El primer grupo lo forman el enzima de hígado de pollo (Utter & Keech, 1963; Scrutton & Utter, 1967) y de paloma (Dugal, 1973b) que dependen totalmente para su actividad de la presencia de un acil-CoA y presentan un coeficiente de Hill próximo a 3 y

una K_a en torno a $4 \mu\text{M}$.

Forman parte del segundo grupo aquellos enzimas que necesitan acetyl-CoA para la expresión de su máxima actividad catalítica y que mantienen un pequeño porcentaje de su actividad en ausencia de acil-CoA. En este grupo se incluyen los enzimas de hígado de rata (Scrutton & White, 1972), hígado de cerdo (Warren & Tipton, 1974a), cerebro de rata (Mahan *et al.*, 1975), riñón de oveja (Ashman *et al.*, 1972) y *Bacillus caldotenax* (Wood *et al.*, 1983). El coeficiente de Hill para este grupo está próximo a 2 y su K_a es de unos $20 \mu\text{M}$.

El tercer grupo está constituido por el enzima de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que a pesar de mostrar una elevada actividad independiente de acil-CoA, necesita la presencia de acetyl-CoA para mostrar su máxima expresión catalítica (Scrutton & White, 1973). El coeficiente de Hill para este microorganismo es de 1. Este enzima también puede ser activado por coenzima A, y otros acil-CoA como el palmitoil-CoA y acetoacetyl-CoA.

Los enzimas de *Aspergillus niger* (Bloom & Johnson, 1961), *A. nidulans* (Chapman & Scrutton, 1978) y *Pseudomonas citronellolis* (Seubert & Remberger, 1961) componen el cuarto grupo y se caracterizan porque el acetyl-CoA no ejerce ningún efecto directo sobre su actividad, aunque sí puede cambiar su sensibilidad a determinados efectores.

El acetoacetyl-CoA inhibe al enzima de hígado de pollo de forma no competitiva con respecto al acetyl-CoA. Además, esta inhibición causa una disminución del coeficiente de Hill para el acetyl-CoA, ya que el valor de este parámetro baja hasta 1. Estas características de inhibición sugieren que el acetoacetyl-CoA se enlaza a un centro distinto del lugar de unión del acetyl-CoA (Fung & Utter, 1970b).

El enzima de hígado de rata también es inhibido por el acetoacetyl-CoA, aunque esta inhibición difiere en varios aspectos de la que sufre el enzima de hígado de pollo. En el caso del enzima de rata el coeficiente de Hill no se ve alterado por la presencia del inhibidor, y el coeficiente de Hill para el acetoacetyl-CoA es menor para el enzima de rata (1.3) que para el enzima de pollo (3.0). Finalmente, este inhibidor es menos potente en su

acción sobre el enzima de rata (K_i aparente de 1.8 mM) que sobre el enzima de pollo (K_i aparente de 0.17 mM) (Utter & Fung, 1971; Scrutton & Fatebene, 1976).

B.- Regulación por Nucleótidos de Adenina

Se han publicado numerosos estudios acerca de la influencia que ejercen sobre la actividad piruvato carboxilasa los nucleótidos de adenina, principalmente ATP y ADP. Con objeto de estudiar su influencia sobre el enzima debe considerarse que forman complejos muy estables con el Mg²⁺, por lo que para la determinación enzimática se requiere Mg²⁺ en exceso. Así, en las condiciones de ensayo todo el ATP⁴⁻ y ADP³⁻ se encuentran como MgATP²⁻ y MgADP⁻.

La relación entre la velocidad inicial de fijación de CO₃H⁻ por la piruvato carboxilasa de riñón de oveja y la concentración de ATPMg²⁻ exhibe un ligero carácter sigmoidal. El incremento en la concentración de Mg²⁺ libre aumenta la velocidad máxima y disminuye la K_m para el ATPMg²⁻ (Keech & Barrit, 1967). Sin embargo, el análisis por computador de estos datos sugiere que existen otras posibilidades que no implican que el ATPMg²⁻ sea un activador alostérico del enzima. El estudio de las piruvato carboxilasas purificadas de éste y otros orígenes han demostrado que el ATPMg²⁻ no activa a la piruvato carboxilasa de hígado de cerdo (Warren & Tipton, 1974b), hígado de pollo (Scrutton, 1971), hígado de ternera (Scrutton, 1971), riñón de paloma (Dugal, 1973a), riñón de oveja (Ashman *et al.*, 1972), *Aspergillus nidulans* (Chapman & Scrutton, 1978) ni cerebro de rata (Mahan *et al.*, 1975).

Se llegó a indicar que el ATPMg²⁻ actuaba como un inhibidor del enzima de hígado de rata, inhibición que sólo se presenta a bajas concentraciones de piruvato (McClure *et al.*, 1971b), aunque este efecto no debe tener importancia fisiológica. Sin embargo, no se excluye un papel regulador del ATPMg²⁻ *in vivo* y lo que es evidente es que el nivel de este metabolito debe, directa o indirectamente, regular la actividad piruvato carboxilasa.

El MgADP⁻ actúa claramente como un producto inhibidor del enzima (Utter *et al.*, 1964; McClure & Lardy, 1971; Barden *et al.*, 1972; Warren & Tipton, 1974b). Así, sobre la piruvato carboxilasa de hígado de cerdo actúa de forma competitiva con respecto al MgATP²⁻ y de forma mixta con respecto al HCO₃⁻ y el piruvato (Warren & Tipton, 1974b).

También se ha estudiado el efecto conjunto de ambos nucleótidos sobre la actividad enzimática. Así, en estudios sobre el enzima purificado, Keech y Utter (1963) y McClure y Lardy (1971) han señalado que la actividad se eleva con el incremento de la relación ATP/ADP. Estos resultados se corresponden con los realizados *in vivo* que sugieren que la carboxilación intramitocondrial de piruvato también esta regulada por dicha relación. Así, la carboxilación de piruvato intramitocondrial se ve reducida cuando en el medio de incubación se reduce la proporción ATP/ADP, o bien cuando la incubación se realiza en presencia de desacoplantes de la fosforilación oxidativa (2,4-dinitrofenol), que elevarían la proporción de ADP en el interior de la mitocondria (Patel & Tilghman, 1973). Por el contrario, el aumento de la relación ATP/ADP mediante la adición de octanoil(-)-carnitina al medio de incubación va a producir un incremento en el nivel de carboxilación (Thienen & Davis, 1981).

C.- Regulación por iones

La piruvato carboxilasa de mamíferos, aves y microorganismos requiere un catión monovalente (típicamente K^+) para la expresión de su máxima actividad catalítica (Utter & Scrutton, 1969; Chapman & Scrutton, 1978). Los enzimas de hígado de pollo (Barden & Scrutton, 1974) y cerdo (Warren & Tipton, 1974a) mantienen, no obstante, una velocidad de reacción baja en ausencia de cationes monovalentes activadores.

Los cationes monovalentes más potentes en cuanto a la activación del enzima de riñón de oveja, en orden decreciente son: NH_4^+ , Cs^+ , K^+ , Rb^+ , $Tris^+$, mientras que el Na^+ y Li^+ no se comportan como activadores en presencia de acetyl-CoA (Ashman *et al.*, 1972). El enzima de hígado de rata es activado según el orden de potencia: K^+ , Rb^+ , NH_4^+ , Cs^+ y Tl^+ , mientras que $Tris^+$, Li^+ y Na^+ son inactivos (Scrutton, 1974).

Algunos cationes monovalentes pueden actuar como inhibidores no competitivos de determinadas piruvato carboxilasas, así el Li^+ y el Na^+ inhiben al enzima de hígado de pollo (Attwood & Keech, 1984).

Como ya hemos visto al hablar del efecto regulador de los nucleótidos de adenina, la piruvato carboxilasa de hígado de pollo y rata, riñón de oveja y paloma, cerebro de rata, levadura, *Aspergillus niger* y *Bacillus stearothermophilus* presentan un requerimiento

absoluto de Mg^{2+} , el cual es útil para dos fines: complejar al ATP^{4-} y formar $MgATP^{2-}$, que es el verdadero sustrato del enzima y activar a la piruvato carboxilasa como tal ion Mg^{2+} . Se ha comprobado que el Mg^{2+} actúa como un activador alostérico del enzima (Dugal, 1973a). La relación entre velocidad inicial de la carboxilación del piruvato y la concentración de Mg^{2+} exhibe una cooperatividad positiva en presencia de concentraciones no saturantes de acetil-CoA, pero se aproxima al comportamiento michaeliano a medida que el nivel de acetil-CoA se incrementa hasta la saturación.

El Ca^{2+} es un inhibidor competitivo de la piruvato carboxilasa con respecto al Mg^{2+} libre y exhibe una K_i para el enzima de pollo de 0.1 mM (Scrutton *et al.*, 1969; Wimhurst & Manchester, 1970; McClure & Lardy, 1971). El efecto del Ca^{2+} no está mediado por un cambio en la concentración intramitocondrial de ATP, ADP ni de acetil-CoA, aunque sí se ha observado una disminución en los niveles intramitocondriales de piruvato. Otro factor que puede explicar la inhibición producida por el Ca^{2+} es su competencia con el Mg^{2+} para complejar el ATP^{4-} . Estos resultados indican que el Ca^{2+} puede contribuir a la regulación de la actividad piruvato carboxilasa *in vivo* (Foldes & Barrit, 1977).

Finalmente, cabe señalar que existe la posibilidad de que la actividad piruvato carboxilasa en la célula viva esté regulada por la concentración de aniones inorgánicos tales como fosfato y sulfato. Sin embargo, el efecto de estos iones sobre la actividad del enzima no ha sido establecido inequívocamente. Así, Schaefer y Veneziale (1973) afirman que la carboxilación del piruvato en mitocondrias aisladas de hígado de rata se ve inhibida totalmente por concentraciones de fosfato en el medio de incubación superiores a 40 mM, suponiéndose que el fosfato actúa como un producto inhibidor de la reacción. Por el contrario, Whipps y Halestrap (1984) encuentran una actividad más elevada en presencia de fosfato 4 mM.

El efecto del ión sulfato sobre la actividad piruvato carboxilasa está en función de la procedencia del enzima. Así el sulfato es un inhibidor competitivo del enzima de hígado de pollo con respecto al acetil-CoA (Utter, 1970). La piruvato carboxilasa de riñón de oveja, sin embargo, no se ve inhibida por SO_4^{2-} en presencia de acetil-CoA 0.25 mM, y a muy bajas concentraciones de acetil-CoA este enzima es débilmente activado por el anión (Ashman *et al.*, 1972).

Dentro de la regulación de la actividad del enzima por iones merece una mención especial el efecto de los protones sobre la actividad del enzima. Así, la velocidad inicial de la reacción de la piruvato carboxilasa muestra una fuerte dependencia respecto del pH del medio de ensayo. Los pH óptimos para la actividad de los distintos enzimas estudiados oscilan entre 8.0 para el de hígado de cerdo (Warren & Tipton, 1974a) y 8.4 para los enzimas de *Bacillus termofilico* (Libor *et al.*, 1978), hígado de paloma (Dugal, 1973b) y riñón de oveja (Ashman *et al.*, 1972).

El pH influye fuertemente sobre el valor de la K_m y V_{max} del enzima de *Bacillus termofilico* para el CO_3H^- . En el caso del enzima de hígado de pollo, el pH actúa como modulador de la respuesta de la piruvato carboxilasa al acetyl-CoA, de manera que un incremento de 0.1 unidades de pH a partir de un valor de 7.2 disminuye la K_a aparente para este efector del enzima de hígado de pollo en un 25% aproximadamente (Scrutton, 1971). Esta observación, junto con la de que muchas otras actividades enzimáticas distintas de la piruvato carboxilasa dependen del pH, sugiere que la concentración de protones puede intervenir en la regulación de la actividad de la piruvato carboxilasa *in vivo*.

D.- Regulación por intermediarios del ciclo de Krebs

La mayoría de los intermediarios del ciclo de Krebs y algunas sustancias relacionadas con él, tales como el glutamato y el aspartato, tienen la capacidad de modular la velocidad de carboxilación del piruvato en distintos sistemas.

Así el α -cetoglutarato inhibe a la piruvato carboxilasa de hígado de pollo (Scrutton & White, 1974) mientras que el succinil-CoA se comporta como un débil inhibidor del enzima. Como la concentración intramitocondrial de succinil-CoA es elevada, Barritt *et al.* (1976) han lanzado la hipótesis de que la actuación conjunta del α -cetoglutarato y el succinil-CoA puede inhibir la carboxilación del piruvato *in vivo* cuando no sea necesario el relleno de intermediarios del ciclo de Krebs. Esta función reguladora no es llevada a cabo por el α -cetoglutarato en neuronas de cerebro de rata, ya que la incubación de mitocondrias de este origen con el cetoácido estimula la carboxilación del piruvato. Sin embargo, la fijación de $^{14}CO_2$ por las mitocondrias de este tejido es inhibida por succinato, fumarato, oxalacetato y, principalmente, malato (Patel & Tilghman, 1973).

El glutamato ejerce un efecto sobre la piruvato carboxilasa que depende de la procedencia del enzima. Inhibe al enzima de hígado de rata (Scrutton & White, 1974; Hers & Hue, 1983) y al enzima de hígado de pollo (Scrutton & White, 1974) y de *Rhizopus arrhizus* (Osmani & Scrutton, 1985). Por el contrario, estimula la carboxilación del piruvato en mitocondrias de cerebro de rata. Parece que el glutamato ejerce su acción transaminándose con el oxalacetato para dar aspartato y α -cetoglutarato. El oxalacetato inhibe al enzima de cerebro de rata, que ve aumentada su actividad al disminuir los niveles de inhibidor (Patel & Tilghman, 1973). También ha sido descrito que el glutamato estimula la fijación de [^{14}C]- CO_3H^- por mitocondrias de riñón de rata (Mehlman, 1968).

El aspartato no actúa como inhibidor del enzima de vertebrados, sin embargo, es un potente inhibidor del enzima de *Bacillus stearothermophilus* (Cazzulo *et al.*, 1970), *Arthrobacter globiformis* (Bridgeland & Jones, 1967), *Saccharomyces cerevisiae* (Scrutton & White, 1973), *Rhizopus arrhizus* (Osmani & Scrutton, 1985), *Bacillus caldotenax* (Wood *et al.*, 1983) y *Aspergillus nidulans* (Chapman & Scrutton, 1978). La inhibición por aspartato de las piruvato carboxilasas de estos dos últimos microorganismos es contrarrestada por acetyl-CoA. El enzima de *Aspergillus nidulans* exhibe la particularidad de ser activado por acetyl-CoA sólo en presencia de aspartato. Se ha supuesto que la inhibición por aspartato puede tener un significado fisiológico en microorganismos ya que el aspartato puede considerarse como un producto final del relleno anaplerótico del ciclo de Krebs.

I.3.4.2.- Regulación hormonal de la piruvato carboxilasa

Las hormonas gluconeogénicas estimulan la carboxilación del piruvato en mitocondrias de hígado de rata. Esto se ha comprobado en mitocondrias aisladas de animales tratados con glucagón, AMPc, adrenalina, fenilefrina, cortisol, dexametasona, angiotensina y vasopresina (Adam & Haynes, 1969; Garrison & Haynes, 1975; Chisholm *et al.*, 1983; Allan *et al.*, 1983; Allan & Titheradge, 1984; Whipps & Halestrap, 1984; Martin *et al.*, 1984; Martin & Titheradge, 1984).

El mecanismo por el cual las hormonas gluconeogénicas estimulan la carboxilación del piruvato es doble. Por un lado, se ha descrito que las hormonas gluconeogénicas actúan incrementando la disponibilidad de sustratos y efectores del enzima, con lo que la

velocidad neta de carboxilación se va a ver incrementada y, por otro lado, numerosas hormonas gluconeogénicas actúan incrementando la síntesis del enzima, aumentando la concentración intramitocondrial del mismo.

Weinberg y Utter (1979), basándose en el tiempo de vida media de la piruvato carboxilasa y en las modificaciones del grado de síntesis y degradación del enzima debida a los efectores hormonales, han señalado que la regulación hormonal a nivel catalítico juega un importante papel cuando son precisos cambios rápidos del metabolismo, mientras que la regulación a largo plazo se efectúa por la modificación de los niveles del enzima.

I.3.4.2.1.- Regulación de la concentración de efectores y metabolitos

Allan *et al.* (1983) han estudiado la acción de algunas hormonas gluconeogénicas sobre hepatocitos de rata incubados previamente con filipina. Este antibiótico poliónico forma complejos con el colesterol en sistemas de membrana, haciendo permeable la célula hepática a los sustratos del medio y permitiendo de este modo la determinación *in situ* de la velocidad con que la mitocondria carboxila el piruvato tras el tratamiento hormonal. Usando esta técnica se ha demostrado que el tratamiento de hepatocitos con glucagón, adrenalina, fenilefrina, angiotensina y vasopresina ocasiona una estimulación de la fijación mitocondrial de CO₂ medida *in situ* comparable a la observada en mitocondrias aisladas.

Agius y Alberti (1985) han incubado suspensiones de hepatocitos intactos de rata con glucagon, determinando el flujo metabólico a través de la piruvato carboxilasa mediante la incorporación a glucosa de ¹⁴C procedente de piruvato marcado. Estos investigadores han observado que en células intactas procedentes de ratas alimentadas, el glucagon aumenta dos veces el flujo a través de la piruvato carboxilasa, pero la hormona no altera dicho flujo en hepatocitos procedentes de ratas ayunadas. No obstante, la actividad piruvato carboxilasa determinada en extractos de mitocondrias sonicadas es la misma para mitocondrias procedentes de ratas control y de ratas tratadas previamente con glucagon, adrenalina, fenilefrina, cortisol, angiotensina o vasopresina (Adam & Haynes, 1969; Chisholm *et al.*, 1983).

Por consiguiente, para que se produzca el efecto hormonal es necesaria la presencia de membranas mitocondriales intactas y el mantenimiento de la compartimentación

celular. Debe considerarse que la actividad piruvato carboxilasa está considerablemente restringida en el interior de la mitocondria por la disponibilidad de sustratos y la concentración de moléculas efectoras y que las hormonas pueden actuar incrementando la concentración de estos efectores y sustratos (Chisholm *et al.*, 1983; Allan & Titheradge, 1984).

El glucagon y las catecolaminas actúan incrementando la velocidad de entrada de piruvato en la mitocondria (Adam & Haynes, 1969; Titheradge & Coore, 1976a,b; Halestrap, 1978b; Martin & Titheradge, 1983; Oliver, 1984, 1988), la concentración intramitocondrial de ATP y la relación [ATP]/[ADP] (Siess *et al.*, 1977; Bryla *et al.*, 1977; Prpic *et al.*, 1978; Titheradge *et al.*, 1979; Titheradge & Haynes, 1980) y la concentración de acetil-CoA (Adam & Haynes, 1969; Siess *et al.*, 1977) y disminuyen la concentración intramitocondrial de glutamato (Siess *et al.*, 1977).

I.3.4.2.2.- Regulación de la concentración de enzima

Las primeras evidencias de que el metabolismo del piruvato puede estar regulado por cambios en los niveles intramitocondriales de la piruvato carboxilasa se deben a Bottdger *et al.* (1970). Estos autores comprobaron que las fluctuaciones en los niveles de la gluconeogénesis hepática eran paralelos a los cambios de la actividad total del enzima. A partir de estos datos iniciales se ha comprobado que los niveles de piruvato carboxilasa pueden modificarse en numerosas situaciones metabólicas.

Weinberg y Utter (1979) han determinado en extractos mitocondriales de hígado de rata con hipertrofia del tiroides una actividad piruvato carboxilasa doble de la que presentan las ratas control, mientras que las ratas tiroidectomizadas muestran una actividad enzimática que oscila en torno a los dos tercios de la actividad de una rata control. Mediante determinaciones inmunológicas se ha comprobado que esta modificación de la actividad corre paralela con los niveles de concentración del enzima en el tejido. Mediante estudios de marcaje con [³H]-leucina se ha comprobado que el aumento de los niveles del enzima se debe a un incremento de la síntesis del enzima, mientras que su velocidad de degradación apenas se ve alterada. El tiempo de vida media del enzima es de 4.6 días.

La diabetes inducida por streptozotocina produce a nivel hepático (Weinberg & Utter, 1980; Salto *et al.*, 1996) una duplicación en la actividad y la cantidad de la piruvato carboxilasa. Este incremento de los niveles del enzima también es debido a un aumento del nivel de síntesis mientras que los niveles de degradación no se modifican. Los efectos de la diabetes sobre la síntesis de la piruvato carboxilasa se revierten mediante el tratamiento con insulina. Por contra en riñón, la diabetes inducida con alloxan no tiene un efecto positivo sobre el aumento de la expresión del enzima (Salto *et al.*, 1996).

Otras situaciones en la que se observa un claro efecto sobre la expresión de la piruvato carboxilasa es en el ayuno así como en el desarrollo perinatal. Así se ha descrito que el ayuno prolongado induce en hígado y riñón la expresión del enzima (Salto *et al.*, 1996), mientras que en el caso del desarrollo perinatal en rata el enzima experimenta una fuerte inducción de su síntesis en las primeras horas tras el parto (Salto *et al.*, 1999; Jitrapakdee *et al.*, 1998), mientras que en riñón la expresión del enzima es muy pequeña hasta etapas posteriores del crecimiento (Salto *et al.*, 1999).

Finalmente, cabe señalar que un posible mecanismo de regulación de la actividad relacionado con la síntesis del enzima es aquel que implica la regulación de la síntesis del enzima catalíticamente activo, es decir el holoenzima a partir de la apopiruvato carboxilasa, biotina y ATP.

En *Bacillus coagulans*, se ha encontrado (Cazzulo *et al.*, 1969) que para que se produzca la síntesis del holoenzima es necesaria la presencia de acetyl-CoA y que ésta es inhibida por la adición de L-aspartato. Parece ser que el mecanismo de activación por el acetyl-CoA se debe a la variación en la conformación del enzima que hace más accesibles los lugares de biotinización del enzima a la holocarboxilasa sintetasa (Scrutton & Utter, 1967). No obstante, los últimos trabajos de Ahmad *et al.* (1986) restan importancia a este posible mecanismo de regulación de la actividad. Así mismo, durante el desarrollo perinatal en la rata, todo el enzima que se expresa se encuentra biotinilado (Salto *et al.*, 1999).

I.3.5.- Organización génica de la piruvato carboxilasa de vertebrados

Mientras que en *S. cerevisiae* han sido descritos dos isoenzimas de la piruvato carboxilasa (PCY1 y PCY2) codificados por genes independientes (Morris *et al.*, 1987; Lim *et al.*, 1988, Walker *et al.*, 1991; Stucka *et al.*, 1991) en mamíferos la piruvato carboxilasa está codificada por un único gen. En rata ha sido descrito un único gen que codifica para el enzima y que se localiza en el cromosoma 1q43 (Webb *et al.*, 1997). En este gen se distinguen 19 exones correspondientes a la región codificante y cuatro exones que codifican para regiones 5' no traducidas (5'-UTR) comprendiendo una región de aproximadamente 40 kb (Figura 1.21).

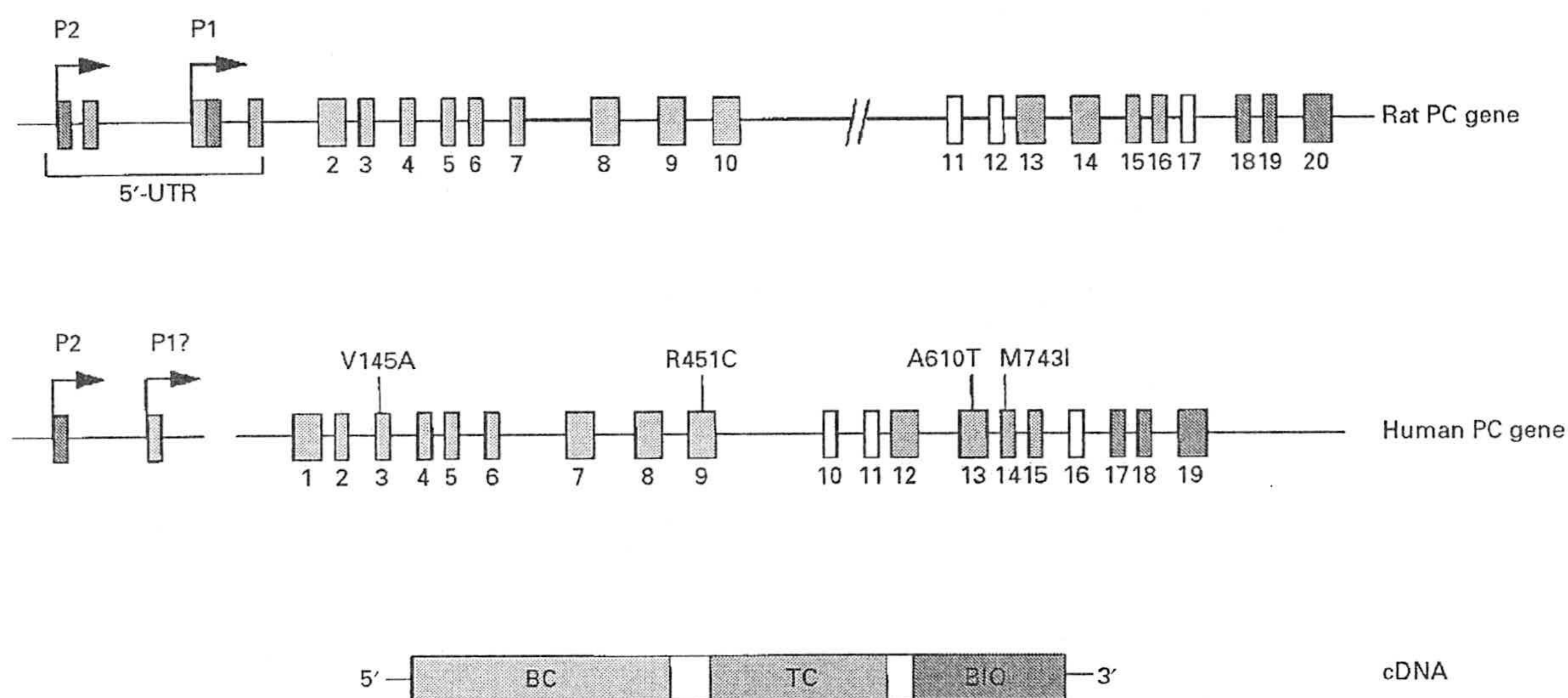


Figura 1. 21.- Organización génica de la piruvato carboxilasa de mamíferos. La organización génica de la piruvato carboxilasa de rata y humana se muestra de una manera esquemática. En ambos casos existen dos promotores alternativos desde los cuales se controla la transcripción del gen. En diferentes colores se muestran los exones que codifican para los distintos dominios del enzima tal y como se refleja en el esquema correspondiente al cDNA. BC: dominio de carboxilación, TC: dominio de transcarboxilación, BIO: dominio de unión a biotina. En el esquema correspondiente al gen humano se indica las mutaciones que han sido asociadas con deficiencias de la actividad piruvato carboxilasa. Esquema basado en Jitrapakdee & Wallace, 1999.

La expresión del gen se encuentra controlada por dos promotores alternativos que han sido denominados promotor proximal (P1) y promotor distal (P2) (Jitrapakdee *et al*

1997). De esta manera la transcripción a partir de estos promotores es la causante de la generación de dos transcritos primarios que posteriormente y mediante splicing alternativo van a generar diferentes mRNAs que codifican para la piruvato carboxilasa y que difieren exclusivamente en su región 5'-UTR (Figura 1.22) (Jitrapakdee *et al* 1996; Jitrapakdee *et al* 1997).

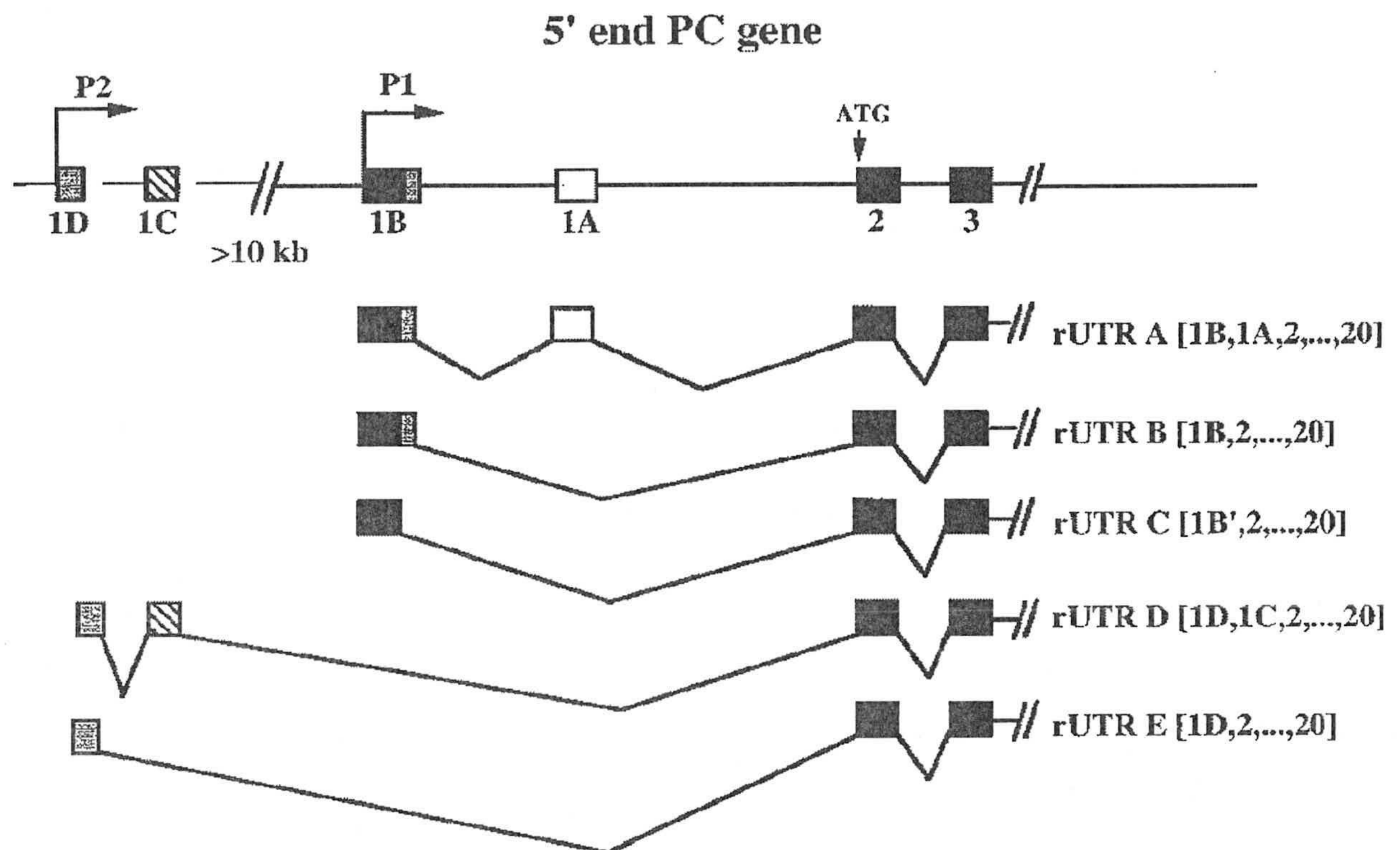


Figura 1. 22.- Splicing alternativo de la región 5'-UTR de la piruvato carboxilasa de rata. Los transcritos de la clase I (rUTR A, rUTR B, and rUTR C) y clase II (rUTR D and rUTR E) se originan mediante splicing alternativo de los exones 1D, 1C, 1B, and 1A. El codón de inicio de la traducción se indica con una flecha. También se indica la posición del promotor proximal (P1) y distal (P2). Tomado de Jitrapakdee *et al.*, 1997.

En rata, el exon 2 codifica para el codón de inicio de la traducción, la secuencia señal de importación a la mitocondria y parte del dominio de carboxilación. Este dominio abarca hasta el exón 10, mientras que el dominio de transcarboxilación puede asignarse a los exones 13 al 16. Finalmente, los exones 18 a 20 codifican para el dominio de unión a biotina, la región 3'-UTR y la señal de poliadenilación. En total la región codificante del gen abarca una zona de aproximadamente 40 Kb del DNA genómico.

La similitud de las reacciones catalizadas por los enzimas biotínicos y el hecho de que estos enzimas presenten un cierto número de sustratos y efectores en común hace suponer que todos ellas han evolucionado de un gen común ancestral y, por lo tanto, deben presentar una cierta analogía estructural, con zonas de homología en sus secuencias de aminoácidos y organización génica. Aunque existen pocos genes correspondientes a enzimas biotínicos cuya organización génica haya sido claramente dilucidada, parece que a partir de la información obtenida para la piruvato carboxilasa es posible concluir que la mayoría de enzimas biotínicos deben proceder de un gen precursor monofuncional que mediante mecanismos de fusión ha dado lugar a las diferentes clases de enzimas biotínicos (Obermayer & Lynen, 1976).

A partir de la revisión de la estructura de los enzimas biotínicos se ha propuesto (Obermayer & Lynen, 1976) un modelo de evolución convergente de la estructura de las subunidades de las carboxilasas, de manera que la carboxilación debió ser llevada a cabo originalmente por enzimas separados que presentaban una proteína transportadora de carboxilos fácilmente dissociable. En el curso de la evolución se produjo la unión de los diferentes enzimas dando lugar a la formación de cadenas polipeptídicas multifuncionales, probablemente como el resultado de una fusión de genes. En función del diferente grado de fusión alcanzado puede explicarse la diferente estructura de subunidades presentada por los enzimas que contienen biotina y la homología en la secuencia de aminoácidos encontrada (Lamhonwah *et al.*, 1987).

Una importante propiedad de la piruvato carboxilasa de rata y humana es que el extremo 5' de su mRNA se genera mediante un proceso de splicing alternativo. De la organización génica de la piruvato carboxilasa de rata se deduce que la única manera posible de generar los transcritos que han sido aislados (Figura 1.22) es postular la existencia de dos promotores a partir de los cuales se generaran transcritos primarios que posteriormente darán lugar a los mRNAs correspondientes a la clase I (Transcritos desde el promotor proximal) y clase II (Transcritos desde el promotor distal). Como se indicará más adelante, la existencia de estos dos promotores alternativos, junto con la generación de transcritos que difieren en su región 5'-UTR será un mecanismo importante para el control de la expresión génica de la piruvato carboxilasa.

En humanos la organización génica de la piruvato carboxilasa es similar, localizándose el gen en el cromosoma 11, en concreto en la posición 11q13.4 (Freytag & Collier, 1984; Walker, *et al.*, 1995). La distribución de intrones y exones es análoga a la descrita en rata y de igual forma la expresión del gen se encuentra controlada por dos promotores alternativos que generan transcritos primarios que tras ser procesados mediante splicing alternativo sólo difieren en su región 5'-UTR (Jitrapakdee *et al.*, 1996).

I.3.5.2.- Regulación de la expresión génica de la piruvato carboxilasa

La expresión génica de la piruvato carboxilasa se encuentra regulada transcripcional, postranscripcional y traduccionalmente. La existencia de estos tres mecanismos de control de la expresión génica corresponde con el importante papel regulador del metabolismo intermediario que tiene la enzima. Además, el estudio evolutivo de la regulación de la expresión de la piruvato carboxilasa desde levaduras hasta mamíferos confirma la existencia de estos tres mecanismos de control de la expresión génica que, con algunas notables variaciones, se han conservado.

El estudio de la regulación de la expresión génica de la piruvato carboxilasa se ha realizado a nivel molecular en una cierta profundidad en levaduras y mamíferos, fundamentalmente en rata y humanos. En levaduras existen dos isoformas de la piruvato carboxilasa codificadas por genes independientes cada uno de ellos controlados por un promotor diferente. En mamíferos existe un único gen pero su expresión se encuentra controlada por dos promotores diferenciados.

En el caso de las levaduras se ha propuesto que ambos genes se encuentran regulados de una manera diferente. Así se ha propuesto que el gen PCY2 se expresa fundamentalmente en la fase de crecimiento exponencial de la levadura, mientras que la expresión del gen PCY1 es constante durante el crecimiento. Por tanto, a nivel de control de inicio de la transcripción, a la expresión del isogen PCY1 se le puede asignar un papel basal mientras que el isogen PCY2 experimenta una activación en algunas fases del crecimiento. Además aparentemente la regulación de la expresión de ambos isogenes es independiente entre sí, e incluso el crecimiento en diferentes fuentes de carbono tiene un efecto diferencial en la inducción de la expresión de cada uno de los isogenes (Brewster *et al.*, 1994; Menéndez & Gancedo, 1998).

Del estudio de las secuencias de los promotores de los genes *PYC1* y *PYC2* de *Saccharomyces cerevisiae* se deduce que en el promotor *PYC1*, se localiza una UAS en la zona -330/-297 y tres secuencias conservadas CCGCC en posiciones -457, -432 and -399. Se ha determinado que en la interacción con las región 330/-214 los genes RTG se encuentran implicados. El promotor *PYC2* ha sido menos caracterizado, aunque ha sido determinado que la eliminación de un fragmento -417 to -291 produce una disminución de 2 veces en la expresión del gen en condiciones de represión y un incremento de la expresión de dos veces en el caso de consiciones desreguladas de crecimiento (Menendez & Gancedo, 1998).

Los transcritos generados a partir de ambos isogenes en levadura codifican para proteínas que presenta una homología próxima al 90% y sólo difieren en sus regiones 5' y 3' no traducidas, por lo que cabe asignarle a estas regiones un papel relevante en el control de la estabilidad del mRNA o bien de la capacidad de traducción de dichos transcritos. No obstante los trabajos que abordan este mecanismo de regulación en levaduras son muy escasos.

En mamíferos, y más concretamente en rata y en humanos se ha confirmado que existe un único gen que codifica para la piruvato carboxilasa pero cuya expresión se encuentra controlada por dos promotores denominados promotor proximal (P1) y promotor distal (P2) (Jitrapakdee *et al.*, 1996, 1997). Además, como ya se ha indicado, a partir de estos dos promotores se generan diferentes trásncritos que mediante un proceso de splicing alternativo dan lugar a distintos mRNAs. Del analisis de la abundancia relativa de los mRNA generados a partir del promotor proximal (P1) y distal (P2) en diferentes tejidos, Jitrapakdee *et al.* (1997) han concluido que el promotor proximal, que genera transcritos que se expresan fundamentalmente en hígado, tejido adiposo y glándula mamaria (Jitrapakdee *et al.*, 1996), y en función de las rutas metabólicas que predominan en estos tejidos, debe transcribirse fundamentalmente en situaciones gluconeogéncias y lipogénicas. Por contra, los transcritos generados a partir del promotor distal se expresan en una gran variedad de tejidos y por tanto parece razonable relacionar la expresión desde este promotor con una función general anapleótica del enzima.

Los resultados anteriores son apoyados por experimentos que demusteran que en ratas obesas Zuker, en tejudo adiposo la expresión de la piruvato carboxilasa se encuentra

incrementada varias veces y este incremento se asocia a una mayor abundancia de transcritos generados desde el promotor proximal (Jitrapakdee *et al.*, 1998). Así mismo, los mismos autores han demostrado que en páncreas la expresión de la piruvato carboxilasa se encuentra controlada fundamentalmente por el promotor distal y se encuentra regulada por los niveles de glucosa. Esto hace concluir a estos autores que en páncreas el enzima tiene una función anaplerótica y que el promotor que la regula es el promotor distal.

En rata, las secuencias de los promotores proximal y distal ha sido determinada por Jitrapakdee *et al.*, 1997. Se ha determinado la secuencia de 1153 bp correspondientes al promotor proximal (Figura 1.23). En este promotor no puede identificarse ninguna caja TATA ni CAAT, por contra sí se han identificado motivos de unión para el factor HIP-1 característico de promotores domésticos. Otros posibles motivos presentes son motivos de unión para AP2, Sp1, CREB, NF-1, HNF-4, cMyb, c-Myc y PEA-3. Quizás uno de los motivos más interesantes es la presencia de un motivo de respuesta a insulina (IRE). De hecho experimentos utilizando genes reporteros (Jitrapakdee *et al.*, 1997) indican que la insulina disminuye muy significativamente la transcripción controlada por este promotor. Otro motivo destacado en el promotor proximal es la presencia de un elemento FSE1 (Fat-Specific Element 1), lo cual justificaría la implicación del promotor proximal en la regulación de la expresión de la piruvato carboxilasa en situaciones de lipogénesis.

Por contra, en el promotor distal (Figura 1.23) pueden ser identificadas tres cajas CAAT aunque no existe ninguna caja TATA próxima al inicio de la transcripción. Curiosamente en este promotor al que se le atribuye un papel anaplerótico también existe una secuencia IRE de respuesta a insulina, aunque experimentos utilizando genes reporteros demuestran que no es funcional.

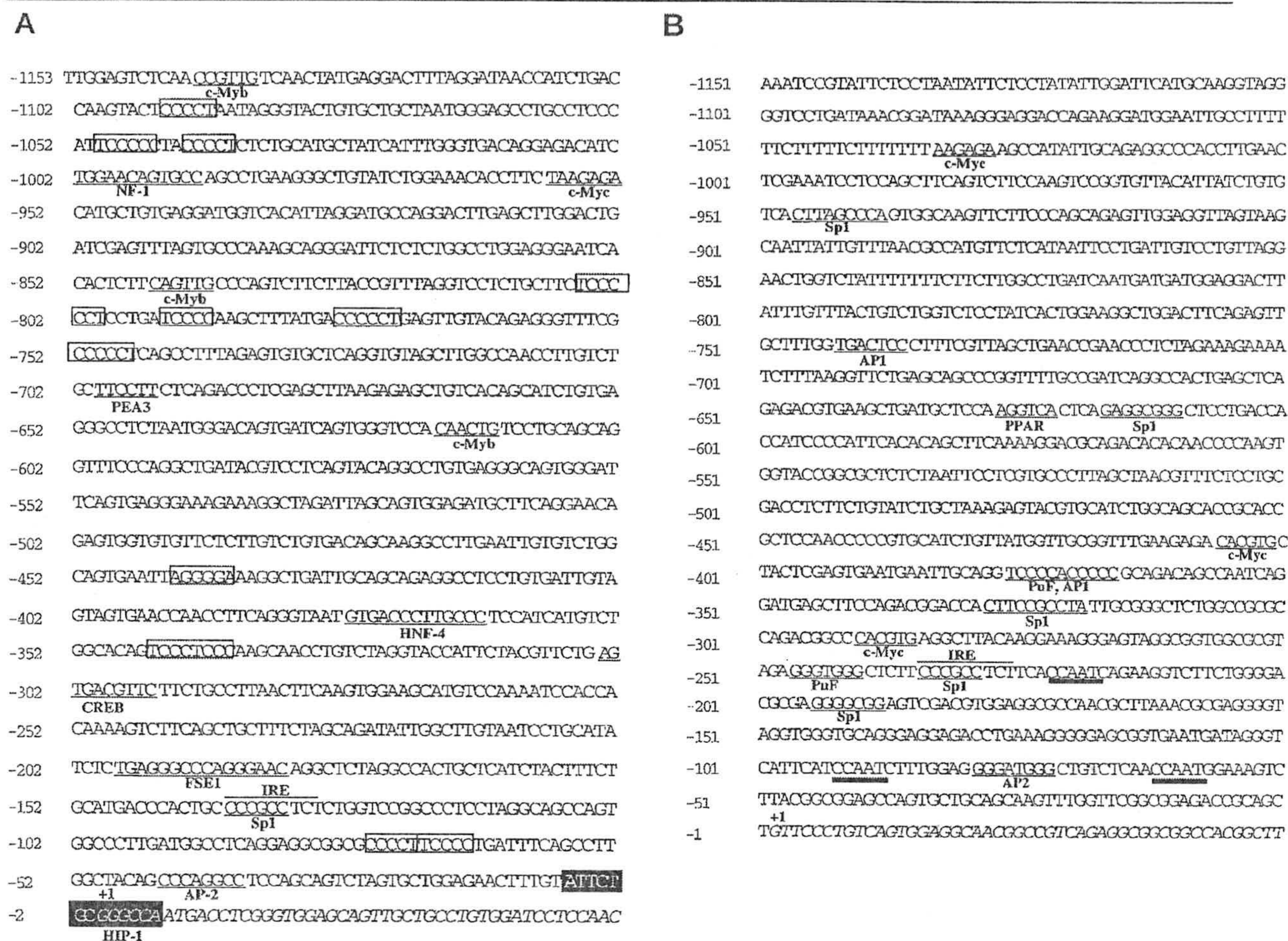


Figura 1.23.- Secuencia de nucleótidos de los promotores proximal y distal de la piruvato carboxilasa de rata. A.- Promotor proximal; B.- Promotor distal. El inicio de la transcripción desde ambos promotores se indica por un +1. Algunos posibles motivos de unión a proteínas se indican en las secuencias.

Otro mecanismo relevante de regulación de la expresión de la piruvato carboxilasa se basa en la existencia de transcritos que difieren en su extremo 5'-UTR mientras que codifican para la misma proteína (Jitrapakdee *et al.* 1996, 1997). En rata y humanos han sido descritos 5 de estos transcritos generados a partir de los promotores proximal y distal mediante un mecanismo de splicing alternativo (Figura 1.22). Se han realizado algunos estudios sobre la función que estos diferentes extremos 5'-UTR podrían tener en la regulación de la expresión del enzima (Jitrapakdee *et al.*, 1998). Experimentos en situaciones de liponeogénesis o lipogénesis activa muestran que el transcrito mayoritario es el C, procedente del procesamiento de transcritos generados desde el promotor proximal. En situaciones anapleróticas, por contra, predominan los transcritos D y E, que claramente son generados a partir de la transcripción desde el promotor distal.

No se ha establecido claramente que función representan los extremos 5' no traducidos en la expresión de la piruvato carboxilasa. Experimentos de traducción in vitro y análisis de la asociación de transcritos a polisomas (Jitrapakdee *et al.*, 1998), parecen indicar que de los dos transcritos mayoritarios, el C (procedente del promotor proximal) y el D (procedente del promotor distal), el primero de ellos tiene una mayor eficiencia de traducción. Es posible que esta diferencia en eficiencia de traducción se encuentre mediada por la estructura secundaria de los diferentes transcritos en su región 5'-UTR, tal y como se ha propuesto para numerosos genes (Kozak, M. 1988).

Por tanto, cabe concluir que la piruvato carboxilasa de rata y probablemente de humanos se encuentra regulada por la existencia de dos promotores. Un promotor proximal activo en gluconeogénesis y lipogénesis y que origina transcritos con una alta eficiencia de traducción y un segundo promotor distal, que con un papel anaplerótico o basal, genera transcritos que presentan una menor capacidad de traducción y que por tanto originan un menor nivel de expresión.

II. OBJETIVOS

UNIVERSIDAD DE GRANADA

29 MAYO 2003

COMISIÓN DE DOCTORADO

II. OBJETIVOS

Una de las líneas de investigación más antiguas del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada es la que trata del estudio de la regulación de la gluconeogénesis hepática y renal. Como es lógico, este proceso metabólico tiene una extraordinaria importancia en la homeostasis glucídica. Igualmente, la gluconeogénesis renal puede, en determinados casos, estar ligada al mantenimiento de la homeostasis ácido-básica, incrementándose en aquellas situaciones fisiológicas o patológicas en las que se desencadene cualquier tipo de acidosis metabólica.

Una parte del trabajo se dirigió a estudiar la regulación de las etapas mitocondriales de la gluconeogénesis. En estos trabajos se demostró que la carboxilación mitocondrial del piruvato para formar oxalacetato, reacción catalizada por la piruvato carboxilasa es una de las etapas reguladas del proceso gluconeogénico. Diversos autores han calculado coeficientes de control de flujo para la piruvato carboxilasa hepática muy elevados, llegando a postular que la etapa catalizada por este enzima es la más importante en el control de toda la ruta gluconeogénica. Más aún, la piruvato carboxilasa es un enzima que participa en otros procesos metabólicos importantes como son la lipogénesis y la síntesis de determinados aminoácidos, sin olvidar su imprescindible papel anaplerótico para el funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

La regulación de la actividad piruvato carboxilasa se produce tanto por modificación en la concentración intramitocondrial de sus efectores alostéricos, como por cambios en la concentración del propio enzima, resultado de la inducción o represión de sus promotores o por alteraciones en su velocidad de degradación.

Ha sido caracterizada la organización génica de diferentes piruvato carboxilasas de muchos orígenes, una característica importante del enzima humano y de rata es que su expresión se encuentra controlada por dos promotores que dan origen mediante procesos de *splicing* alternativo a transcritos que difieren en su extremo 5' no traducido, manteniendo en principio la misma secuencia codificante en todos los casos. La relevancia que tiene la existencia de estos diferentes transcritos en la regulación de la expresión del

enzima y el papel que ambos promotores tienen en el control del inicio de la transcripción han sido caracterizados muy parcialmente.

Por tanto, los objetivos que nos hemos planteado en esta Tesis Doctoral han sido llevar a cabo una caracterización lo más profunda que nos sea posible de la variabilidad génica de la piruvato carboxilasa y el estudio de los mecanismos de regulación de su expresión génica. Estos objetivos generales se concretan en:

1.- *Caracterización de la variabilidad génica de la piruvato carboxilasa.* Puesto que ha sido descrita la existencia de varias isoformas que difieren en su región 5' no traducida del mRNA de nuestro enzima en humano y rata, nosotros proponemos un estudio exhaustivo de qué isoformas del mRNA de la piruvato carboxilasa de rata existen. Para ello, nuestro estudio no se va a limitar al estudio de la región 5' no traducida del mRNA, sino que se va a extender a las regiones codificantes y 3' no traducidas.

2.- *Determinación de la función de cada isoforma de la piruvato carboxilasa en la regulación de la expresión génica.* Una vez que determinemos qué isoformas del mRNA de la piruvato carboxilasa existen, proponemos la caracterización de las mismas en experimentos en los que las regiones 5' y/o 3' no traducidas se fusionen con genes reporteros y sean transfectadas en líneas celulares eucariotas. De esta manera, podremos determinar si estas regiones traducidas tienen un papel relevante bien en la estabilidad del mRNA del gen o bien en la eficiencia de traducción del mismo. Es decir pretendemos determinar si esta variabilidad génica ejerce una función reguladora a nivel post-transcripcional o traduccional.

3.- *Determinar el patrón de expresión de isoformas de la piruvato carboxilasa en diferentes tejidos y situaciones fisiológicas.* Pretendemos determinar si existe un patrón tejido específico de distribución de isoformas que hayamos identificado en los objetivos previos. Si consideramos que ha sido descrito que la expresión de piruvato carboxilasa se encuentra controlada por dos promotores que generan diferentes isoformas que varían en su región 5' no traducida, el análisis del patrón de expresión de isoformas, podría permitirnos determinar el promotor que está preferentemente expresándose en cada tejido o situación y por tanto tratar de asignar una función fisiológica a la expresión desde cada promotor.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. MATERIAL

III.1.1. Instrumentación

Para los cultivos y manipulación de bacterias se han usado los siguientes equipos:

- Campana de flujo laminar Telstar modelo Micro-V
- Incubador Gallenkamp con agitación orbital termostatzado por aire
- Electroporador Eppendorf modelo 2510

Para la purificación y análisis de ácidos nucleicos se usó el equipamiento siguiente:

- Cubetas para electroforesis horizontal de Biorad
- Transiluminador de UV de New Brunswick Scientific
- Sistema de electroforesis vertical para secuenciación de DNA Poker

Face II de Hoefer Scientific Instruments

- Fuentes de alimentación GPS 200/400 de Pharmacia
- Homogenizador de tejidos Ultraturrax de IKA Laburtechnik
- Horno de hibridación Techne hybridiser HB-1D.
- Cross-Linker UV Stratalinker[®] modelo 1800 de Stratagene.
- Equipo para secado de geles a vacío de Heraeus Instruments.
- Termociclador Perkin-Elmer modelo 9700

Para los cultivos de células eucariotas y el estudio de la expresión de genes reporteros se usaron:

- Campana de flujo laminar de MDH
- Incubador de CO₂ de Revco

- Microscopio óptico Olympus
- Lector de placas Fluoriskan Ascent FL de Labsystems
- Microscopio de fluorescencia Olympus IX-50
- Microscopio confocal Leica TCS SP
- Fluorímetro RF 5301 PC de Shimadzu
- Citómetro de flujo Becton Dickinson Facs Vantage

Otros aparatos de uso general fueron:

- Baños termostatizados Precistern de Selecta
- Cámara fotográfica Kodak DC-120
- Espectrofotómetro DU[®]-70 de Beckman
- Centrífugas Beckman JA-20 y L8-70
- pHmetro de Crison
- Estufas Selecta
- Microfugas Eppendorf
- Termobloques multiplacas de Selecta
- Balanzas Precisa
- Autoclave Selecta

III.1.2. Material biológico y productos

III.1.2.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas de la raza Wistar de peso comprendido entre 200-300 g. Los animales procedían del animalario de la Universidad de Granada y fueron mantenidas durante el tiempo de cada experimento en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia en una habitación dotada de ventilación y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con la fase de oscuridad entre las 20:00 horas y las 8:00 del día siguiente. La humedad relativa osciló entre el 45-50 % y la temperatura entre 22-24 °C. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar y con agua, con libre acceso en todo momento. Estas ratas se estabularon al menos 7 días antes de su utilización. Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y su cuidado se realizó siguiendo las normas del

comité de ética de la Universidad de Granada y aprobada por el Animal Welfare Committee.

III.1.2.2. Células eucariotas

Se han utilizado células C9 para experimentos de transfección. Son células derivadas de hígado de rata Sprague-Dawley (CRL 1439) que fueron cedidas por el Profesor J.M. Cuezva del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

III.1.2.3. Bacterias

Para la clonación de DNA se ha utilizado la cepa XL1-blue de *E. coli*.

III.1.2.4. Vectores de DNA

Los vectores pGEM-T y pGEM-T easy de Promega y pST-blue1 de Novagen fueron usados para clonar fragmentos de PCR y para secuenciación. Los vectores linealizados poseen una timina adicional en 5' desapareada, para aprovechar la adenina adicional que agrega la Taq polimerasa en las reacciones de amplificación, por lo que se

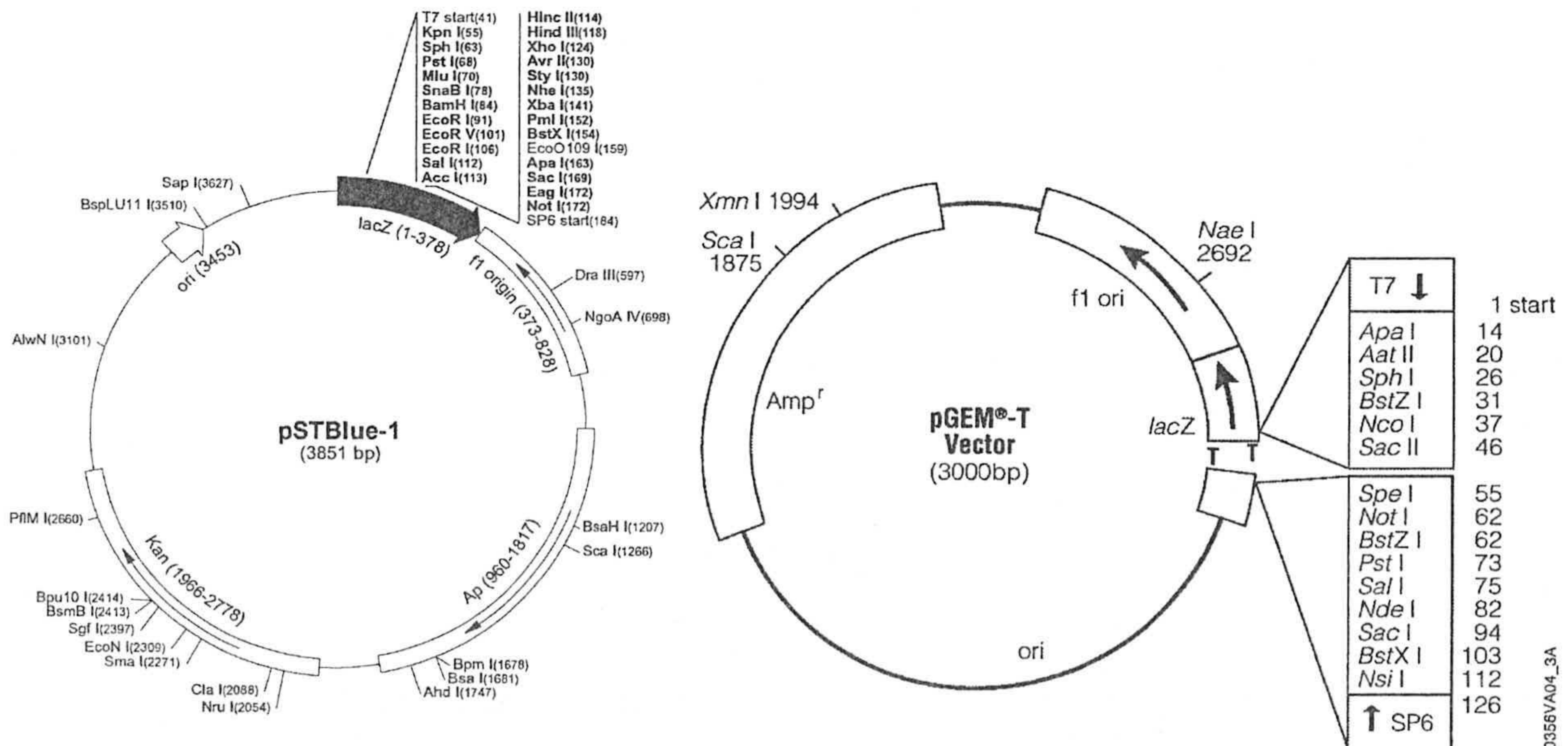


Figura 3.1. Vectores de clonación utilizados

facilita la clonación de fragmentos de PCR. Tienen también un gen de resistencia a ampicilina para la selección de transformantes y permiten la selección azul-blanca por alfa complementación. Estos vectores incluyen los promotores de T7 y SP6 permitiendo la secuenciación de fragmentos clonados oligonucleótidos universales. Los mapas de los vectores se recogen en la figura 3.1.

El vector pEGFP-N2 de Clontech se usó como vector de expresión de la proteína fluorescente verde. El vector tiene genes de resistencia a kanamicina y neomicina. Permite la clonación de secuencias que se expresarán como proteínas de fusión la proteína fluorescente verde sin modificar la pauta de lectura, al existir variantes N1, N2 y N3. La expresión de la proteína verde viene dirigida por un promotor de citomegalovirus y también incluye secuencias potenciadoras en 3' de SV-40. El mapa del vector se recoge en la figura 3.2.

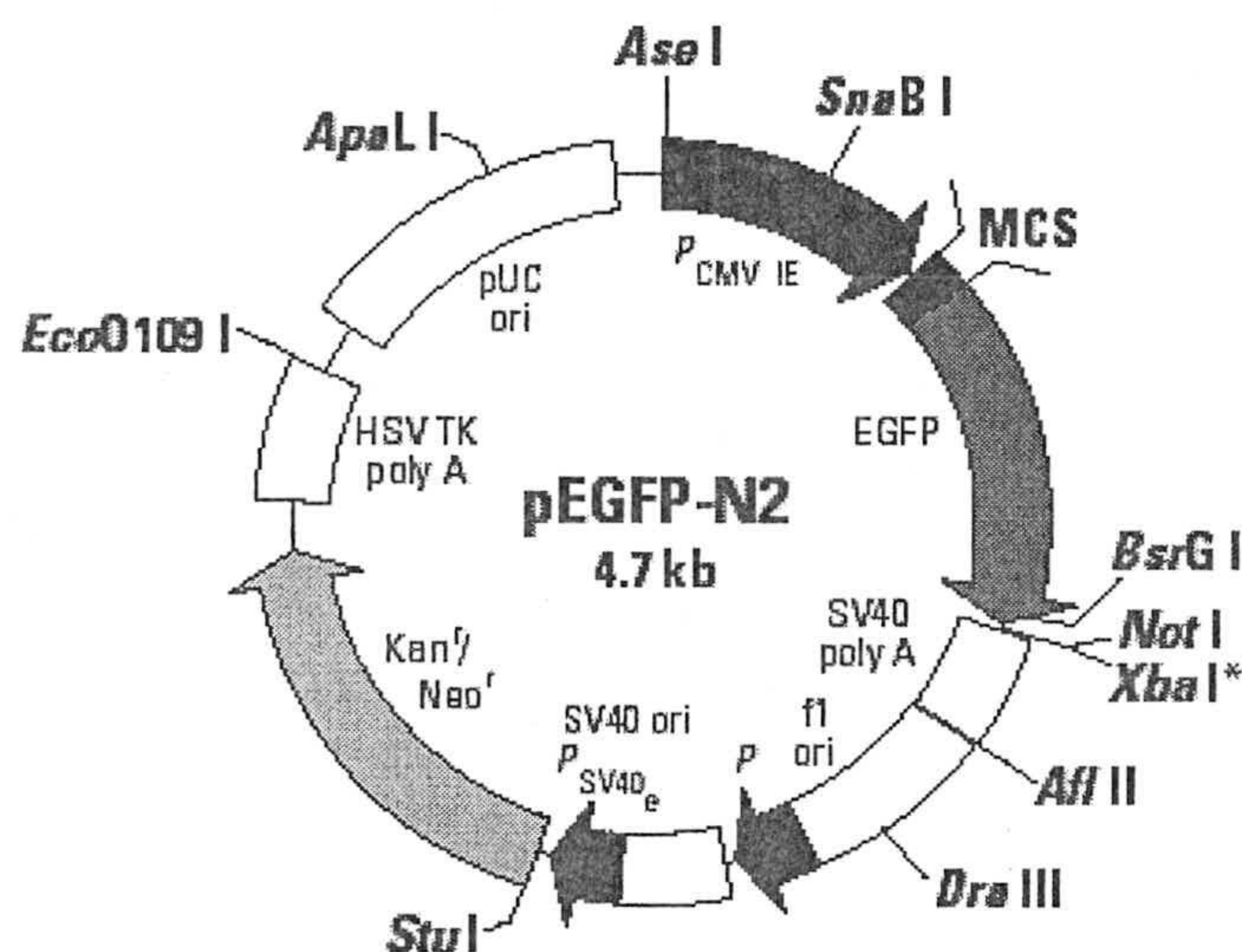


Figura 3.2. Mapa físico del vector pEGFP-N2.

III.1.2.5. Oligonucleótidos

Para el estudio de la expresión del gen de la piruvato carboxilasa se han utilizado en distintas técnicas los oligonucleótidos mostrados en la tabla 3.1. Las secuencias de otros oligonucleótidos generales utilizados para reacciones de secuenciación y amplificación de insertos en vectores se detallan en la tabla 3.2.

Tabla 3.1.- Oligonucleótidos utilizados para el estudio de la expresión del gen de la piruvato carboxilasa.

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	POSICIÓN
1A-as-1	GGTGAGATCATGCCAGGGG	-39
1A-s-1	CCCCTGGCATGATCTCACC	-58
1B-as-1	CTTGTACCAGCAGCCAAACACCTAATCG	-20
1B-as-2	CACCTAATCGTGCACACAGAGG	-38
1B-s-1	CGATTAGGTGTTTGGCTGCTGGTACAAG	-48
1B-s-2	GTGGATCCTCCAACACGTCC	-99
1B-s-3	CTCGGGTGGAGCAGTTGCTG	-102
1B-s-4	GCCAATGACCTCGGGTGGAGCAG	-111
1B-s-BgIII	gcagatct GGCCAATGACCTCGGGG	-113
1C-as-1	GTGCAATCAGCTCTCCAGAAGGCAGG	-4
1C-s-1	CCTGCCTTCTGGAGAGCTGATTGCAC	-30
1D-as-1	CTTCGCCCCGTCGCCTCAAGCC	-1
1D-as-2	CCCCGTCGCCTCAAGCC	-5
1D-s-1	GGCTTGAGGCGACGGGGCGAAG	-22
1D-s-2	GTCAGTGGAGGCAACGGCCGTC	-59
1D-s-3	CTGTCAGTGGAGGCAACGGC	-61
1D-s-BgIII	gcagatct GTTCCCGTCAGTGGAGGCAAC	-66
2-as-1	CAGGAGCCTCAGGCCCCC	+42
2-as-2	CCCAGGAGCCTCAGGCCCCC	+44
2-as-3	CGCCGGACATTTGGGGAGG	+92
2-as-SmaI	ggcccgg GCCGGACATTTGG	+91
2-s-1	ATGCTGAAGTTCCAAACAGT	+1
2,3-as-1	GATGGCAATCTCACCTCTGTTGG	+151
11-as-1	CAGCTGGAACAGCTCGGG	+1470
11-s-1	GTGGACACCCAGTTCATG	+1426
15-s-1	CTGTACCAAAGGGACTCCTC	+2445
16-as-1	CCCAGTACTCACTGTAGTC	+2516
16-s-1	GACTACAGTGAGTACTGGG	+2497
20-as-1	CACAGCTTCTGTTGAGAGGC	+3595
20-as-2	CTCCATGGGCGAAGTCACC	+3463
20-as-3	CTCCATCTCCAGGATGAGG	+3535

Se nombran con el número del exón en el que hibridan seguido de las iniciales de sentido o antisentido y del número identificativo. Se indica la posición en que hibrida el nucleótido 5' en el exón 1 o en el cDNA. En aquellos oligonucleótidos en que se incluyen secuencias de restricción, éstas están escritas en letra minúscula.

Tabla 3.2. Oligonucleótidos generales utilizados en reacciones de secuenciación y amplificación o en la generación de sondas para cuantificación de RNA.

β -actin-F	TACAACCTCCTTGCAGCTCC
β -actin-R	GGATCTTCATGAGGTAGTCTGTC
M13-R	GGAAACAGCTATGACCAT
SP6	GGAAACAGCTATGACCATG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

III.1.2.6. Productos para manipulación de DNA o RNA

Para la obtención a pequeña escala de DNA plasmídico a partir de cultivos bacterianos se usó el kit Concert Rapid Plasmid Purification Systems de Gibco BRL y para purificar mayores cantidades de DNA plasmídico se usó alternativamente el kit “Perfectprep Plasmid Maxi” de Eppendorf o fue purificado por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio de acuerdo con la técnica descrita en Sambrock *et al.* (1989).

Para la purificación de fragmentos de DNA obtenidos por digestión con enzimas de restricción o por amplificación mediante PCR se realizaron electroforesis en geles de agarosa de diferente concentración, las bandas de DNA, visualizadas por incubación de los geles en una disolución de bromuro de etidio al 0,02 % y exposición a luz ultravioleta, fueron cortadas con un bisturí y el DNA fue eluido utilizando el Kit “NucleoSpin Extract 2 in 1” de la casa Macherey-Nagel.

Los enzimas de restricción, DNA ligasa y Taq polimerasa, fueron proporcionados por Amersham Pharmacia Biotech.

La retrotranscripción de RNA se llevo acabo con el Kit “First-Strand cDNA Síntesis” suministrado por Amersham Pharmacia Biotech.

Para el marcaje radioactivo de ácidos nucleicos se utilizaron cebadores universales y nucleótidos marcados radioactivamente en posición α o γ , $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000Ci/mmol) y $\gamma^{32}\text{P}$ -dCTP (3000Ci/mmol). El DNA marcado se sintetizó con T4 polinucleotido-kinasa o con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa. Todos estos reactivos fueron

proporcionados por Amersham Pharmacia Biotech. El marcaje no radiactivo de oligonucleótidos se realizó con digoxigenina utilizando el Kit "Dig High Prime DNA Labelling and detection starter Kit 1" de la casa Roche.

La transferencia a membranas de ácidos nucleicos y su hibridación se realizó utilizando membranas de nylon cargadas positivamente Nytran[®] supercharge (Schleicher and Schuell). Como tampón de hibridación se utilizó Northern Max[™] prehyb/hyb Buffer de la casa comercial Ambion.

Las películas de autorradiografía Kodak Biomax MR-1 Film 13x18 cm fueron suministradas por la casa comercial Sigma Chemical Co.

Para determinar el tamaño de las bandas obtenidas en los experimentos de extensión de cebadores, se compararon sus migraciones electroforéticas con las del marcador de pesos moleculares DNA Molecular Weight Marker VIII (0.019-1.11 kbp) de la casa Roche. También se prepararon marcadores por digestión del fago λ suministrado por Sigma Chemical Co. con *Hind*III o con *Pst*I. Otros marcadores fueron escaleras de 50 o 100 pares de bases de Sigma Chemical Co.

III.1.2.7. Medios de cultivo de células eucariotas

Las células se cultivaron en medio DMEM, con suero bovino fetal, glutamina, penicilina, estreptomycin y aminoácidos no esenciales suministrados por la casa Sigma Chemical Co. o por Gibco BR. Para las transfecciones se utilizó Lipofectina de Gibco BR. Para la selección de las células transfectadas se usó el antibiótico geneticina o G 418 de Gibco BR.

III.1.2.8. Otros reactivos

Otros productos y reactivos utilizados como SDS, NaCl, MgCl₂, MgSO₄, EDTA, tris-HCl, urea, tiocianato de guanidinio, acetato sódico, citrato sódico, borato, ácido maleico, glucosa, Sephadex G50, Sephadex G25, persulfato amónico, agarosa, azul de bromofenol, fenol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, etanol, bromuro de etidio, ácido acético, glicerol, DEPC, N-laurilsarcosina, 2-mercaptoetanol, 20xSSC, acrilamida al

40%, TEMED, tween 20, triptona, extracto de levadura, y agar fueron de grado analítico y procedían de las siguientes casas comerciales Sigma Chemical Co, Merck, Bio-Rad, Pronadisa, Difco, Panreac y Merck.

III.2 MÉTODOS

III.2.1. Cultivos de bacterias

Todos los medios y soluciones usados para el crecimiento de bacterias se esterilizaron en autoclave por calor húmedo a 120 °C y 1 atmósfera de presión.

Como medio normal de crecimiento de la cepa *XLI blue* de *E.coli* se utilizó el medio Luria Bertani (LB) (Sambrook et al.,1989), cuya composición por litro fue la siguiente: 10 g de Triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl. Para la preparación de medio sólido LB se añaden 15 g de bacto-agar para alcanzar una concentración final de 1.5 % (p/v).

Las soluciones de antibióticos Ampicilina (50 mg/ml) y Kanamicina (25 mg/ml) se prepararon en H₂O destilada y se esterilizaron por filtración; la Tetraciclina (15 mg/ml) se disolvió en metanol. Las soluciones concentradas se almacenaron a -20 °C. Para su uso, las disoluciones se disolvieron en la proporción 1/1000.

III.2.2. Transformación

III.2.2.1. Preparación de células competentes

El método para la preparación de células competentes y su ulterior transformación fue descrito por Sugino *et al* (1990). De una forma resumida, a partir de 3 ml de un inóculo de la cepa bacteriana se realiza una dilución 1:100 en 50 ml LB suplementado con 500 µl de MgSO₄, 10mM y 500 µl de glucosa al 0.2% esterilizada por filtración. Este cultivo se crece a 37°C con agitación hasta la fase de crecimiento logarítmico (DO = 0,6), tras incubar en hielo durante 10 minutos se recogen las bacterias por centrifugación a 1500 xg durante 10 minutos a 4°C. El sedimento bacteriano se resuspende en frío suavemente en

500 μ l de la solución A (LB + MgSO₄ 7H₂O 10mM + glucosa al 0.2%) y 1200 μ l de solución B (36% glicerina + 12% PEG - 7500). Finalmente, de la suspensión resultante se hicieron alicuotas de 100 μ l que se congelaron a -80°C manteniéndose a esta temperatura un mínimo de 8 horas antes de su uso. Con este método se obtuvieron células que permitieron frecuencias de transformación mayores de 1×10^6 transformantes/ μ g de DNA.

III.2.2.2. Transformación mediante choque térmico

La introducción de DNA plasmídico en las bacterias se hizo según el método de Hanahan (1983). En un tubo eppendorf colocado en un baño de hielo se mezcló todo el volumen de la ligación con 100 μ l de células competentes y se incubó durante una hora. A continuación las bacterias recibieron un choque térmico por incubación a 42°C durante 2 minutos. Se volvieron a enfriar en un baño de hielo durante 10 minutos y se añadieron 900 μ l de medio LB líquido. Las bacterias se incubaron con agitación a 37°C durante una hora y después se sembraron 250 μ l en placas de Petri con LB agar adicionado con los antibióticos correspondientes, IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido, 200 mg/ml de agua) y XGAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, 20 mg/ml de dimetil-sulfoxido) para la selección de colonias entre las de color azul que se han transformado con plásmido sin inserto y las de color blanco que supuestamente llevan el inserto. Finalmente, las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

III.2.2.3. Transformación por electroporación

Se inocularon 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos correspondientes, de acuerdo con los genes de resistencia en el plásmido, y se dejó crecer el cultivo durante toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. Al día siguiente se determinó la densidad óptica a 590 nm y se inocularon 50 ml de LB, suplementado con antibióticos, con la cantidad adecuada del cultivo para obtener una densidad óptica final de 0,1. Se dejó crecer en las mismas condiciones hasta alcanzar un valor de absorción comprendido entre 0,6 y 1. El cultivo se centrifugó a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C para sedimentar las bacterias y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en un volumen igual de agua previamente enfriada a 4 °C y se volvió a centrifugar. Después de eliminar el sobrenadante, las bacterias se resuspendieron en 0,002 volúmenes de glicerol al 10% previamente enfriado.

Para la transformación se mezclaron 40 μ l de suspensión de bacterias con el volumen total de la ligación, del cual previamente se habían eliminado las sales por diálisis sobre filtros de 0.025 μ m durante 30 minutos y se transfirieron a la cubeta de electroporación. Se introdujo la cubeta en el electroporador y se generó un pulso eléctrico de 2500 V durante 5 segundos. Las bacterias, finalmente se recuperaron con 1 ml de medio SOC y se incubaron a 37 °C agitándose a 100 rpm durante 45-60 minutos antes de sembrar 100 μ l en placas con LB agar adicionadas con los antibióticos de selección e IPTG + X-GAL. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

El medio SOC está compuesto por 20 g de Triptona, 5 g de extracto de levadura y 0.5 g de NaCl disueltos en 950 ml de agua, después se le añaden 10 ml de KCl 250 mM y se ajusta el pH a 7 con NaOH 5N. Finalmente, se enrasa con agua hasta 1 L y se autoclava. Antes de usar hay que añadirle 5 ml de MgCl₂ 2M estéril y glucosa hasta una concentración final de 10 mM.

III.2.3. Aislamiento y purificación de DNA plasmídico

Para el aislamiento y purificación de DNA plasmídico de los cultivos bacterianos se utilizaron los métodos que se describen a continuación, dependiendo del grado de pureza requerido, de la cantidad de DNA que se quisiera obtener y del tamaño del plásmido a aislar.

III.2.3.1. Método de la lisis alcalina

El aislamiento de plásmidos a pequeña escala para analizar los clones tras una transformación se utilizó el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*1989) con algunas modificaciones.

Se partió de un volumen de 1,5 mL de cultivo bacteriano. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 12.000 xg durante 3 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 200 μ l de solución P1 (25 mM Tris pH 8 + 10 mM EDTA), a continuación se le añadieron 200 μ l de solución de lisis P2 (20 μ l SDS 1%(P/V) + 20 μ l NaOH 4M para 200 μ l). Después de agitar los tubos eppendorfs

suavemente por inversión, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, el lisado se neutralizó añadiéndole 200 μ l de solución P3 (Acetato sódico 3 M pH 5.2). La solución se incubó durante 10 minutos en hielo y después el DNA cromosómico y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12.000 xg durante 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf limpio y se añadieron 500 μ l de fenol-cloroformo en proporción (1:1) (v/v) recogiendo la fase acuosa después de agitar y centrifugar. El exceso de fenol fue eliminado por lavado con cloroformo-alcoholisoamílico en proporción (24:1) (v/v). Posteriormente a la fase acuosa se le añadió 1 ml de isopropanol frío y se incubó durante 30 minutos a -20°C para precipitar el DNA, que se recuperó por centrifugación a 12.000 xg durante 30 minutos. El sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 75%(v/v) en H₂O estéril. Tras una nueva centrifugación a 12.000 xg durante 5 minutos se desechó el sobrenadante y se secó el sedimento en un aparato speed-vac de Haereus. El DNA purificado se resuspendió en 20 μ l de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0 + 0.1 mM EDTA) y se incubó con 1 μ l de RNAasa a 37 °C durante 10 minutos. Finalmente se cargaron 2 μ l de esta preparación en un gel de agarosa para su análisis electroforético.

III.2.3.2. Método "Concert prep" para la purificación de DNA plasmídico a pequeña escala

El sistema "Concert rapid Plasmid purification Systems" (Gibco BRL. ref:11453) se utilizó para la preparación rápida de DNA plasmídico libre de RNA, partiendo de un volumen de cultivo bacteriano de 3 mL y siguiendo las instrucciones del fabricante. Este DNA plasmídico se empleó para reacciones posteriores de digestión con enzimas de restricción o para su secuenciación.

III.2.3.3. Método "Maxiprep" para purificación de DNA plasmídico a gran escala

Para la transfección de células eucariotas con vectores de expresión hacen falta cantidades grandes de DNA de un mayor grado de pureza, por lo tanto se utilizó el sistema "Perfectprep Plasmid Maxi" de Eppendorf, realizando todas las fases del protocolo del comerciante.

III.2.4. Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones del DNA con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas sugeridas por la casa comercial. Normalmente las reacciones se efectuaron con 0,1-0,5 μg de DNA más 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente suministrado por la casa comercial (10 veces concentrado) y 0,5-10 unidades del enzima de restricción en un volumen final de 10-30 μl , completado con agua destilada y estéril. Las digestiones se realizaron por incubación a la temperatura adecuada durante 3 horas. Estas digestiones se utilizaron para confirmar el éxito de las reacciones de ligación de insertos y para subclonación en vectores adecuados con sitios de cortes compatibles.

III.2.5. Electroforesis de DNA

III.2.5.1. Electroforesis horizontal en gel de agarosa

La separación y visualización tanto de plásmidos completos, como de fragmentos de DNA, originados por la digestión con enzimas de restricción, se realizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa sumergido en TAE 1x (este tampón se preparó de una solución 50 veces concentrada y esterilizada en el autoclave: Tris-base, 4,84g; ácido acético 1,14ml; EDTA-Na₂ 0,5 M pH 8,2 y H₂O hasta 1 litro) a un voltaje de 80-100 V.

Por cada 5 μl de muestra a analizar se añadió 1 μl de tampón de carga (400 μl de Glicerol 87% (v/v) y azul de bromofenol con agua estéril. Cada muestra se depositó en un pocillo del gel de agarosa a la concentración adecuada en función del tamaño de las bandas a separar (0.8%-4% (p/v) en TAE 1x, sumergido en una cubeta con el mismo tampón. Las moléculas de DNA se tiñeron por inmersión en una solución TAE 1x con bromuro de Etidio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 10 minutos. El DNA se visualizó mediante exposición del gel a la luz ultravioleta (254nm-300nm) y el tamaño de los fragmentos se estimó por interpolación en curvas logarítmicas del tamaño de cada fragmento frente a su movilidad relativa, utilizando como patrón los fragmentos del DNA del fago λ cortado con el enzima **HindIII**

o **PstI**, u otros marcadores de tamaño descritos en el apartado 2.1.2.6. Las imágenes se recogieron con una cámara digital acoplada a una impresora.

III.2.5.2. Electroforesis vertical en geles de poliacrilamida

Las muestras se separaron por electroforesis vertical en geles del 6,5 % de poliacrilamida de 44 cm de largo. Para su preparación se disolvieron 25,2 g de urea en 6 ml de tampón TBE 10X, al que se le añadieron 9,76 ml de poliacrilamida al 40%, 75 µl de TEMED y agua hasta un volumen final de 60 ml. Finalmente, para polimerizar el gel se añadieron 250 µl de persulfato amonico al 10 %. Tras agitar unos segundos, evitando la formación de burbujas, la mezcla se vertió entre los cristales del sistema, con separadores de 0,25 mm. Los geles se precorrieron durante 30 minutos a 1500 v. Se cargaron 6 µl por pocillo y la electroforesis se realizó a 1500 v. Una vez finalizada, los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman durante 2 horas a 65 °C y se expusieron con una película de radiografía. Para determinar el tamaño de las bandas obtenidas se compararon sus migraciones electroforéticas con las del marcador DNA Molecular Weight Marker VIII (0.019-1.11 kbp) de la casa Roche.

III.2.5.3. Electroforesis capilar

Los productos de las reacciones para la secuenciación del DNA se separaron por electroforesis capilar en un aparato Perkin-Elmer.

III.2.6. Recuperación de fragmentos de DNA separados en geles de agarosa

Una vez identificado en el gel de agarosa el fragmento de DNA de interés, éste se escindió con ayuda de un bisturí. El DNA se recuperó por electroelución o utilizando el sistema comercial “NucleoSpin Extract 2 in 1” (GFX-PCR Amersham) siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial.

III.2.7. Ligación de DNA

Fragmentos de DNA obtenidos por digestión con enzimas de restricción o por reacciones de PCR se mezclaron con vectores linealizados con extremos compatibles en proporciones 1:1, 1:2, 1:4. se adicionó tampón comercial 10x y 1 μ l de T₄ DNA ligasa para un volumen final de 10 μ l completado con agua. La mezcla se incubó a 10-12°C durante toda la noche.

III.2.8. Extracción y cuantificación de RNA total en tejidos

III.2.8.1. Extracción de RNA

El RNA total de los tejidos se extrajo mediante el método descrito por Chomczynsky y Sacchi (1987) con ligeras modificaciones: Se partió 100 mg de tejido, congelado a -80°C, y se homogeneizó en 1ml de Tiocianato de Guanidinio en baño de hielo. A continuación, se añadió 100 μ l de acetato sódico 2M pH 4, se agitó y posteriormente se añadió sucesivamente 1 ml de fenol pH: 4 y 200 μ l de cloroformo-alcohol isoamilico. Las muestras se incubaron en hielo durante 15 min y se centrifugaron a 10.000 xg en frío durante 15 min. La fase acuosa obtenida se precipitó 1 ml de isopropanol en frío y se incubó a -20°C durante 1 hora. Las muestras se centrifugaron a 12.000 xg durante 20 min a 4°C y el precipitado de RNA fue purificado adicionalmente mediante una segunda precipitación. Para ello, el precipitado se disolvió en 300 μ l de Tiocianato de Guanidina y fue reprecipitado con 300 μ l de isopropanol. Tras incubar a -20°C durante 1 hora, el RNA se recogió por centrifugación a 12.000 xg durante 30 min en frío. El precipitado obtenido se lavó con 1ml de etanol al 75% y se centrifugó de nuevo a 12.000 xg durante 20 min. El precipitado de RNA se secó al aire y finalente fue resuspendido en 50-100 μ l de H₂O DEPC. Los RNA totales así extraídos se mantuvieron a -80°C.

Reactivos empleados y método de preparación:

Agua DEPC 0,1 y 0,2%: Añadir el DEPC al agua y se deja toda la noche agitando y después se autoclava dos veces.

Tiocianato de Guanidina 4M: Añadir 44,9g de GT a 60 mL del siguiente buffer compuesto por 3,1 mL de Citrato Na 0,75M pH 7,0 (cc final 25 mM) mas 4,7 mL de n-lauroylsarcosina 10% (cc final 0,5%) y de 52,2 mL de agua DEPC autoclavada. Después se calienta a 65°C para disolverlo totalmente y se filtra con filtro estéril de 0,2 mm. Este reactivo se conserva a temperatura ambiente.

Solución de desnaturalización: GT/0,1M 2-Mercaptoetanol (GT): Se mezcla 0,36 mL de 2-mercaptoetanol con 50 mL de tiocianato de guanidina (GT).

Acetato sódico 2M pH 4,0: Se pesa 16.41 g de acetato sódico (cc final de 2M) y se disuelve en agua. Después se le añade el ácido acético glacial hasta un pH 4,0 y finalmente se ajusta hasta 100 mL con agua DEPC. Se deja toda la noche y se autoclava antes de usar.

Fenol pH4,0: Es comercial (SIGMA).

Cloroformo:Alcohol isoamilico (49:1): Se mezcla 49 mL de cloroformo con 1 mL de alcohol isoamílico en frasco previamente autoclavado y libre de RNAsas.

Citrato sódico 0,75M,pH 7,0: Se prepara el citratoNa 0,75M pesando 22,06 g de citratoNa y se disuelve en agua hasta 100 mL, de la misma manera se prepara el ácido cítrico 0,75M pesando 15,76 g y disolviéndolo en agua hasta 100 mL. Finalmente se mezclan las dos soluciones ajustando el pH hasta 7,0 y un volumen de 100 mL con agua DEPC, se deja toda la noche y se autoclava antes de usarlo.

N-Lauroylsarcosina 10%: Se pesa 10 g del reactivo y se disuelve en 100 mL de agua DEPC y se autoclava antes de usar.

Isopropanol al 100%: Isopropanol al 100% comercial libre de RNAsas.

Etanol 70%: Se mezcla el etanol absoluto con agua DEPC a una proporción del 70% en frasco libre de RNAsas.

III.2.8.2. Determinación de la concentración de RNA

La concentración de RNA se cuantificó espectrofotométricamente determinando la absorbancia de las muestras a 260nm y 280nm frente a un blanco de H₂O DEPC. La concentración de RNA se calcula respecto al valor estándar de A₂₆₀=1 para solución de 40 µg/ml de RNA. La relación A_{260nm}/280nm se utilizó para estimar el grado de pureza de las muestras: un valor superior a 1.9 se consideró indicador de contaminación por DNA y un valor inferior a 1.7 se consideró indicativo de contaminación por proteínas y/o fenol.

La cuantificación del RNA total por fluorescencia se ha realizado mediante el kit comercial de Molecular Probes Ribogreen® de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

III.2.9. Northern-blot

III.2.9.1 Separación electroforética de RNA

Las muestras de RNA total se separaron mediante electroforesis en agarosa en condiciones desnaturizantes. Para ello, las muestras de RNA (10 µg) se diluyeron hasta un volumen de 15 µl y se les añadió 5 µl de tampón de carga y 1 µl de Bromuro de Etidio. Antes de cargar estas muestras en el gel se calentaron 10 minutos a 65°C para su desnaturización. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1% en un tampón borato en presencia de formaldehído.

III.2.9.2. Transferencia de RNA a membranas de Nylon

A partir del gel obtenido por electroforesis en condiciones desnaturizantes, previamente lavado con agua para eliminar el exceso de formaldehído, se realizó la transferencia del RNA a la membrana de nylon cargado positivamente por capilaridad. La transferencia se ha realizado utilizando un usando un tampón 10xSSC (3M NaCl + 3M Citrato sódico pH 7,0). La transferencia se efectuó verticalmente (de arriba hacia abajo) durante toda la noche. Una vez finalizada la transferencia, el RNA se unió a la membrana de forma covalente irradiándola con luz UV usando un Cross-Linker (Stratagene). Las membranas así transferidas se guardaron hasta su uso a -80°C.

III.2.9.3. Marcaje de sondas de DNA con nucleótidos radioactivos

Las sondas empleadas para la detección de secuencias específicas de mRNA se obtuvieron a partir de fragmentos aislados de plásmidos por digestión con enzimas de restricción mediante el método de *Random primer labelling* o de cebadores al azar. El tamaño de los fragmentos de DNA que se utilizaron para el marcaje de sondas fue de aproximadamente 900 pb.

A partir de 30 ng de DNA correspondiente a la sonda a sintetizar, se añadieron 0,5 μ l de N6 random primers (hexadeoxinucleótidos, 0,5 μ g/ μ l) para un volumen final de 14 μ l completado con agua estéril. La mezcla de DNA y cebadores se desnaturalizó en baño de agua hirviendo durante 3 min y rápidamente se enfrió en baño de hielo durante 5 min. Al DNA desnaturalizado se adicionó una mezcla compuesta por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (12 unidades), desoxinucleótidos no marcados y 50 μ Ci α^{32} P-dCTP (3000Ci/mmol). La reacción de marcaje se llevó a cabo a temperatura ambiente durante toda la noche y finalmente se paró con la adición de 25 μ l de solución A (50mM TrisHCl pH 7,5 + 50 mM NaCl + 5 mM EDTA pH 8,0 + 0,5%SDS).

La filtración de la sonda marcada se efectúa para eliminar los nucleótidos no incorporados, se realizó mediante una columna de Sephadex G-50.

III.2.9.4. Hibridación

Las membranas se prehibridaron con 5 ml de tampón de prehibridación comercial y durante 4 horas a temperatura de 42°C. Posteriormente se hibridaron con la solución de hibridación en presencia de la sonda marcada (10×10^6 cpm incorporadas/ml de tampón de hibridación). La hibridación se mantuvo durante toda la noche a 42°C.

Tras finalizar la hibridación, la radiactividad unida inespecíficamente a la membrana se eliminó mediante una serie de lavados sucesivos a 65°C. El orden de los lavados fue el siguiente:

4 lavados durante 15 min con una solución que contiene 2xSSC y 0.1% SDS.

2 lavados durante 15 min con una solución que contiene 0.2xSSC y 0.1% SDS.

1 lavado en 0.2xSSC.

Las membranas lavadas se expusieron para su autorradiografía con una película Kodak durante periodos variables (2 días a 3 semanas) en cassettes con dobles pantallas intensificadoras a -80°C.

III.2.10. Transcripción inversa (RT)

Es una técnica con la que se sintetiza cDNA, es decir se hacen copias de DNA a partir del RNA mensajero expresado en un material biológico, utilizando transcriptasa inversa de retrovirus, que se ceba con oligonucleótidos que hibriden con el mRNA. El mRNA eucariótico posee en el extremo 3' largas colas de poli-adenina (poli-A) por lo que el uso de oligonucleótidos de timina (oligodT) permite copiar todas las moléculas de RNA mensajero extraídas. La utilización de oligonucleótidos antisentido complementarios al mRNA de un gen concreto permite una retrotranscripción selectiva. Esta técnica se realizó mediante el uso de un kit comercial, First-Strand cDNA Synthesis Kit de Amersham Pharmacia Biotech siguiendo las instrucciones del fabricante. También se uso el método RLM-RACE de Ambion siguiendo el protocolo del fabricante.

III.2.11. Secuenciación del DNA

La secuenciación se realizó en los Servicios Técnicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra" con la utilización de un secuenciador automático (Perkin Elmer), que permite un rápido análisis de las moléculas de DNA de hebra simple generadas en una reacción de polimerización en las que se añaden didesoxinucleótidos marcados con un indicador de fluorescencia (método de Sanger modificado).

III.2.12. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Partiendo de cDNA de doble cadena y mediante cebadores complementarios a los extremos de la secuencia que nos interesa, esta reacción nos permite una amplificación exponencial del DNA molde usado (Arnheim & Ehrlich,1992). Como polimerasa se usó una DNA polimerasa termoestable, Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de PCR, en particular las temperaturas de hibridación de los cebadores y los tiempos de elongación del fragmento, fueron específicas para cada amplificación. Las

temperaturas de hibridación se determinaron empíricamente a partir de la T_m de los oligos [$T_m(^{\circ}C)=4x(G+C)+2x(A+T)$]. En general, las condiciones fueron de 35 ciclos en tres fases: Una desnaturalización de 1 a $94^{\circ}C$; 1 minuto de hibridación a la temperatura adecuada de hibridación de los dos oligos; una fase de extensión a $72^{\circ}C$ entre 1 y 3 minutos dependiendo del tamaño del fragmento de cDNA a amplificar.

La concentración de cebadores en la reacción fue $1 \text{ pmol}/\mu\text{l}$, dNTPs 0.1 mM y 5 unidades de la Taq polimerasa. Para la reacción se usó el tampón comercial suministrado por el fabricante (Amershan Pharmacia Biotech).

III.2.13. Extensión de cebadores (Primer extension)

Para la determinación de la variabilidad del extremo 5' del mRNA se utilizaron oligonucleótidos antisentido, complementarios al exón 2 o al exón 1A, que una vez marcados con ^{32}P se hibridaron con RNA total extraído de hígado o de corteza renal de rata y se extendieron con transcriptasa inversa. El DNA sintetizado se separó en geles de secuenciación a los que se les realizaron las oportunas autorradiografías.

III.2.13.1. Marcaje de oligonucleótidos y de los marcadores de tamaño

Los oligonucleótidos seleccionados se marcaron con polinucleótido kinasa del fago T4. En un volumen final de $50 \mu\text{l}$, se incubaron $2 \mu\text{l}$ de oligonucleótido ($10 \text{ pmol}/\mu\text{l}$), $5 \mu\text{l}$ de tampón, $5 \mu\text{l}$ de $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ ($10\text{mCi}/\text{ml}$) y 6 unidades de polinucleótido Kinasa de T4 en agua tratada con DEPC. Para los marcadores de tamaño se utilizó $1 \mu\text{l}$ de una disolución de DNA (DNA Molecular Weight Marker VIII ($0.019\text{-}1.11 \text{ kbp}$)) de la casa Roche y $1 \mu\text{l}$ de $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ ($10\text{mCi}/\text{ml}$). Las mezclas de reacción se incubaron durante 2 horas a $37^{\circ}C$. Transcurrido este tiempo se inactivó la enzima por incubación a $65^{\circ}C$ durante 5 minutos. La radioactividad no incorporada se eliminó por filtración utilizando una columna de Sephadex G-25.

III.2.13.2. Hibridación de oligonucleótidos y extensión

A un volumen que contenía 5-6 μg de RNA se le añadieron de 1-3 μl de oligonucleótido marcado (500.000 cpm) y se completó hasta 9 μl con agua DEPC. Los tubos se calentaron por inmersión en un baño de agua a 95 °C durante 5 min y se pasaron posteriormente a un termobloque a 65°C durante 10 minutos. Se dejó caer la temperatura del termobloque lentamente hasta 40°C (unas cinco horas) para conseguir la máxima hidridación del RNA con los oligonucleótidos marcados.

Para el proceso de la extensión se utilizó un Kit comercial (First Strand cDNA Synthesis Kit). Al RNA hibridado con los oligonucleótidos marcados se le adicionó 1 μl de DTT 0,2 M y 5 μl de la mezcla "Bulk first strand" que contenía los cuatro dNTPs y transcriptasa inversa. La mezcla se incubó a 37 °C durante 2 horas. La reacción se paró por incubación a 90°C durante 5 minutos. Posteriormente el DNA sintetizado se precipitó adicionando 1.5 μl de acetato sódico 3 M, pH 5.2 y 50 μl de etanol al 100% incubando durante la noche a -20°C. El DNA precipitado se sedimentó por centrifugación durante 30 minutos a 13200 rpm y 4°C. El sedimento se lavó con 50 μl de etanol al 70% y se disolvió finalmente en 4 μl de tampón TE al que se añadieron 2 μl de tampón de carga para la electroforesis. Inmediatamente antes de proceder a la electroforesis las muestras se calentaron a 65 °C durante 10 minutos. La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se realizó como hemos descrito previamente.

III.2.14. Southern-blot

Las muestras de DNA, plasmídico o amplificado mediante la técnica de RT-PCR, digeridas o no con enzimas de restricción se separaron en geles de agarosa de concentración variable en función del tamaño de los fragmentos a separar y se transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente de la casa comercial Schleicher and Schuell, siguiendo el protocolo de transferencia alcalina descrito en el libro de métodos "Current protocols in molecular biology" (Ausubel *et al.*, 1991).

Así, después de la electroforesis, se realizó una depuración de las muestras. Para ello, el gel se sumergió en una solución de HCl 0.25 N durante 10 minutos hasta el viraje del azul de bromofenol de azul a amarillo. Posteriormente, el gel fue lavado con agua y el DNA se desnaturalizó incubándolo en una solución de NaCl 0.5 N más NaOH 1 M durante media hora, la sosa se eliminó mediante lavado con agua y el gel se neutralizó en una solución compuesta de Tris HCl 0.5 M pH 7 más NaCl 1.5 M durante media hora. Finalmente se tamponó el gel incubándolo durante media hora en 20x SSC.

El gel así preparado se transfirió por capilaridad desde arriba hacia abajo en 20x SSC a una membrana de nylon cargada positivamente durante toda la noche. Una vez finalizada la transferencia, se lavó la membrana con el 2 xSSC para eliminar los restos de agarosa y el DNA se fijó a la membrana irreversiblemente mediante luz UV en un cross-linker. Las membranas se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Como sondas se utilizaron oligonucleótidos específicos del extremo 5' del mRNA de la piruvato carboxilasa. Estos oligonucleótidos se marcaron no radiactivamente con digoxigenina (esteroide de la planta *Digitalis*). Para ello se utilizó el Kit Dig Oligonucleotido 3'-End Labeling de la casa comercial Roche. Utilizando este kit, los oligonucleótidos se marcan enzimáticamente con digoxigenine-dUTP, mediante la incorporación en el extremo 5' de un grupo DIG-ddUTP (digoxigenin-labelled dideoxyuridine-triphosphate) gracias a una transferasa terminal.

Para el *Southern-blot* la prehibridación e hibridación de las membranas se realizó de una forma análoga a la descrita para el *Northern-blot*. Tras 3 horas de prehibridación, a la temperatura específica para el oligonucleótido, con 5 ml de tampón de hibridación se añadieron 1-10 pM de oligonucleótido marcado y se mantuvo la hibridación durante toda la noche a la misma temperatura. La membrana se sometió a tres lavados de 30 minutos a la temperatura de hibridación menos cinco grados con 2x SSC + 0.1% (p/v) de SDS.

La detección inmunológica de la digoxigenina incorporada en las membranas se realizó según el protocolo detallado por Roche, utilizando un anticuerpo comercial frente a la digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina. La detección se realizó mediante una reacción de quimioluminiscencia. Las membranas se expusieron con una película durante un tiempo variable en función de la señal obtenida y finalmente fueron reveladas.

IV. RESULTADOS

IV. Resultados

IV.1. Estudio de las isoformas de RNA mensajero de la piruvato carboxilasa en rata.

La transcripción del gen de la piruvato carboxilasa en diversos organismos y las consiguientes modificaciones post-transcripcionales dan lugar a múltiples isoformas de mRNA tal como ha sido descrito en la introducción de este trabajo. El primer objetivo que nos planteamos fue investigar todas las isoformas que se expresan en corteza renal de rata, para proceder a su clonación. Para ello nos hemos basado en las secuencias de este gen que habían sido publicadas previamente. Hemos realizado estudios separados para dilucidar la posible existencia de isoformas en la región codificante y en ambos extremos del RNA mensajero. Todas las secuencias encontradas se han incluido en un apéndice bajo el epígrafe secuencias.

IV.1.1. Región codificante del mRNA

En primer lugar decidimos clonar la región codificante y analizar la posible existencia de isoformas que pudieran expresarse en corteza renal de rata. Para ello se aisló RNA total y se realizó una transcripción inversa con oligo-dT-*NotI*. Este oligonucleótido hibrida en la cola de poli-A de los RNA mensajeros y puede por tanto extenderse con transcriptasa inversa para construir los cDNAs. De acuerdo con la secuencia publicada para la piruvato carboxilasa de hígado rata, se diseñaron oligonucleótidos con los que se realizaron diversas reacciones de PCR para amplificar eficientemente diversos fragmentos de la región codificante. Se han utilizado tres combinaciones de oligonucleótidos para amplificar la zona 5', la zona central y la zona 3' del mRNA, de forma que se pudieran conseguir fragmentos solapantes que en un futuro pudieran permitir la combinación de todos ellos para la clonación en vectores de expresión, lo que no ha sido objeto de esta tesis. La estrategia experimental así como las condiciones de PCR se indican en la Figura 4.1. La figura 4.2. muestra los resultados de estos experimentos. En cada condición

únicamente se amplificó una banda que fue aislada en geles de agarosa al 0,5 %, cortada, eluida del gel y clonada en el vector pGEMT-V. Cada una de las bandas clonadas se secuenció y las secuencias se compararon con las de las bases de datos. La conclusión de estos experimentos es que no existen isoformas de mRNA en la región codificante, ya que cada condición de PCR amplificaba una única banda. Estos fragmentos se usaron para obtener diferentes sondas de DNA que se usaron para la detección en experimentos de Northern-blot.

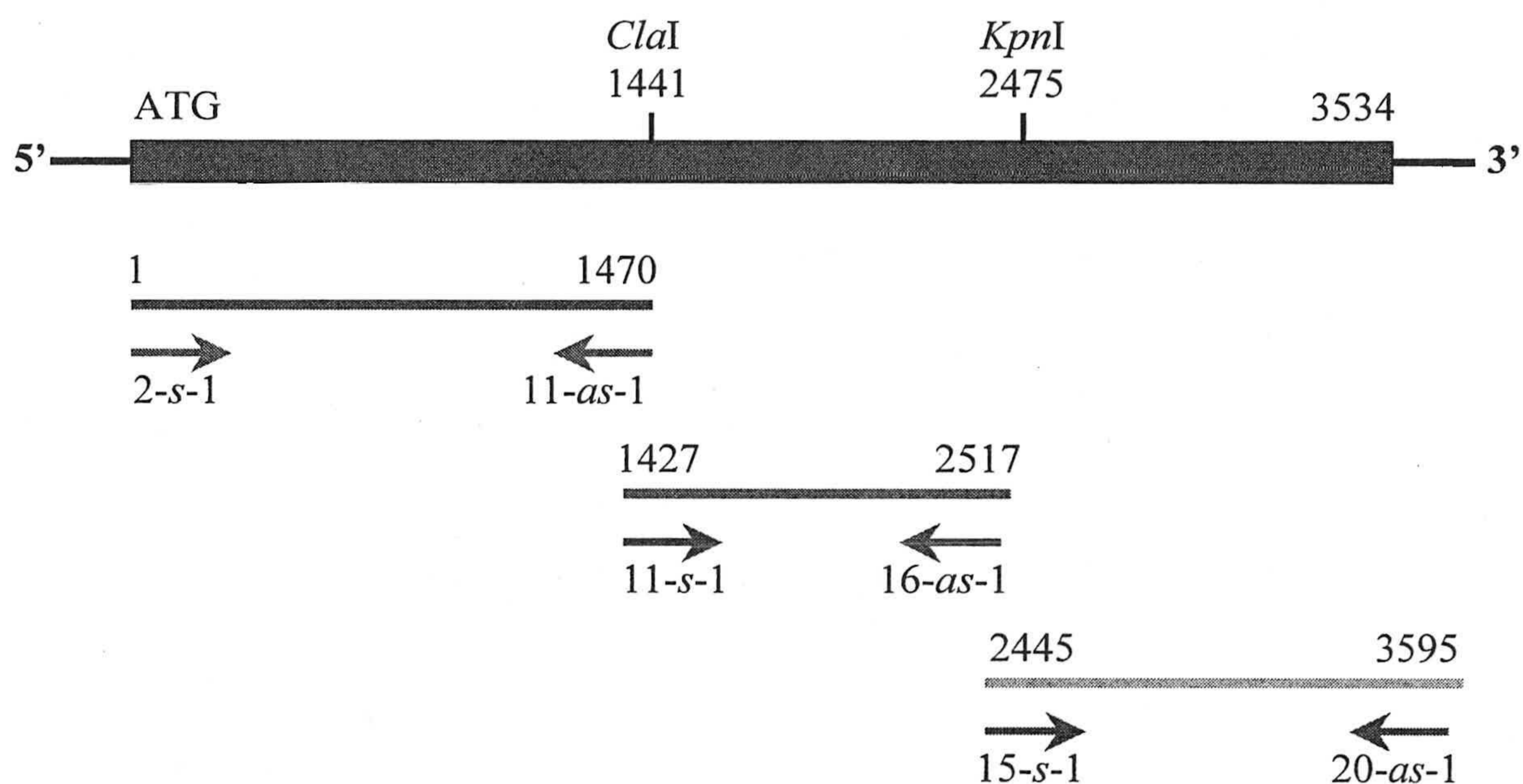


Figura 4.1. Esquema de la amplificación por PCR de tres fragmentos solapantes de la región codificante del gen de la piruvato carboxilasa de rata. Las condiciones de PCR fueron 94°C / 5 min; 91°C / 1min; 48°C / 1 min; 72°C / 2 min durante 45 ciclos y finalmente 72°C / 7 min.

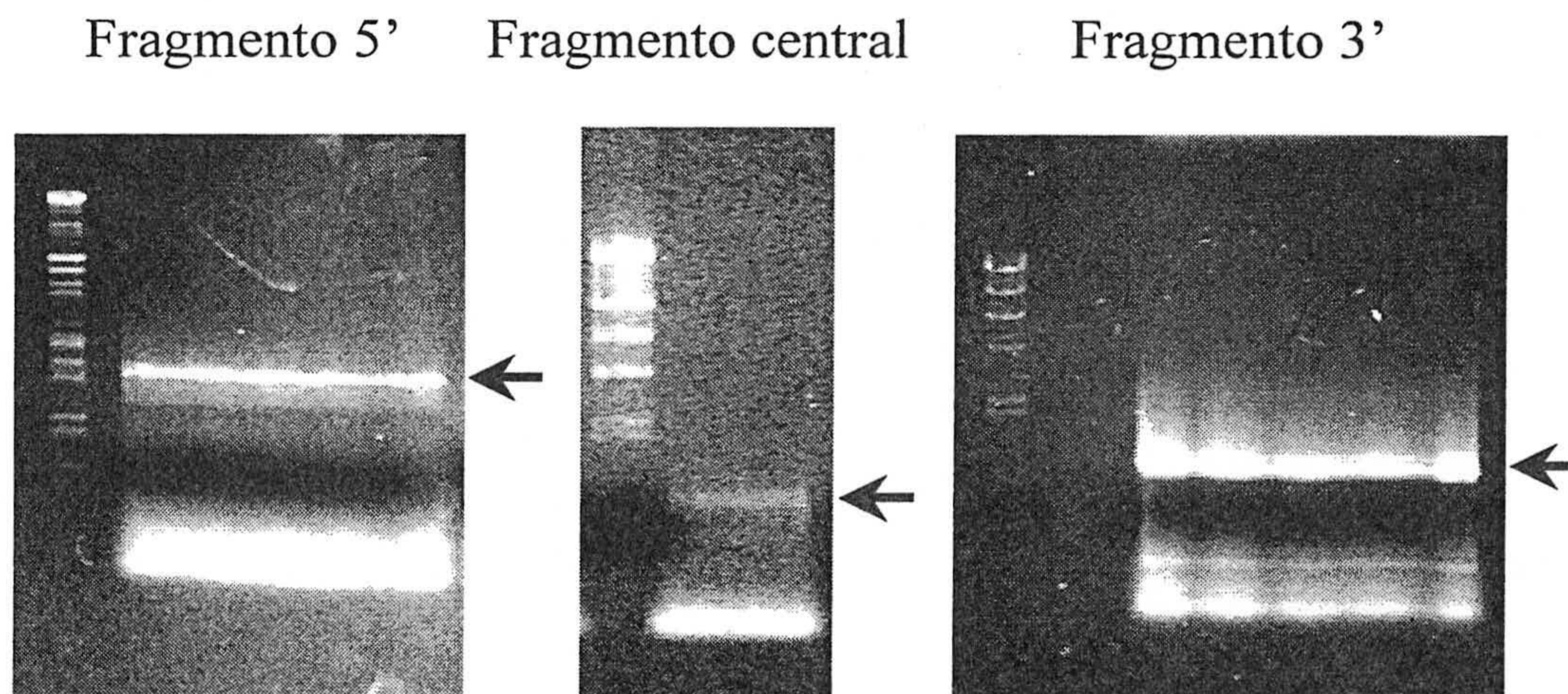


Figura 4.2. Amplificación por PCR de tres fragmentos solapantes de la región codificante del gen de la piruvato carboxilasa de rata.

IV.1.2. Estudio del extremo 3' del mRNA

En muchos genes se ha descrito la existencia de isoformas en las que se modifica el extremo 3' del RNA mensajero debido a diferentes señales de terminación de la transcripción que dan lugar a sitios de poliadenilación diferentes (referencias). Para tratar de identificar variantes del extremo 3' del mRNA de la piruvato carboxilasa se utilizó la técnica de amplificación rápida de los extremos 3' de los posibles cDNAs (Rapid Amplification cDNA Ends, RACE utilizando un kit de Ambion (First Choice™ RLM-RACE) cuyo protocolo experimental se esquematizada en la figura 4.3.

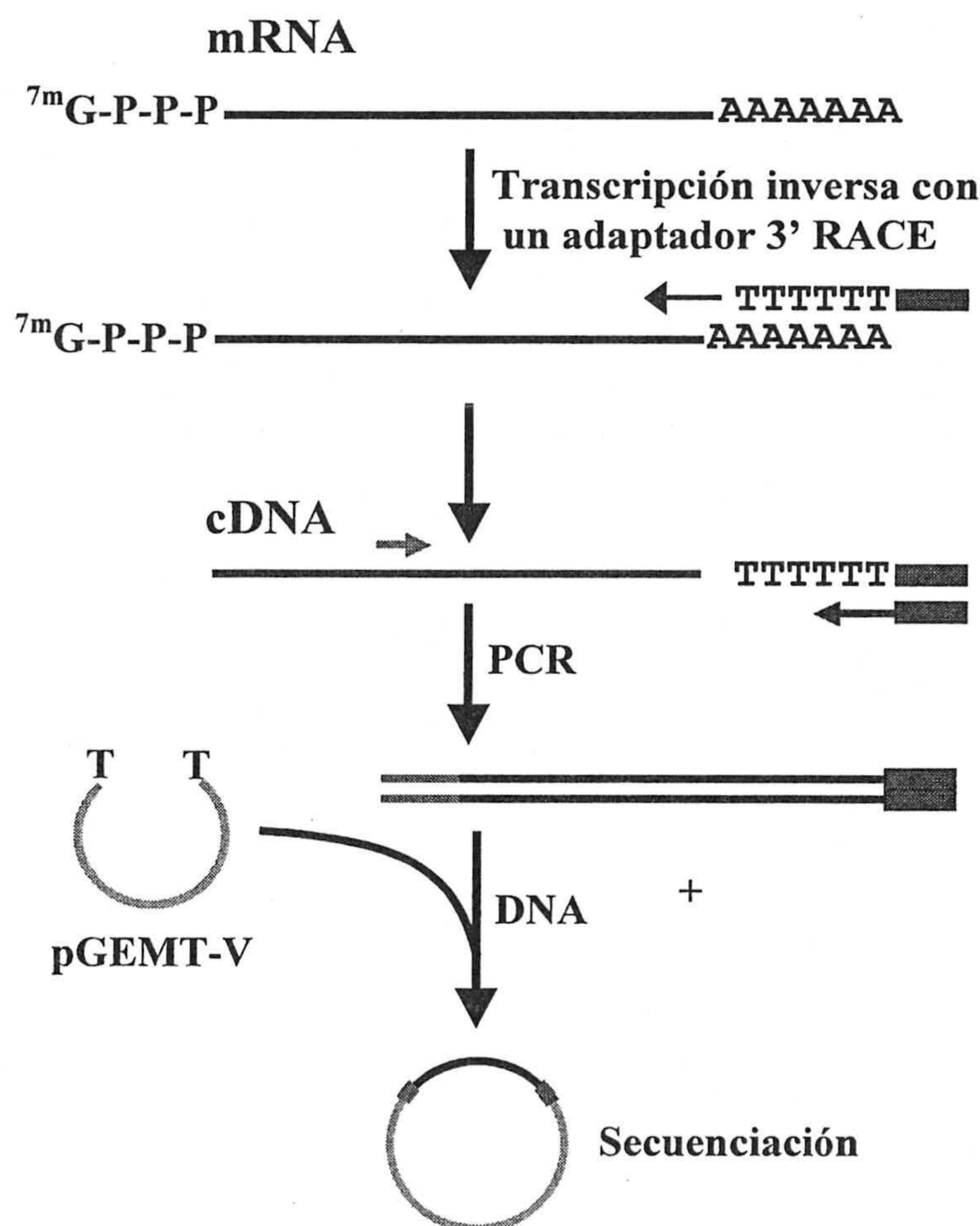


Figura 4.3. Esquema de la técnica 3'-RACE.

En primer lugar se realizó una transcripción inversa del RNA total extraído de riñón, de diafragma y de músculo esquelético de rata usando como cebador un oligonucleótido que contiene en el extremo 5' una secuencia específica para un adaptador seguida de un oligo-dT. El cDNA sintetizado se utilizó como molde para una reacción de

PCR en la que se usó un cebador complementario al adaptador que hibrida en el extremo correspondiente a la cola de poliA de los transcritos y el oligonucleótido 19-s-1 que hibrida en la secuencia de cDNA a 3240 pb. La reacción de PCR se realizó con inicio en caliente (5 min a 94°C) seguido de 45 ciclos (91°C / 1min; 68°C / 1 min; 72°C / 45s) y una extensión final de 7 min a 72°C.

Los productos del PCR se separaron por electroforesis en agarosa y se realizó un Southern-blot en el que se utilizó el oligonucleótido 20-as-1 marcado con digoxigenina para la detección. Una fotografía de los resultados se muestra en la figura 4.4. Como puede observarse se obtuvo un patrón complejo de bandas en los distintos tejidos, que al hibridar con el oligonucleótido 20-as-1 producían únicamente tres señales positivas en riñón y dos en músculo esquelético. De ellas, sólo una, en torno a 800 pb, daba una señal mayoritaria específica en todos los tejidos. De acuerdo con la secuencia publicada, el tamaño esperado para el extremo 3' de la piruvato carboxilasa amplificado en nuestras condiciones experimentales debía ser de 787 pb.

Las bandas que dieron señales positivas en el Southern-blot se clonaron en pGEMT-V y se secuenciaron. Únicamente se obtuvo una secuencia de piruvato carboxilasa que coincidía con la de la banda esperada de 787 pares de bases, resultando ser las demás artefactos de PCR con múltiples adeninas y timinas, por lo que se concluyó que no existe variabilidad en el extremo 3' del mRNA de la piruvato carboxilasa en ninguno de los tejidos estudiados.

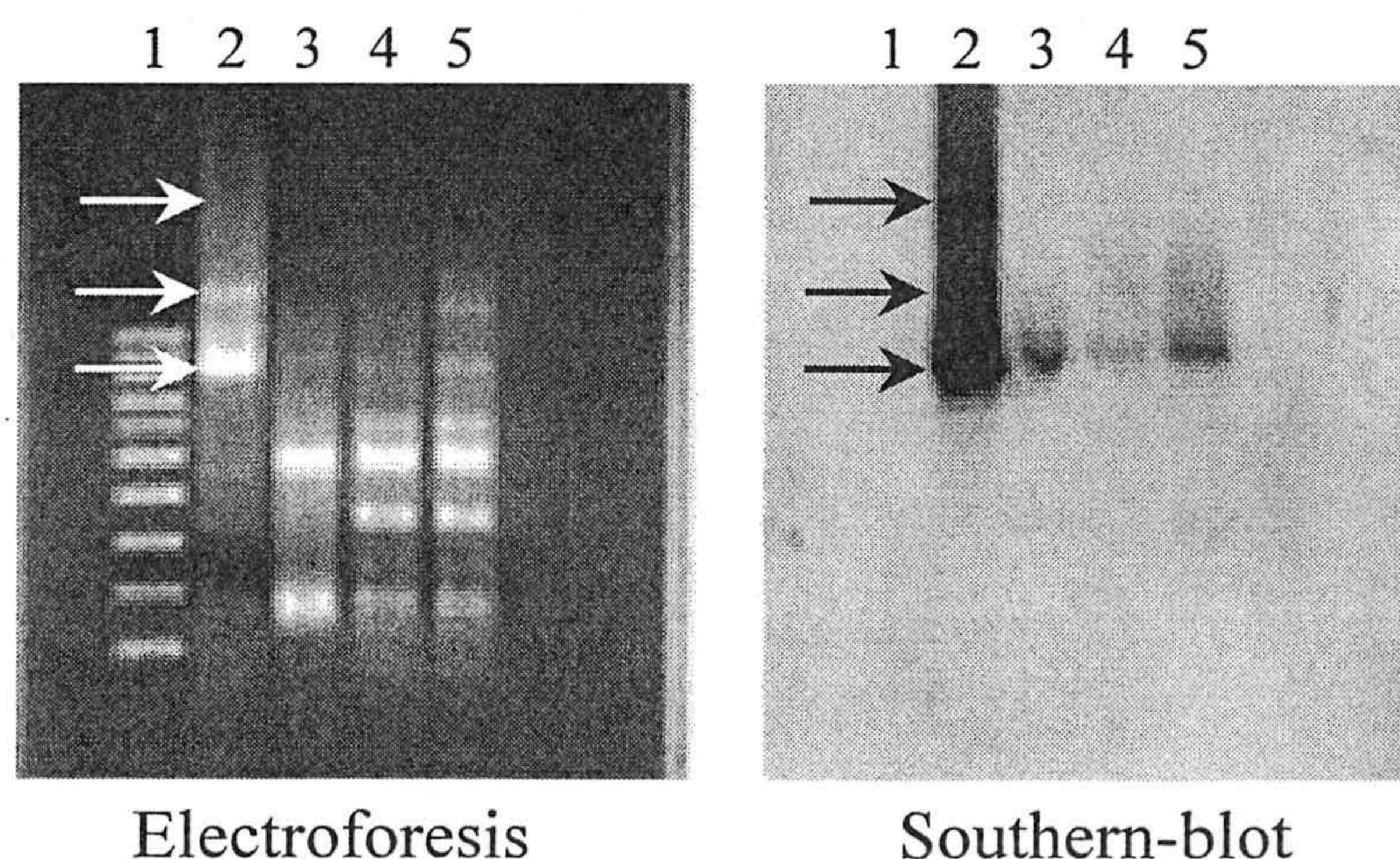


Figura 4.4.- Amplificación y Southern-blot del extremo 3'. Marcador de tamaño 100 pb, 2.- Corteza renal. 3.- Diafragma. 4.- Músculo esquelético control. 5.- Músculo esquelético ayuno.

IV.1.3. Estudio del extremo 5' del mRNA

En todo lo referente al estudio del extremo 5', a lo largo de este trabajo, usaremos el esquema descrito en la figura 4.5

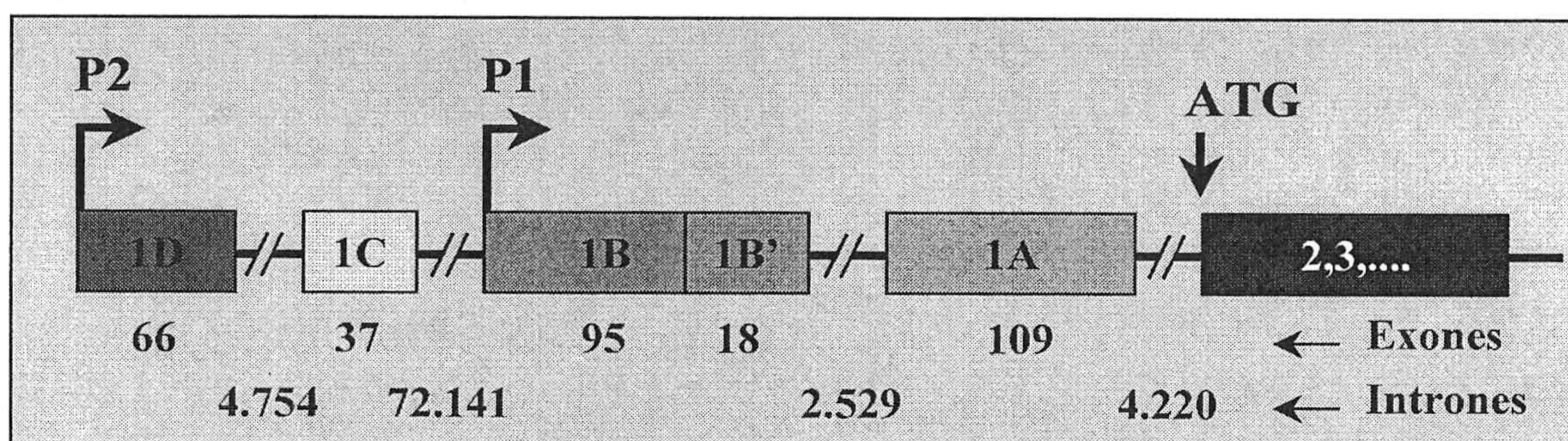


Figura 4.5. Estructura del extremo 5' del gen de la piruvato carboxilasa de rata. Están indicadas las posiciones del inicio de transcripción de los dos promotores P1 y P2, así como el punto de inicio de la traducción. Los subexones del exón 1, no traducible, se indican en cajas coloreadas y su tamaño en pares de bases está indicado en verde. En color rojo se indica el tamaño de los intrones en esta región génica.

En primer lugar procedimos a determinar las isoformas que genera el extremo 5' por el uso diferencial de los dos promotores descritos en la bibliografía (Wallace) y por las posibles formas de *splicing* entre varios exones posibles.

La técnica de extensión de cebadores (*primer extension*) permite determinar el origen de transcripción de un gen al extender oligonucleótidos que hibriden con el RNA mensajero y que actúen como cebadores para una transcriptasa inversa. La técnica se realizó tal como se explica en el apartado (III-¿¿¿¿¿) utilizando los oligonucleótidos 2-*as*-1 y 1A-*as*-1 que hibridan respectivamente en el exón común 2 y en el exón 1A (figura 4.6).

Los fragmentos de DNA obtenidos por extensión del RNA total extraído de hígado y de corteza renal de rata se muestran en la figura 4.7. En los experimentos realizados utilizando el oligonucleótido 2-*as*-1 que hibrida en el exón 2, común a todas las isoformas descritas, esperábamos obtener una imagen clara de la variabilidad de isoformas del extremo 5', sin embargo, en varios experimentos se observaron multitud de bandas que no permitían una identificación clara de los fragmentos amplificados (Figura 4.7.A). Se

empleó el oligonucleótido 1A-as-1 para mejorar la imagen, ya que con él sólo se deberían observar las isoformas de RNA mensajero derivadas del promotor 1. No obstante, se encontró que se amplificaban numerosas bandas, sin diferencias notables entre hígado y riñón (Figura 4.7.B).

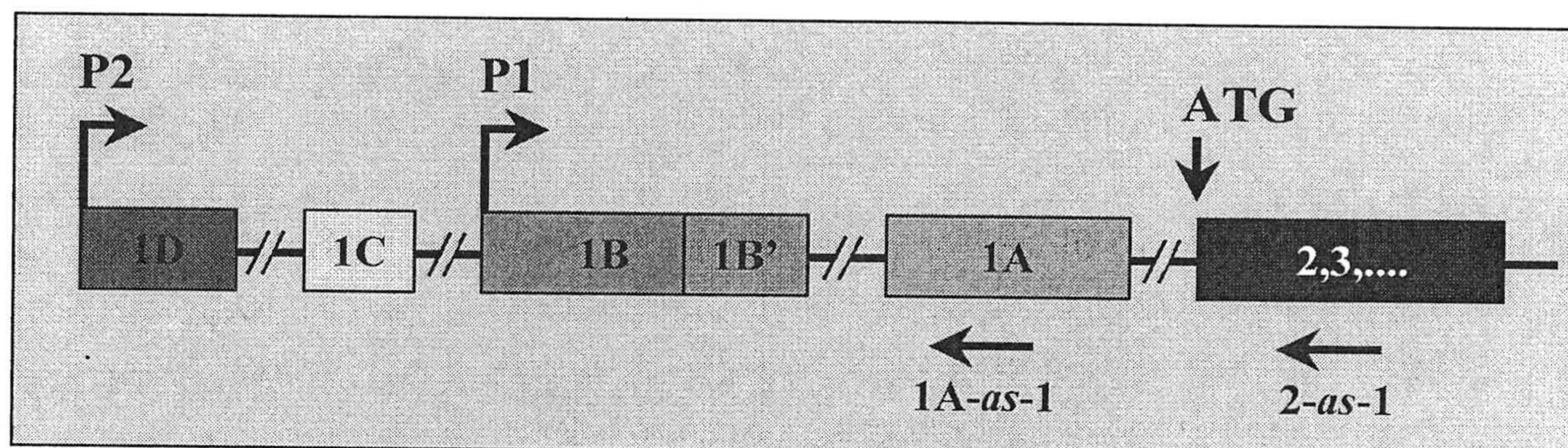


Figura 4.6. Sitios de hibridación de los oligonucleótidos utilizados para los experimentos de extensión de cebadores.

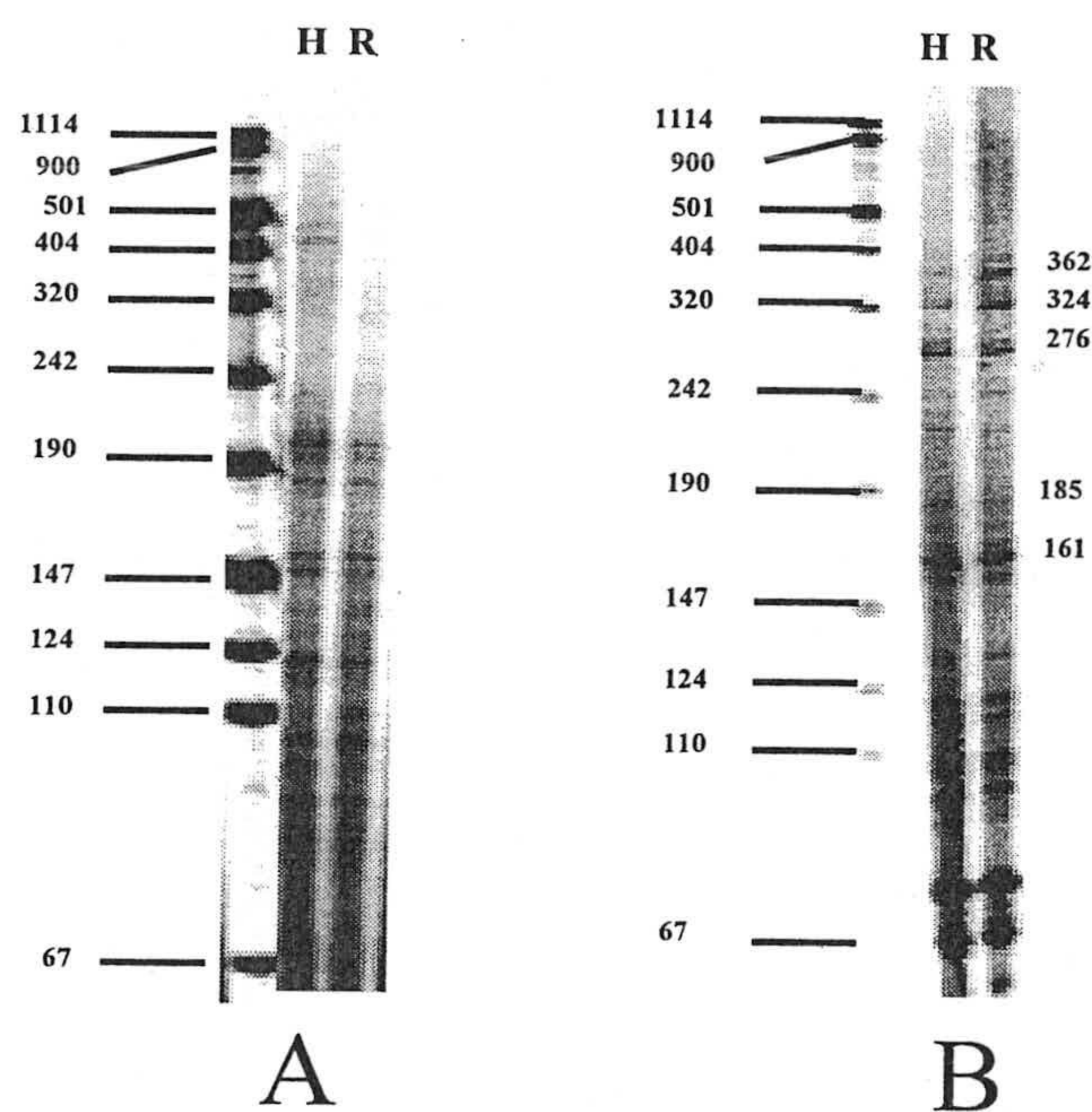


FIGURA 4.7.- Extensión de cebadores. A) Con oligonucleótido 2-as-1. B) Con oligonucleótido 1A-as-1. En cada imagen se muestran tres calles, la primera corresponde a los marcadores de tamaño, cuyo valor en número de bases está indicado a la izquierda. Las otras dos calles corresponden respectivamente a muestras de hígado (H) y de corteza renal (R). A la derecha de la imagen B están indicados en número de bases el tamaño de algunos de los fragmentos extendidos. Los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces con cada oligonucleótido.

Debido al patrón complejo de señales obtenido con los experimentos de extensión de cebadores se procedió a realizar un nuevo abordaje experimental tratando de amplificar los fragmentos retrotranscritos por PCR.

Se han utilizado dos oligonucleótidos diferentes para la retrotranscripción. En primer lugar se utilizó oligo-dT para retrotranscribir todos los RNA mensajeros desde la cola de poliadenina. También se ha hecho una retrotranscripción específica para la piruvato carboxilasa empleando el oligonucleótido 2,3-*as*-1 que hibrida antisentido con los exones comunes de la piruvato carboxilasa más próximos al extremo 5' del mRNA, en concreto con el extremo 3' del exón 2 y con el extremo 5' del exón 3. El uso de este oligonucleótido garantiza que sólo se retrotranscribirán aquellas moléculas de mRNA para la piruvato carboxilasa que hayan sido bien procesadas postranscripcionalmente y que los transcritos serán relativamente cortos lo que facilitará su estudio posterior. Tras varias pruebas, para los estudios de las isoformas del extremo 5' se procedió a trabajar con este último método de retrotranscripción que se combinó con la amplificación posterior por PCR de los transcritos sintetizados.

La amplificación por PCR se realizó utilizando parejas de oligonucleótidos en las que uno correspondía al exón 2 antisentido y el otro a los diferentes sub-exones 1 de los dos promotores descritos P1 y P2. Nunca se usó para el PCR el mismo oligonucleótido antisentido empleado para la retrotranscripción, sino uno más interno para incrementar la probabilidad de que todos los fragmentos amplificados correspondieran a la piruvato carboxilasa. Las moléculas amplificadas por PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa. Posteriormente se realizaron transferencias a membranas y el DNA amplificado se identificó con otro oligonucleótido común para la piruvato carboxilasa, en general se usó el 2-*as*-1 que hibrida en la posición +42 del exón 2 (Southern-blots). Un esquema de la estrategia empleada para los experimentos de RT-PCR y reconocimiento por Southern-blots de los fragmentos amplificados se muestra en la figura 4.8.

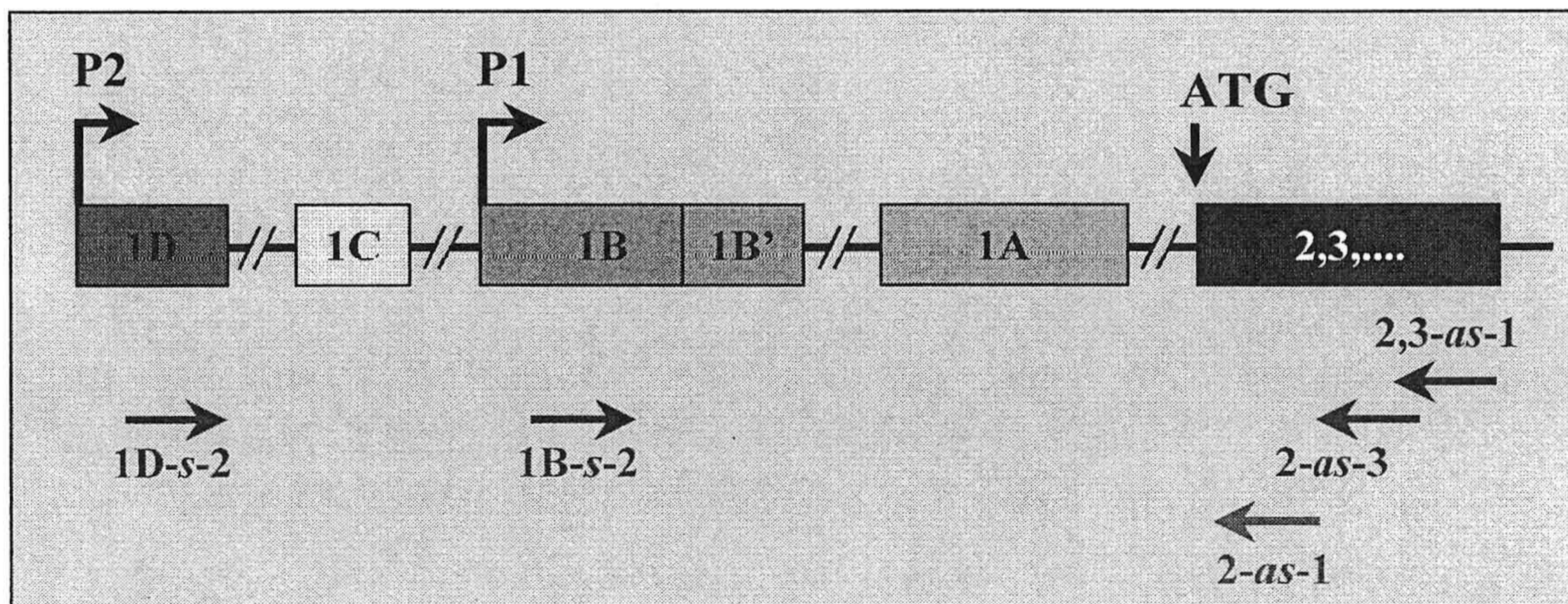


Figura 4.8. *Retrotranscripción específica del extremo 5' de la piruvato carboxilasa, amplificación por PCR y Southern-blots. Se utilizó el oligonucleótido 2,3-as-1 para la reacción de la transcriptasa inversa. Para estudiar los fragmentos retrotranscritos correspondientes a cada promotor se amplificaron por PCR en dos tubos independientemente, con las parejas de oligonucleótidos 2-as-3, 1B-s-2 para el promotor 1 y 2-as-3, 1D-s-2 para el promotor 2. La detección específica de los fragmentos amplificados se realizó por hibridación con el oligonucleótido 2-as-1 previamente marcado con digoxigenina.*

Se utilizaron muestras de RNA extraído a partir de hígado y de corteza renal de rata que se retrotranscribieron con el oligonucleótido 2,3-as-1. Posteriormente se realizaron amplificaciones por PCR con el oligonucleótido común 2-as-3 y 1B-s-2 y 1D-s-2 específicos respectivamente para los promotores 1 y 2. Se realizaron 35 ciclos después de mantener las muestras a 94 °C durante 5 min. Cada ciclo incluía tres etapas de 1 minuto de duración a 91 °C, 65 °C y 72 °C. La reacción finalizó con un periodo de 7 min a 72 °C para la extensión de fragmentos incompletos. Las muestras de PCR se separaron en geles de agarosa al 2,5 % y se transfirieron a membranas de nylon para la detección específica de fragmentos correspondientes a la piruvato carboxilasa con el oligonucleótido 2-as-1 marcado con digoxigenina.

En la figura 4.9. se muestran los resultados de este experimento. Puede observarse un patrón de bandas complejo aunque algunas no son reconocidas por un oligonucleótido específico del exón 2 de la piruvato carboxilasa. En cualquier caso, el número de bandas obtenido supera a las cinco que cabría esperar de acuerdo con los datos publicados sobre este gen. También se aprecia que no existe diferencia entre las isoformas amplificadas con RNA extraído de hígado o de corteza renal.

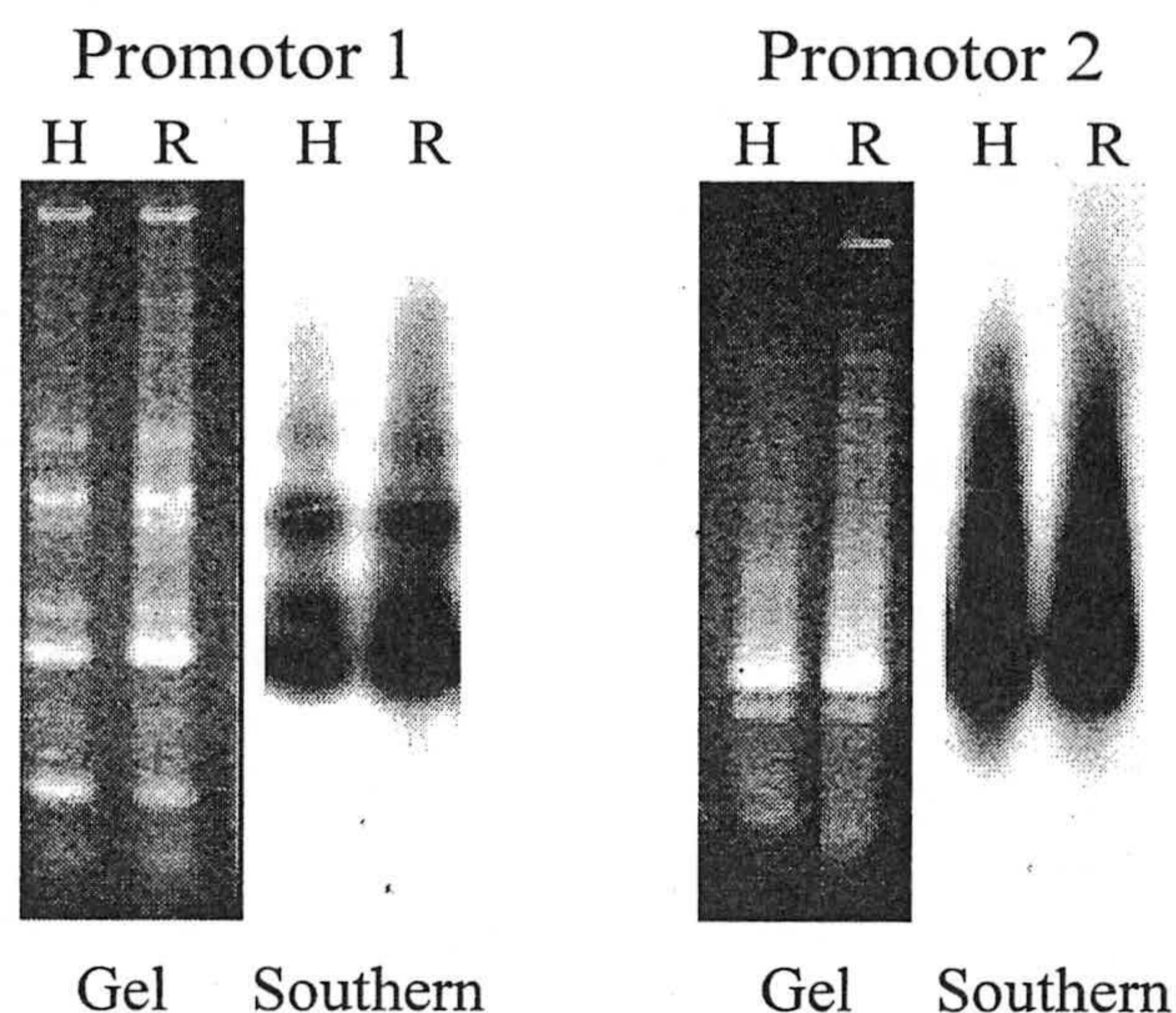


Figura 4.9. Separación electroforética y southern-blots de los fragmentos amplificados por PCR correspondientes a los extremos 5' de las isoformas de mRNA de la piruvato carboxilasa. El experimento se realizó tal como se indica en la figura 4.4.

Todas las bandas que dieron señales positivas se cortaron del gel y se eluyeron utilizando el kit GFXTM PCR DNA and gel band purification kit de Amersham. Las distintas bandas purificadas se clonaron en el vector pGEM-T que aprovecha la adición de una adenina inespecífica en el extremo 5' de los fragmentos amplificados por la Taq polimerasa. Los fragmentos clonados fueron secuenciados tal como se describe en el apartado 2.?? utilizando oligonucleótidos universales Sp6, M13 reverso o T7.

Las secuencias obtenidas para cada fragmento se compararon con la secuencia descrita para la piruvato carboxilasa de rata y se pudo concluir que los resultados eran congruentes con la existencia de al menos seis isoformas de mRNA, tres correspondientes a cada promotor. Además, se encontraron bandas con diferente migración electroforética y, sin embargo, la misma secuencia, lo que indica la existencia de fuertes estructuras secundarias que pueden tener influencia bien en la estabilidad de los mRNAs o en su capacidad para ser traducidos. Las distintas isoformas encontradas correspondían a las esquematizadas en la figura 4.10 que serán abreviadas a lo largo del trabajo como 1C, 1M, 1L, 2C, 2M y 2L, nomenclatura que corresponde a corta, media y larga de los promotores 1 y 2 respectivamente.

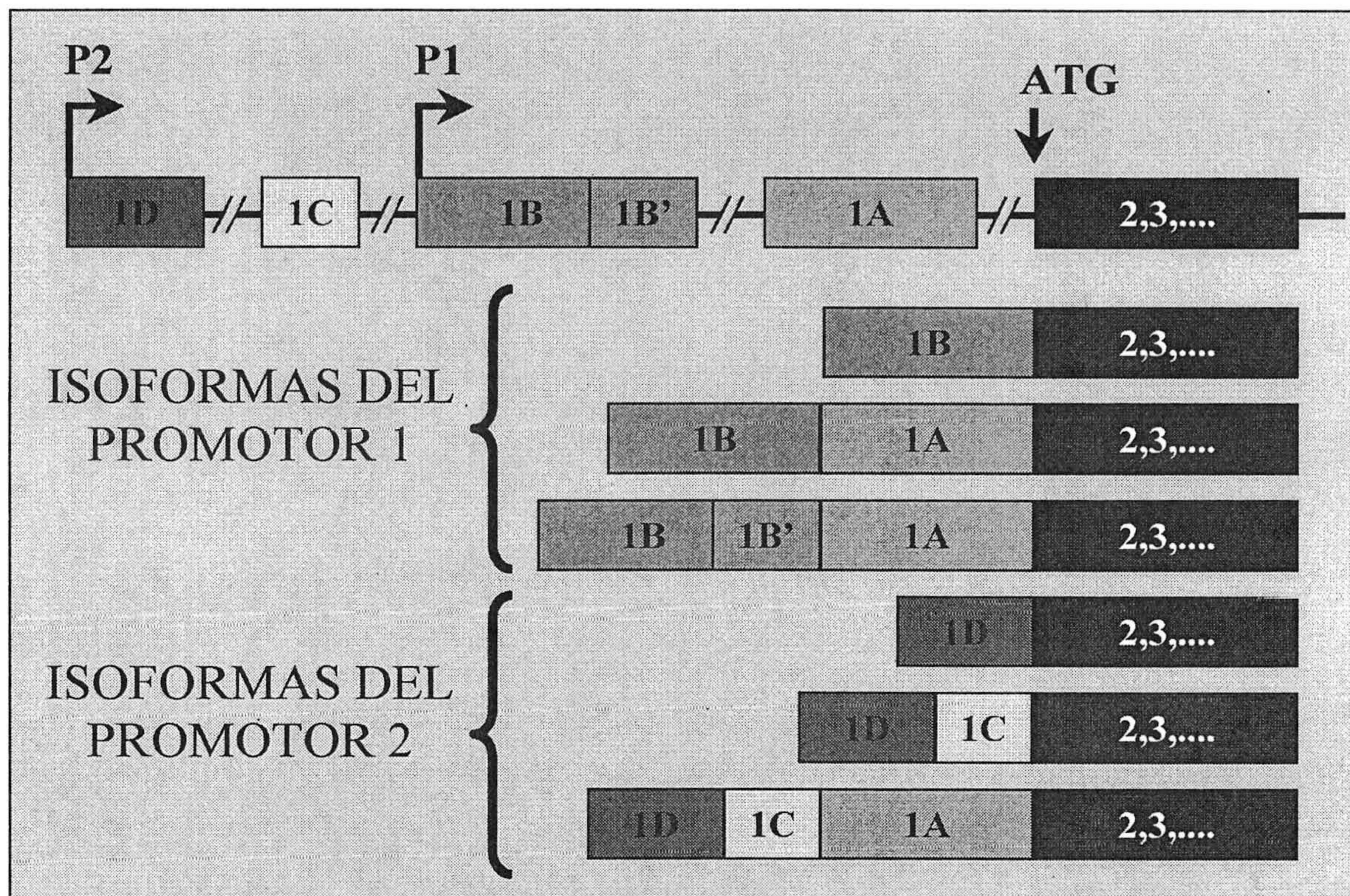


Figura 4.10. Esquema de las isoformas correspondientes al extremo 5' de la piruvato carboxilasa encontradas tras la secuenciación de los fragmentos mostrados en la figura 4.5. Están dibujadas de arriba hacia abajo por orden de tamaño las isoformas 1C, 1M, 1L, 2C, 2M y 2L.

Debido a que no existe concordancia total entre nuestros resultados y los publicados (Wallace , ¿????), se realizaron experimentos de PCR utilizando una combinatoria de oligonucleótidos para confirmar la expresión de las bandas que habíamos encontrado y excluir la existencia de otras. Las diferentes reacciones que se realizaron están esquematizadas en la figura 4.11.

Estos experimentos confirmaron nuestros resultados previos. Como puede observarse en la figura 4.10 no se obtuvo ninguna amplificación con las parejas de oligonucleótidos 1C-s-1, 1B-as-1 o 1D-s-1, 1B-as-1 demostrándose que no existen isoformas en las que se combinen los exones 1C o 1D con el exón 1B.

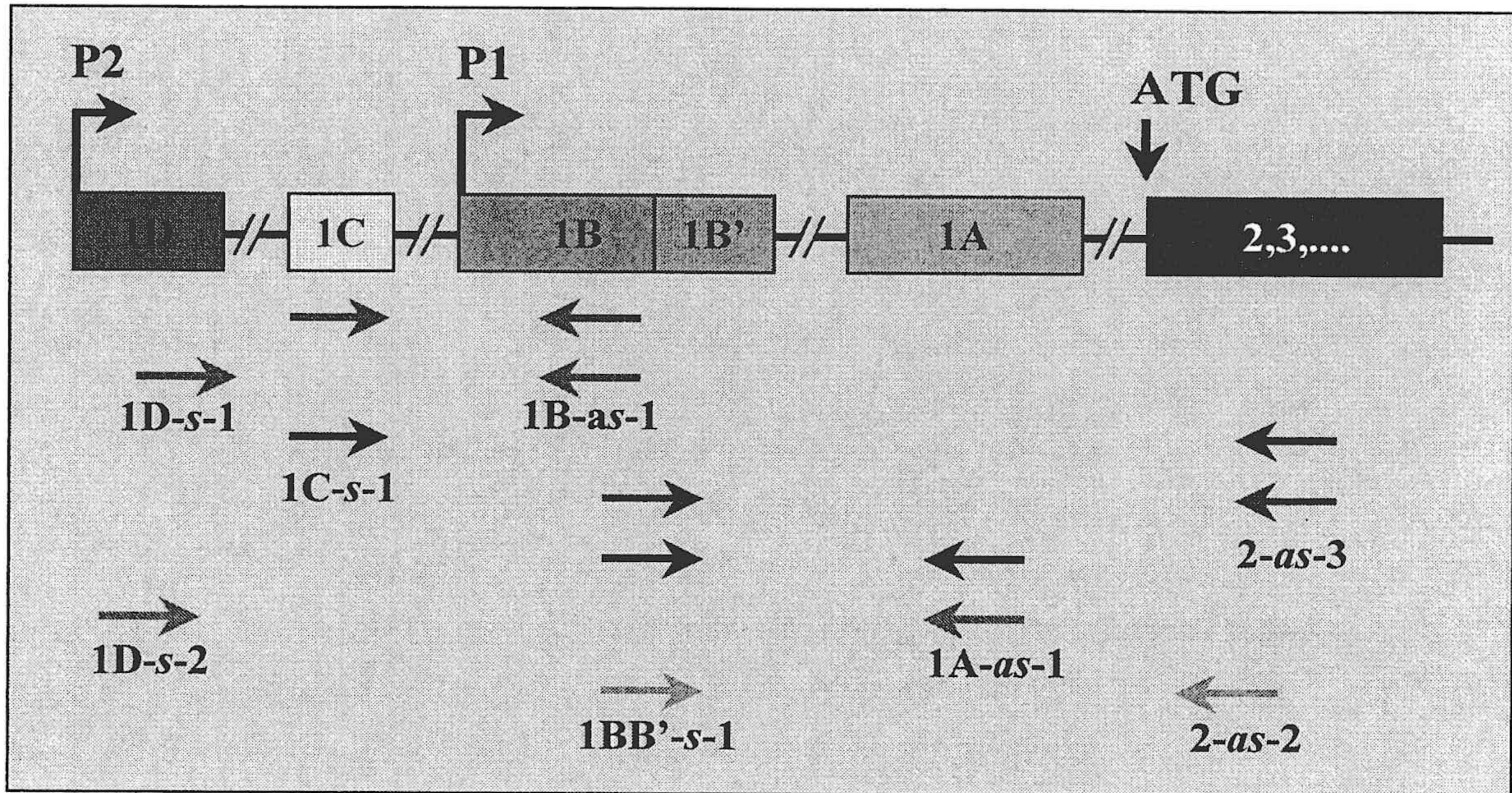


Figura 4.11. Combinatoria de oligonucleótidos para confirmar las isoformas de mRNA de la piruvato carboxilasa. Cada pareja de oligonucleótidos utilizada está dibujada en un color diferente. Se empleó como DNA molde el resultado de una reacción de retrotranscripción de RNA, obtenido de hígado o de riñón de rata, con el oligonucleótido 2,3-as-1.

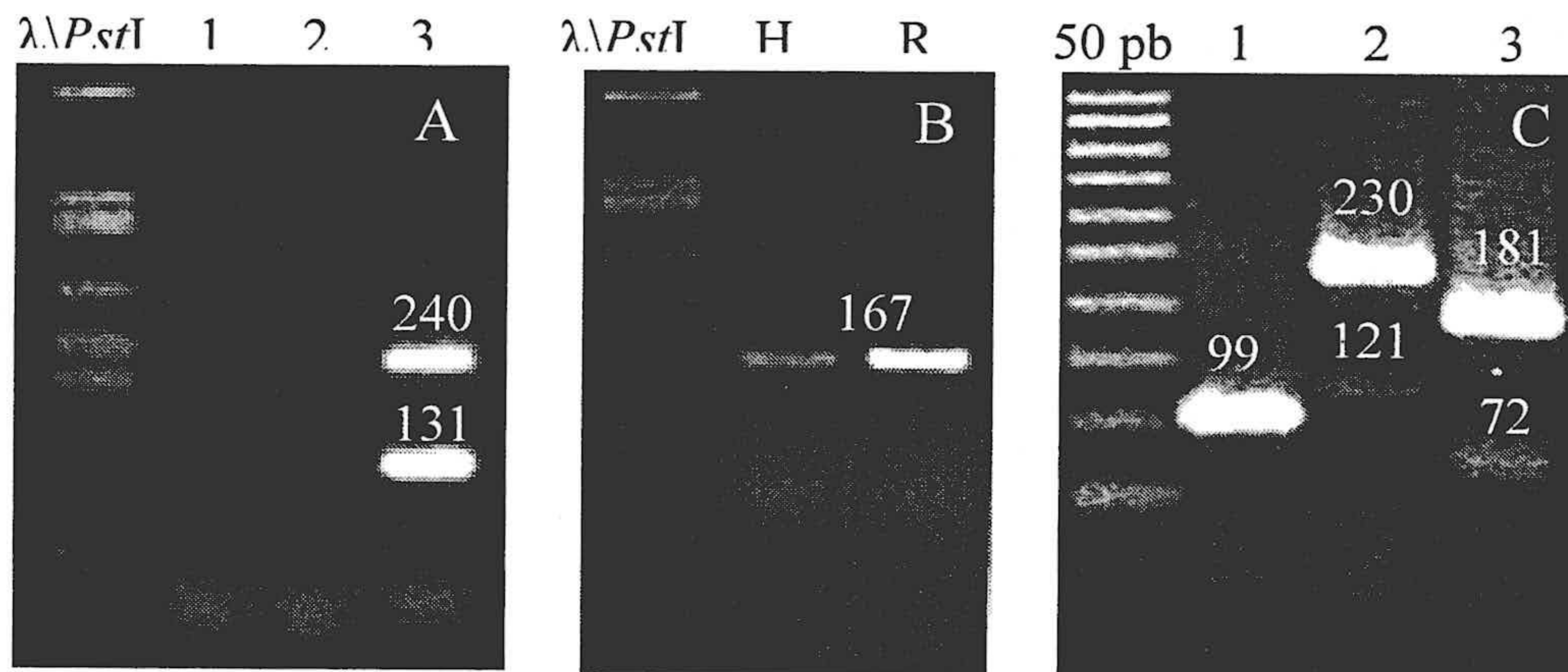


Figura 4.12. Resultados de la amplificación por PCR de retrotranscritos de hígado o de riñón de rata con diferentes parejas de oligonucleótidos. En el gel A se cargaron muestras de riñón amplificadas con las parejas de oligonucleótidos 1C-s-1 y 1B-as-1 en la calle 1, 1D-s-2 y 1B-as-1 en la calle 2, 1C-s-1 y 2-as-3 en la calle 3. En el gel B se cargaron muestras de Hígado (H) o de Riñón (R) amplificadas con los oligonucleótidos 1D-s-2 y 1A-as-1. En el gel C se cargaron muestras de hígado amplificadas con los oligonucleótidos 1BB'-s-1 y 1A-as-1 en la calle 1, 1BB'-s-1 y 2-as-3 en la calle 2, 1BB'-s-1 y 2-as-2 en la calle 3. El tamaño de las bandas amplificadas, calculado a partir de los datos de secuencia está indicado en pares de bases.

Sin embargo, cuando se realizó una reacción de PCR con los oligonucleótidos 1D-s-2 y 1A-as-1 se obtuvo una banda clara, del tamaño previsto, con retrotranscritos de hígado o de riñón de rata, con lo que se demostró la existencia de un ajuste diferencial que incluye el exón 1D correspondiente al promotor 2 con el exón 1A que está dispuesto en el gen en posición 3' respecto al promotor 1. La reacción de PCR con los oligonucleótidos 1C-s-1 y 2-as-3 rindió dos bandas que se corresponden con las isoformas 1M y 1L.

Para confirmar la ausencia de una isoforma descrita por Wallace *et al.*, 19?? que incluiría los exones 1B-1B'-2-3-... se hicieron reacciones de PCR con el oligonucleótido 1bb'-s-1 (gel 3). La amplificación por PCR con los oligonucleótidos 1BB'-s-1 y 1A-as-1 produjo una única banda que coincide en tamaño para el esperado de la isoforma 1L. Sin embargo, la amplificación con el oligonucleótido 1BB'-s-1 y 2-as-3 o 2-as-2 produjo, en ambos casos, la amplificación de una banda mayoritaria, nuevamente correspondiente a la isoforma 1L, pero también amplificaba una banda que aunque muy minoritaria se detectaba claramente y correspondía en tamaño a la isoforma decrita por Wallace y que nosotros no habíamos encontrado previamente. No obstante, al ser una isoforma aparentemente minoritaria no se clonó y no se consideró a lo largo de este trabajo.

IV.2. Papel de los diferentes 5'-UTRs en la expresión génica

La existencia de mRNAs de la piruvato carboxilasa que únicamente difieren en su extremo 5' y que codifican a una única isoforma de la proteína, solo puede explicarse si los extremos 5'-UTR tienen importancia reguladora "*in vivo*" en cuanto a la estabilidad de los mRNAs o en la tasa de traducción de la proteína. Para tratar de dilucidar estos aspectos se clonaron, en fase de lectura, todas las isoformas en un vector que codifica a la proteína fluorescente verde, que puede ser expresada en células transfectadas en cultivo.

IV.2.1. Construcciones moleculares

IV.2.1.1. Clonación de las isoformas 5'-UTR de ambos promotores

Todas las isoformas del promotor 1 que habíamos clonado y secuenciado tenían en su extremo 5' el oligonucleótido 1B-s-2, que hibrida en la posición -99 del exón 1B. Para clonar la secuencia completa se diseñaron los oligonucleótidos 1B-as-1 y 1B-s-4 con los que se realizó un PCR a partir de una muestra de cDNA de riñón obtenida por retrotranscripción con el oligonucleótido 2,3-as-1, con lo que se obtuvo una banda corta de 91 pares de bases correspondientes al extremo 5' del exón 1B con la excepción de dos nucleótidos.

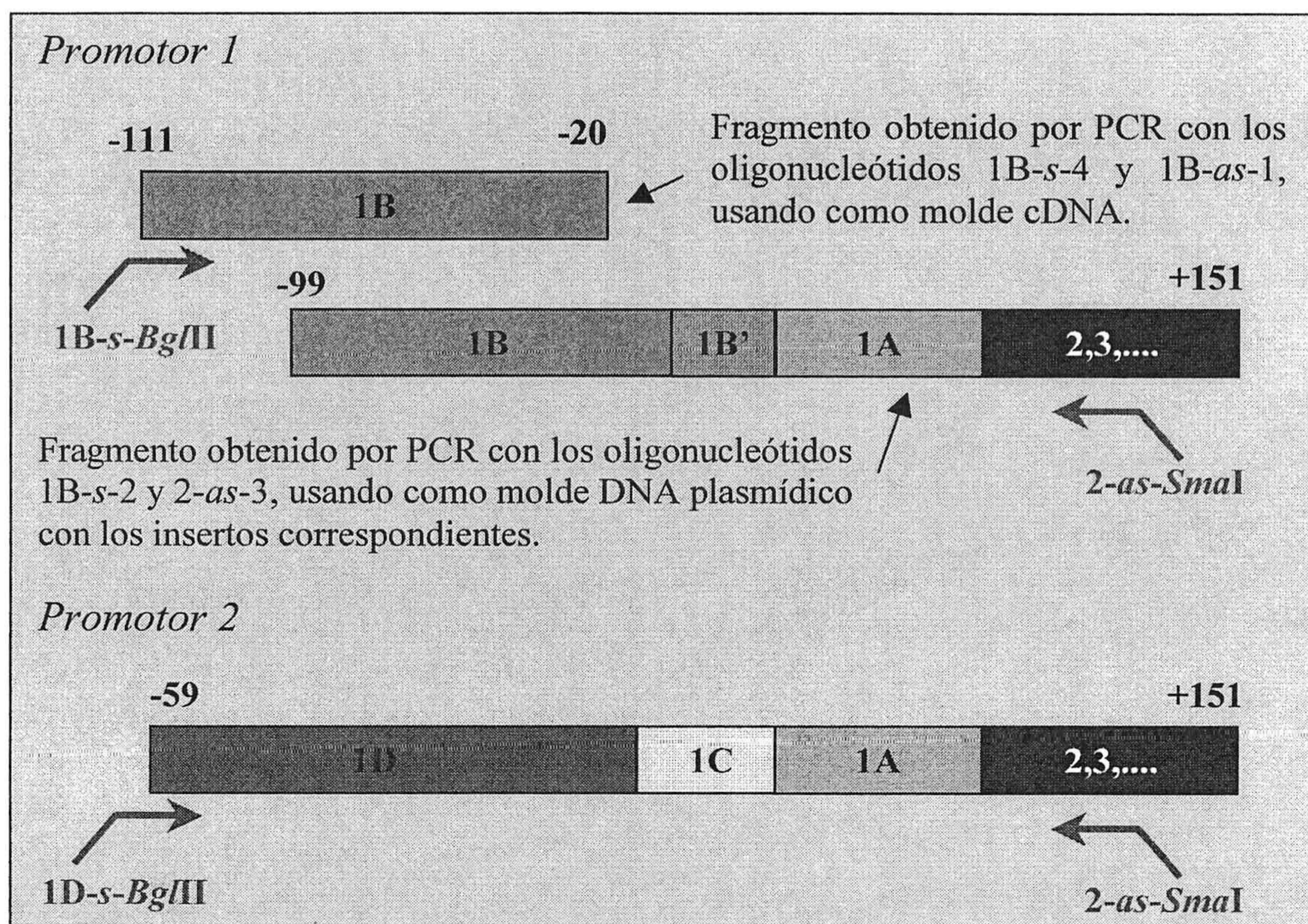


Figura 4.13. Estrategia para obtener clones que incluyan la secuencia completa de las isoformas del mRNA derivadas de la transcripción de los promotores 1 y 2. El tamaño de los exones no está proporcionado habiéndose magnificado los exones 1B y 1D. Se han representado sólo las isoformas 1L y 2L.

Por otra parte, con cada uno de los clones correspondientes al promotor P1 se hicieron reacciones de PCR con los oligonucleótidos 1B-s-2 y 2-as-3 para obtener las correspondientes bandas de cDNA. Estas bandas se combinaron independientemente con el extremo 5' del exón 1B y se añadieron nuevos oligonucleótidos, 1B-s-BglII y 2-as-sma-I para una nueva reacción de PCR que rindiera los exones completos y que además incluyera en sus extremos sitios de corte para la subclonación en otros vectores. La unión por PCR de los dos fragmentos es posible por el solapamiento de 79 pares de bases que corresponden precisamente al exón 1B. Durante los primeros cinco ciclos la temperatura de hibridación fue de 54 °C y en los 30 ciclos siguientes fue de 69 °C. El esquema de esta estrategia experimental para la isoforma de mayor tamaño se muestra en la figura 4.13 y los resultados experimentales en la figura 4.14.

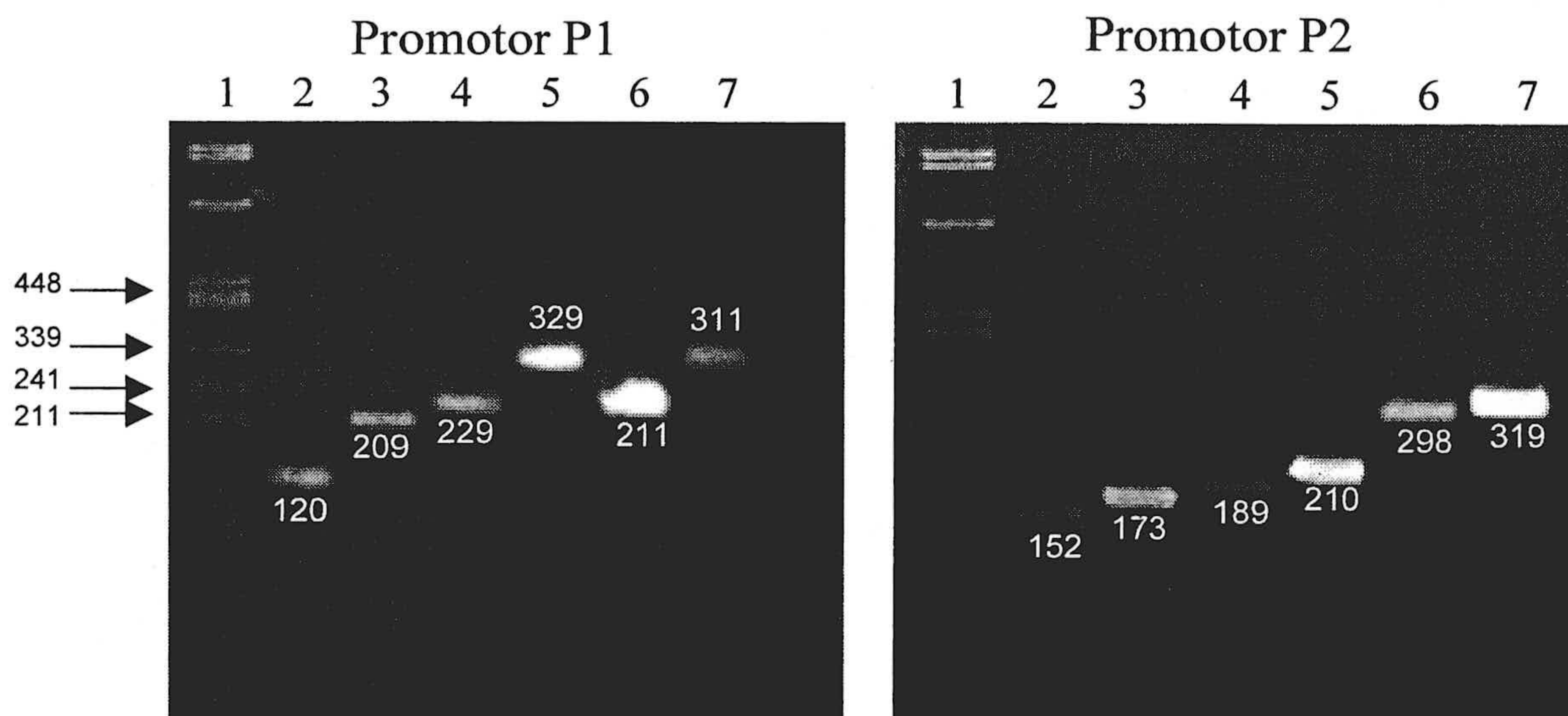


Figura 4.14. Separación electroforética del DNA obtenido por PCR para obtener las distintas isoformas de mRNA con la secuencia completa de los exones. En la calle 1 de cada gel se cargó λ /PstI como marcador de tamaño. En las calles 2 y 3, 4 y 5, 6 y 7 del gel correspondiente al promotor 1 se cargaron respectivamente el DNA incompleto y el DNA completo correspondiente a las isoformas 1C, 1L y 1M. En las calles 2 y 3, 4 y 5, 6 y 7 del gel correspondiente al promotor 2 se cargaron respectivamente el DNA incompleto y el DNA completo correspondiente a las isoformas 2C, 2M y 2L. El tamaño de cada banda, calculado a partir de los datos de secuencia, está indicado.

El oligonucleótido que se había diseñado para el estudio del promotor 2 (1D-s-2) se alinea desde la posición -59 del exón 1D a sólo 7 nucleótidos del extremo 5' de este exón. Por tanto para incrementar el tamaño de los insertos, ya clonados, hasta la longitud total del exón se diseñó un oligonucleótido, 1D-s-BgIII, con la secuencia completa desde el extremo 5' y que además incluía un sitio de restricción BgIII para facilitar la subclonación. Con este oligonucleótido y su pareja 2-as-SmaI se realizaron reacciones de PCR con cada uno de los fragmentos clonados durante 35 ciclos a una temperatura de hibridación de 69 °C. El esquema de este diseño y una fotografía de los resultados experimentales se muestran en las figuras 4.13 y 4.14 respectivamente.

Todos los fragmentos amplificados correspondientes a las isoformas completas de los extremos 5'-UTR de los promotores 1 y 2 se clonaron en los vectores pGEM-T o en pST-Blue, que poseen timinas desapareadas en ambas hebras, por lo que la clonación de productos de PCR es muy fácil. Cada una de las isoformas incluye además un fragmento

común de 91 pares de bases del exón 2, debido a que la amplificación se ha realizado desde el oligonucleótido 2-*as*-SmaI.

Para comprobar la clonación se digirió el DNA plasmídico aislado de los diferentes clones con Apa I y con Pst I, enzimas para las que existen sitios únicos de restricción situados cada uno en un lado del lugar de clonación en el vector y que no cortan a ninguno de los insertos. En la figura 4.15 se muestran los resultados de esta comprobación.

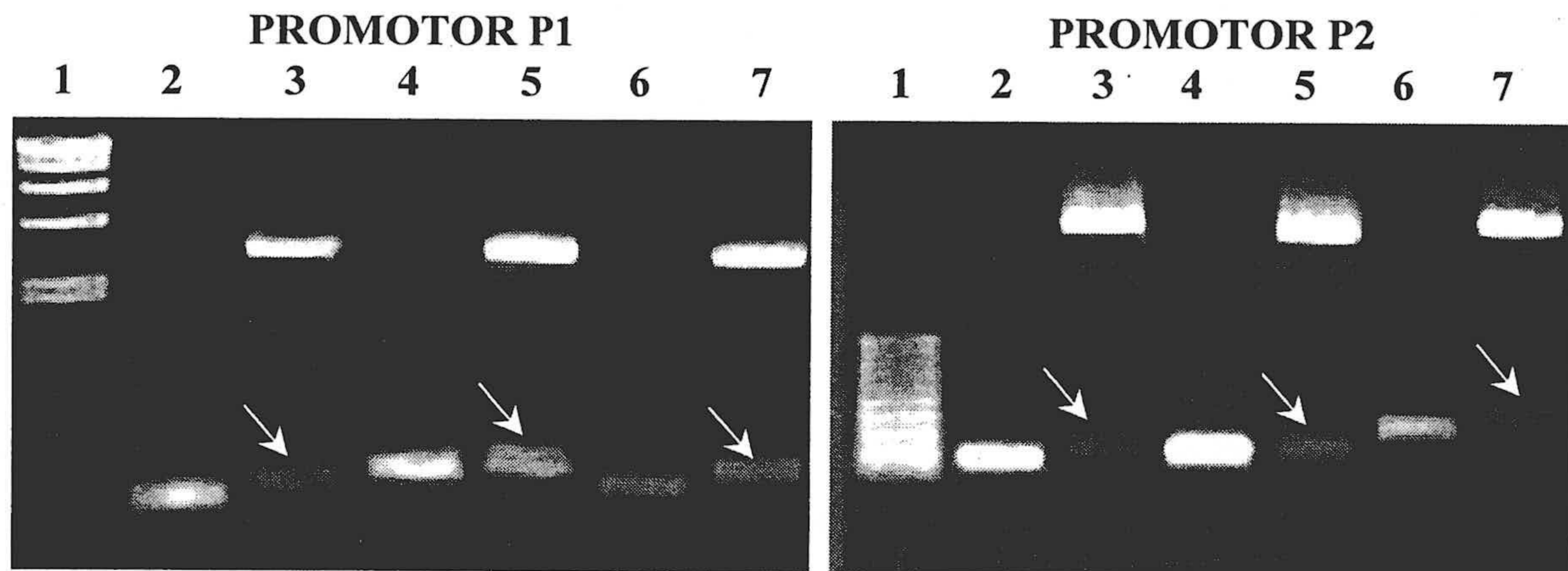


Figura 4.15. Comprobación de la clonación en pGEM-T. En las calles 1 de cada gel se corrieron marcadores de peso molecular λ Hind III o de 100 pb. En las calles 2, 4 y 6 se corrieron fragmentos amplificados por PCR de las isoformas corta, media y larga de cada promotor. En las calles 3, 5 y 7 se corrieron digestiones dobles del DNA plasmídico de los diferentes clones con ApaI y PstI2. Las flechas blancas indican las bandas escindidas de cada vector.

IV.2.1.2. Inserción de las isoformas 5'-UTR en el vector pEGFP-N2

El vector de expresión pEGFP-N2 contiene un promotor muy potente de citomegalovirus corriente arriba del sitio de clonación en el que existen sitios de restricción únicos BglII y SmaI. La digestión doble del vector con ambas enzimas produce una estructura abierta con los extremos orientados para la clonación adecuada de las distintas isoformas.

La transcripción a partir del promotor de citomegalovirus produce un RNA que en su extremo 5' incluye los fragmentos clonados y a continuación el mRNA de la proteína fluorescente verde seguido de una cola de poli-A. La clonación en fase de lectura de los fragmentos 5'-UTR y de parte del exón 2 de la piruvato carboxilasa debe permitir, por

tanto, la traducción de una proteína de fusión que consiste básicamente en la secuencia de importación a la mitocondria de la piruvato carboxilasa unida a la proteína verde. Este tipo de construcciones puede permitir el estudio de la influencia de los extremos 5' no traducibles del mRNA de la piruvato carboxilasa sobre la estabilidad de los mRNAs y sobre su tasa de traducción.

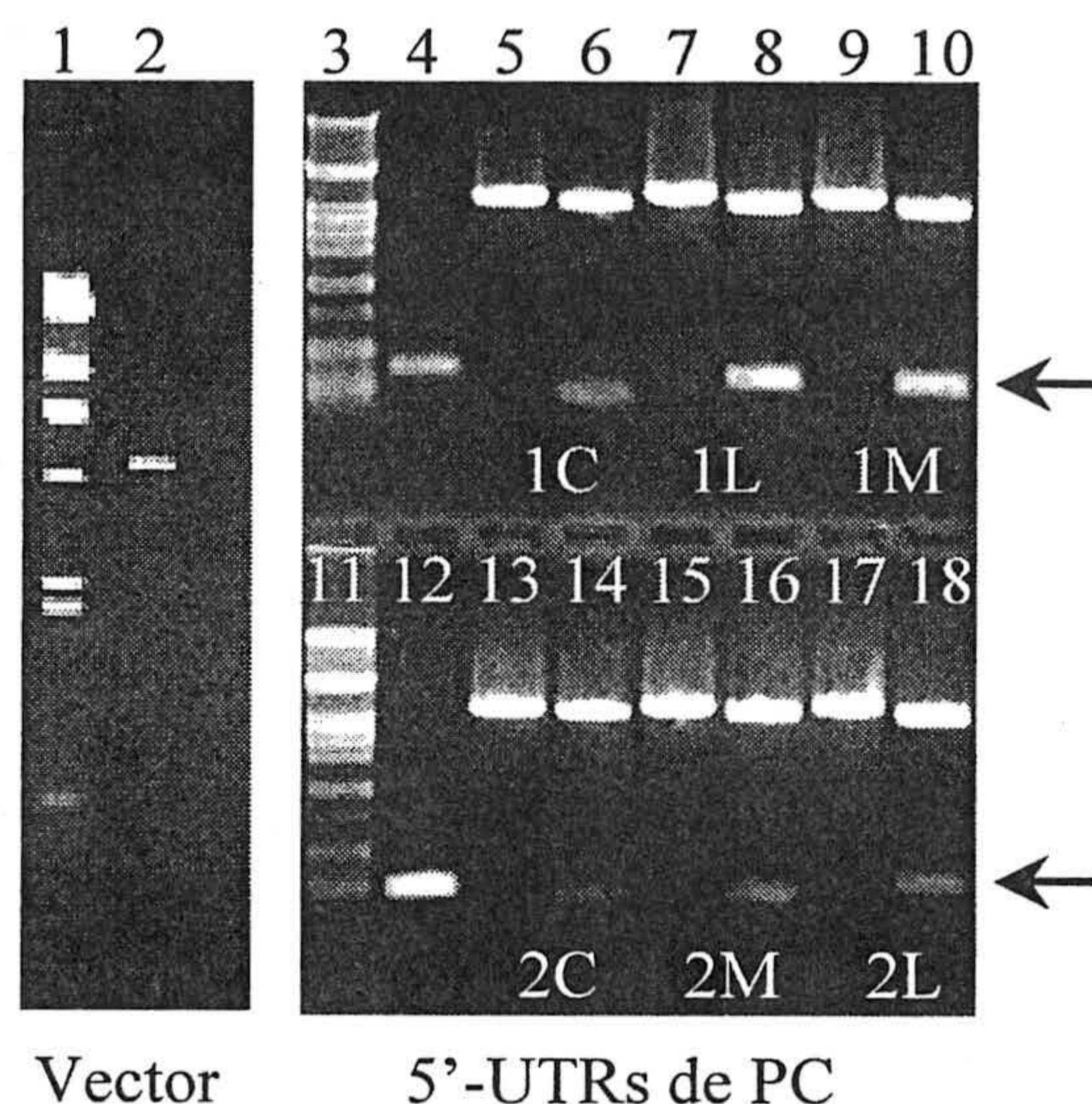


Figura 4.16. Preparación del vector pEGF-N2 y de los 5'-UTRs de la piruvato carboxilasa para su clonación. Las calles 1, 3 y 11 muestran marcadores de tamaño, λ /HindIII en la 1 y λ /PstI en las calles 3 y 11. La calle 2 es p-EGF-N2 digerido con BglII y SmaI. La calle 4 es la isoforma 1L y la calle 12 es la isoforma 2M obtenidas por PCR de sus respectivos clones en pGEM-T. Las calles 5, 7 y 9 muestran digestiones con SmaI de los clones en pGEM-T de las isoformas 1C, 1L y 1M y las calles 13, 15 y 17 de las isoformas 2C, 2M y 2L. En las calles 6, 8, 10, 14, 16 y 18 se muestran las digestiones dobles con BglII y SmaI de los mismos plásmidos. Los insertos escindidos se marcan con una flecha.

El vector pEGFP-N2 y los clones en pGEM-T con las isoformas insertadas se digirieron con BglII. Los productos de la digestión se pasaron por una columna ¿?? para eliminar las sales y después se procedió a la digestión con SmaI en condiciones óptimas. Los resultados se muestran en la figura 4.16. El vector digerido y los fragmentos de los extremos 5'UTR conteniendo 92 pares de bases del exón 2 se purificaron y se incubaron con DNA ligasa. Tras la transformación correspondiente de *E. coli* cepa ¿???? se seleccionaron los clones positivos y se comprobó la clonación por escisión de los insertos por digestión doble con BglII y Sma I (figura 4.17). Tras la comprobación, se secuenciaron los diferentes insertos para eliminar la posibilidad de que en las reacciones de PCR se

hubieran incorporado mutaciones no deseadas. Tras todo ello se prepararon plásmidos purificados para la transfección de células eucariotas.

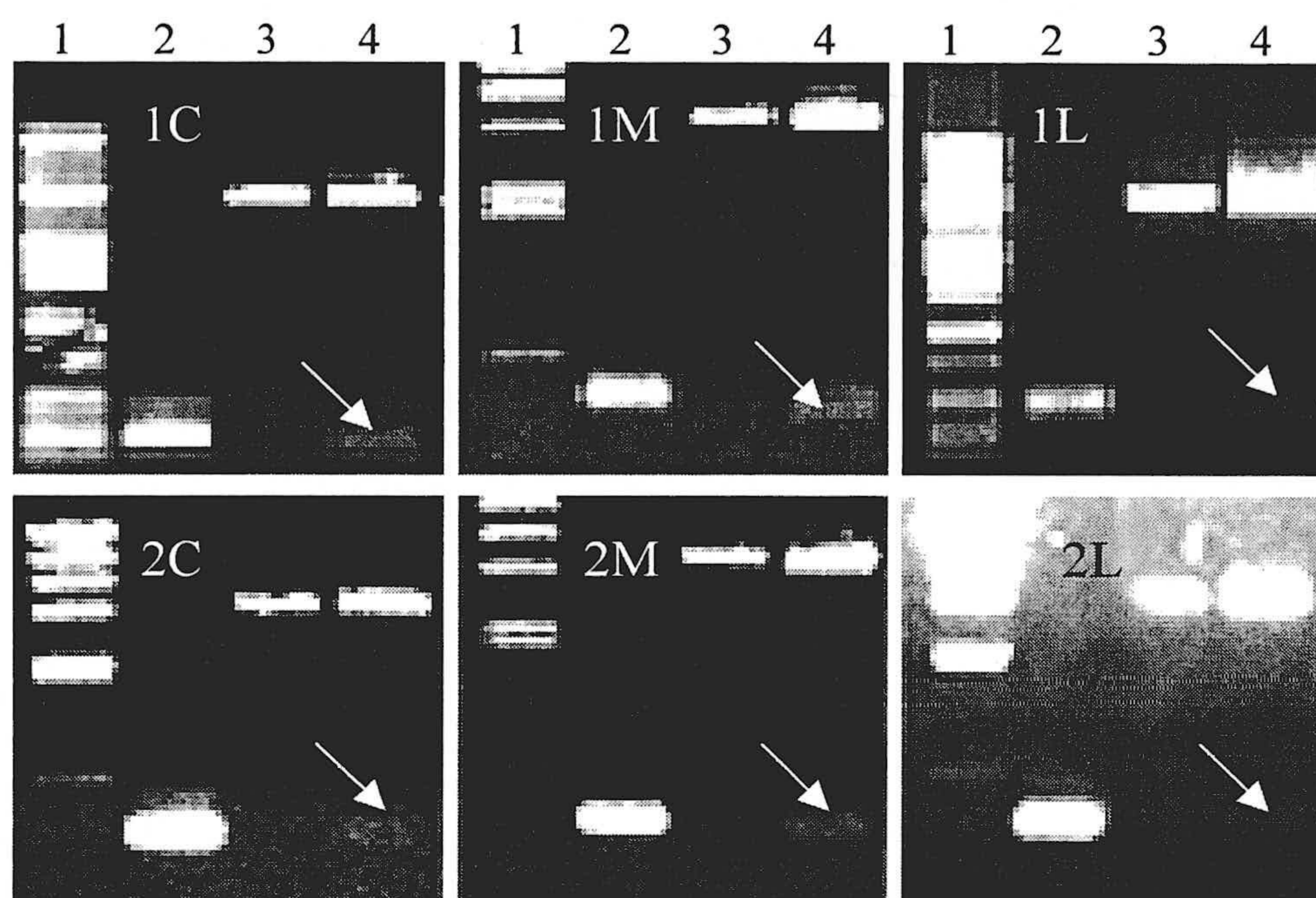


Figura 4.17. *Comprobación de la clonación de las isoformas del mRNA de la piruvato carboxilasa en pEGFP-N2. El DNA plasmídico clonado se amplificó por PCR y se separó en la calle 2 de cada construcción. Las calles número tres muestran los plásmidos linealizados por digestión con SmaI. En la calle 4 se muestran digestiones dobles de los plásmidos con SmaI y con BglII. Los insertos que se separan están indicados con una flecha.*

IV.2.2. Efecto de los 5'-UTRs de la piruvato carboxilasa sobre la expresión de la proteína fluorescente verde

El exón 2 de la piruvato carboxilasa comienza en el ATG que constituye el inicio de la traducción y contiene por tanto la secuencia señal para la importación a la mitocondria. Para estudiar, por tanto, el papel de los diferentes 5'-UTRs de la piruvato carboxilasa en la expresión de la proteína se clonaron, en fase de lectura con el gen de la proteína fluorescente verde, cada uno de los extremos 5' del mRNA junto a los primeros 91 pares de bases del exón 2. Estas construcciones deben permitir la expresión de la proteína verde que debe localizarse intramitocondrialmente

IV.2.2.1. Cultivo, transfección y selección de células hepáticas C9.

La línea celular de hígado de rata C9 (clone 9) (Una referencia de Pepe) fue proporcionada por el Prof. Cuezva libre de contaminación por micoplasmas. El método de cultivo se indica en la sección correspondiente de Material y Métodos.

Cultivos celulares entre el 70 y el 80 % de confluencia fueron transfectados con el plásmido pEGFP-N2 y con las diferentes construcciones de los 5'-UTRs de la piruvato carboxilasa. Para ello se empleó lipofectamina siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. Al día siguiente de la transfección se eliminó el medio y se añadió medio de cultivo normal. Tras 24 horas las células se sembraron diluidas en placas nuevas a las que se añadió medio de selección que incluía el antibiótico Geneticina a una concentración de 500 µg / ml. Cuando las células alcanzaron la confluencia en cada placa se sembraron a una dilución 1/10 y se mantuvo el cultivo en presencia del antibiótico. En este estado las células se utilizaron para los diferentes experimentos.

IV.2.2.2. Localización subcelular de la proteína fluorescente verde

Células transfectadas con el plásmido pEGFP-N2 expresan la proteína fluorescente verde que se aprecia localizada en todo el citoplasma y especialmente concentrada en el núcleo celular, cuando se observan las células con un microscopio de fluorescencia y son excitadas con luz ultravioleta cercana (figura 4.18).

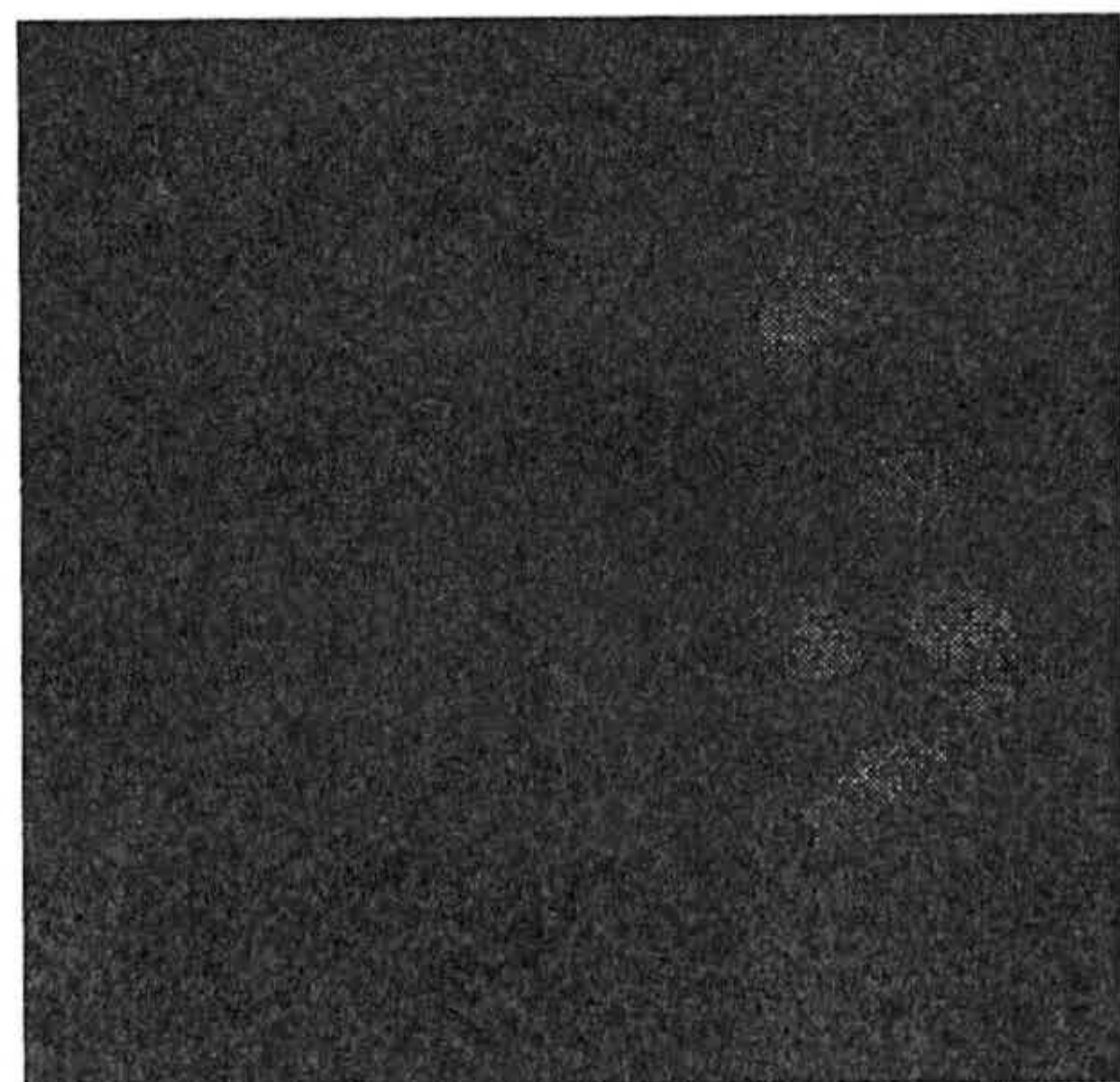


Figura 4.18. Localización nuclear de la proteína fluorescente verde en células C9 transfectadas con el plásmido pEGFP-N2.

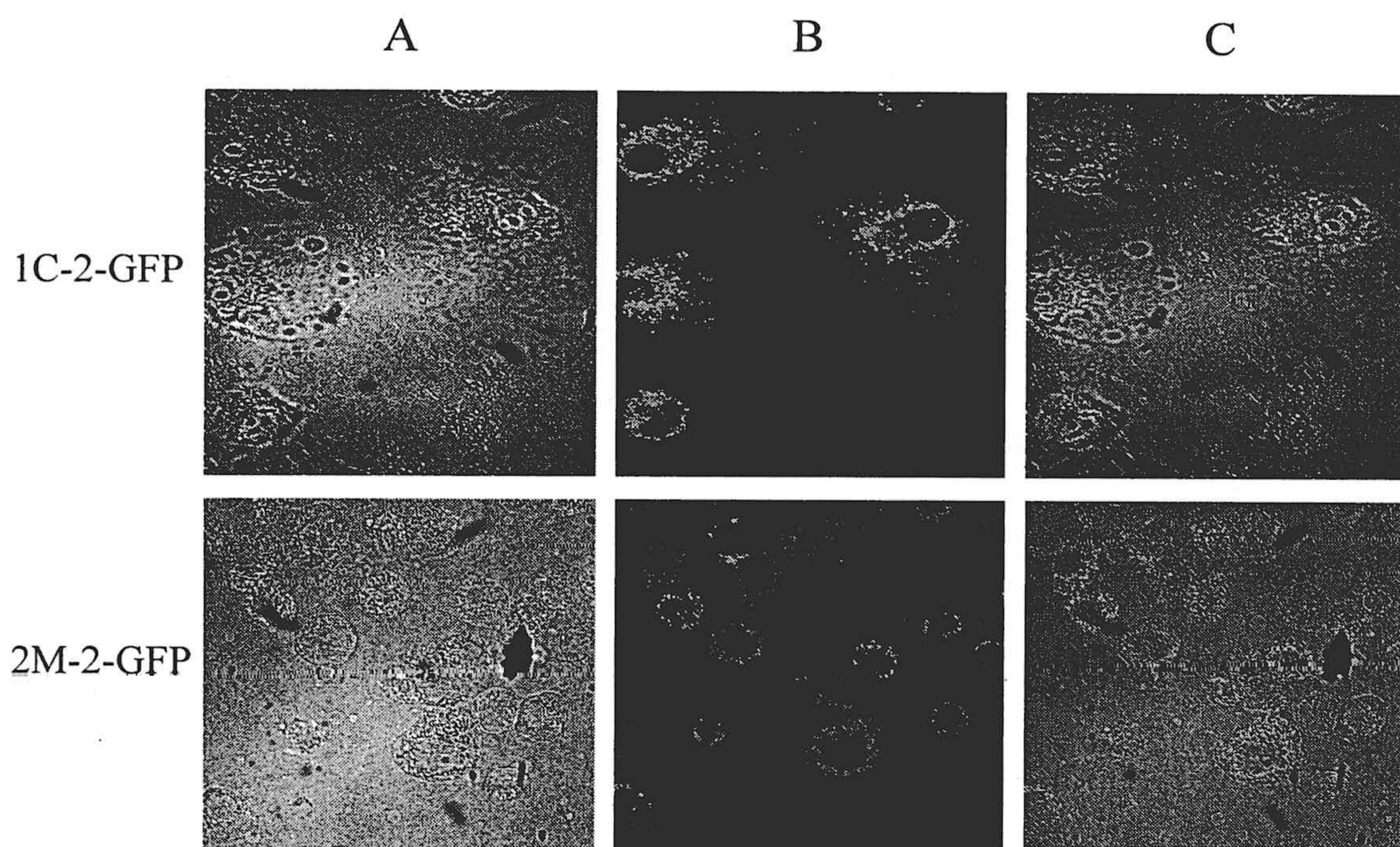


Figura 4.19. Localización subcelular de la proteína fluorescente verde. Se muestra una preparación de células transfectadas con el vector pEGFP-N2 control y una preparación de células transfectadas con el vector incluyendo un inserto de cada promotor, en concreto la isoforma 1C y la isoforma 2M. Los paneles A muestran fotografías con microscopía óptica de las células, los paneles B muestran fotografías con microscopía de fluorescencia y en los paneles C se han superpuesto ambas imágenes.

Cuando las células se transfectaron con el plásmido pEGFP-N2 al que se le habían insertado cualquiera de las isoformas 5'-UTR de la piruvato carboxilasa y el exón común 2 expresaron la proteína fluorescente verde como una proteína de fusión que al incluir la secuencia de importación a la mitocondria, se dirige a estos orgánulos. En la figura 4.19 se muestran células transfectadas con isoformas de cada uno de los dos promotores que han sido fotografiadas con luz visible y con luz ultravioleta. Posteriormente se ha hecho un montaje de ambas fotografías y se observa que el exón 2 independientemente de que el 5'UTR corresponda a cualquiera de los dos promotores hace que la proteína fluorescente verde se sitúe en la célula en posición perinuclear, coincidente con la disposición de las mitocondrias.

Para corroborar el destino mitocondrial de la proteína fluorescente verde en nuestro sistema se empleó rodamina-B. Este compuesto es activamente importado a mitocondrias

energizadas, mientras que queda difuso en el citoplasma en el caso de células que no tengan una cadena de transporte de electrones funcional.

En la figura 4.20 se muestra una preparación de células en una placa de cultivo a las que se añadió rodamina-B como marcador mitocondrial, a una concentración de $x \mu\text{g/ml}$, fotografiadas en un microscopio de fluorescencia invertido a 400x, con luz visible y con luz ultravioleta y un filtro para rodamina. Puede observarse que la disposición de la rodamina es coincidente con la posición perinuclear esperada para las mitocondrias.

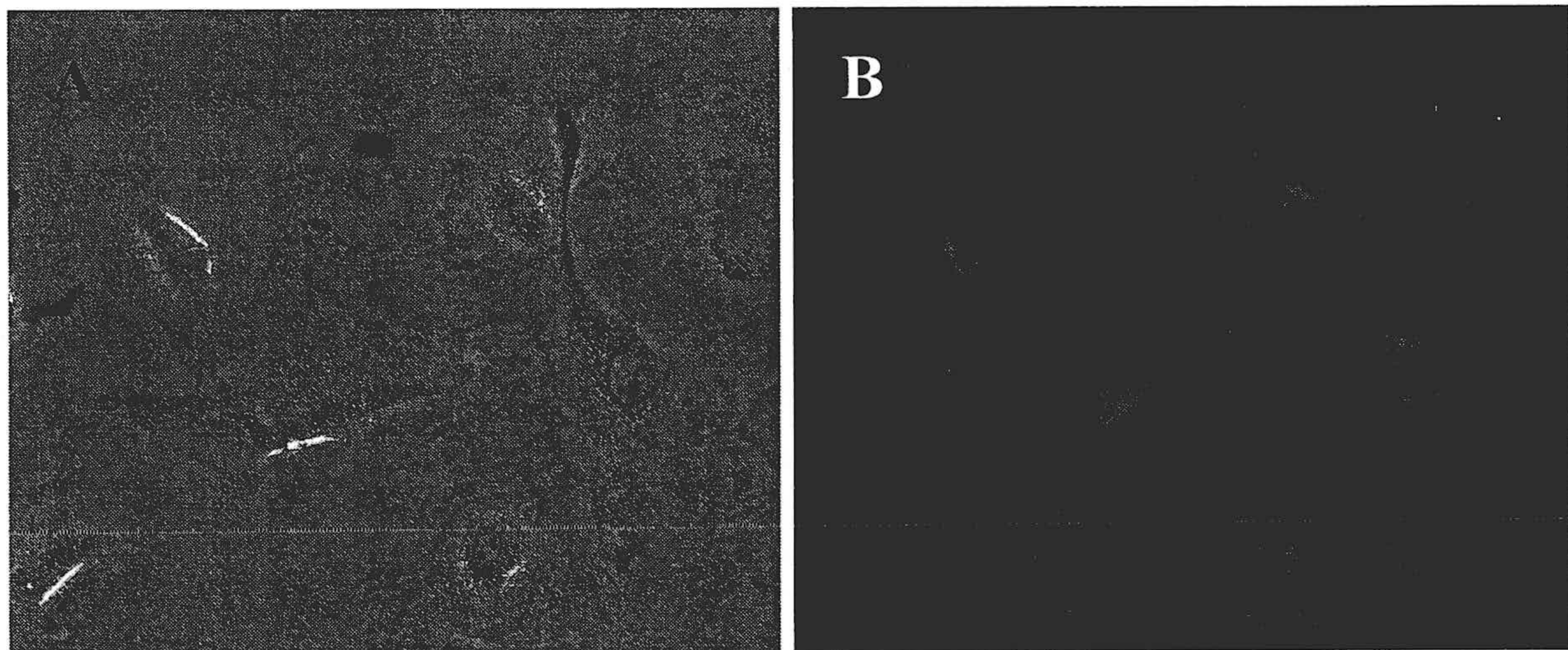


Figura 4.20. *Cultivo de células hepáticas C9 normales en presencia de rodamina-B. En el panel A se muestra una fotografía del cultivo realizada con luz visible y en el panel B se ha fotografiado el mismo campo con iluminación ultravioleta y filtro para Rodamina-B.*

Una vez demostrada la localización intramitocondrial de la rodamina se incubaron cultivos de células C9 previamente transfectadas con el plásmido pEGFP-N2 control o con construcciones incluyendo 5'-UTRs de los dos promotores y el exón común 2 de la piruvato carboxilasa. Tras la adición de rodamina-B al medio de cultivo las células fueron fotografiadas en un microscopio confocal (figura 4.21) bajo iluminación ultravioleta con filtro para fluoresceína (paneles A) y con filtro para rodamina (paneles B). La composición confocal de ambas fotografías muestra coloración amarillo-anaranjada en las zonas en que coinciden la proteína verde y la rodamina-B.

Puede observarse que en células transfectadas con el plásmido control, que no posee señal de importación a la mitocondria, la fluorescencia verde y la fluorescencia roja

quedan separadas, indicando una localización intracelular diferente para ambos marcadores.

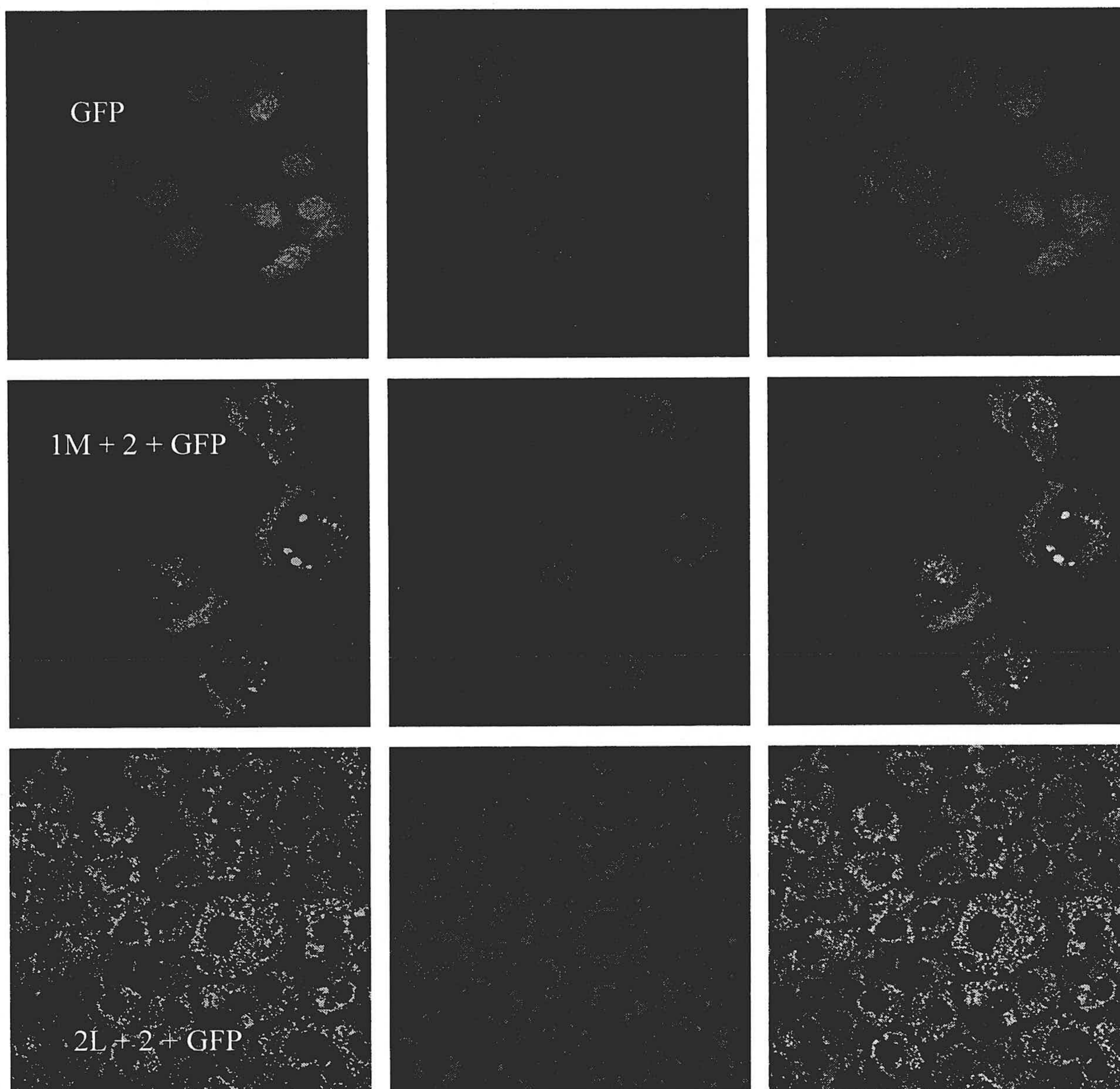


Figura 4.21. Localización mitocondrial de la proteína fluorescente verde en células transfectadas con un plásmido que contiene 5'-UTRs del promotor P1 o del promotor P2 mas el exón 2 del gen de la piruvato carboxilasa fusionado al gen de la proteína verde. Las fotografías se han realizado en un microscopio confocal con iluminación ultravioleta y filtros para UV-B (A), Rodamina (B). En la columna C se muestra la superposición de ambas imágenes.

Sin embargo en las células transfectadas con pEGFP-N2, modificado indistintamente con la inserción de fragmentos del promotor P1 o del promotor P2 seguidos del exón 2 de la piruvato carboxilasa en posición 5' del gen de la proteína verde, se observan manchas amarillas coincidentes con la distribución perinuclear de las mitocondrias, demostrándose por tanto que nuestras construcciones no sólo expresan en fase de lectura la proteína verde sino que, además, ésta es capaz de dirigirse a la mitocondria en respuesta a la señalización incluida en la construcción.

IV.2.2.3. Efecto de los 5'-UTRs de la piruvato carboxilasa sobre la intensidad de fluorescencia.

La observación por microscopía de fluorescencia de células que habían sido transfectadas con diferentes construcciones que incluían los extremos 5' de las distintas isoformas del mRNA, inmediatamente muestra que existe un efecto de estos extremos sobre el control de la expresión. La figura 4.22. muestra fotografías de placas de cultivo en las que están creciendo células C9 transfectadas con las seis isoformas distintas. Todas las fotografías están realizadas en idénticas condiciones de apertura de diafragma y tiempo de exposición para obtener una impresión que, al menos de forma cualitativa, indique el efecto de las diferentes inserciones sobre la expresión de la proteína verde.

El primer grupo de imágenes no está procesado, mientras que en el segundo grupo se ha realizado una intensificación del verde para mostrar claramente la existencia de células fluorescentes en todas las preparaciones. Es evidente que las células transfectadas con las construcciones 1C, 1L y 2C son las que fluorescen con mayor intensidad, mientras que en las demás los niveles de fluorescencia son bajos. Estos resultados son repetitivos en diferentes experimentos habiéndose realizado un mínimo de 4 transfecciones para cada construcción.

Ha sido publicado que la fluorescencia de células transfectadas con plásmidos que permiten la expresión de la proteína verde puede ser muy diferente en distintos clones (Referencia) posiblemente como consecuencia de la diferente localización intranuclear del vector determinada por su expresión como plásmido libre o por su integración en diferentes regiones cromosómicas, por lo que la selección de los plásmidos mas fluorescentes es un procedimiento habitual.

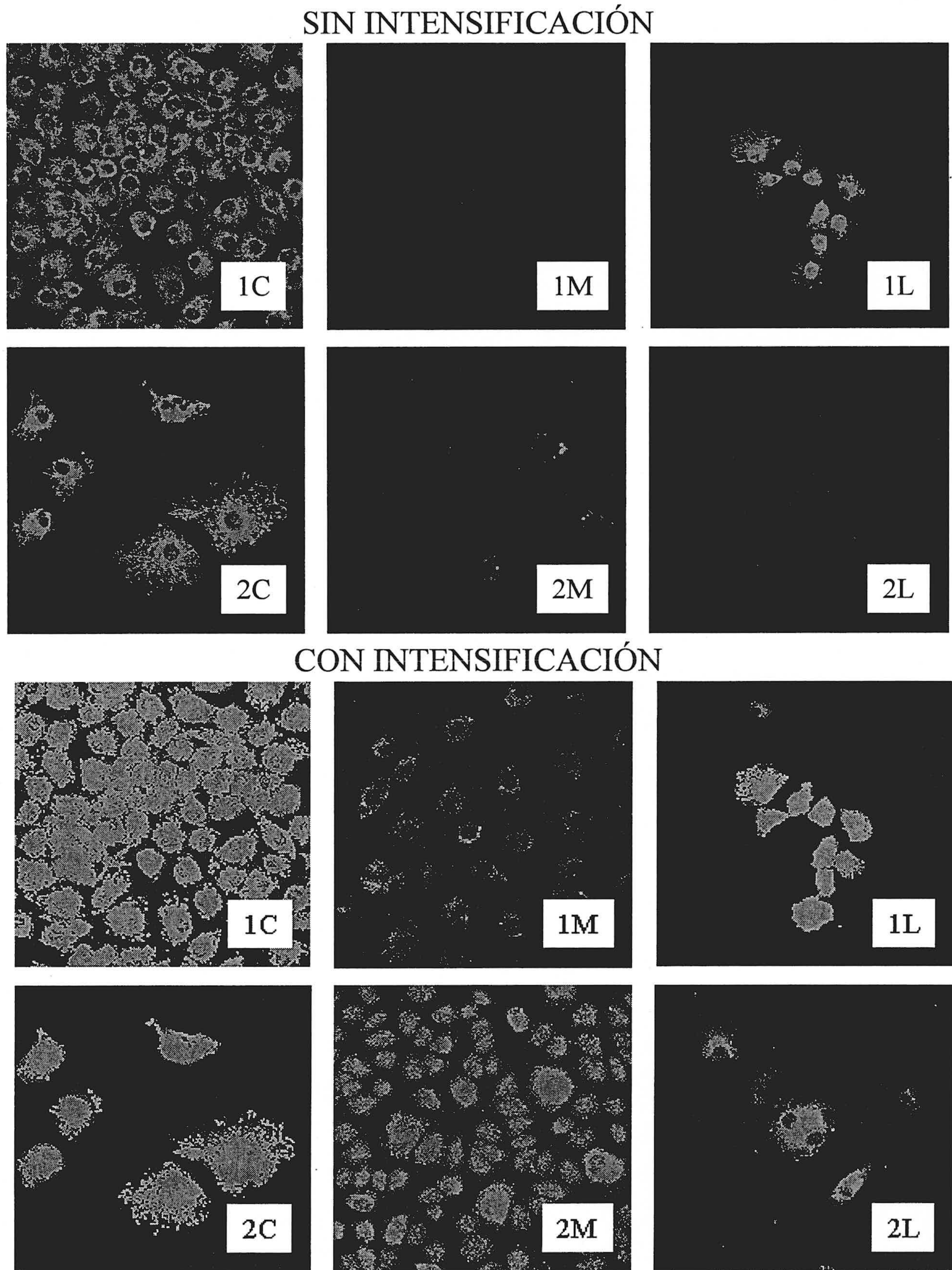


Figura 4.22. Efecto de los diferentes 5'-UTR sobre la expresión de proteína verde en células C9.

En nuestro caso, no fue necesario clonar las células con mayor índice de fluorescencia ya que de forma consistente en todas las transfecciones transitorias el comportamiento fue semejante.

Para tratar de cuantificar la diferente expresión de la proteína verde se determinó la intensidad de fluorescencia en un citómetro de flujo. Las células se despegaron de la placa de cultivo en el momento de la determinación con la disolución de tripsina-EDTA utilizada normalmente para los pases celulares e inmediatamente una suspensión de células en PBS se pasó por el citómetro. Se seleccionaron células (Figura 4.23) en función de la dispersión lateral y frontal de la luz, parámetros que indican agregaciones celulares o vesículas según que posean una dispersión frontal grande o pequeña, respectivamente.

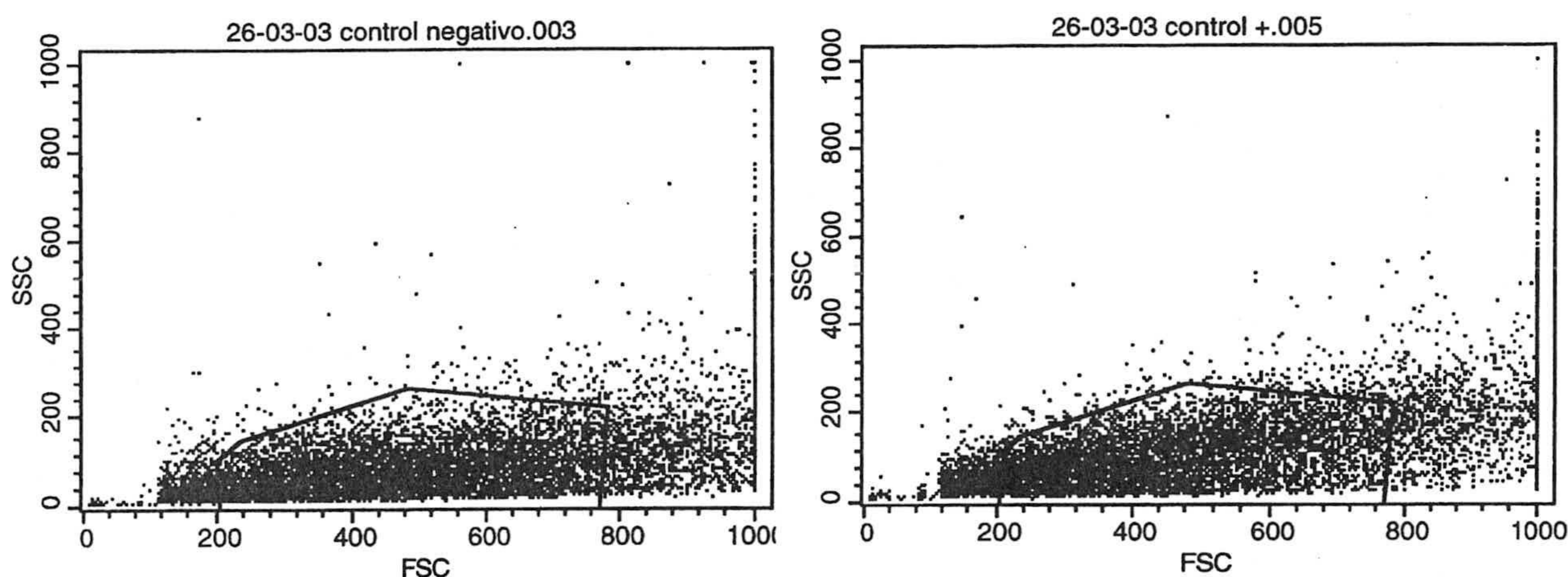


Figura 4.23. Selección de células intactas en los experimentos de citometría de flujo. En abscisas se representa la dispersión frontal de la luz (FSC) y en ordenadas la difusión lateral (SSC). Únicamente se midió fluorescencia a las células seleccionadas bajo la línea poligonal mostrada.

Las células seleccionadas recibieron un haz láser de argón y su fluorescencia verde y roja fueron determinadas. Previamente el citómetro había sido calibrado con rodamina para el canal rojo y con fluoresceína para el canal verde. Los resultados obtenidos para células C9 controles sin transfectar y para células, controles positivos, transfectadas con el plásmido pEGFP-N2 se muestran en la figura 4.24. Puede apreciarse cómo los controles negativos se agrupan en una zona tipo flecha de baja intensidad de fluorescencia, mientras que los controles positivos se agrupan en dos zonas en flecha, una de baja y otra de alta intensidad de fluorescencia. Las células controles sirvieron para determinar una zona de

exclusión R2 indicada en la figura 4.24, para eliminar del contador aquellas células que fluorescen con baja intensidad y que por tanto no habían sido transfectadas con el gen de la proteína fluorescente verde.

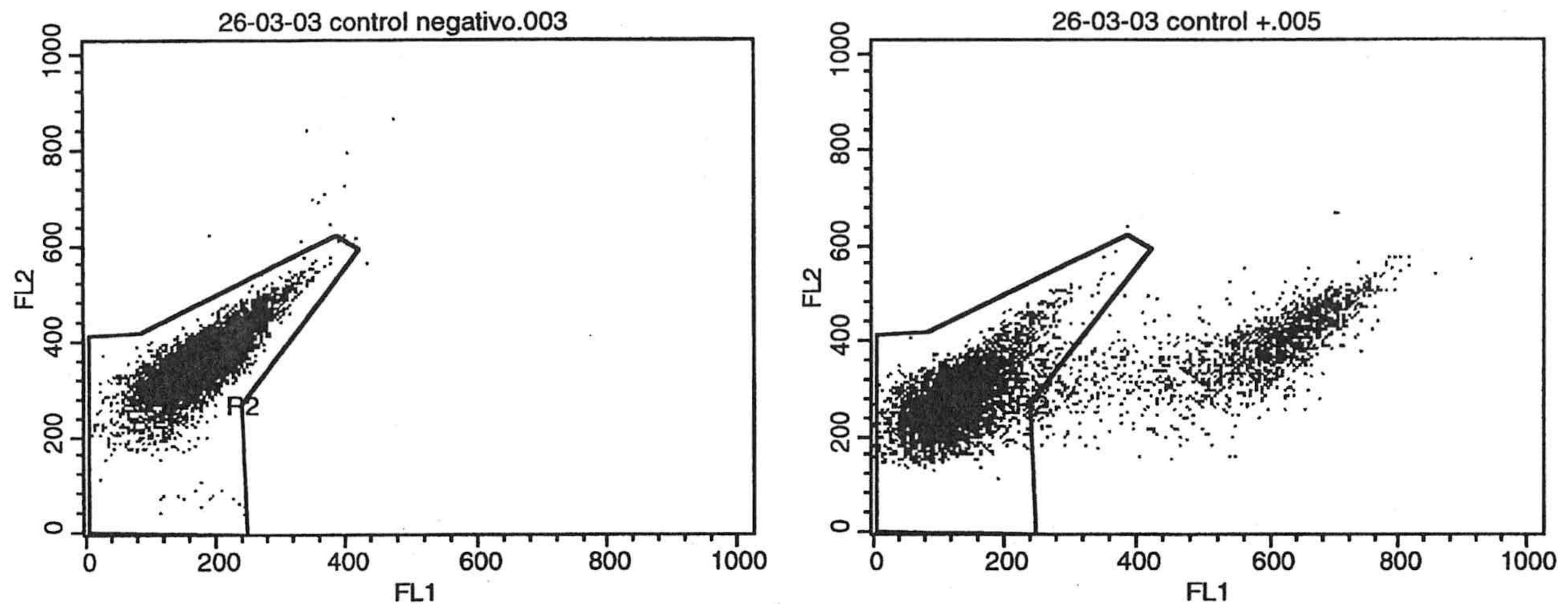


Figura 4.24. Selección de células que expresan la proteína fluorescente verde. En abcisas se representa la intensidad de fluorescencia verde y en ordenadas la intensidad de fluorescencia roja. Las células cuya intensidad de fluorescencia quedaba dentro del área R2 seleccionada para células C9 controles fueron consideradas no transfectadas en todos los casos. Los controles positivos son células C9 transfectadas con el plásmido control pEGP-N2.

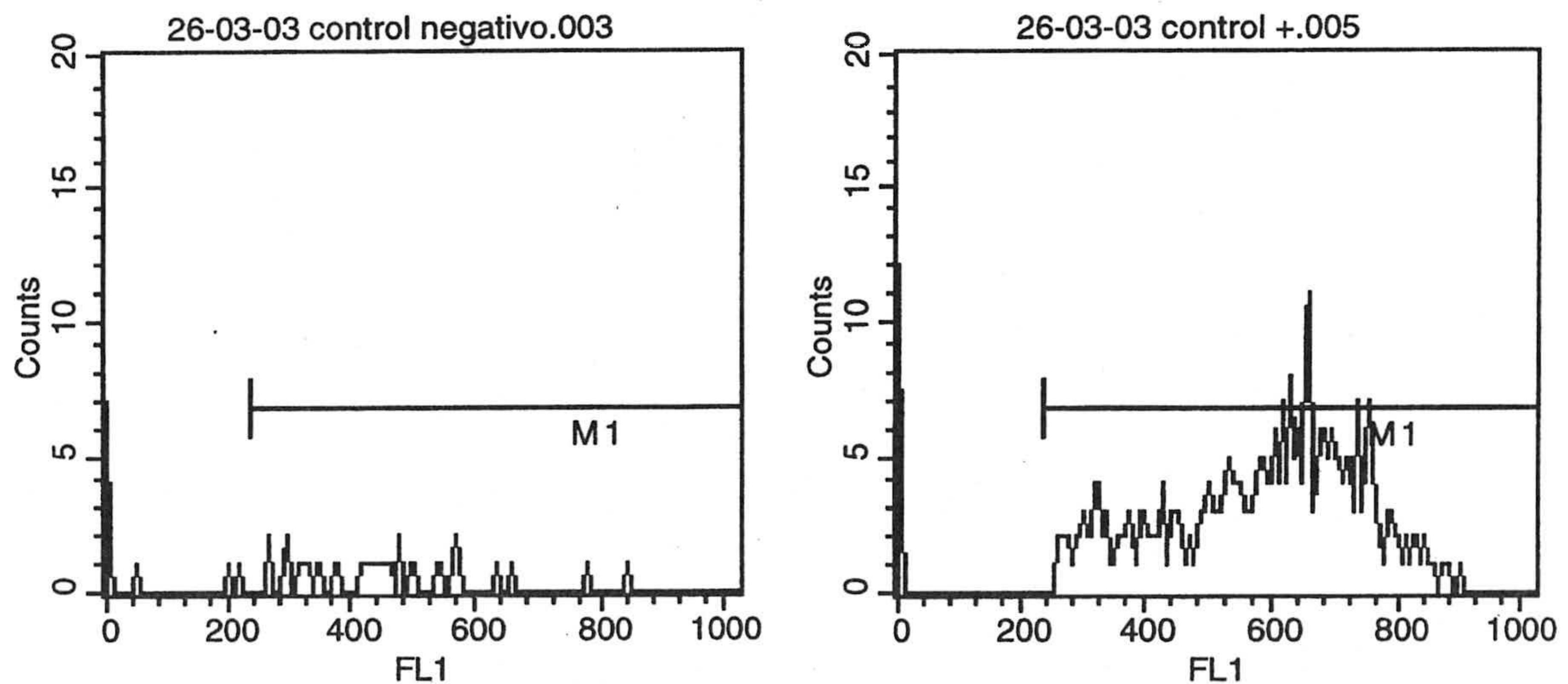


Figura 4.25. Histograma que muestra la fluorescencia en el canal verde de las células no excluidas con los filtros previos. El número de células que quedaban en la región M1 así como su intensidad de fluorescencia media fue registrado. En cada determinación se contaron 20.000 células totales.

Las células que quedaban en la región R1 de la figura 4.24 fueron medidas y su intensidad de fluorescencia verde quedó registrada. Una representación de la medición de fluorescencia en células controles negativos y positivos se indica en la figura 4.25 en forma de gráfica que muestra la ventana M1, de fluorescencia en el canal verde, seleccionada para medir dentro de la zona R1 únicamente aquellas células que presentaban una intensidad mínima de fluorescencia de 220 unidades.

En cada determinación se contó la fluorescencia de 20.000 células y, de ellas, se seleccionaron dentro de la ventana M1 un número variable que sirvió para calcular la eficiencia de transfección, que fue variable para cada construcción. En dos experimentos realizados en triplicado, las eficiencias medias de transfección para cada una de las isoformas fueron:

	Control +	1C	1M	1L	2C	2M	2L
% transfección	21	45	6	4	22	1	27

La intensidad media de fluorescencia debida a la fluorescencia de la proteína verde expresada en las células transfectadas se calculó restando a la intensidad media total de las células seleccionadas la intensidad de fluorescencia debida a otros compuestos celulares fluorescentes. Este último valor fue calculado determinando la intensidad media de fluorescencia de las células consideradas como no transfectadas, es decir, aquellas que quedaban en la ventana R2 de la figura 4.24.

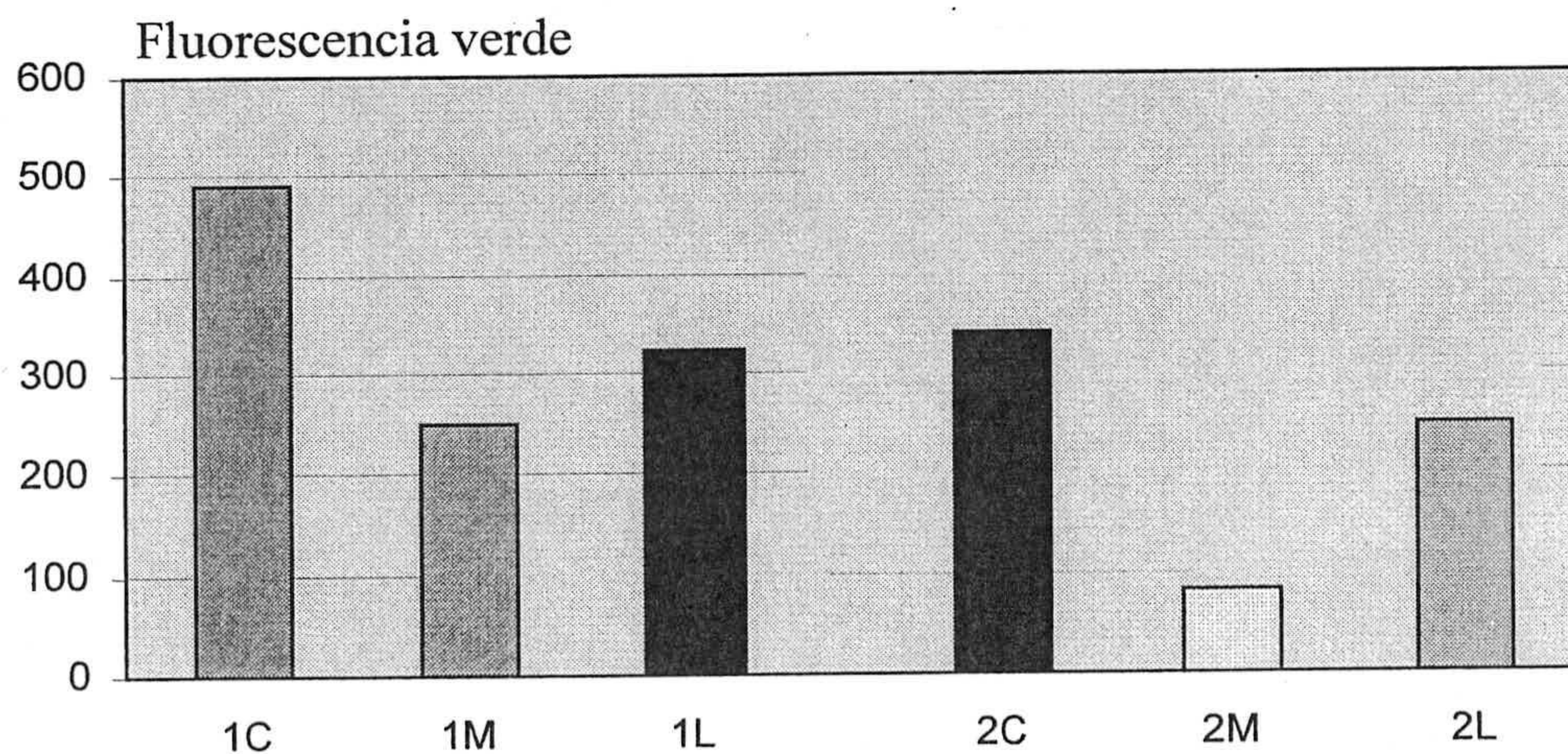


Figura 4.26. Intensidad media de fluorescencia de células C9 transfectadas con el vector pEGFP-N2 incluyendo los distintos 5'-UTRs de la piruvato carboxilasa y la secuencia de importación a la mitocondria. La intensidad de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias.

Placas de células transfectadas con cada una de las construcciones fueron cultivadas en paralelo con las que se usaron para las determinaciones de fluorescencia. En estas células se purificó RNA total por el método del trizol y se realizaron experimentos de Northern-blot con una sonda marcada con ^{32}P frente al mRNA del gen de la proteína fluorescente verde. Las autorradiografías de la banda positiva fueron cuantificadas por densitometría y sus valores fueron normalizados frente a la sonda del RNA 12S de ribosomas mitocondriales. Una vez calculada la cantidad de mRNA, ésta fue dividida por el porcentaje de transfección de las células con cada una de las diferentes construcciones, obteniéndose por tanto un valor que equivale a la cantidad de mRNA para la proteína verde en las células transfectadas. Los resultados se expresan en la figura 4.27.

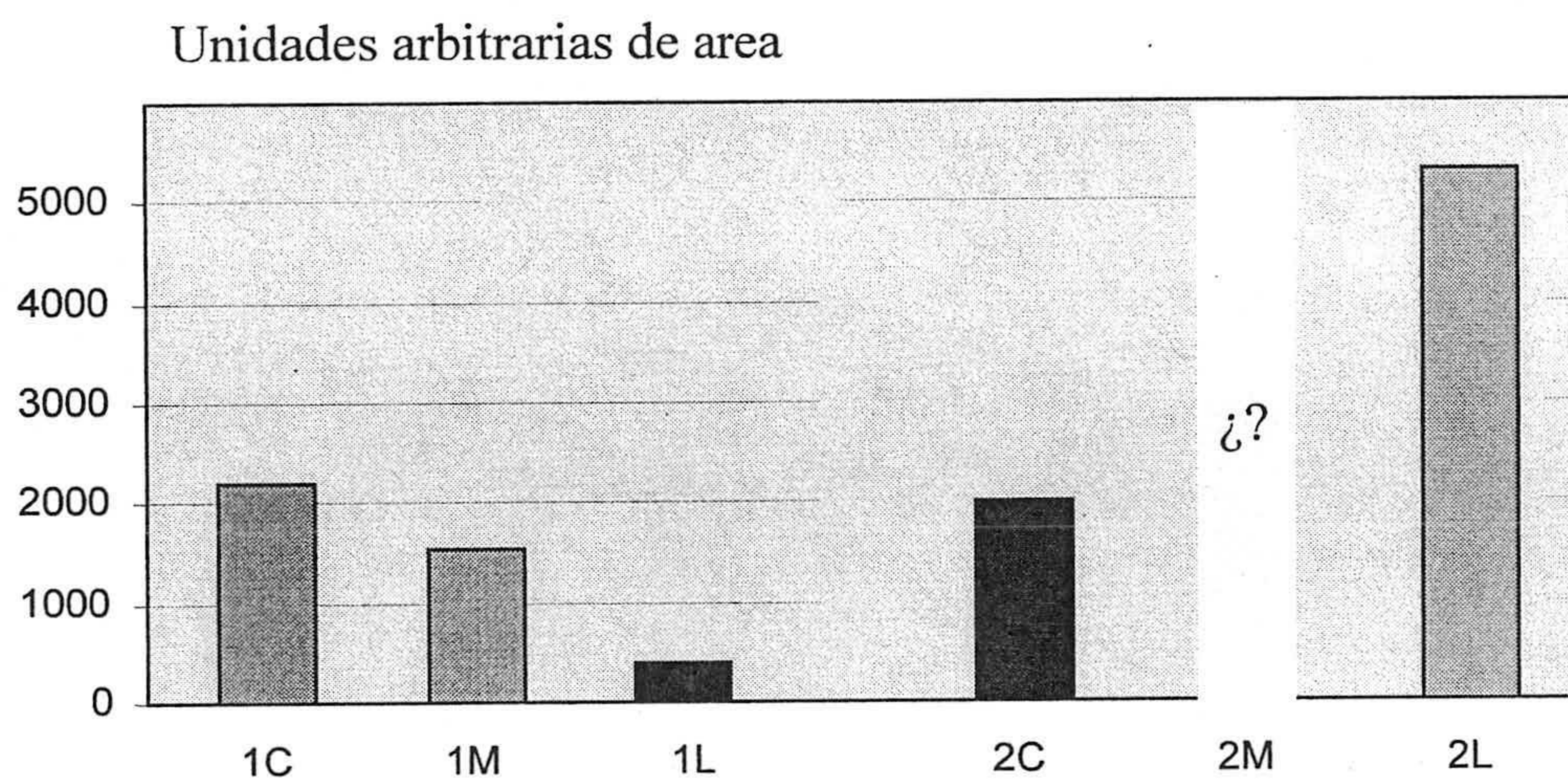


Figura 4.27. *Determinación del contenido de mRNA para la proteína fluorescente verde en células transfectadas con las distintas isoformas de los 5'UTRs del mRNA de la piruvato carboxilasa junto a parte del exón común 2 fusionadas al gen de la proteína fluorescente verde. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de área normalizada frente a la sonda 12S. En dos experimentos realizados la eficiencia de transfección para la construcción 2M fue del 1 % y la señal obtenida para el RNA no pudo ser cuantificada.*

En todas las construcciones empleadas para los experimentos de transfección el gen de la proteína verde está bajo el control de un promotor potente de citomegalovirus y, además, el vector posee secuencias potenciadoras de SV40. Si los diferentes 5'-UTRs de la piruvato carboxilasa, incluidos en las diferentes construcciones, no tuvieran efecto sobre la expresión génica de la proteína verde se debería esperar una cantidad de mRNA idéntico en todas las pruebas. Dado que los resultados son significativamente diferentes con cada una de las construcciones y la potencia del promotor, cabe asignar las diferencias encontradas a efectos post-transcripcionales sobre los diferentes mRNAs.

Para tratar de evaluar si el efecto se produce sobre la estabilidad de los mRNAs o sobre su capacidad para ser traducidos se calculó un nuevo índice que consiste en el cociente entre la cantidad de mRNA para la proteína verde (figura 4.27) y la intensidad de fluorescencia media determinada en el citómetro de flujo (figura 4.26). Los resultados de este cálculo se indican en la figura 4.28.

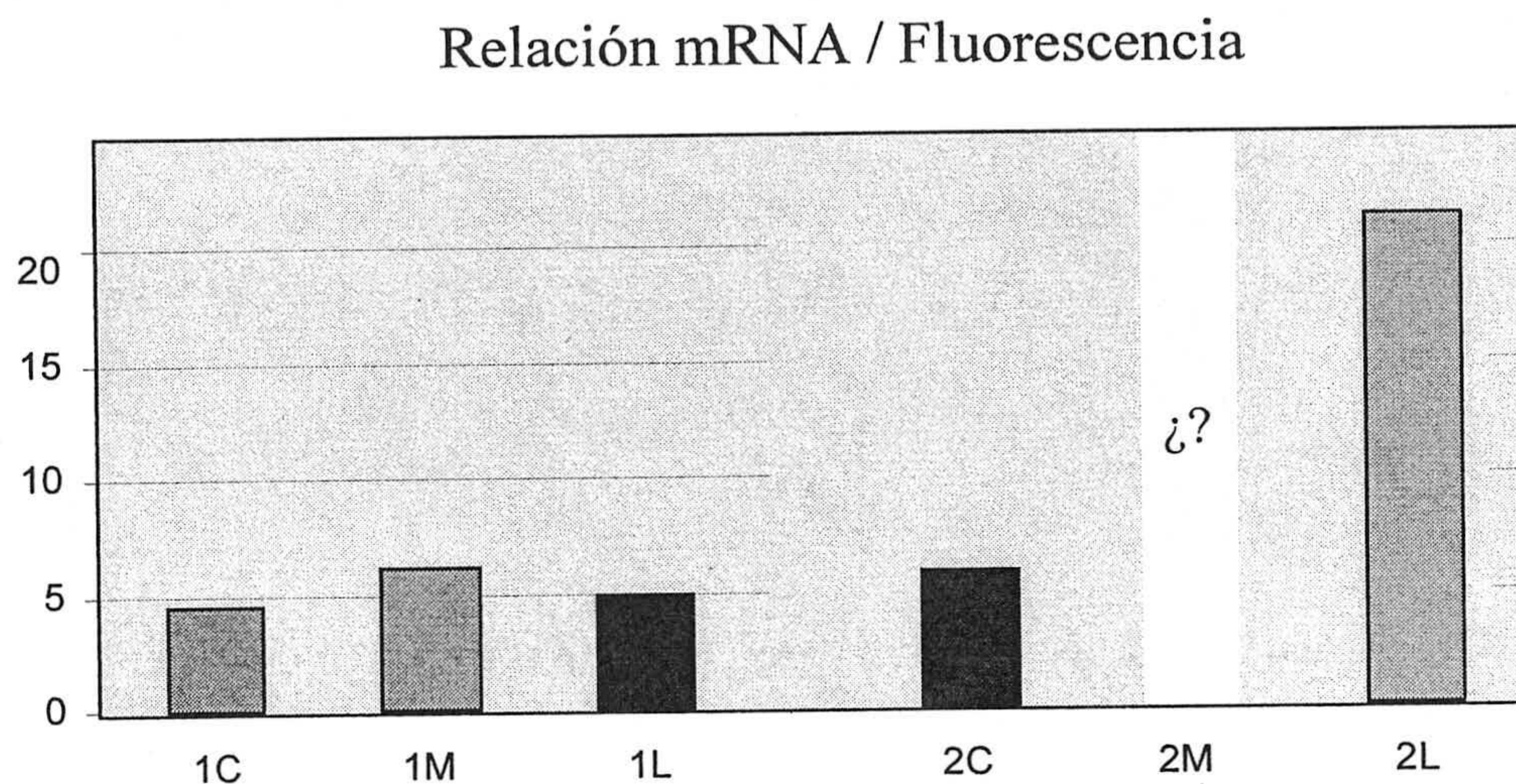


Figura 4.28. *Relación entre el mRNA de la proteína fluorescente verde y la intensidad de fluorescencia en células transfectadas con los diferentes 5'-UTRs de la piruvato carboxilasa.*

Los resultados obtenidos con estos cálculos parecen indicar que la isoforma 2L se traduce menos eficientemente que las demás, ya que el índice calculado es mucho más elevado.

IV.3. Expresión del gen de la piruvato carboxilasa en rata

El estudio de la expresión del gen de la piruvato carboxilasa se ha realizado siguiendo diferentes estrategias experimentales, fundamentalmente Northern blots y técnicas de PCR. Las técnicas de hibridación Northern permiten determinar la cantidad de mRNA de piruvato carboxilasa en tejidos o condiciones experimentales diferentes, pero no permiten discriminar entre las diferentes isoformas ya que todas ellas tienen un tamaño muy similar. Se ha intentado en varios experimentos determinar las isoformas del mRNA utilizando técnicas de protección frente a la digestión por ribonucleasa (RPA) pero no ha sido posible obtener ningún resultado con ellas. Por ello, se han utilizado reacciones de PCR diseñadas para amplificar fragmentos concretos de cDNA de la piruvato carboxilasa que de forma semicuantitativa permitan discriminar entre ellas.

Una vez puesta a punto la metodología se ha estudiado la expresión de la piruvato carboxilasa en varios tejidos de rata y en diferentes situaciones metabólicas.

IV.3.1. Diseño de herramientas

Para poder aplicar las técnicas de PCR se necesitaba estudiar de forma precisa los distintos fragmentos que se amplificaban con los diferentes oligonucleótidos, para poder cuantificar por densitometría únicamente las bandas en las que estuviéramos interesados, ya que habíamos determinado de forma inequívoca la expresión de al menos tres isoformas correspondientes al promotor P1 y y otras tres correspondientes al promotor P2, sin embargo en distintos experimentos se encontraron mayor número de bandas de amplificación de las esperadas. Además, se ha diseñado también un método basado en RT-PCR para tratar de determinar el uso diferencial de los dos promotores P1 y P2.

IV.3.1.1. Herramientas para el estudio de los diferentes 5'UTRs de la piruvato carboxilasa.

Se ha intentado cuantificar la expresión de los diferentes 5'-UTRs de la piruvato carboxilasa utilizando técnicas de RT-PCR, para ello debíamos optimizar el método de

PCR para poder obtener bandas de amplificación que fueran inequívocamente interpretadas. Se prepararon diferentes parejas de oligonucleótidos para repetir la estrategia ya explicada en la figura 4.8. Los mejores resultados se obtuvieron con las combinaciones de oligonucleótidos representados en la figura 4.29, empleándose el oligonucleótido 2,3-as-1 para la reacción de retrotranscripción del RNA extraído de diferentes tejidos o células y, a continuación, el oligonucleótido 2-as-SmaI emparejado con los oligonucleótidos 1B-s-BglII o 1D-s-2 para amplificar respectivamente las isoformas correspondientes a los promotores P1 o P2 (figura 4.29)

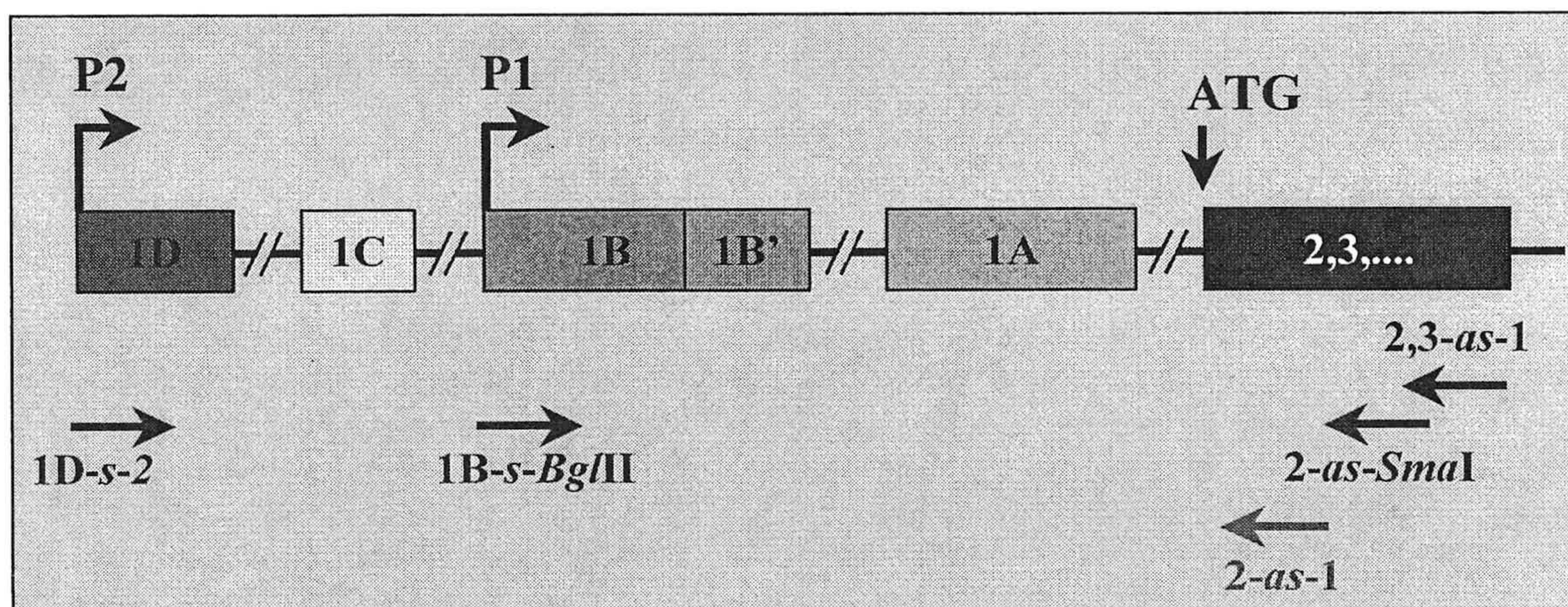


Figura 4.29. *Retrotranscripción específica del extremo 5' de la piruvato carboxilasa, amplificación por PCR y Southern-blots.* Se utilizó el oligonucleótido 2,3-as-1 para la reacción de la transcriptasa inversa. Para estudiar los fragmentos retrotranscritos correspondientes a cada promotor se amplificaron por PCR en dos tubos independientemente, con las parejas de oligonucleótidos 2-as-SmaI, 1B-s-BglII para el promotor 1 y 2-as-SmaI, 1D-s-2 para el promotor 2. La detección de los fragmentos amplificados se realizó por hibridación con el oligonucleótido 2-as-1 previamente marcado con digoxigenina.

Los fragmentos amplificados se comprobaron mediante la realización de un Southern-blot utilizando un nuevo oligonucleótido más interno que hibrida con el fragmento común amplificado del exón 2, 2-as-1. Los resultados de este tipo de experimentos con muestras de hígado y de corteza renal de rata se muestran en la figura 4.30. Puede observarse que cuando los fragmentos amplificados por PCR se separaron en geles de agarosa al 2% se obtenían bandas suficientemente separadas que comigraban con los fragmentos amplificados por PCR a partir de cada una de las distintas isoformas clonadas en pGEM-T. Además se obtenían bandas extra que también daban señal positiva con la sonda 2-as-1.

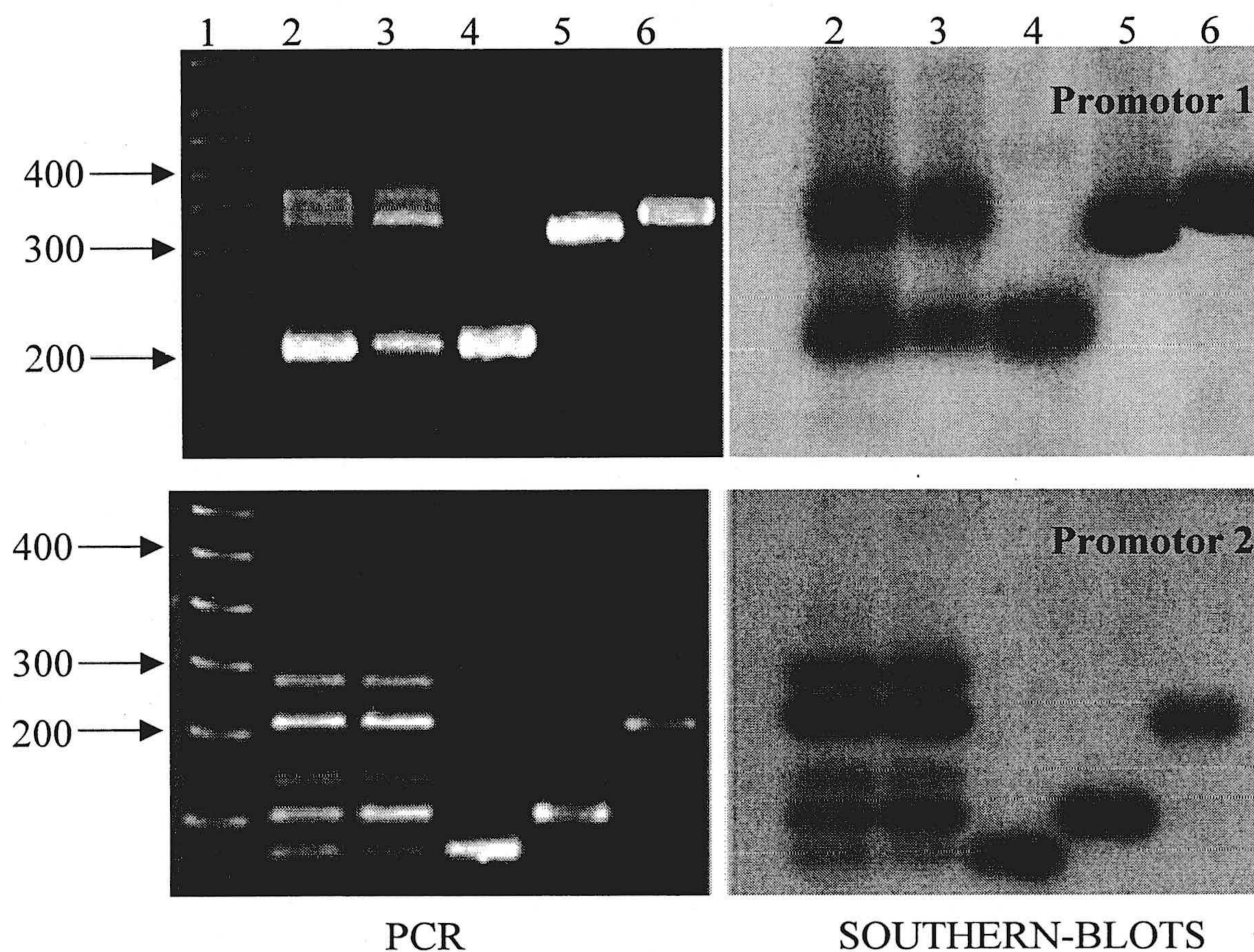


Figura 4.30. Reacciones de PCR y detección por Southern-blot de los fragmentos amplificados. En la calle 1 se corrieron marcadores de tamaño molecular que está indicado a la izquierda en número de pares de bases. En las calles 2 y 3 se corrieron las reacciones de PCR, indicadas en la figura 4.29 para cada promotor, realizadas después de la transcripción inversa de RNA extraído de hígado y de corteza renal de rata, respectivamente. En las calles 4, 5 y 6 se corrieron fragmentos de PCR correspondientes a las isoformas corta, media y larga de cada promotor, amplificados a partir de los fragmentos secuenciados y clonados en pGEM-T.

La multiplicidad de bandas que producían señales positivas en los experimentos de Southern-blot y que no coincidían en tamaño con ninguna de las isoformas amplificadas de fragmentos clonados hizo sospechar que podrían estar produciéndose artefactos de PCR que producían la aparición de bandas extra. Debido a que distintas isoformas del mismo promotor poseen exones comunes también podía ocurrir que se produjeran formas híbridas que alteraran la movilidad en los geles de agarosa. Para comprobar esta última hipótesis se incubaron en las mismas condiciones del PCR sin adición de oligonucleótidos ni de Taq

polimerasa diferentes combinaciones de los fragmentos amplificados a partir de las isoformas clonadas. Puede apreciarse en la figura 4.31 que cualquier combinación de bandas únicas produce bandas adicionales del tipo de las esquematizadas en la figura 4.32, lo que dificultó la interpretación de nuestros primeros resultados.

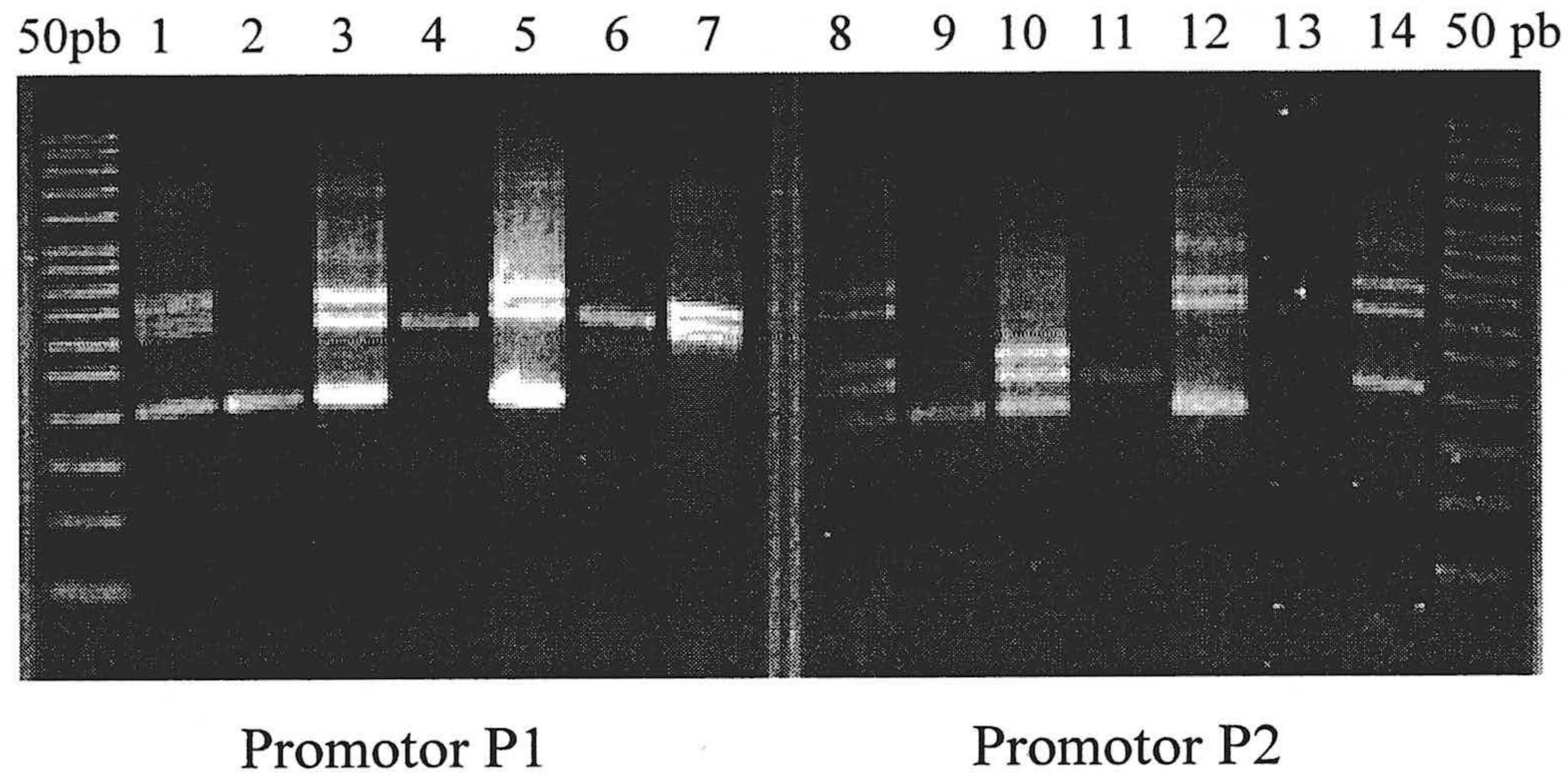


Figura 4.31. Combinaciones de fragmentos amplificados por PCR para explicar la aparición de las estructuras secundarias. En las calles 2, 4 y 6 se cargaron los 5'-UTRs correspondientes a las isoformas 1C, 1M y 1L y en las calles 9, 11 y 13 se cargaron los 5'-UTRs correspondientes a las isoformas 2C, 2M y 2L, respectivamente. Todos estos fragmentos se obtuvieron por PCR de los respectivos fragmentos clonados en p-GEM-T usando los oligonucleótidos 1B-s-BglII para los correspondientes al promotor P1 o 2-as-SmaI para los del promotor P2. En todos los casos se añadió el oligonucleótido común 2-as-Sma I. Los fragmentos amplificados se combinaron entre sí calentándose a 92°C y dejándose enfriar antes de ser cargados en el gel. Calle 1: fragmentos 2, 4 y 6; Calle 3: fragmentos 2 y 4; Calle 5: fragmentos 2 y 6; Calle 7: fragmentos 4 y 6; Calle 8: fragmentos 9, 11 y 13; Calle 10: fragmentos 9 y 11; Calle 12: fragmentos 9 y 13; calle 14: fragmentos 11 y 13. La electroforesis se efectuó en un gel de agarosa al 2.5%.

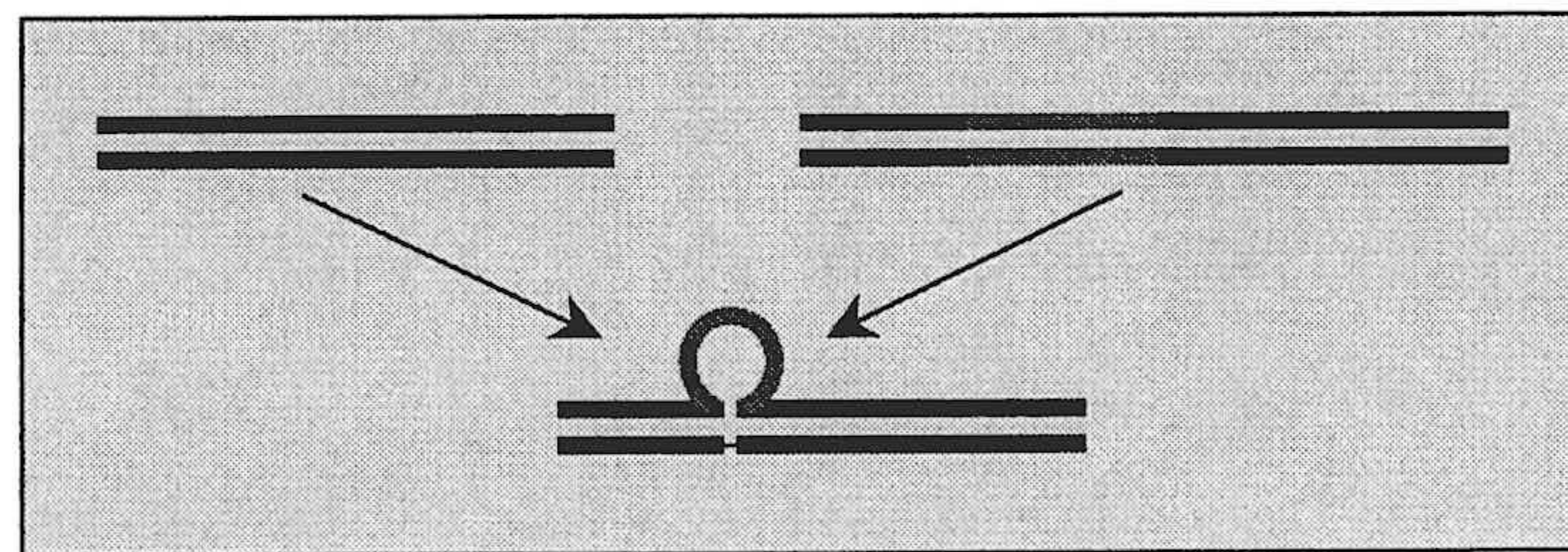


Figura 4.32. Esquema para la formación de bandas híbridas. Los exones comunes de las distintas isoformas pueden hibridar entre sí debido a que los fragmentos amplificados tienen todos el exón 2 común.

Para confirmar que la complejidad de bandas en los geles de agarosa eran debidas a la formación de bandas híbridas entre los fragmentos amplificados de las diferentes isoformas se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia de urea 8M. En este sistema el DNA corre desnaturalizado y se impide la aparición de bandas híbridas. Como cabía esperar se obtuvo un resultado mucho más claro y para cada promotor se obtuvieron las tres isoformas corta, media y larga, marcadas con flechas en la figura 4.33.

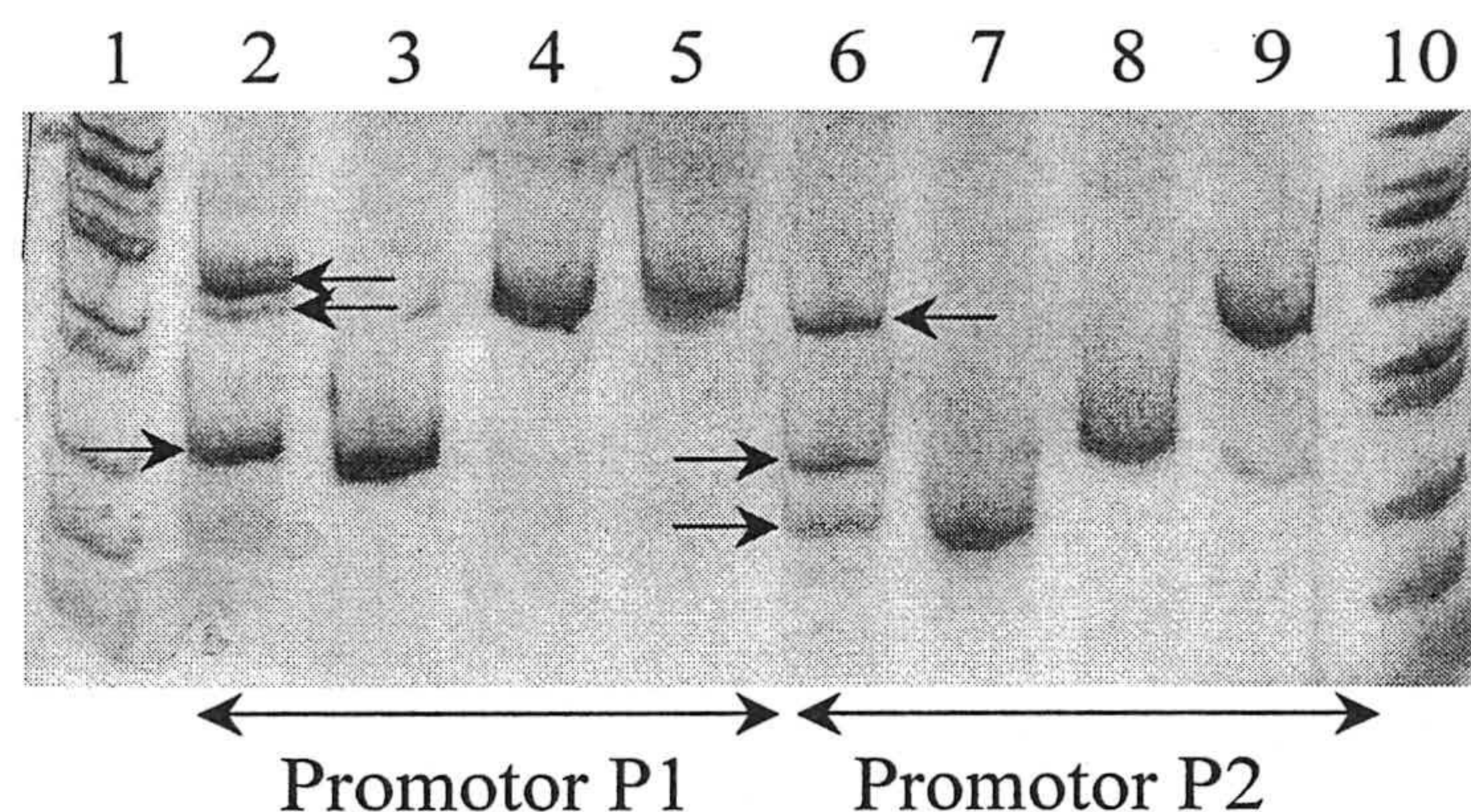


Figura 4.33. Separación en gel desnaturalizante de poliacrilamida de los fragmentos amplificados por PCR. En las calles 1 y 10 se corrieron marcadores de tamaño molecular de 50 pares de bases. En las calles 2 y 6 se corrieron respectivamente las reacciones de PCR indicadas en la figura 4.29 para cada promotor, realizadas después de la transcripción inversa de RNA extraído de hígado de rata. En las calles 3, 4 y 5 se corrieron fragmentos de PCR correspondientes a las isoformas corta, media y larga del promotor P1 y en las calles 6, 7 y 8 las correspondientes al promotor P2, amplificados a partir de los fragmentos secuenciados y clonados en pGEM-T. Las distintas isoformas larga, media y corta para cada promotor están marcadas con flechas de arriba abajo en la fotografía.

IV.3.1.2. Herramientas para el estudio del uso diferencial de promotores

Para tratar de estudiar el uso de cada uno de los promotores en diferentes tejidos se diseñaron reacciones de PCR que amplificaran una banda única para todas las isoformas de cada promotor, aprovechando que todas ellas coinciden en el primer exón. Es decir, todas las isoformas derivadas de la expresión del promotor P1 tienen en común el exón 1B y todas las derivadas de la expresión de P2 tienen en común el exón 1D. Debido a que el tamaño de estos dos exones es muy reducido el tamaño de los fragmentos amplificados

debe ser también muy pequeño. En la figura 4.34. se indican los oligonucleótidos utilizados. Con este sistema se amplifica una banda única de 66 pares de bases para P1 y de 56 pb para P2.

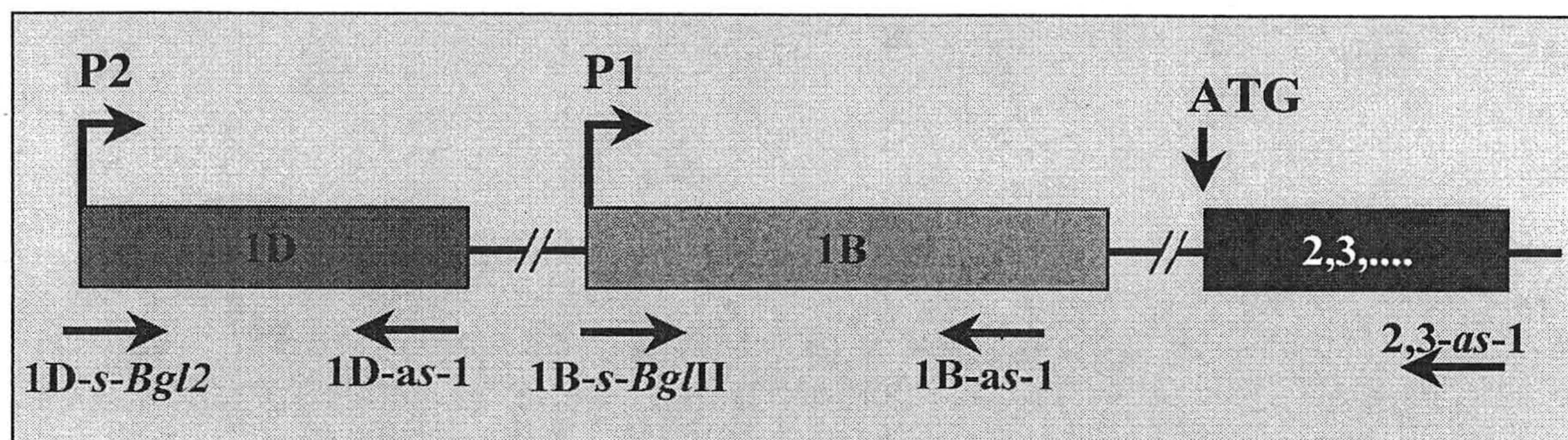


Figura 4.34. Esquema para la amplificación de bandas únicas correspondientes a cada promotor.

IV.3.2. Expresión de isoformas en tejidos

Debido a la multiplicidad de funciones metabólicas de la piruvato carboxilasa cabe esperar una expresión casi ubicua, aunque puede haber un uso diferencial de promotores y, posiblemente, también un splicing diferencial que explique la multiplicidad de isoformas.

En primer lugar hemos valorado la cantidad total de mRNA para la enzima en varios tejidos y el efecto del ayuno, para estudiar posteriormente por RT-PCR el uso de promotores y la generación de las diferentes isoformas. Con este sistema hemos pretendido evaluar también el efecto del ayuno sobre la expresión diferencial de las distintas isoformas.

IV.3.2.1. Efecto del ayuno sobre la cantidad de mRNA para la piruvato carboxilasa en diferentes tejidos de rata

Ratas alimentadas o ayunadas durante 48 horas fueron sacrificadas por dislocación cervical e inmediatamente se tomaron muestras de diferentes tejidos que se congelaron en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta el momento en que se procedió a la extracción de RNA total por el método del tiocianato de guanidío.

Se realizaron determinaciones de la cantidad total del RNA de la piruvato carboxilasa, para lo que se separaron las muestras de RNA total en geles al 0,8 % de agarosa, que posteriormente, fueron transferidos a membranas para las posteriores hibridaciones con sondas marcadas con ^{32}P . En la figura 4.35 se muestra una fotografía con distintas membranas de experimentos representativos en los que se analiza el efecto del ayuno sobre la concentración de mRNA para la piruvato carboxilasa en hígado, corteza renal, cerebro y tejido adiposo.

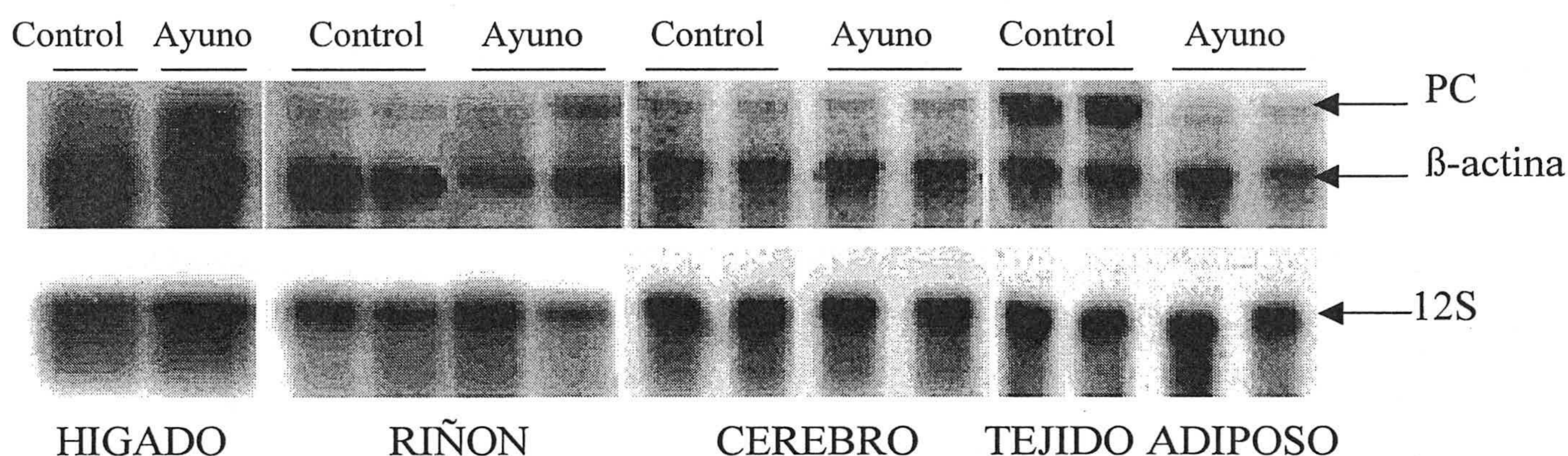


Figura 4.35. Efecto del ayuno sobre la expresión del mRNA total para la piruvato carboxilasa en diferentes tejidos de rata. Las membranas se hibridaron conjuntamente con una sonda para la piruvato carboxilasa y con una sonda para la β -actina. Posteriormente tras el lavado de estas sondas se incubaron con una sonda para el RNA ribosomal 12S de mitocondrias.

Las bandas obtenidas en los experimentos de Northern-blots fueron cuantificadas por densitometría y los valores se normalizaron en cada tejido frente a la señal obtenida con las sondas de β -actina y de 12S ribosomal. Los resultados se muestran en la figura 4.36 como variaciones porcentuales sobre los valores obtenidos en alimentación. Se observa que en tejidos gluconeogénicos como el hígado y la corteza renal la concentración del RNA mensajero total de la piruvato carboxilasa se incrementa significativamente. Este aumento es mucho mayor en hígado que en corteza renal. En el caso del cerebro se obtienen resultados ligeramente diferentes en función de que la normalización se realice con la sonda de β -actina o con la sonda 12S, sin modificación en el primer caso y un ligero incremento en el segundo. Estos resultados pueden indicar variaciones en el mRNA de la piruvato carboxilasa, en la concentración de β -actina o en la cantidad de mitocondrias por efecto del ayuno. En cualquier caso las variaciones no son espectaculares. Finalmente, en

tejido adiposo se observa una disminución del mRNA de la piruvato carboxilasa en ayuno, como cabía esperar en una situación lipolítica.

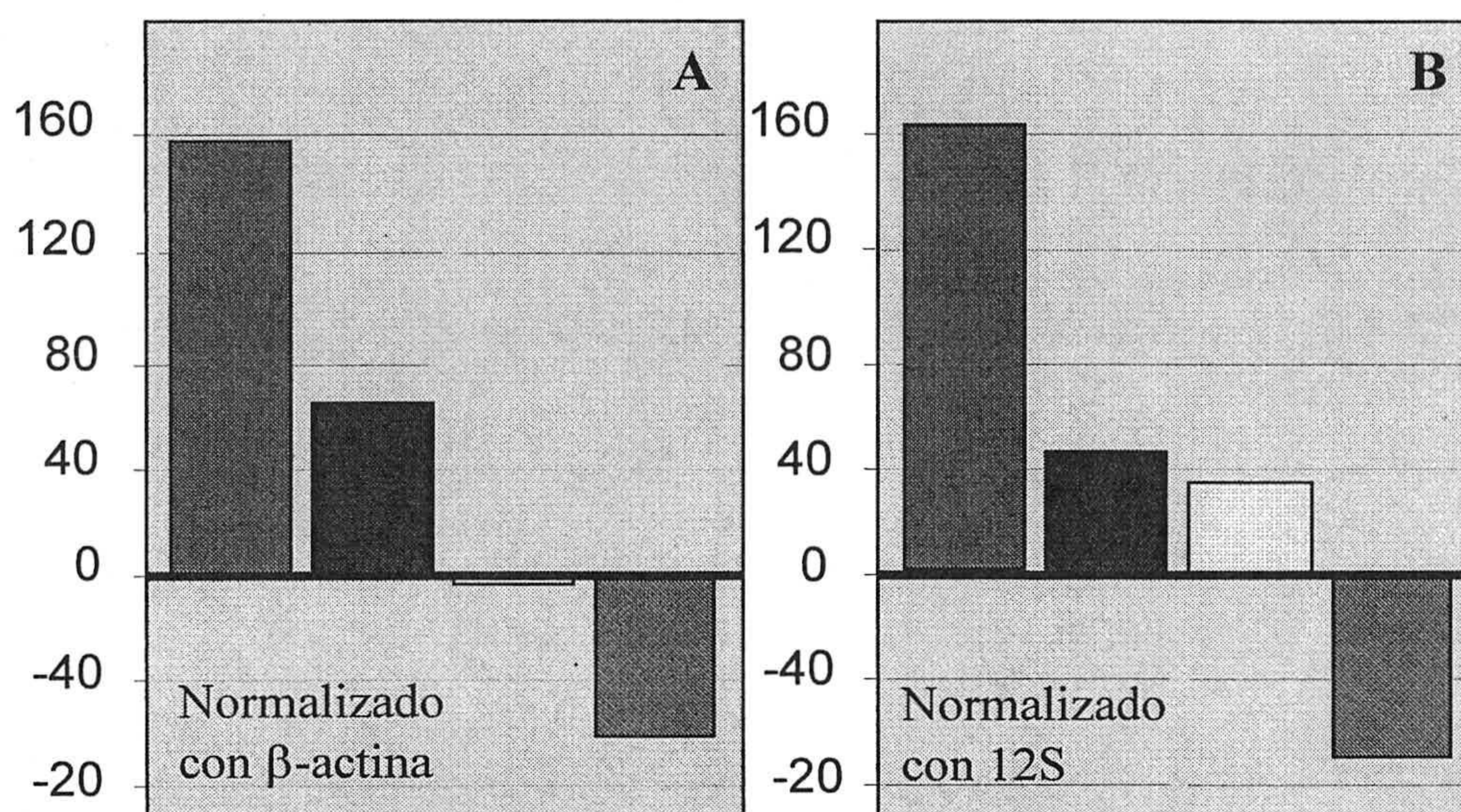


Figura 4.36. Efecto del ayuno sobre la cantidad total de mRNA para la piruvato carboxilasa en diferentes tejidos de rata. Las membranas se hibridaron simultáneamente con las sondas para la piruvato carboxilasa y para la β -actina y se expusieron. Posteriormente, se hibridaron con la sonda para el RNA ribosomal 12 S de mitocondrias. Se muestra un experimento.

Una vez determinada la cantidad total de mRNA se pretendió estudiar el uso diferencial de promotores en los distintos tejidos por RT-PCR con el diseño indicado en la figura 4.34. Para ello se normalizó la cantidad de RNA con la señal de la sonda 12 S para la realización de reacciones de transcripción inversa. Posteriormente, el cDNA se amplificó con las parejas de oligonucleótidos 1B-*s-Bg*III y 1B-*as*-1 para el estudio de la expresión del promotor P1 y 1D-*s-Bg*III y 1D-*as*-1 para el estudio de la expresión del promotor P2. Los resultados se muestran en la figura 4.37.

Aunque se realizaron numerosos ensayos con variaciones en el número de ciclos de PCR no pudimos llegar a conclusiones significativas sobre diferencias de expresión de uno u otro promotor inducidas en una situación de ayuno en ninguno de los diferentes tejidos de rata ensayados.

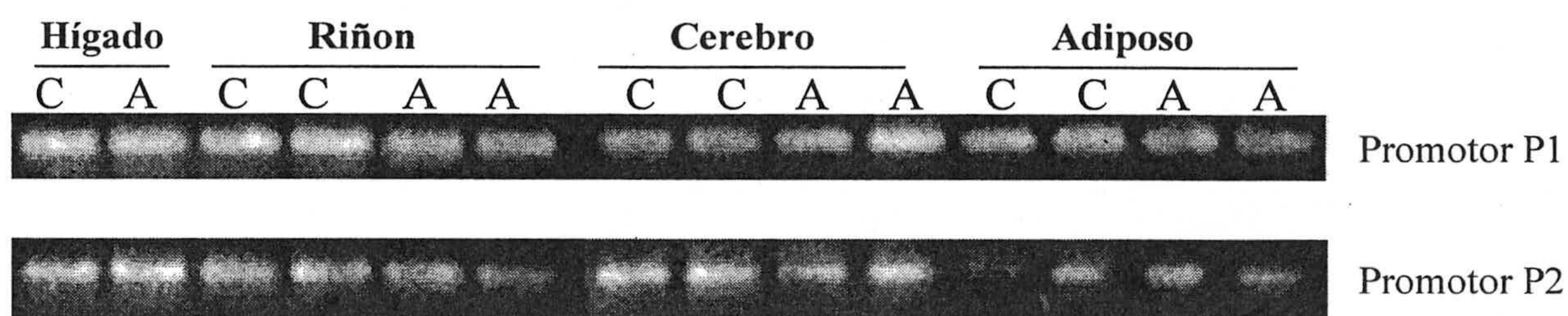


Figura 4.37. Efecto del ayuno sobre la expresión diferencial de promotores en varios tejidos de rata. Se realizaron reacciones de transcripción inversa normalizadas con la señal de la sonda 12 S y posteriormente se amplificaron los cDNAs por PCR. El número de ciclos fue de 33 para obtener una señal medible de cada banda, evitando que éstas se saturaran. C.- Ratas controles; A.- Ratas ayunadas.

Posteriormente se estudió la expresión de las diferentes isoformas de cada promotor empleando el sistema descrito en la figura 4.29. Los resultados están indicados en la figura 4.38. Nuestro sistema permite concluir que en las dos situaciones metabólicas y en todos los tejidos se expresan todas y cada una de las isoformas de mRNA de la piruvato carboxilasa descritas en este trabajo, pero la técnica de amplificación por PCR que hemos empleado no permite discriminar las posibles variaciones que pudieran tener lugar en cuanto a la cantidad relativa de cada una de ellas.

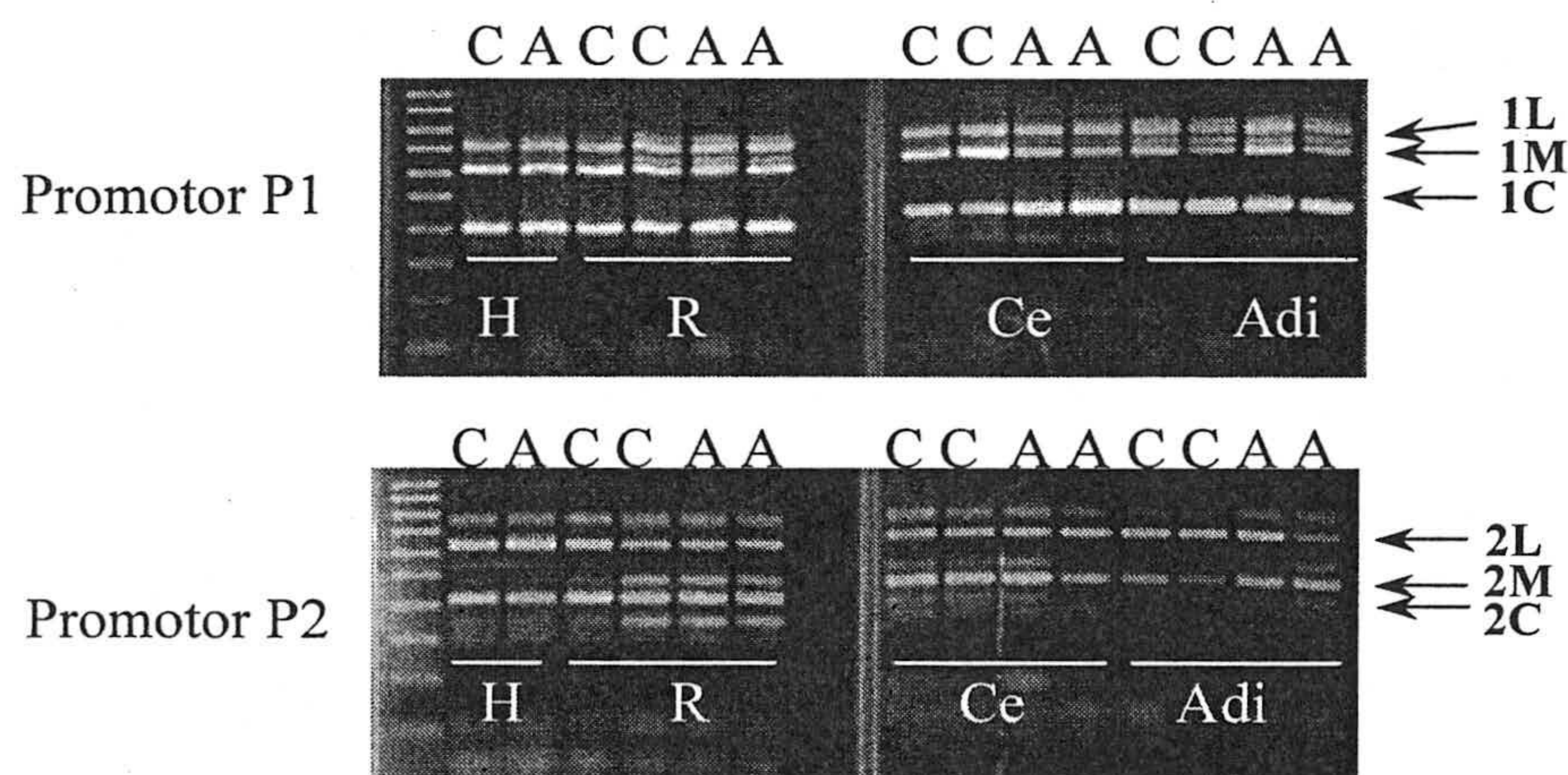


Figura 4.38. Efecto del ayuno sobre la expresión de isoformas de mRNA de la piruvato carboxilasa en diferentes tejidos de rata. H.- Hígado; R.- Riñón; Ce.- Cerebro y Adi.- Tejido adiposo. Con flechas se indican las diferentes isoformas amplificadas del extremo 5' de la piruvato carboxilasa.

IV.3.3. Efecto del ayuno sobre la expresión de la piruvato carboxilasa en hepatocitos de rata

El hígado es un órgano que está formado por varios tipos celulares diferentes. Incluso dentro de los hepatocitos se han descrito grandes diferencias metabólicas y físicas entre ellos debido a su zonación. Se puede hablar de dos poblaciones características, hepatocitos periportales y perivenosos. Mientras que los primeros tienen atribuida una mayor importancia en la gluconeogénesis y en la ureogénesis, los segundos son fundamentales en la captación del amoníaco que escapa de su conversión en urea. De dos poblaciones celulares con tan claras diferencias metabólicas cabría esperar un comportamiento diferencial en la expresión de la piruvato carboxilasa, por lo que se procedió a su estudio. Hepatocitos aislados de ratas controles y de ratas ayunadas durante 1 día fueron separados por elutriación en dos poblaciones enriquecidas en hepatocitos periportales y perivenosos respectivamente. La preparación de hepatocitos se realizó en el laboratorio de la profesora Begoña Ochoa de la Universidad del País Vasco.

IV.3.3.1. Efecto del ayuno sobre el estado ácido-básico en rata.

Está bien documentado que el ayuno produce acidosis metabólica como consecuencia del incremento en la producción de cuerpos cetónicos (referencia). En primer lugar se pretendió determinar el estado de acidosis en los animales usados para la preparación de los hepatocitos.

En el momento de la operación se extrajo sangre venosa de los animales y se determinó el pH. Las ratas controles tenían un pH sanguíneo de $7,302 \pm 0,015$ mientras que en las ratas ayunadas era de $7,194 \pm 0,031$. Con 7 grados de libertad se obtiene un valor de t de Student que indica una $P < 0,05$. Para confirmar el estado acidótico de los animales se determinó la concentración de cuerpos cetónicos en suero. Los resultados se expresan en la figura 4.39.

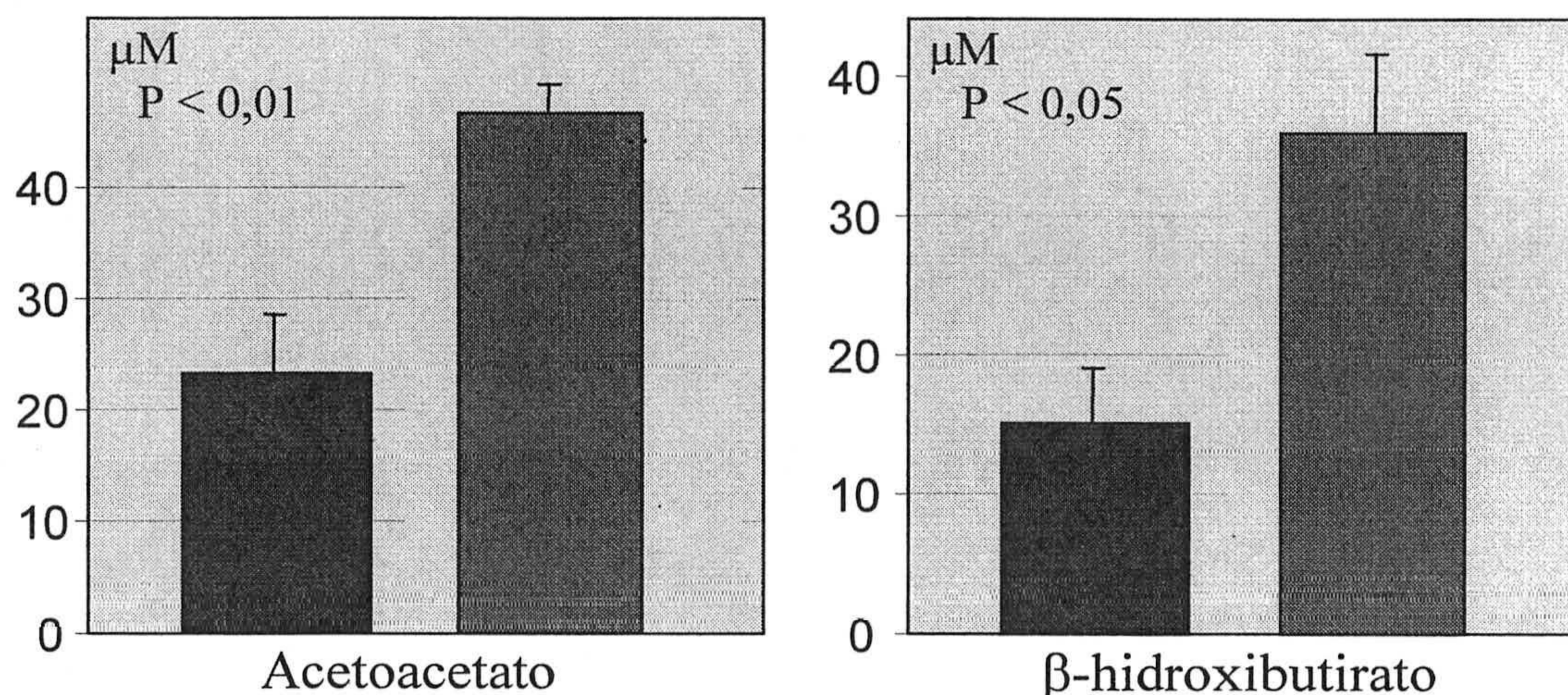


Figura 4.39. Concentración de cuerpos cetónicos en suero obtenido de ratas alimentadas (azul) y de ratas ayunadas (rojo) en el momento de la operación para la preparación de hepatocitos.

IV.3.3.2. Expresión de PC en hepatocitos periportales y perivenosos.

Hepatocitos aislados de ratas controles y de ratas ayunadas fueron separados por elutriación en dos poblaciones muy enriquecidas en hepatocitos periportales y perivenosos. Se extrajo RNA total de ambas poblaciones por el método del Trizol y se cuantificó espectrofotométricamente. Estas muestras de RNA se separaron en un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes cargando 10 μg de RNA total de cada muestra. Posteriormente se hizo una transferencia a una membrana de nylon para la realización de northern-blots usando respectivamente una sonda específica para la piruvato carboxilasa, para el RNA mitocondrial 12S y para la β -actina. Todas las sondas se marcaron con ^{32}P como se indica en la sección III.2.9.3. Los resultados de estos experimentos están reflejados en la figura 4.40.

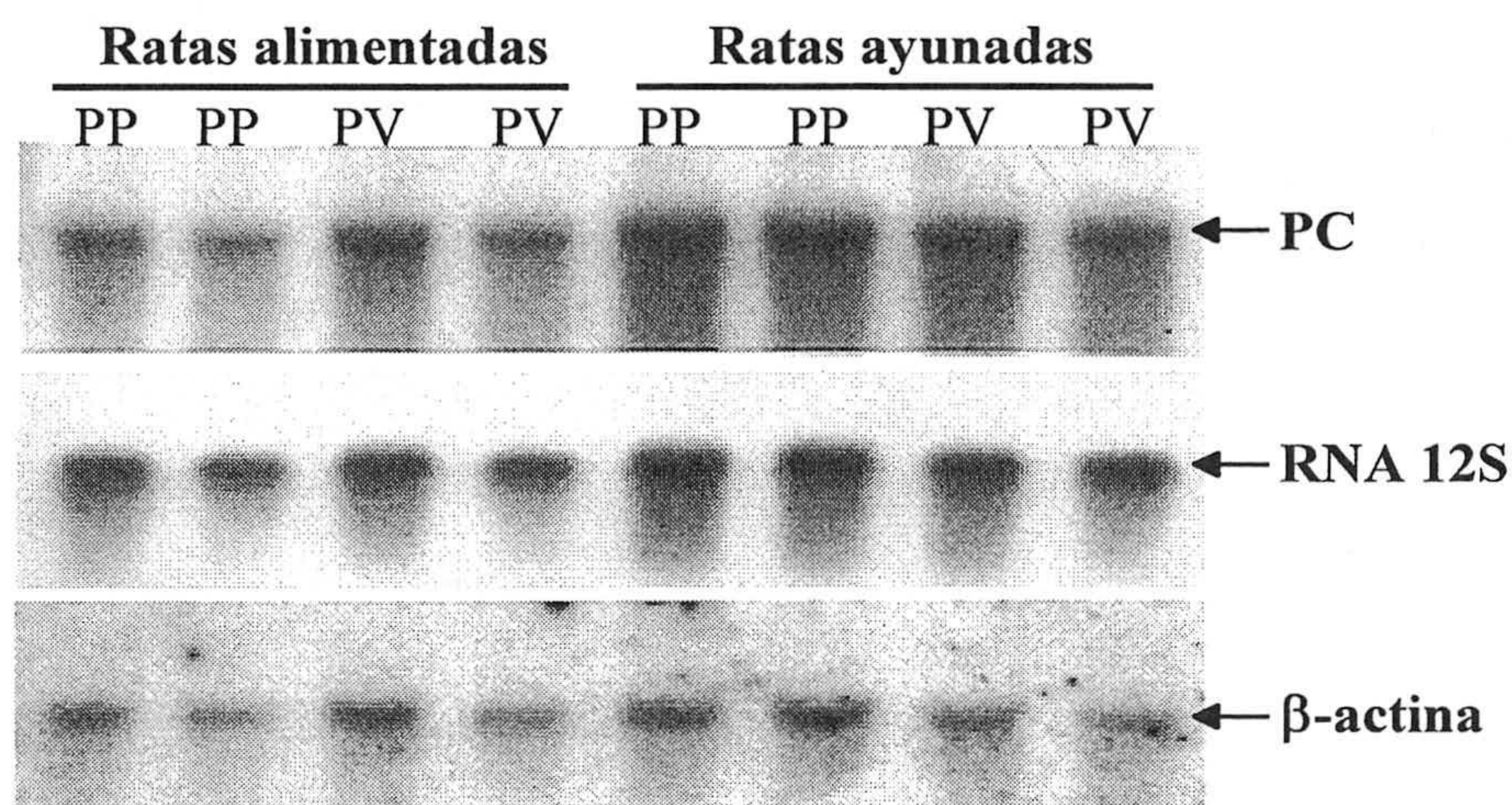


Figura 4.40. Efecto del ayuno sobre la expresión de la piruvato carboxilasa en hepatocitos periportales y perivenosos. Se muestra un Northern-blot con dos muestras diferentes.

La expresión de la piruvato carboxilasa se determinó cuantificando las intensidades de las señales autorradiográficas producidas por cada banda y normalizando respectivamente con la sonda para el RNA mitocondrial 12S y con la sonda para la β -actina. Los resultados se expresan, porcentualmente respecto a la expresión en hepatocitos periportales obtenidos de ratas alimentadas, en la figura 4.41.

No se obtuvieron resultados idénticos en cuanto a la cantidad de mRNA para la piruvato carboxilasa en hepatocitos periportales o perivenosos en función de que la normalización se realizara con la sonda del RNA mitocondrial 12S o con la sonda de la β -actina. En ambos casos se demuestra que el ayuno produce un incremento significativo en la cantidad de mRNA para la piruvato carboxilasa, aumento que es mucho mayor cuando los resultados del Northern se normalizan con la sonda de β -actina.

Para aclarar estos resultados se cuantificaron por densitometría las bandas de los RNA ribosómicos en la fotografía del gel teñido con bromuro de etidio (datos no mostrados). Observamos que la densidad de las bandas ribosomales no se correspondía con los resultados obtenidos para la autorradiografía con la sonda de β -actina y sí lo hacen en mayor medida con los resultados obtenidos con la sonda de RNA mitocondrial 12S, por lo que la cuantificación con esta última sonda parece mucho más fiable, no pudiendo descartarse un efecto negativo del ayuno sobre la cantidad de mRNA para la β -actina.

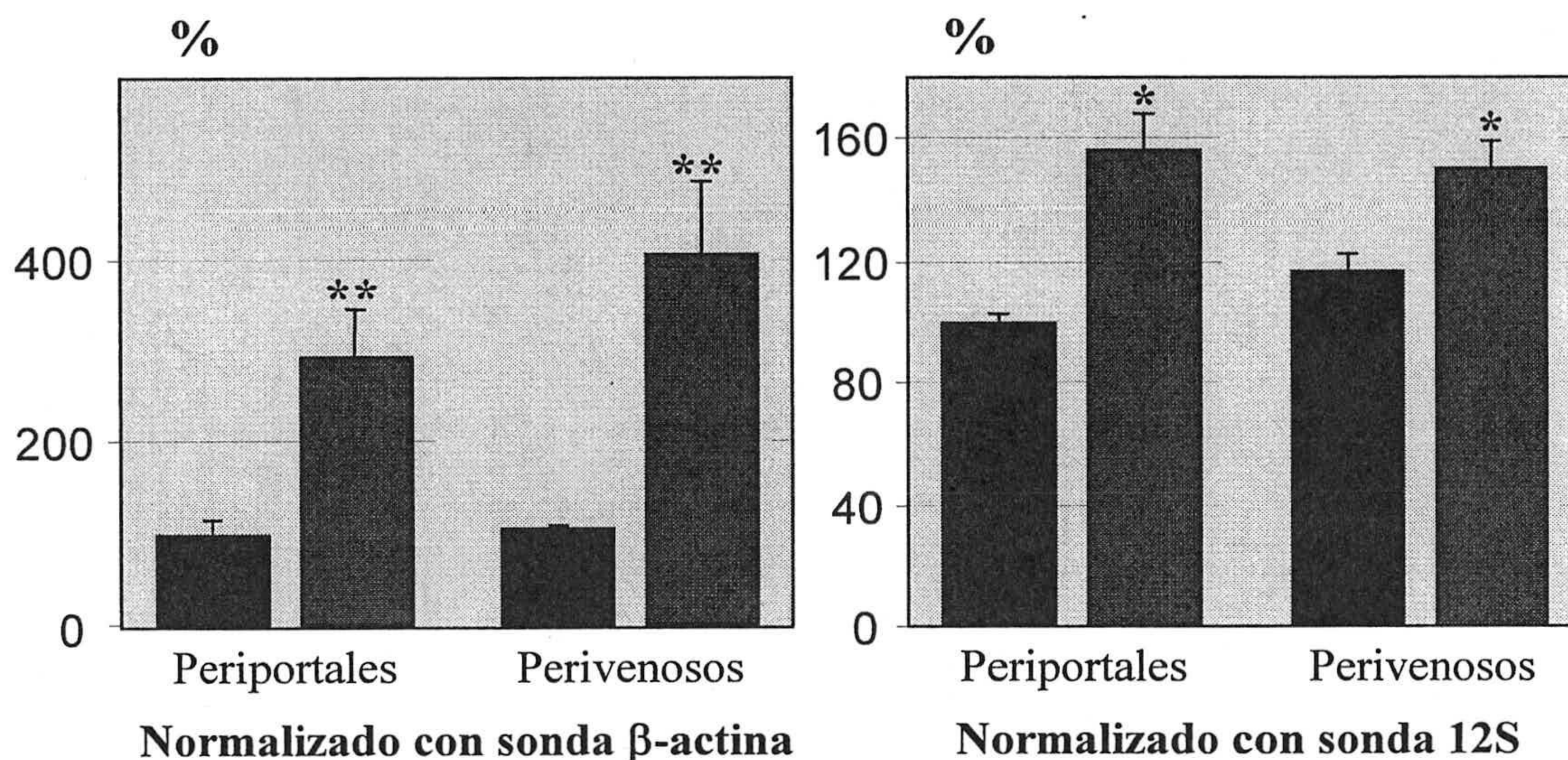


Figura 4.41. Efecto del ayuno sobre la cantidad de mRNA de piruvato carboxilasa en hepatocitos perivenosos y periportales aislados de rata. Los resultados se expresan en porcentaje respecto a las señales autorradiográficas obtenidas con las muestras de hepatocitos periportales de ratas alimentadas, normalizados con la señal obtenida con la sonda mitocondrial 12S o con la sonda de β -actina. En azul se muestran los resultados en hepatocitos de ratas alimentadas y en rojo en hepatocitos de ratas ayunadas. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ de acuerdo con el test de la t de Student.

La cantidad de RNA se normalizó con los resultados obtenidos para la sonda mitocondrial 12S para realizar reacciones de transcripción inversa con oligo-dT. Posteriormente se realizaron reacciones de PCR para amplificar el exón 1D, común para todas las isoformas de mRNA derivadas de la expresión del promotor 2, usando la pareja de oligonucleótidos 1D-s-3 y 1D-as-2 que deben amplificar una secuencia de DNA de 56 pares de bases. También se amplificó el exón 1B, común para todas las isoformas derivadas de la expresión del promotor 1, con la pareja de oligonucleótidos 1B-s-3 y 1B-as-2 que deben amplificar una secuencia de DNA de 66 pares de bases. Las condiciones del PCR fueron 94°C/5 min seguido de 35 ciclos 91°C/1 min, 65°C/1 min, 72°C/1 min y finalmente una extensión durante 7 min a 72°C. Con esta técnica se puede comparar la cantidad de mRNA correspondiente a cada promotor en diferentes situaciones, pero no se puede determinar cual de los promotores se expresa más. Las intensidades de las bandas amplificadas se cuantificaron por densitometría. Los resultados están recogidos en la Figura 4.42.

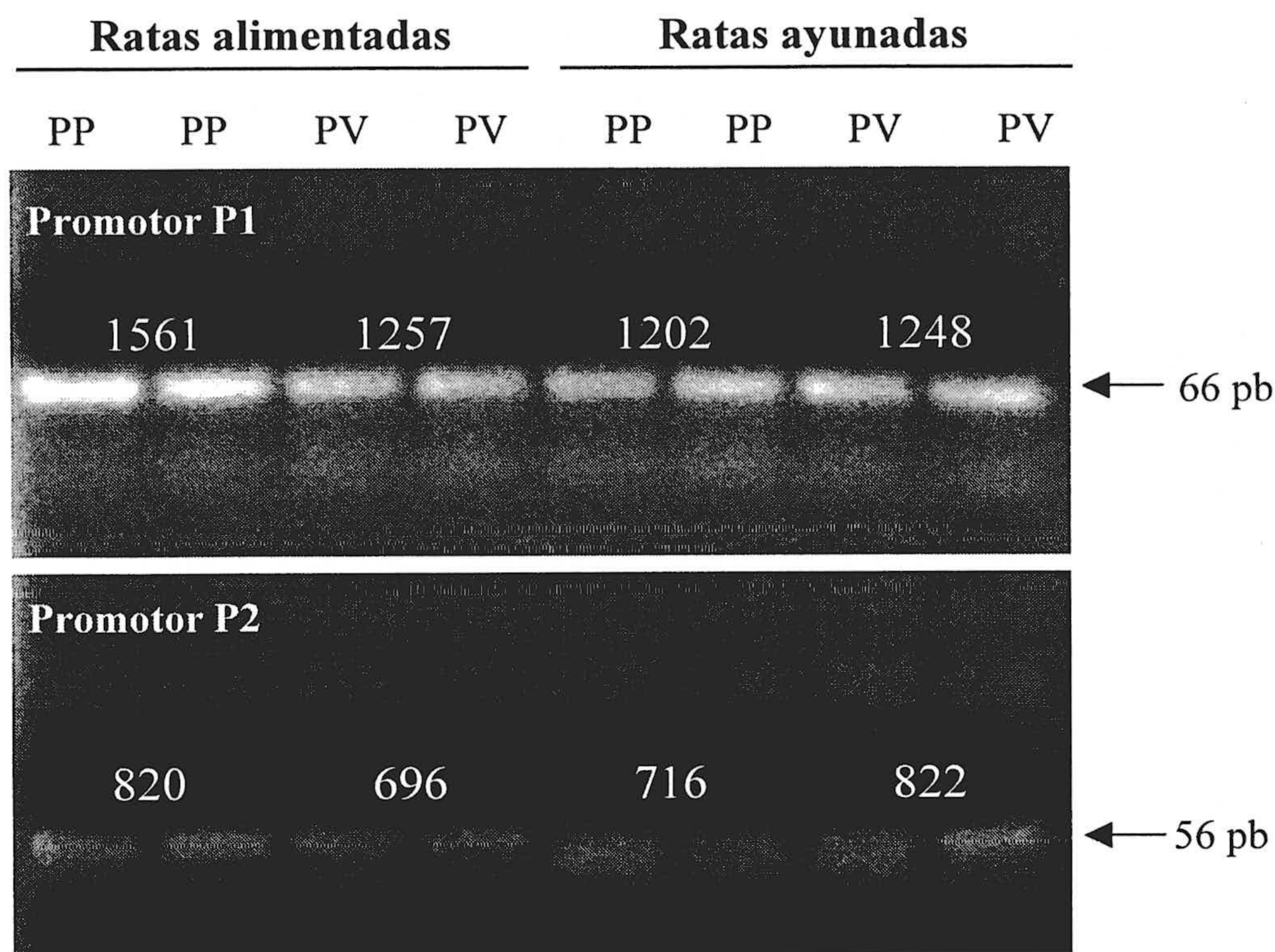


Figura 4.42.- *Expresión diferencial de los promotores proximal y distal en hepatocitos aislados de rata. El cDNA correspondiente a cada promotor se amplificó por PCR y las bandas se analizaron por electroforesis y densitometría. Los resultados medios para cada condición están escritos sobre la fotografía.*

Cuando se realizó el estudio de la expresión de las diferentes isoformas se encontró que tanto en hepatocitos periportales como en hepatocitos perivenosos se expresan todas y cada una de las isoformas (figura 4.43). Se ha estudiado el efecto del ayuno sobre la expresión de las isoformas y no se ha visto ninguna diferencia significativa entre ellas, probablemente porque el umbral de detección de la técnica empleada es muy limitado (figura 4.44).

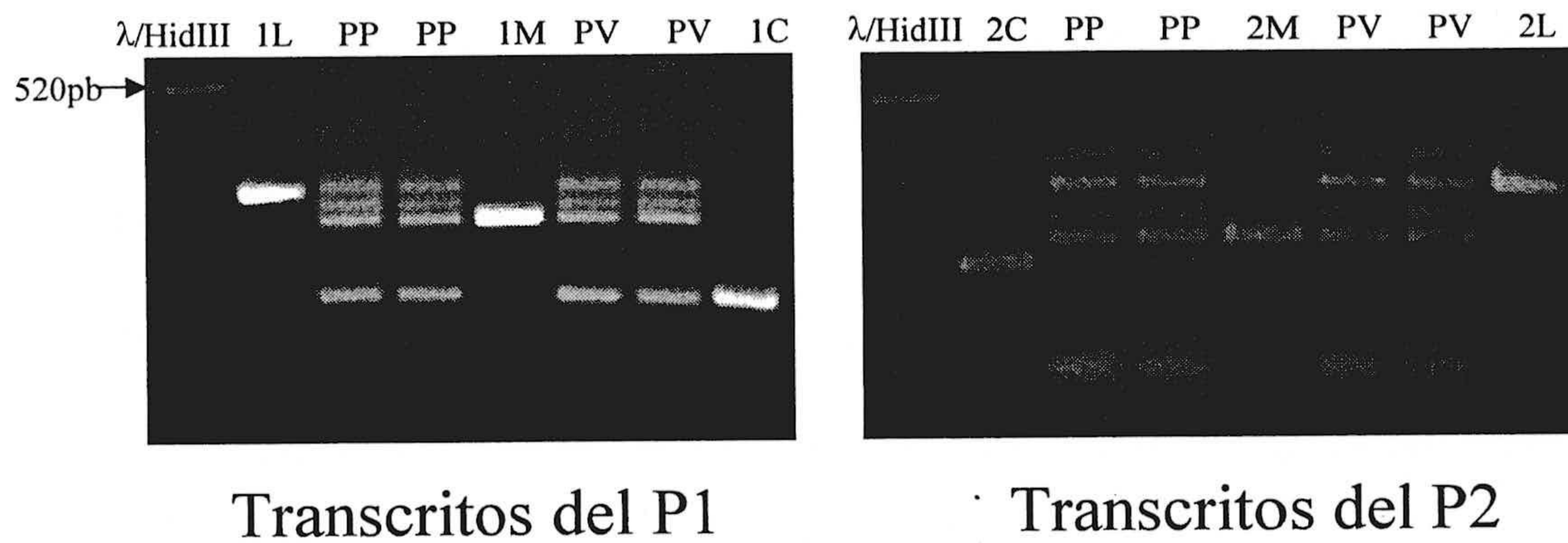


Figura 4.43.- Expresión de isoformas de los 5'-UTRs de la piruvato carboxilasa en hepatocitos periportales y perivenosos. Las muestras amplificadas por RT-PCR por duplicado se han separado en geles de agarosa al 2%. Para mostrar la identificación de las bandas se han corrido en paralelo con muestras amplificadas a partir de las isoformas clonadas en pGEM-T.

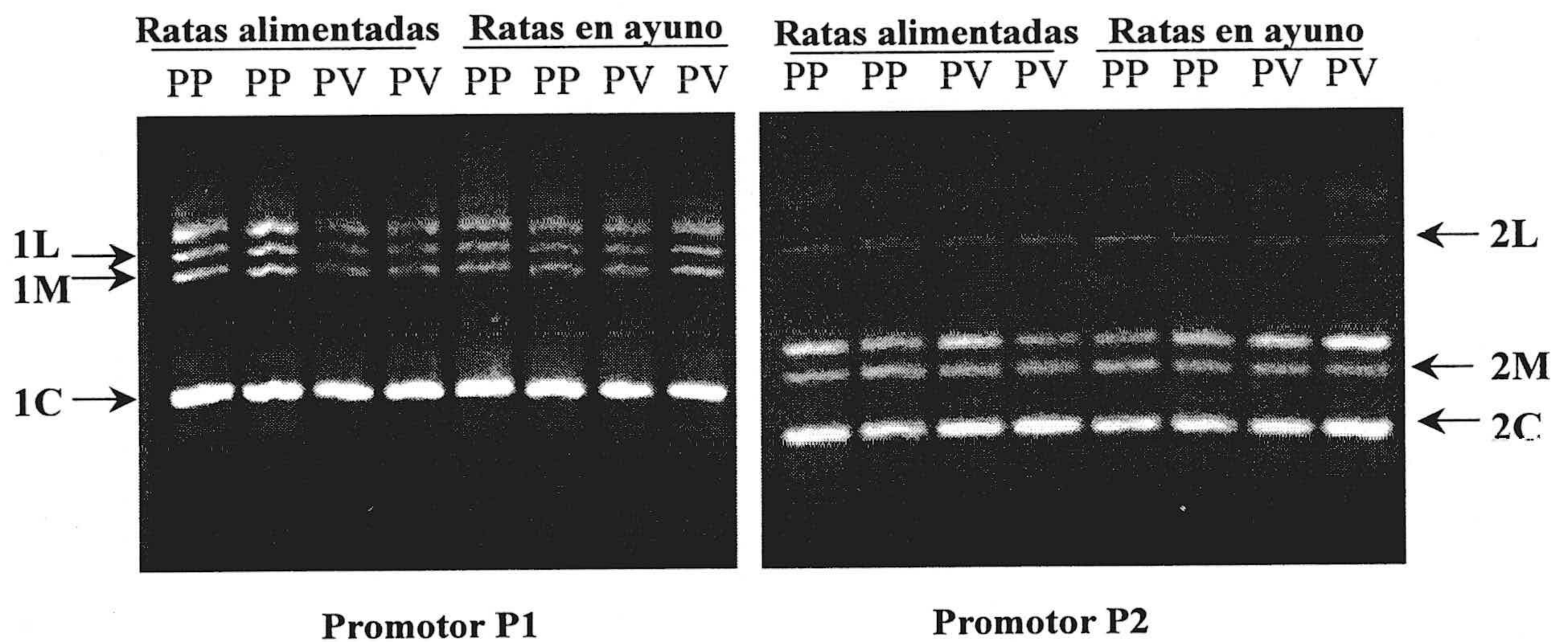
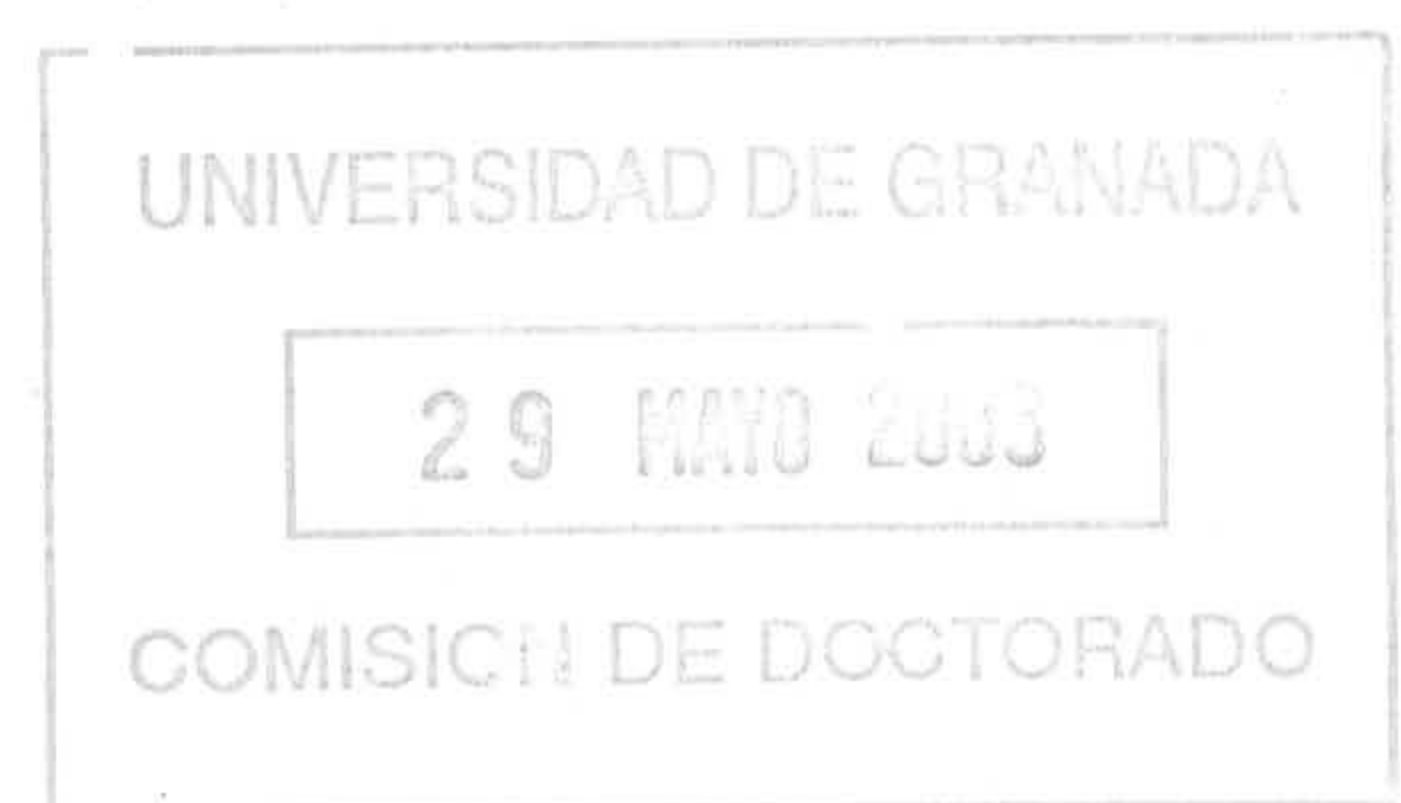


Figura 4.44.- Efecto del ayuno sobre la expresión de isoformas de los 5'-UTRs de la piruvato carboxilasa en hepatocitos periportales y perivenosos. Las muestras amplificadas por RT-PCR por duplicado se han separado en geles de agarosa al 3%.

V. DISCUSIÓN



VI. DISCUSIÓN

La regulación de la expresión de la Piruvato Carboxilasa es un punto importante de regulación del metabolismo intermediario. El hecho de que el enzima tenga una función general de relleno anaplerótico en numerosos tejidos, así como funciones en rutas metabólicas específicas como la gluconeogénesis en hígado y riñón, hace suponer que exista un control diferencial de su expresión en función de los tejidos y/o papel fisiológico del enzima. Así nuestro grupo ha demostrado un comportamiento diferencial del enzima en hígado y riñón en situaciones como la diabetes, desarrollo perinatal o intoxicación con tetracloruro de carbono (Salto *et al* 1996, 1999).

En respuesta a estas funciones complejas del enzima, la expresión del mismo se encuentra muy regulada. Por una parte, como se recoge en la sección de antecedentes, el enzima se encuentra modulado por una serie de efectores alostéricos, fundamentalmente el acetil-CoA. Por otra parte, en gran medida, el control de la actividad de este enzima se regula mediante el control de la síntesis del mismo. Ha sido descrita que la expresión de la piruvato carboxilasa se encuentra regulada tanto transcripcionalmente como post-transcripcionalmente. En la regulación transcripcional de la expresión génica hay que destacar que el gen de la piruvato carboxilasa se encuentra controlado por dos promotores, uno proximal al que se le ha asignado un papel relevante en situaciones metabólicas en las que existen un incremento en los niveles de enzima, fundamentalmente gluconeogénesis y lipogénesis, y un segundo promotor, en una posición distal del gen, al que se le ha atribuido un papel importante en el mantenimiento de unos niveles transcripcionales basales en las situaciones en que es necesario un relleno anaplerótico del ciclo de Krebs.

El mecanismo más importante de regulación de la expresión a nivel post-transcripcional es el que surge de la existencia de un *splicing* alternativo en el que diferentes exones del extremo 5' del gen se combinan entre sí para generar isoformas que difiriendo en su región 5' no traducida codifican para la misma enzima. Si consideramos que la expresión de los exones que intervienen en el *splicing* alternativo de la región 5' UTR del mensajero se encuentra controlada por uno de los dos promotores anteriormente descritos, comprenderemos que el significado de esta variabilidad génica es complejo.

Un nivel mayor aún de complejidad puede ser considerado si se tiene en cuenta que de momento se ha propuesto que las diferentes isoformas descritas del enzima, que recordemos sólo difieren en su región 5' no traducida, presentan una diferente capacidad de ser traducidas en experimentos de traducción *in vitro* y por tanto cabe pensar que estas isoformas tengan un papel importante en el control traduccional de la expresión de la Piruvato carboxilasa *in vivo*. Cúal es el mecanismo molecular de esta regulación de la traducción permanece sin ser caracterizado, aunque se ha propuesto que algunos de los exones que intervienen en la generación de la región 5' UTR tienen una fuerte estructura secundaria que puede controlar la eficiencia de traducción por el ribosoma eucariota.

El proposito de esta Tesis Doctoral es tratar de clarificar la regulación de la expresión de la Piruvato Carboxilasa y responder a una serie de preguntas que surgen de la lectura de la bibliografía. Estas preguntas podríamos enumerarlas como:

- 1.- ¿Cuántas isoformas del piruvato carboxilasa existen y cuáles son?
- 2.- ¿Qué función tiene cada una de ellas?
- 3.- ¿Cómo se expresan diferencialmente estas isoformas en situaciones fisio/patológicas?

Hemos de considerar al tratar de responder a la primera pregunta que, ya que se ha demostrado que existe variabilidad en el extremo 5' del mRNA del gen, esta variabilidad pudiera extenderse a la región codificante del mismo o a su extremo 3' no traducido. Por ello hemos abordado el estudio exhaustivo de la existencia de posibles variantes del gen en hígado y riñón de rata, tanto de las regiones no traducidas como de la región codificante.

Puesto que la secuencia de la región codificante deducida a partir del cDNA obtenido de hígado era conocida, centramos nuestro esfuerzo en clonar a partir de RNA de riñón la región codificante de nuestro enzima. Para ello a partir de RNA total se ha realizado una retrotranscripción con oligo-dT como cebador de la transcriptasa inversa y el cDNA resultante se ha amplificado mediante PCR con 3 parejas de oligonucleótidos (diseñado a partir de la secuencia conocida del cDNA de hígado) y que abarcan toda la región codificante. Los resultados obtenidos indican que existe en cada una de las reacciones realizadas una única banda amplificada. El aislamiento de estas bandas, su clonado y secuenciación nos ha permitido concluir que no existen *splicing* alternativos que afecten a la región codificante del gen, al menos en riñón de rata y que la secuencia

obtenida es idéntica a la descrita para el hígado.

Este resultado no es sorprendente si consideramos que en otras especies, como en levaduras, aunque existen dos genes que codifican para la Piruvato Carboxilasa (PYC1 y PYC2) las diferencias en estos genes se localizan fundamentalmente en sus regiones promotoras y extremos 5' no traducidos, mientras que las regiones codificantes de los mismo presentan un alto grado de homología. En rata parece que la situación es idéntica y que existen dos regiones promotoras, que controlando la expresión del gen dan lugar a moléculas de mRNA que no presentan diferencias en sus regiones codificantes. Algunas pequeñas diferencias en el comportamiento cinético e inmunológico de la piruvato carboxilasa de hígado y riñón de rata (Salto *et al.*, 1991, 1993) probablemente son debidas a modificaciones postraduccionales del enzima o asociación con otros enzimas en cada uno de estos tejidos, más que a variaciones en su estructura primaria.

El estudio de las posibles variaciones en el extremo 3' no traducido del mRNA se ha abordado mediante la técnica de RACE (Rapid Amplification cDNA Ends). En esta técnica, el RNA total de riñón y otros tejidos ha sido retrotranscrito utilizando como cebador un oligonucleótido que además de una cola de oligo-dT que contiene un adaptador. A partir del cDNA obtenido se han realizado amplificaciones mediante PCR utilizando de nuevo el mismo cebador y un oligonucleótido que hibrida en el extremo 3' de la porción codificante del cDNA de la piruvato carboxilasa. Las amplificaciones obtenidas se han separado mediante una electroforesis en agarosa, transferido a Nylon cargado positivamente e hibridadas con un oligonucleótido marcado con digoxigenina que es complementario al extremo 3' de la región codificante del gen. De esta forma ha sido posible discriminar aquellas amplificaciones inespecíficas causadas por el uso de un oligonucleótido general, oligo-dT, que es complementario a todos los mRNA retrotranscritos. De nuestros resultados se desprende que tres bandas amplificadas hibridan en este Southern-blot. El análisis de la secuencia de estas bandas indica que la de menor tamaño coincide con la secuencia descrita para el extremo 3' del mRNA de rata. Así mismo esta secuencia es la que esta descrita en la colección de secuencias EST por lo que claramente se corresponde con un lugar de poliadenilación del gen de rata. Es interesante destacar que ha sido descrita la existencia de un extremo 3' no traducido de gran longitud en el caso de la piruvato carboxilasa de pollo (Jitrapakdee *et al.* 2002). Además estos autores indican que esta región 3' no traducida tiene una fuerte estructura secundaria, lo

cual ha evitado que haya podido ser secuenciada. Nosotros en rata, fundamentalmente en riñón, encontramos una banda en nuestra amplificación que en principio podría corresponderse con un transcrito de mayor longitud. No obstante, la secuenciación de estas bandas no nos ha ofrecido resultados fiables, probablemente debido a la existencia de estructuras secundarias que han dificultado su clonado y secuenciación. Es posible que la existencia de estructuras secundarias en el extremo 3' del RNA (tal y como se ha descrito en el gen de pollo) dificultase su amplificación y/o secuenciación por lo que no puede ser descartada completamente la existencia de un transcrito de la Piruvato Carboxilasa de mayor longitud.

El estudio del extremo 5' del mRNA de la piruvato carboxilasa de rata es el que ofrece un mayor interés, ya que ha sido descrita la existencia en rata y humanos de 6 isoformas que difieren en la región 5'-UTR. Nosotros hemos abordado un doble estudio de esta región. En primer lugar hemos realizado experimentos de extensión de cebadores para tratar de dilucidar el número y el tamaño de las diferentes isoformas existentes. En segundo lugar, mediante RT-PCR, y utilizando la información de la secuencia de los diferentes exones que componen el gen, hemos estudiado qué posibles combinaciones se pueden dar mediante *splicing* alternativo de los diferentes exones conocidos.

Se han realizado dos tipos de experimentos de extensión de cebadores: En un primer caso se han empleado cebadores que hibridan en la región codificante del gen (en concreto en el exón 2), y por tanto extienden todos los transcritos generados. En una segunda aproximación se han empleado cebadores que sólo hibridan y extienden los transcritos procedentes de un solo promotor (en concreto el promotor 1, ya que se ha utilizado un oligonucleótido que hibrida en el exón 1A).

Los resultados obtenidos en ambas aproximaciones experimentales son difíciles de interpretar ya que se extienden multitud de bandas tanto en las muestras procedentes de hígado como de riñón. No obstante es más fácil intentar abordar el estudio de los experimentos de extensión de cebadores realizados utilizando el oligonucleótido que extiende sólo aquellas isoformas que contengan el exón 1A. En principio cabe esperar de esta extensión que se obtengan únicamente dos bandas, de 165 y 183 bases y que corresponderían a las isoformas que en su región 5' UTR presentan los exones 1B + 1A o bien los exones 1BB' + 1A.

El análisis de nuestros resultados nos indica que los productos mayoritarios que se extienden en esta retrotranscripción son bandas de un tamaño aproximado a 80 bases. Este resultado indica la existencia de fuertes estructuras secundarias que conducen a una prematura terminación de la transcripción. Aunque se han realizado experimentos de extensión a 42°C utilizando AMV transcriptasa inversa, no ha sido posible evitar esta terminación prematura de la extensión (Datos no mostrados). El exón 1A se ha propuesto que tiene una fuerte estructura secundaria que dificulta la traducción del RNA mensajero que lo contiene. Esta estructura secundaria probablemente generaría extensiones de un tamaño aproximado de 70 bases que se corresponden con las terminaciones prematuras que localizamos.

El estudio de los productos de extensión en la zona entre 150 y 200 bases es sugerente. En nuestros resultados localizamos bandas de aproximadamente 160 y 180 bases que se corresponden con las isoformas descritas previamente. Más interesante es de destacar que se localizan bandas de aproximadamente 170 bases, que no correspondiéndose con ninguna de las isoformas descritas previamente sí podrían generarse mediante combianciones de los exones ya descritos para el extremo 5' UTR de nuestro gen. Así por ejemplo una combianción de exones procedentes de los dos promotores 1D + 1C + 1A nos originaría una banda de 173 bases que se ajusta bastante a la banda que encontramos en nuestras extensiones.

Finalmente se obtienen extensiones de mayor tamaño del que cabe esperar en la región entre 250 y 350 bases. Estas bandas es difícil establecer su identidad, aunque es muy significativo señalar que aparecen en todos los tejidos estudiados en los que la expresión de la piruvato carboxilasa debe ser relevante.

Por tanto, de los experimentos de extensión de cebadores es posible concluir que en el caso de las extensiones realizadas a partir de exón 1A se encuentran productos que corresponde con las isoformas ya descias, adicionalmente se obtienen productos extendidos que podrían ser reflejo de nuevas isoformas del extremo 5' UTR del gen y finalmente se confirma la posible existencia de estructuras secundarias que dificultan la extensión en el exón 1A y que pudieran tener un papel regulador de la expresión del gen.

Por tanto, a partir de estos resultados que podrían ofrecer indicios de la existencia de nuevas isoformas, hemos decidido una segunda aproximación experimental en la que partiendo de la organización génica conocida del extremo 5' UTR de rata, hemos diseñado oligonucleótidos que hibridan con el exón 2 (común a todas las isoformas al corresponder a la porción codificante) y oligonucleótidos específicos de los exones 1A y 1B que corresponden al extremo 5' de las isoformas generadas desde los promotores proximales y distales respectivamente.

Utilizando esta aproximación, se han realizado amplificaciones por PCR y los productos obtenidos se ha confirmado su identidad mediante *Southern-blot* utilizando como sonda un oligonucleótido que hibrida en el exón 2 común a todas las isoformas generadas. El primer resultado destacado es que se obtienen señales de hibridación con un número mayor de bandas del que cabría esperar, tanto en el caso del promotor 1 como en el caso del promotor 2. Por tanto, este resultado claramente apoya la existencia de más isoformas del extremo 5' UTR de la piruvato carboxilasa de las descritas.

Para confirmar este resultado, las bandas que han sido identificadas por *Southern-blot* como positivas se han aislado mediante electroforesis preparativa en agarosa y se han clonado en el vector pGEM-T. La posterior secuenciación de las bandas clonadas ha ofrecido unos resultados muy destacados. Así, el análisis de las secuencias obtenidas a partir del PCR que amplifica los productos del promotor 1, nos ha permitido identificar la presencia de secuencias del extremo 5' que se corresponden con la combinación de exones 1B B' + 1A + 2 y 1B + 2 que ya habían sido descritas. Es interesante señalar que de acuerdo con nuestros resultados, un producto de amplificación correspondiente a la isoforma generada por la unión de los exones 1BB' + 2 y que ha sido descrita previamente no hemos podido aislarla utilizando nuestra combinación de oligonucleótidos. Finalmente, y más interesante, hemos encontrado una isoforma previamente no descrita formada por la combinación de los exones 1B + 2.

En el caso del análisis de los productos amplificados en el promotor 2, es resultado obtenido es muy destacable ya que además de aplicarse las isoformas conocidas, generadas por la combinación de exones 1D + 2 o bien 1D + 1C + 2, hemos encontrado una nueva isoforma generada por la combinación de exones 1D + 1C + 1A + 2. Esta nueva isoforma, de la que ya teníamos indicios mediante experimentos de extensión de

cebadores, es muy interesante ya que se origina mediante la combinación de exones procedentes tanto del promotor 2 como el promotor 1 e incluso en ella se localiza el exón 1A al que se le ha atribuido un papel relevante en la regulación de la traducción. Por tanto, es posible que esta nueva isoforma tenga importancia en la regulación de la expresión génica de la piruvato carboxilasa tanto en hígado como en riñón de rata.

Además, el hecho de que exista esta isoforma pone en duda lo propuesto hasta el momento en el sentido de que exista una diferenciación taxativa en el uso de promotores y presencia de isoformas con funciones gluconeogénicas o lipogénicas por una parte y anapleróticas por otra. Si esta isoforma se genera por transcripción desde el promotor 2 y posterior *splicing* alternativo, aunque está utilizando el promotor anaplerótico, incluiría en su secuencia un exón correspondiente a los transcritos generados desde el promotor gluconeogénico (Exón 1A). Por tanto, hemos decidido reevaluar el papel gluconeogénico o anaplerótico de los dos promotores y las funciones que pudiesen tener cada una de las isoformas que hemos localizado.

Finalmente, una última hipótesis que cabría barajar es que esta isoforma no se hubiese generado mediante transcripción desde el promotor 2 y posterior *splicing* alternativo, sino que se hubiese generado mediante *transplicing* entre los transcritos primarios originados desde los dos promotores de forma independiente. Este mecanismo de *transplicing* es cada vez más propuesto como un proceso general de generación de variabilidad génica y en nuestro caso no cabe descartarlo completamente. De cualquier forma este mecanismo también pondría en duda la división absoluta de funciones de los dos promotores del gen.

Un último aspecto a destacar de nuestra búsqueda de nuevas isoformas, y que ha dificultado en gran medida la experimentación, ha sido que hemos encontrado para cada promotor la presencia de bandas amplificadas por PCR que aunque en geles de agarosa tienen una movilidad electroforética diferente, tras su clonado y secuenciación se comprueba que corresponden a bandas de un tamaño aparentemente inferior. Una explicación de este comportamiento es la posible existencia de varias estructuras secundarias en estas isoformas que originan dos bandas en geles de agarosa. Para confirmarlo las mismas muestras se han separado en electroforesis en poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en presencia de 8 M de urea. Esta electroforesis confirma

que la duplicidad de bandas se debe a la existencia de estructuras secundarias ya que en condiciones desnaturalizantes cada isoforma corresponde a una única banda en la electroforesis.

Es curioso señalar que mientras que si se realizan amplificaciones por PCR de plásmidos que contienen insertos de las diferentes isoformas se obtiene una única banda, es cuando se combinan varias de estas bandas cuando se produce la aparición de bandas adicionales. Por tanto y como hemos demostrado mediante combinaciones de diferentes bandas, las bandas adicionales están formadas por heterodímeros de las distintas isoformas en los que cada una de las cadenas de DNA que los forman difieren en la presencia o no de un exón. Así por ejemplo, la combinación de las isoformas 1D+1C+2 y 1D+1C+1A+2 genera una banda adicional en la que se forma un heterodímero que difiere en el exón 1A y que genera una estructura secundaria que en agarosa le origina una movilidad electroforética diferente.

Por tanto nuestros resultados de búsqueda de isoformas de la piruvato carboxilasa de rata nos hacen concluir que existen isoformas nuevas, tanto del promotor 1 como del promotor 2, algunas de ellas generadas por combinación de exones procedentes de ambos promotores, lo cual pone en duda el papel de ambos promotores en la regulación de la expresión. Además estas isoformas poseen una fuerte estructura secundaria que puede influir en la regulación de la expresión génica. Por tanto, gran parte de nuestros esfuerzos han ido dirigidos a resolver estas nuevas incógnitas que se nos planteaban: ¿qué papel *in vivo* tiene cada una de las isoformas de la piruvato carboxilasa para regular la expresión génica? y ¿Cuál es el papel de cada promotor en situaciones o tejidos en los que predomine la anaplerosis o la gluconeogénesis?

Para abordar esta primera pregunta hemos diseñado un sistema de expresión en células eucariotas que nos permita analizar *in celula* el papel de cada isoforma en la expresión génica de forma individual. De hecho, hasta el momento, con algunas de las isoformas previamente descritas se han realizado experimentos de traducción *in vitro* que muestran que algunas isoformas, en las que cabe predecir que algún o algunos exones generen estructuras secundarias, tienen un nivel de traducción inferior a aquellas isoformas que presentan un extremo 5' no traducido de menor tamaño y posiblemente con una estructura secundaria más sencilla. Así por ejemplo, se ha propuesto (Jitrapakdee *et al.*

1998) que debido a la posibilidad de formarse estructuras secundarias entre el exón 1D y 1C, las isoformas que presenten ambos tienen una capacidad de traducción inferior a las isoformas que presentan sólo el exón 1D.

Nosotros hemos preferido utilizar un sistema de expresión *in celula* en el que expresamos construcciones del extremo 5'-UTR de las diferentes isoformas que hemos caracterizado junto con el inicio de la región codificante de la piruvato carboxilasa que comprende la propuesta secuencia señal de importación a la mitocondria. Estas construcciones se encuentran en fase con la región codificante de la proteína fluorescente verde (GFP), de tal manera que es posible monitorizar la expresión de nuestras construcciones y establecer su localización subcelular.

El propósito de este sistema experimental es doble, por una parte hemos pretendido confirmar que la localización subcelular de la piruvato carboxilasa es mitocondrial en todos los casos en los que se expresen nuestras isoformas. Esto adicionalmente nos indicaría que muy probablemente se estuviese utilizando en todas las isoformas el mismo codón de inicio de la traducción, lo cual implicaría la presencia de la secuencia señal de importación a la mitocondria en todos los casos. El segundo objetivo perseguido era estudiar de forma conjunta la regulación de la piruvato carboxilasa tanto a nivel de estabilidad del mRNA como a nivel de la capacidad de traducción.

Los resultados obtenidos tras la transfección con nuestras construcciones de una línea celular de hepatomas de rata de mínima desviación que hemos tomado como modelo de tejido hepático, es que en todos los casos se consigue la expresión de la proteína fluorescente verde. No obstante, como señalaremos a continuación los niveles de expresión son considerablemente diferentes entre isoformas. La localización de la proteína verde en todas nuestras construcciones es mitocondrial y claramente diferente de la localización que se obtiene cuando se realizan transfecciones con el vector pEGFP-N2 que hemos utilizado como control positivo de transfección y en la que la expresión del enzima tiene una localización citoplasmática y nuclear.

La inclusión en este vector de expresión del extremo 5' no traducido de las diferentes isoformas de la piruvato carboxilasa más el exón 2 de la misma que codifica para su secuencia señal de importación conduce a que la localización de la fluorescencia

sea mitocondrial. Esto se demuestra mediante el patrón de distribución de fluorescencia, típicamente perinuclear y en forma de una estructura arracimada así como en la completa ausencia de localización nuclear y citosólica. Adicionalmente hemos realizado experimentos de colocalización. En ellos hemos estudiado la distribución de fluorescencia procedente de nuestra proteína fluorescente verde y de la rodamina-B. La rodamina-B es un colorante catiónico que *in vivo* tiene una localización mitocondrial. Nuestros experimentos indican que tanto la fluorescencia procedente de la rodamina-B como la debida a la GFP tienen la misma localización y por tanto puede concluirse que la distribución de nuestro enzima debe ser exclusivamente mitocondrial con independencia de la isoforma que se esté expresando. Este resultado es válido tanto para las isoformas expresadas desde el promotor 1 como para aquellas cuya expresión se controla desde el promotor 2. Como ya hemos indicado esto obviamente implica que todas las formas conduzcan a la expresión de una misma proteína en la que el codón de iniciación coincida con el ya previamente descrito y que corresponde con el inicio de la secuencia señal de importación a la mitocondria.

Este resultado parece, en principio obvio, pero debemos considerar que en algunas situaciones, como el desarrollo perinatal (salto *et al.* 1999) se ha propuesto que el transporte a la mitocondria puede constituir un punto de regulación de la expresión de la piruvato carboxilasa. En segundo lugar, un análisis de la secuencia de los extremos 5' UTR de las diferentes isoformas parece indicar que existen varios posible inicios de la traducción debidos a la presencia de varios codones AUG, algunos de los cuales podrían dar lugar a proteínas con un extremo amino diferente y por tanto con una localización subcelular distinta. Finalmente, señalar que el análisis por ordenador de la presencia de motivos estructurales en el extremo 5' del mRNA de las isoformas de nuestro enzima indica que en todos los casos y solapado con el exón 2 existe una secuencia IRES (Internal Ribosome Entry Site) que al menos teóricamente podría estar controlando la eficiencia de traducción de cada isoforma y que pudiese favorecer la utilización de un codón alternativo de inicio de la traducción.

Nuestros resultados parecen indicar que, aunque todas estas hipótesis son atractivas, existe un único inicio de la traducción para todas las isoformas, y el papel de una traducción independiente de la caperuza, aunque no puede ser descartado totalmente requiere un estudio en mayor profundidad.

Aunque todas las isoformas se expresan, tal y como se confirma mediante microscopía confocal, los niveles de expresión de la proteína fluorescente verde son muy distintos entre isoformas. Si consideramos que en nuestras construcciones, la expresión de todas las isoformas se regula desde un promotor de citomegalovirus que debe originar los mismos niveles de expresión y por tanto de transcritos primarios de nuestra construcción, los diferentes niveles de expresión medidos como cantidad de fluorescencia deben corresponder a procesos post-transcripcionales, probablemente estabilidad del mRNA generado o bien capacidad de traducción de cada una de las isoformas.

La síntesis neta de proteína fluorescente verde la hemos determinado cualitativamente mediante microscopía confocal, fijando las condiciones de la microscopía de forma que sean análogas para todas las construcciones transfectadas, y de forma cuantitativa mediante citometría de flujo en la que se ha discriminado el porcentaje de transfección así como la fluorescencia media de las células transfectadas. Los resultados cualitativos como los cuantitativos son en líneas generales coincidentes, aunque debido a la muy baja expresión de algunas de las isoformas estudiadas, los valores medidos por citometría se aproximan a los valores umbrales de detección de la técnica.

De cualquier modo, los resultados indican que las isoformas 1C y 1L procedentes del promotor 1 tiene una alta eficiencia de expresión, mientras que la isoforma 1M tiene un nivel muy bajo. En el caso del promotor dos, la expresión de la isoformas 2C es elevada, mientras que las isoformas 2M y 2L tienen niveles muy reducidos. Quizás se puede indicar que la expresión de la isoformas 2M, aunque baja está por encima de la expresión de las isoformas 2L de su promotor y 1M del promotor proximal.

Para intentar dilucidar a qué se deben estos diferentes niveles de expresión, hemos cuantificado en estas transfecciones la cantidad de mRNA correspondiente a las distintas isoformas. Esta cuantificación se ha realizado por Northern-blot utilizando una sonda correspondiente a la secuencia codificante de la proteína fluorescente verde y los resultados se han normalizado con una sonda de la subunidad ribosomal mitocondrial 12S. También ha sido tenido en cuenta el porcentaje de transfección de cada una de las construcciones que hemos determinado mediante citometría de flujo.

Nuestros resultados indican que excepto en un caso, existe un paralelismo entre los niveles de mRNA y la fluorescencia detectada. Es decir, existe un paralelismo entre mRNA y cantidad de proteína expresada. Es el caso de las isoformas 1C, 1M y 1L del promotor 1 y las isoformas 2C y 2M del promotor 2. Para estas isoformas debemos concluir por tanto que la regulación de la expresión de las mismas tiene lugar post-transcripcionalmente, muy probablemente a nivel de la estabilidad del mRNA generado. Podemos concluir que estas isoformas presentarán diferentes estructuras secundarias en su extremo 5' UTR que producirán o no una rápida desestabilización y degradación del mismo.

Este resultado no está de acuerdo con lo previamente descrito, en el que se asociaba mayoritariamente la regulación de las distintas isoformas a un efecto del extremo 5' UTR sobre la capacidad de traducción. Debemos de considerar que los experimentos descritos en la bibliografía son experimentos de traducción *in vitro* y que aunque es probable que los extremos 5' UTR de estas isoformas controlen en parte la eficiencia de traducción, nuestros resultados indican que su mayor efecto es sobre la estabilidad del mRNA.

Sorprendentemente, nuestros resultados indican que existe una importante excepción en el comportamiento de las isoformas. Así, la isoforma 2L, aquella formada por una combinación de exones procedentes de los dos promotores, aunque presenta niveles de mRNA muy elevados, tiene una expresión de proteína medida como intensidad de fluorescencia muy baja. Por tanto, en esta isoforma cabe concluir que el principal mecanismo de regulación de su expresión es a nivel traduccional. Quizás el comportamiento único de esta isoforma pueda correlacionarse con los aspectos diferenciales que presenta con respecto a las otras isoformas ya que combina en su extremo 5' UTR exones procedentes de ambos promotores e incluso es posible que se haya generado a partir de un proceso de *transplicing* entre transcritos primarios generados desde el promotor distal y el proximal.

Las bases moleculares del comportamiento que hemos observado son difíciles de determinar, aunque un análisis de la estructura secundaria del extremo 5' UTR de las isoformas estudiadas puede ofrecer alguna indicación. Así, mientras que existen notables diferencias en la cantidad de mRNA y proteína entre las isoformas 1M y 1L, estructuralmente sólo se diferencian en la presencia o ausencia de 18 bases

correspondientes al exón 1B'. Obviamente estas bases deben tener un papel preponderante en la estabilidad del mRNA.

En el caso de la isoforma 2L, la comparación de los niveles de mRNA y proteína con la isoforma 2M indica que la presencia del exón 1A tiene un notable efecto sobre la capacidad de traducción de la isoforma 2L mientras que al mismo tiempo produce una estabilización de la cantidad de mRNA de la isoforma. Por tanto este exón tiene un efecto bifuncional sobre la estabilidad y eficiencia de traducción de las isoformas que lo presentan.

En conclusión, nuestros experimentos in celula demuestran que la región 5' UTR del gen de la piruvato carboxilasa tiene un papel complejo sobre la regulación de la expresión génica. Para cada promotor existe al menos una isoforma de este extremo que tiene unos niveles elevados de estabilidad y capacidad de traducción (Isoformas 1C y 2C), mientras que el resto de isoformas generamos producen un menor nivel de proteína ya sea por un claro efecto sobre la estabilidad del mRNA o bien sobre la capacidad de traducción del mismo (Isoforma 2L).

Cual es la importancia biológica de estas isoformas con una baja capacidad de expresión es difícil de determinar. No obstante, hemos intentado conocer la distribución tisular de estas isoformas para tratar de establecer si su expresión se circunscribe a ciertos tipos de tejidos en los que se pueda asociar la aparición de isoformas con el papel que clásicamente se ha atribuido al enzima en cada uno de estos tejidos.

Así hemos seleccionado tejidos como hígado y riñón en los que se le ha atribuido a la piruvato carboxilasa un papel fundamentalmente gluconeogénico. En contraste, la expresión del enzima en tejidos como cerebro o músculo se considera que tiene una función anaplerótica de relleno del ciclo de Krebs y finalmente, en tejido adiposo ha sido claramente establecido que la piruvato carboxilasa interviene de forma activa en la lipogénesis. Además de realizar el estudio de la expresión de isoformas de la piruvato carboxilasa en estos tejidos en condiciones basales, hemos tratado de dilucidar si el ayuno tiene algún efecto en el patrón de expresión de las mismas. Cabría esperar que el ayuno produjese un incremento de la expresión del enzima en tejidos gluconeogénicos, disminuyera la expresión del mismo en tejido adiposo al bloquearse por ayuno la

lipogénesis y tendría un efecto variable en tejidos en los que el enzima tiene un papel anaplerótico.

Para confirmar estas expectativas, en una primera aproximación, hemos estudiado la cantidad de mRNA mensajero de la piruvato carboxilasa en estos tejidos tanto en condiciones basales como en el ayuno.

Como se indica a lo largo de los resultados, la cuantificación de RNA mensajero se ha realizado utilizando ambos tipos de sondas ya que aunque la normalización con respecto a la β -actina ha sido ampliamente utilizada en la bibliografía, cada vez es más patente que se producen variaciones entre tejidos y con el ayuno o diabetes en la expresión de la misma. Como alternativa hemos seleccionado para normalizar nuestros resultados la expresión de RNA ribosomal 12S de la mitocondria, que además de presentar quizás un menor grado de variabilidad, corresponde con la misma localización subcelular que el destino final de nuestro enzima.

De cualquier manera, en condiciones basales el máximo nivel de expresión de la piruvato carboxilasa se produce en hígado, seguido de riñón, cerebro y tejido adiposo. Este resultado se obtiene tanto cuando se normaliza la expresión con la de la β -actina, como cuando se normaliza con una sonda correspondiente a la 12S del ribosoma mitocondrial. Este resultado destaca el papel gluconeogénico del enzima en hígado y riñón en los que se obtienen los mayores niveles de transcripción del enzima.

El ayuno, como cabría esperar, tiene un notable efecto en la cantidad de mRNA de la piruvato carboxilasa en los tejidos, así en hígado y en menor medida en riñón se produce un considerable aumento de su expresión ajustándose al papel gluconeogénico de nuestro enzima, mientras que en tejido adiposo existe una significativa disminución de la cantidad de mRNA del enzima en respuesta al ayuno y a la anulación de la lipogénesis en esta situación metabólica.

Por tanto, del análisis de nuestros resultados cabe concluir que la piruvato carboxilasa en hígado y riñón se ajusta a su función gluconeogénica, mientras que en tejido adiposo su patrón de respuesta es típicamente lipogénico. En cerebro el comportamiento es más difícil de clasificar ya que por una parte debemos de considerar que probablemente el

enzima tenga un papel de relleno anaplerótico, pero también intervenga en procesos de biosíntesis de neurotransmisores como el GABA. De cualquier manera, en cerebro nuestros resultados muestran que el ayuno tiene un efecto pequeño en la variación de los niveles de mRNA del enzima.

El siguiente paso a abordar es el estudio de la expresión diferencial de cada una de las isoformas de la piruvato carboxilasa en estos tejidos. Una técnica de elección para ellos sería la extensión de cebadores, una técnica cuantitativa que debiera permitirnos diferencial entre isoformas. No obstante como ya hemos señalado anteriormente, la existencia de estructuras secundarias fuertes en la región 5' UTR del mRNA dificulta sobremanera el análisis de los resultados mediante esta técnica. Lo mismo sucede en el caso de la técnica de RPA. Cuando hemos realizado esta técnicas (resultados no mostrados), probablemente a causa de la estructura secundaria del mRNA del gen, hemos obtenido hibridaciones en medio líquido parciales que han dado lugar a la protección de fragmentos de manera incompleta y que por tanto es muy difícil de identificar mediante la asignación de tamaños.

Por todo lo anterior, nos ha quedado disponible como técnica la identificación de la expresión de isoformas del extremo 5' UTR del mRNA de la piruvato carboxilasa mediante RT-PCR. Esta técnica nos ofrecía la ventaja de utilizar elevadas temperaturas de hibridación que minimizaban en parte el efecto de la estructuras secundarias del cDNA generado así como una elevada eficiencia de amplificación de los transcritos presentes en nuestras muestras. Un serio inconveniente de la técnica e la dificultad de cuantificación de los resultados, debido a la no linealidad de la reacción de amplificación por PCR, y la poca sensibilidad a la hora de diferenciar entre muestras de concentración de cDNA parecidas.

Como una primera aproximación para el análisis de la expresión de isoformas en cada tejido ha sido la realización de un RT-PCR en el que se han utilizado como oligonucleótidos dos pareja de cebadores que amplifican los exones 1B y 1D. Puesto que todos los transcritos generados desde el promotor 1 contienen el exón 1B y todos los generados desde el promotor 2 contienen el exón 1D, este RT-PCR nos permite cuantificar en su conjunto la expresión de isoformas reguladas por el promotor distal o proximal.

El análisis de los resultados obtenidos con esta técnica en los diferentes tejidos en condiciones basales nos ofrece unos resultados interesantes. Cuando realizamos el cociente

entre los transcritos generados por el promotor 1 y los generados por el promotor 2, obtenemos valores de aproximadamente 0,8 para hígado y riñón, 0,7 para cerebro y valores de 1,3 en el caso de tejido adiposo. Por tanto, en cada uno de estos tejidos aparentemente se produce un uso diferencial de promotores, predominando el promotor 1, lipogénico, en tejido adiposo y existiendo un mayor balance entre ambos promotores en el caso de cerebro hígado y riñón.

Si este resultado fuese válido, en ayuno, el balance entre el uso del promotor distal y el promotor proximal debería alterarse de forma considerable en tejido adiposo que es donde se produce una sensible disminución de la expresión del mRNA total del enzima. Nuestros resultados parecen indicarlo ya que se obtiene un cociente entre ambos promotores de aproximadamente 0,9, lo que correspondería con una sensible disminución de la expresión desde el promotor 1, que como ya hemos indicado ha sido considerado lipogénico.

Aunque estos resultados parecen significativos deben ser tomados con una cierta precaución, en parte debido a la inherente falta de sensibilidad de la técnica empleada y en parte debido al hecho de que aunque podamos atribuir un papel lipogénico al promotor 1, lo cierto es que en todos los tejidos estudiados encontramos expresión desde ambos promotores, no pudiendo circunscribir la activación de un promotor concreto a un determinado tejido o función de forma exclusiva. Así por ejemplo, en hígado y riñón, el aumento de expresión que hemos detectado mediante *Northern-blot*, no se traduce en un cambio sensible en el uso preferencial de promotores y el cociente que con nuestra técnica de RT-PCR podemos establecer para estos tejidos en situaciones basales y de ayuno es sensiblemente semejante en todos los casos, con valores en torno a 0,7 y 0,8.

Una prueba de la dificultad de asignar un papel determinante a una isoforma en una situación metabólica concreta se nos muestra cuando analizamos mediante RT-PCR la expresión de isoformas individuales del extremo 5' UTR de nuestro mRNA. Los resultados obtenidos nos indican que las seis isoformas que hemos caracterizado en la primera parte de esta Tesis se expresan en todos los tejidos y condiciones estudiados y que por tanto a priori no existe una expresión diferencial de isoformas. Es posible que existan moderadas diferencias en la expresión de cada una de ellas entre tejidos, pero la poca sensibilidad de la única técnica disponible para su estudio, el RT-PCR, dificulta sobremanera su análisis.

No obstante, y como un intento más de caracterización de la expresión de isoformas hemos abordado el estudio de la regulación de la expresión de la piruvato carboxilasa en hepatocitos periportales y perivenosos. Así, en colaboración con la profesora Begoña Ochoa de la Universidad del País Vasco hemos estudiado cual es el patrón de expresión de la piruvato carboxilasa en estos dos tipos de hepatocitos y como el ayuno puede tener un efecto de modulación sobre la expresión de nuestro enzima en esas dos poblaciones aisladas de células hepáticas.

El ayuno experimental induce en las ratas una moderada acidosis metabólica que previamente ha sido descrito que tiene notables efectos sobre la compartimentación celular de la gluconeogénesis y síntesis de cuerpos cetónicos en hepatocitos periportales y perivenosos (Burns et al., 1999). Así, en hígados de ratas ayunadas, la gluconeogénesis a partir de lactato se produce casi exclusivamente en los hepatocitos periportales, mientras que en los hepatocitos perivenosos existe una cierta tasa de glucolisis. Por contra, se ha encontrado que en la diabetes y el ayuno, la situación se invierte teniendo un papel más destacado en la producción neta de glucosa la región perivenosa en lugar de la periportal.

En nuestro modelo experimental se ha inducido un ayuno moderado, que aunque produce un aumento de los cuerpos cetónicos y una bajada del pH en sangre, no llega a desencadenar una acidosis metabólica severa que bloquee la producción hepática de glucosa (Burns et al. 1999). En estas condiciones, la cantidad total de mRNA correspondiente a la piruvato carboxilasa se ha determinado mediante *Northern-blot* y los resultados se han normalizado con el uso de sondas de β -actina o RNA ribosomal mitocondrial 12S.

En ambos casos, el ayuno tanto en la región periportal y perivenosa conduce a un incremento moderado de la expresión de la piruvato carboxilasa como queda reflejado por el aumento de los niveles de mRNA del enzima. Puesto que en la zona perivenosa, en nuestras condiciones experimentales, el aumento de la expresión de la piruvato carboxilasa no debe ir paralelo a un aumento significativo de la gluconeogénesis, es posible que el papel del enzima en esta localización sea contribuir a una estabilización del metabolismo ácido básico favoreciendo la síntesis de glutamina a nivel hepático a partir de α -ceto-glutarato. Es decir en esta situación el enzima tendría un marcado papel anaplerótico del

ciclo de Krebs.

Por contra, en hepatocitos periportales, el incremento en los niveles de mRNA de la piruvato carboxilasa debe corresponderse con el aumento descrito en esta situación para la gluconeogénesis a partir de lactato y por tanto se podría asignar al enzima un papel plenamente gluconeogénico.

Cuando analizamos la expresión de los promotores proximal y distal de la piruvato carboxilasa mediante RT-PCR como hemos descrito previamente, nos encontramos con una situación muy diferente de la que cabría esperar. Así tanto en hepatocitos periportales y perivenosos en una situación control se produce el mismo cociente de expresión entre el promotor 1, supuestamente gluconeogénico, y el promotor 2, presumiblemente anaplerótico. Es más, cuando analizamos este cociente en una situación de ayuno, tampoco encontramos ninguna diferencia entre los hepatocitos periportales y perivenosos. Es decir, nuestros resultados de expresión mediante Northern-blot y RT-PCR nos indican que aunque existe una zonación de la gluconeogénesis hepática, esta no se corresponde con una zonación de nuestro enzima, ya que induciéndose en ambas poblaciones de hepatocitos la síntesis de mRNA, no puede asignarse a un incremento de la actividad de uno de los dos promotores del enzima en concreto.

A la vista de estos resultados, y como cabría esperar, el estudio individualizado de cada una de las isoformas no arroja ninguna diferencia significativa entre hepatocitos periportales o perivenosos o bien entre las condiciones de ayuno y alimentación. Es decir las seis isoformas descritas se expresan en ambas poblaciones de hepatocitos en todas las condiciones analizadas.

Por tanto, de nuestros resultados de análisis de la expresión de las isoformas de la piruvato carboxilasa en tejidos, podemos concluir que desde nuestro punto de vista no es correcto asignar al promotor proximal un papel exclusivamente gluconeogénico y al promotor distal un papel relevante en situaciones en las que se requiera una anaplerosis. Nuestros resultados nos indican que la realidad es que ambos promotores se inducen de una forma coordinada en tejidos como hígado y riñón en los que la inducción de la piruvato carboxilasa en respuesta a la necesidad de un incremento de la capacidad gluconeogénica se encuentra modulada por ambos promotores. En tejido adiposo, por

contra, la situación sí puede considerarse diferente y quizás sí se puede confirmar un papel activo del promotor 1 en la regulación de la lipogénesis.

Finalmente y como conclusión, señalar que nuestros resultados dibujan un panorama en el que la regulación de la expresión de la piruvato carboxilasa es muy compleja. Esta complejidad se basa en la existencia de múltiples isoformas, algunas de ellas generadas por la combinación de exones procedentes de los dos promotores del gen. Además existen, en vista de nuestros resultados, dos mecanismos que parecen regular la expresión génica. Un primer mecanismo en el que el extremo 5' UTR parece influir en la estabilidad del mRNA de un conjunto de isoformas y un segundo mecanismo en el que el extremo 5' ejerce un notable efecto sobre la capacidad de traducción de los mRNAs que lo presentan. Finalmente, parece que nuestros resultados van en contra de una asignación de funciones a la expresión desde los promotores proximal y distal, y que por tanto la regulación de la expresión del enzima en múltiples tejidos y situaciones corresponde de una manera coordinada a ambos promotores. Cómo se da esta coordinación y en que fenómenos moleculares se basa serán objeto de posteriores estudios.

VI. CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

1.- *Caracterización de la variabilidad génica de la piruvato carboxilasa.* De nuestros resultados se desprende que mientras que existe un alto grado de variabilidad génica en la región 5'-UTR de la piruvato carboxilasa de rata, no existen variantes ni en la región codificante del gen ni en el extremo 3'-UTR. El análisis de la variabilidad de la región 5'-UTR nos indica que existen 6 isoformas del mRNA, dos de ellas previamente no descritas. De estas nuevas isoformas, una de ellas se genera por combinación de exones regulados por los promotores proximal y distal del gen.

2.- *Determinación de la función de cada isoforma de la piruvato carboxilasa en la regulación de la expresión génica.* Mediante experimentos en los que se han transfectado a células eucarióticas en cultivo diversas construcciones que codifican para proteínas de fusión entre el extremo 5' no traducido de cada isoforma de la piruvato carboxilasa de rata y una proteína fluorescente verde, cabe concluir que todas las isoformas presentan un patrón de expresión mitocondrial que corresponde con un único inicio de la traducción. No obstante, el nivel de expresión de estas isoformas es muy diferente. El análisis de los niveles de proteína producidos en estos ensayos y la cantidad de mRNA existente, indican que para cada isoforma existe un mecanismo principal de regulación de la expresión. Estos mecanismos son aquellos que afectan a la estabilidad del mRNA sintetizado o bien aquellos que implican una modificación de la eficiencia de traducción.

3.- *Determinar el patrón de expresión de isoformas de la piruvato carboxilasa en diferentes tejidos y situaciones fisiológicas.* Del análisis del patrón de expresión de las diferentes isoformas del extremo 5'-UTR de la piruvato carboxilasa, cabe concluir que la regulación de la expresión de la piruvato carboxilasa es muy compleja. No hemos podido determinar que exista una distribución de isoformas tejido específica, de manera que no podemos todavía asignar una función concreta a los promotores proximal y distal del gen. Al encontrar que todas las isoformas se expresan en todos los tejidos estudiados, tanto en situación de alimentación como durante el ayuno, cabe concluir que la regulación de la expresión del enzima corresponde de manera coordinada a ambos promotores.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Adam, P. A. J. and Haynes, R. C. (1969) Control of hepatic mitochondrial carbon dioxide fixation by glucagon, epinephrine and cortisol. *J. Biol. Chem.* **44**: 6444-6450.
- Agius, L. and Alberti, K. G. M. M. (1985) Regulation of flux through pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **152**: 699-707.
- Ahmad, F., Ahmad, P. M. and Mendez, A. (1986) Rat liver pyruvate carboxylase. Purification, detection and cuantification of apo and holo forms by immuno-blotting and by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Biochem. J.* **236**: 527-533.
- Allan, E. H. and Titheradge, M. A. (1984) Effect of treatment of rats with dexamethasone in vivo on gluconeogenesis and metabolite compartimentation in subsequently isolated hepatocytes. *Biochem. J.* **219**: 117-123.
- Allan, E. H., Chisholm, A. B. and Titheradge, M. A. (1983) Hormonal stimulation of mitochondrial pyruvate carboxylation in filipin-treated hepatocytes. *Biochem. J.* **212**: 417-426.
- Anderson, J. W. (1970) Pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase in rat intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta.* **208**: 165-167.
- apparent hysteretic properties of pyruvate carboxylase from *Rhizopus arrhizus*. *FEBS Lett.* **177**: 157-160.
- Ashman, L. K. and Keech, D. B. (1975) Sheep Kidney Pyruvate Carboxylase. Studies of the coupling of adenosine triphosphate hydrolysis and CO₂ fixation. *J. Biol. Chem.* **250**: 14-21.
- Ashman, L. K., Keech, D. B., Wallace, J. C. and Nielsen, J. (1972) Sheep kidney pyruvate carboxylase. Studies on its activation by acetyl Coenzyme A and characteristics of its acetyl Coenzyme A independent reaction. *J. Biol. Chem.* **247**: 5818-5824.
- Ashman, L. K., Wallace, J. C. and Keech, D. B. (1973) Desensitization of pyruvate carboxylase against acetyl-CoA stimulation by chemical modification. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **51**: 924-931.
- Athappilly, F. K. and Hendrickson, W. A. (1995) Structure of the biotinyl domain of acetyl-coenzyme A carboxylase determined by MAD phasing. *Structure.* **3(12)**: 1407-1419.
- Attwood, P. V. and Keech, D. B. (1984) Pyruvate Carboxylase. *Curr. Tops. Cell. Reg.* **23**: 1-55.
- Attwood, P. V., Mayer, F. and Wallace, J. C. (1986) Avidin as a probe of the conformational changes induced in pyruvate carboxylase by acetyl-CoA and pyruvate. *FEBS Lett.* **203**: 191-196.
- Bachmann, S., Sakai, T. and Kriz, W. (1985) Nephron and collecting duct structure in the kidney rat. In Urinary system (T. C. Jones, U. Mohr and R. D. Hunt Eds.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg , New York, London, Paris, Tokyo. pp 3-24.
- Bailly, C., Imbert-Teboul, M. Chabardes, D., Hus-Citharel, A., Montegut, J., Clique, A. and Morel, F. (1980) The distal nephron of rat kidney: A target site for glucagon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 3422-3424.
- Baines, A. D. and De Rouffignac, C. (1969) Functional heterogeneity of nephrons. II. Filtration rates, intraluminal flow velocities and functional water reabsorption. *Pfluger Arch.* **308**: 260-276.

- Bais, R. and Keech, D. B. (1972) Magnesium ion (Mg^{2+}) activation of sheep kidney pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **247**: 3255-3261.
- Ballard, F. J. and Hanson, R. W. (1967) The citrate-cleavage pathway and lipogenesis in rat adipose tissue; replenishment of oxalacetate. *J. Lipids Res.* **8**: 73-79.
- Ballard, F. J. and Hanson, R. W. (1967) Phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in developing rat liver. *Biochem. J.* **104**: 866-871.
- Ballard, F. J. and Hanson, R. W. (1969) Purification of phosphoenolpyruvate carboxykinase from the cytosol fraction of rat liver and the immunochemical demonstration of differences between this enzyme and the mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* **244**: 5625-5630.
- Ballard, F. J., Hanson, R. W. and Reshef, L. (1970) Immunochemical studies with soluble and mitochondrial pyruvate carboxylase activities from rat tissues. *Biochem. J.* **119**: 735-742.
- Bannister, D. W. (1976) The biochemistry of fatty liver and kidney syndrome. Biotin-mediated restoration of hepatic gluconeogenesis in vitro and its relationship to pyruvate carboxylase activity. *Biochem. J.* **156**: 167-173.
- Barden, R. E. and Scrutton, M. C. (1974) Pyruvate carboxylase from chicken liver. Effects of univalent and divalent cations on catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **249**: 4829-4838.
- Barden, R. E., Fung, C. H., Utter, M. F. and Scrutton, M. C. (1972) Pyruvate carboxylase from chicken liver. Steady state kinetic studies indicate a two-site ping-pong mechanism. *J. Biol. Chem.* **247**: 1323-1333.
- Barden, R. E., Taylor, B. L., Isohashi, F., Frey, W. H., Zander, G., Lee, J. C. and Utter, M. F. (1975) Structural properties of pyruvate carboxylase from chicken liver and other sources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 4308.
- Barrit, G. J. (1985) in Pyruvate Carboxylase (Keech, D. B. and Wallace, J. C. Eds.), pp. 141-177, CRC Series in Enzyme Biology, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Barrit, G. J., Keech, D. B. and Ling, A. M. (1966) Apparent cooperative effect of acetyl-CoA on sheep kidney pyruvate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**: 476-481.
- Barrit, G. J., Zander, G. L. and Utter, M. F. (1976) In Gluconeogenesis: its regulation in mammalian species. John Wiley & Sons, New York pp 3-46.
- Bartels, P. A. and Sestoft, L. (1980) Thyroid hormone-induced changes in gluconeogenesis and ketogenesis in perfused rat liver. *Biochem. Biophys. Acta* **633**: 56-67.
- Battaglia, F. C. and Meschia, G. (1978) Substrates of fetal metabolism. *Physiol. Rev.* **58**: 499-527.
- Benoy, M. P. and Elliot, K. A. C. (1937) The metabolism of lactic and pyruvic acids in normal and tumor tissue. V. Synthesis of carbohydrate. *Biochem. J.* **31**: 1268-1275.
- Berger, M. and Wood, H. G. (1975) Purification of the subunits of transcarboxylase by affinity chromatography on avidin-spharose. *J. Biol. Chem.* **250**: 927-933.
- Bergmeyer, H. and Bernt, E. (1974) Glucose determination with glucose oxidase and peroxidase. In Methods of enzymatic analysis (H. U. Bergmeyer Ed.). Verlag Chemie Academic Press Inc. New York and London pp 1205-1212.
- Bloom, S. J. and Johnson, M. J. (1961) The pyruvate carboxylase of *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* **237**: 2718-2720.
- Bottger, I., Kriegel, H. and Wieland, O. (1970). Fluctuation of hepatic enzymes important in glucose metabolism in relation to thyroid function. *Eur. J. Biochem.* **13**: 253-257.
- Bottger, I., Wieland, O., Brdiczka, D. and Pette, D. (1969) Intracellular localization of pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver. *Eur. J. Biochem.* **8**: 113-119.

- Bradford, M. (1986) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bramwell, M. E. (1987) Characterization of biotinylated proteins in mammalian cells using ¹²⁵I-streptavidin. *J. Biochem. Biophys. Methods* **15**: 125-132.
- Brennan, W. A. and Aprille, J. R. (1984) Regulation of hepatic gluconeogenesis by rapid compartmentation of mitochondrial adenine nucleotides in the newborn rabbit *Comp. Biochem. and Physiol.* **77B**: 35-39.
- Brennan, W. A. and Aprille, J. R. (1985) Regulation of hepatic gluconeogenesis in newborn rabbit: Controlling factor in presuckling period *Am. J. Physiol.* **249**: 498-505.
- Brewster, N. K.; Val, D. L.; Walker, M. E., and Wallace, J. C. (1994) Regulation of pyruvate carboxylase isozyme (PYC1, PYC2) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and nonfermentative growth. *Arch Biochem Biophys.* **311(1)**: 62-71.
- Bridgeland, E.S. and Jones, K. M. (1967) Formation of dicarboxylic acids and phosphoenolpyruvate in *Arthrobacter globiformis*. *Biochem. J.* **104**: 9P-10P.
- Browner, M. F.; Taroni, F.; Sztul, E., and Rosenberg, L. E. (1989) Sequence analysis, biogenesis, and mitochondrial import of the alpha-subunit of rat liver propionyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.* **264(21)**: 12680-5.
- Brownsey, R. W., Hughes, W. A., Denton, R. M. and Mayer, J. (1977) Demonstration of the phosphorylation of acetyl-coenzyme A carboxylase within intact rat epididymal fat cells. *Biochem. J.* **168**: 441-445.
- Bryla, J., Harris, E. J. and Plumb, J. A. (1977) The stimulatory effect of glucagon and dibutiril cyclic AMP on ureogenesis and gluconeogenesis in relation to the mitochondrial ATP content. *FEBS Lett.* **80**: 443-447.
- Burch, H. B., Narins, R. G., Chu, C., Fagioli, S., Choi, S., Mccarthy, W. and Lowry, O. H. (1978) Distribution along the rat nephron of three enzymes of gluconeogenesis in acidosis and starvation. *Am. J. Physiol.* **235**: F246-F253.
- Burns, S.P., Cohen, R.D., Iles, R.A., Bailey, R.A., Desai, M., Germain, J.P. and Going, T.C.H. (1999) Zonation of gluconeogenesis, ketogenesis and intracellular pH in livers from normal and diabetic ketoacidotic rats : evidence for intralobular redistribution of metabolic events in ketoacidosis. *Biochem. J.* **343**: 273-280
- Carbone MA, Mackay N, Ling M, Cole DE, Douglas C, Rigat B, Feigenbaum A, Clarke JT, Haworth JC, Greenberg CR, Seargeant L, Robinson BH. (1998) Amerindian pyruvate carboxylase deficiency is associated with two distinct missense mutations. *Am J Hum Genet.* **62**: 1312-1319.
- Cazzulo, J. J. and Stoppani, A. O. (1968) The regulation of yeast pyruvate carboxylase by acetyl-coenzyme A and L-aspartate. *Arch Biochem Biophys.* **127(1)**:563-567.
- Cazzulo, J. J. and Stoppani, A. O. M. (1967) Purification and properties of pyruvate carboxylase from baker's yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **121**: 596-608.
- Cazzulo, J. J., Sundaram, T. K. and Kornberg, H. L. (1969) Regulation of pyruvate carboxylase formation from the apoenzyme and biotin in a thermophilic *Bacillus*. *Nature* **223**: 1137-1338.
- Cazzulo, J. J., Sundaram, T. K. and Kornberg, H. L. (1970) Properties and regulation of pyruvate carboxylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Proc. Roy. Soc. Ser. B* **176**: 1-19.
- Clark, M. G., Bloxham, D. P., Holland, P. C. and Lardy, H. A. (1974) Estimation of the fructose 1,6-diphosphatase-fosfructokinase substrate cycle and its relationship to gluconeogenesis in rat liver in vivo. *J. Biol. Chem.* **249**: 279-290.

- Claus, T. H. and Pilkis, S. J. (1976) Regulation by insulin of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes *Biochim. Biophys. Acta* **421**: 246-262.
- Claus, T. H. and Pilkis, S. J. (1981) Hormonal control of hepatic gluconeogenesis. *Biochem. Actions Horm.* **181**: 209-271
- Claus, T. H., El Maghrabi, M. R., Regen, M. D., Stewart, H. B., Mcgrane, M., Kountz, P. D., Nyfeler, F., Pilkis, J. and Pilkis, S. J. (1984) The role of the fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism. *Curr. Top. Cell. Reg.* **23**: 57-86.
- Cleland, W. W. (1963) Kinetics of enzyme catalyzed reactions with two or more substrates or products. Nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta* **67**: 104-137.
- Cohen, N. D., Beegen, H., Utter, M. F. and Wrigley, N. G. (1979) A re-examination of the electron microscopic appearance of pyruvate carboxylase from chicken liver. *J. Biol. Chem.* **254**: 1740-1447.
- Cohen, N. D., Duc, J. A., Beegen, H. and Utter, M. F. (1979) Quaternary structure of pyruvate carboxylase from *Pseudomonas citronellolis*. *J. Biol. Chem.* **254**: 9262-9269.
- Cohen, N. D., Utter, M. F., Wrigley, N. G. and Barret, A. N. (1979) Quaternary structure of yeast pyruvate carboxylase: Biochemical analysis and electron microscope studies. *Biochemistry* **18**: 2197-2203.
- Cooper, A. J. and Plum, F. (1987) *Physiol. Rev.* **67**: 440-519.
- Cooper, T. G. and Benedict, C. R. (1968) Regulation of pyruvate carboxylase by coenzyme A and acyl coenzyme A thio esters. *Biochemistry* **7**: 3032-3036.
- Cortes, P., Verghese, C. P., Venkatachalam, K. K., Schoenberger, A. M. and Levin, N. W. (1980) Phosphoribosylpyrophosphate bioavailability in diabetic rat renal cortex in vivo. *Am. J. Physiol.* **238**: E341-348.
- Cronan, J. E. Jr. (1989) *coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme. *Cell.* **58(3)**: 427-429.
- Cuezva, J. M. (1986) Glucolisis y gluconeogenesis en el feto y en el neonato. In *Bioquímica perinatal.* (E. Herrera, Ed.) Fundación Ramón Areces, Madrid. pp 153-176.
- Cuezva, J. M., Burkett, E. S., Kerr, D. S., Rodman, H. M. and Patel, M. S. (1982) The newborn of diabetic rat. I. Hormonal and metabolic changes in the postnatal period. *Pediatr. Res.* **16**: 632-637.
- Cuezva, J. M., Moreno, F. J., Medina, J. M. and Mayor, F. (1980) prematurity in the rat. I. Fuels and gluconeogenic enzymes. *Biol. Neonate* **37**: 88-95.
- Cuezva, J. M., Valcarce, C. and Medina, J. M. (1985) Substrates availability for maintenance of energy homeostasis in the immediate post natal periods of the fasted newborn rat. In *The Physiological development of the fetus and newborn* (C. T. Jones and P. W. Nathanielsz, Eds.) Academic Press, London. pp 63-69.
- Chan, T. M., Bacon, C. B. and Hill, S. A. (1979) Glucagon stimulation of liver mitochondrial CO₂ fixation utilizing pyruvate generated inside the mitochondria. *J. Biol. Chem.* **254**: 8730-8732.
- Chang, A. Y. and Scheneider, D. I. (1970) Rate of gluconeogenesis and levels of gluconeogenic enzymes in liver and kidney of diabetic and normal Chinese hamster. *Biochim. Biophys. Acta* **222**: 587-592.
- Chang, L. O. (1977) The development of pyruvate carboxylase in rat liver mitochondria. *Pediatr. Res.* **11**: 6-8.
- Chapman, A. G. and Scrutton, M. C. (1978) Regulatory properties of pyruvate carboxylase from *Aspergillus nidulans*: evidence for the presence of a masked activator site. *Biochem. Soc. Trans.* **6**: 1220-1222.

- Chapman-Smith, A. and Cronan, J. E. Jr. (1999) The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *TIBS* **24**: 359-363.
- Chapman-Smith, A.; Booker, G. W.; Clements, P. R.; Wallace, J. C., and Keech, D. B. (1991) Further studies on the localization of the reactive lysyl residue of pyruvate carboxylase. *Biochem J.* **276 (Pt 3)**: 759-764.
- Chisholm, A. B., Allan, E. H. and Titheradge, M. A. (1983) Regulation of mitochondrial pyruvate carboxylation in isolated hepatocytes by acute insulin treatment. *Biochem. J.* **214**: 451-458.
- Dawson, A. G. (1977) Contribution of pH-sensitive metabolic processes to pH homeostasis in isolated rat kidney tubules. *Biochim. Biophys. Acta* **499**: 85-98.
- Decker, K. (1974) Acetyl-Coenzyme A. UV-spectrophotometric assay. In *Methods of enzymatic analysis* (H. U. Bergmeyer, Ed.), Verlag Chemie, Academic Press, London, pp 1988-1993.
- Diesterhalf, M., Shrago, E. and Sallach, H. J. (1971) Human liver phosphoenolpyruvate carboxykinase. Evidence for a separate mitochondrial and cytosol enzyme. *Biochem. Med.* **5**: 297-303.
- Dixon, M. (1953) The effect of pH on the affinities of enzymes for substrates and inhibitors. *Biochem. J.* **55**: 161-170.
- Duee, P. H., Pegorier, J.P., El Manoubi, L., Ferre, P., Bois-Joyeux, B. and Girard, J. (1986) Development of gluconeogenesis from different substrates in newborn rabbit hepatocytes. *J. Develop. Physiol.* **8**: 387-394.
- Dugal, B. S. (1973) Effect of magnesium ion (Mg^{2+}) and magnesium adenosinotriphosphate ion ($MgATP^{2+}$) on pigeon kidney pyruvate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**: 1603-1610.
- Dugal, B. S. (1973) Apparent co-operative effects of acetyl-CoA in pigeon liver pyruvate carboxylase. *FEBS Lett.* **30**: 181-184.
- Dunbar, B. S. (1987) The use of two-dimensional electrophoresis combined with immunological techniques. *BioTechniques* **5**: 218-226.
- Easterbrook-Smith, S. B., Campbell, A. J., Keech, D. B. and Wallace, J. C. (1979) The atypical velocity response by pyruvate carboxylase to increasing concentrations of acetyl-coenzyme A. *Biochem. J.* **179**: 497-502.
- Easterbrook-Smith, S. B., Hudson, P. J., Goss, N. H., Keech, D. B. and Wallace, J. C. (1976) Pyruvate carboxylase: Mechanism of the second partial reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **176**: 709-720.
- Easterbrook-Smith, S. B., Wallace, J. C. and Keech, D. B. (1976) Pyruvate carboxylase: Affinity labelling of the magnesium adenosine triphosphate binding site. *Eur. J. Biochem.* **62**: 125-130.
- Endou, H., Nonoguchi, H., Nakada, J., Takehara, Y. and Yamada, H. (1985) Glutamine metabolism in the kidney: ammoniogenesis and gluconeogenesis in isolated nephron segments of rats. In *Kidney metabolism and function* (R. Dzurik, B. Lichardus and W. Guder Eds.). Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. pp 26-33.
- Endou, H., Nonoguchi, H., Takehara, Y., Yamada, H. and Nakada, J. (1985) Intranephron heterogeneity of ammoniogenesis and gluconeogenesis in rats. *Contr. Nephrol.* **47**: 98-104.
- Exton, J. H. and Park, C. R. (1968) Control of gluconeogenesis in the liver. Effect of glucagon, catecholamines and adenosine 3',5'-monophosphate on gluconeogenesis in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **243**: 4189-4196.

- Exton, J. H. and Park, C. R. (1969) Control of gluconeogenesis in liver. III. Effects of L-lactate, pyruvate, fructose, glucagon, epinephrine, and adenosine 3',5'-monophosphate on gluconeogenic intermediates in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **244**: 1424-1433.
- Exton, J. H., Friedmann, N., Wong, E. H., Brineaux, J. P., Corbin, J. D. and Park, C. R. (1972) Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **247**: 3579-3588.
- Exton, J. H., Harper, S. C., Tucker, A. L., Flagg, J. L. and Park, C. R. (1973) Effects of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on gluconeogenesis in perfused livers from diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta* **329**: 41-57.
- Exton, J. H., Mallette, L. E., Jeferson, L. S., Wong, E. H. A., Friedmann, N., Miller, T. B. Jr. and Park, C. R. (1970) Hormonal control of hepatic gluconeogenesis. *Recent Prog. Hor. Res.* **26**: 411-461.
- Faus, M. J., Lupia_Ez, J. A., Vargas, A. and Sanchez-Medina, F. (1978) Induction of rat kidney gluconeogenesis during acute liver intoxication by carbon tetrachloride. *Biochem. J.* **174**: 461-467.
- Fernandez, E., Valcarce, C., Cuezva, J. M. and Medina, J. M. (1983) Postnatal hypoglycaemia and gluconeogenesis in the newborn rat. *Biochem. J.* **214**: 525-532.
- Flores, H. and Alleyne, G. A. O. (1971) Phosphoenolpyruvate carboxykinase of Kidney. Subcellular distribution and response to acid-base changes. *Biochem. J.* **123**: 35-39.
- Foldes, M. and Barrit, G. J. (1977) Regulation by calcium ions of pyruvate carboxylation, pyruvate transport and adenine nucleotide transport in isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **252**: 5372-5380.
- Forissier, M. and Baverel, G. (1981) The conversion of alanine into glutamine in guinea-pig renal cortex. Essential role of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **200**: 27-33.
- Frey, W. H. and Utter, M. F. (1977) Binding of acetyl-CoA to Chicken liver pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **252**: 51-56.
- Freytag, S. O. and Collier, K. J. (1984) Molecular cloning of a cDNA for human pyruvate carboxylase. Structural relationship to other biotin-containing carboxylases and regulation of mRNA content in differentiating preadipocytes. *J Biol Chem.* **259(20)**:12831-12837.
- Friedmann, M. K. (1984) Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Physiol. Rev.* **64**: 170-259.
- Friedrichs, D. and Schoner, W. (1973) Stimulation of renal gluconeogenesis by inhibition of the sodium pump. *Biochim. Biophys. Acta* **304**: 142-160.
- Fuchs, J., Johannssen, W., Rohde, M. and Mayer, F. (1988) Pyruvate carboxylase from *Pseudomonas citronellolis*: shape of the enzyme, and localization of its prosthetic biotin group by electron microscopic affinity labeling. *FEBS Lett.* **231**: 102-106.
- Fung, C. H. and Utter, M. F. (1970) Control of liver pyruvate carboxylase by PEP and acyl-CoA. *Fed. Proc.* **29**: 1656.
- Gamberino, W. C., Berkich, D. A., Lynch, C. J., Xu, B. and LaNoue, K. F. (1997) *J. Neurochem.* **69**: 2313-2325.
- Garrison, J. C. and Borland, M. K. (1979) Regulation of pyruvate carboxylation and gluconeogenesis in rat hepatocytes via a β -adrenergic, adenosine 3'5' monophosphate-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **254**: 1129-1133.
- Garrison, J. C. and Haynes, R. C. (1973) Hormonal control of glycogenolysis and gluconeogenesis in isolated rat liver cells. *J. Biol. Chem.* **248**: 5333-5343.

- Garrison, J. C. and Haynes, R. C. (1975) The hormonal control of gluconeogenesis by regulation of mitochondrial pyruvate carboxylation in isolated rat liver cells. *J. Biol. Chem.* **250**: 2769-2777.
- Gesek, F. A., Wolff, D. W. and Strandhoy, J. W. (1987) Improved separation method for rat proximal and distal renal tubules. *Am. J. Physiol.* **253**: F358-F365.
- Girard, G. R., Cuendet, G. S., Marliss, E. B., Kervran, A., Rieutort, M. and Assan, R. (1973) Fuels, hormones and liver metabolism at term and during the early postnatal period in the rat. *J. Clin. Invest.* **52**: 3190-3200.
- Glock, G. E. and Mclean, P. (1955) A preliminary investigation of the hormonal control of the hexose monophosphate oxidative pathway. *Biochem. J.* **61**: 397-404.
- Gomez-Coronado, D., Soley, M. and Herrera, E. (1985) Insulin effect on in vivo gluconeogenesis from [3-¹⁴C]pyruvate in the starved rat. *Int. J. Biochem.* **17**: 1307-1311.
- Goodall, G. J., Baldwin, G. S., Wallace, J. C. and Keech, D. B. (1981) Factor that influence the translocation of the N-carboxybiotin moiety between the two sub-sites of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **199**: 603-609.
- Goodman, A. D., Fuisz, R. E. and Cahill, G. F. (1966) Renal gluconeogenesis in acidosis, alkalosis, and potassium deficiency: its possible role in regulation of renal ammonia production. *J. Clin. Invest.* **45**: 612-619.
- Goorno, W. E., Rector, F. C. and Seldin, D. W. (1967) Relation of renal gluconeogenesis to ammonia production in the dog and rat. *Am. J. Physiol.* **213**: 969-974.
- Goss, N. H., Dyer, P. Y., Keech, D. B. and Wallace, J. C. (1979) An electronic microscopic study of pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **254**: 1734-1739.
- Goto, E., Sakakibara, F., Nishida, T., Kawamura, T., Sano, T., Tsuchida, I. and Sakamoto, N. (1984) Gluconeogenesis and ammonia production in the isolated perfused rat kidney: The effect of starvation, acidosis and diabetic ketosis. *Nagoya J. Med. Sci.* **46**: 67-78.
- Green, N. M. and Toms, E. J. (1973) The properties of subunits of avidin coupled to sepharose. *Biochem. J.* **133**: 687-700.
- Gregoire, F. (1975) Oxidative metabolism of the normal rat glomerulus. *Kidney Int.* **7**: 86-93.
- Groen, A. K., Van Roermund, C. W. T., Vervoorn, R. C. and Tager, J. M. (1986) Control of gluconeogenesis in rat liver cells. Flux control coefficient of the enzymes in the gluconeogenic pathway in the absence and presence of glucagon. *Biochem. J.* **237**: 379-389.
- Groen, A. K., Vervoorn, R. C., Van Der Meer, R. and Tager, J. M. (1983) Control of gluconeogenesis in rat liver cells. Kinetics of individual enzymes and effect of glucagon. *J. Biol. Chem.* **258**: 14346-14353.
- Guchhait, R. B., Polakis, S. E., Dimroth, P., Stoff, E., Moss, J. and Lane, M. D. (1974) Acetyl coenzyme A carboxylase system of *Escherichia coli*. Purification and properties of the biotin carboxylase, carboxyltransferase and carboxylcarriers protein components. *J. Biol. Chem.* **249**: 6633-6645.
- Guder, W. G. and Ross, B. D. (1984) Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int.* **26**: 101-111.
- Guder, W. G. and Rupperecht, A. (1975) Metabolism of isolated kidney tubules. Independent actions of catecholamines on renal cyclic adenosine 3'5' monophosphate levels and gluconeogenesis. *Eur. J. Biochem.* **52**: 283-290.
- Guder, W. G. and Schmidt, U. (1974) The localization of gluconeogenesis in rat nephron. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**: 273-278.

- Guder, W. G. and Schmidt, U. (1976) Substrate and oxygen dependence of renal metabolism. *Kidney Int.* **10**: 32-38.
- Gyoergy, P., Keller, W. and Brehme, T. H. (1928) Nierenstoffwechsel und nierentwicklung. *Biochem. Zeitschr* **200**: 356-366.
- Halestrap, A. P. (1978) Stimulation of pyruvate transport in metabolizing mitochondria through changes in the transmembrane pH gradient induced by glucagon treatment of rats. *Biochem. J.* **172**: 389-398.
- Halestrap, A. P. (1978) Stimulation of the respiratory chain of the rat liver mitochondria between cytochrome C1 and cytochrome C by glucagon. *Biochem. J.* **172**: 399-405.
- Halestrap, A. P. (1982) The nature of stimulation of respiratory chain of rat liver mitochondria by glucagon pretreatment of animals. *Biochem. J.* **204**: 37-42.
- Halestrap, A. P. (1987) Glucagon treatment of rats activates the respiratory chain of liver mitochondria at more than one site. *Biochim. Biophys. Acta* **927**: 280-290.
- Halestrap, A. P. and Armston, A. E. (1984) A reevaluation of the role of the mitochondrial pyruvate transport in the hormonal control of rat liver mitochondrial pyruvate metabolism. *Biochem. J.* **223**: 677-685.
- Halestrap, A. P., Quinlan, P. T., Whipps, D. E. and Armston, A. E. (1986) Regulation of the mitochondrial matrix volume in vivo and in vitro. The role of Calcium. *Biochem. J.* **236**: 779-787.
- Halestrap, A. P., Scott, R. D. and Thomas, A. P. (1980) Mitochondrial pyruvate transport and its hormonal regulation. *Int. J. Biochem.* **11**: 97-105.
- Hallman, M. (1971) Changes in mitochondrial respiratory chain proteins during perinatal development. Evidence of the importance of environmental oxygen tension. *Biochim. Biophys. Acta* **253**: 360-372.
- Hancock, K. and Tsang, V. C. W. (1983) Indian ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* **133**: 157-162.
- Haneji, T. and Koide S. S. (1989) Transblot identification of biotin-containing proteins in rat liver. *Anal. Biochem.* **177**: 57-61.
- Hanson, R. W. and Garber, A. J. (1972) Phosphoenolpyruvate carboxykinase. I. Its role in gluconeogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**: 1010-1021.
- Hanson, R. W. and Mehlman, M. A. (1976) Gluconeogenesis. Its regulation
- Hanson, R. W., Reshef, L. and Ballard, J. (1975) Hormonal regulation of hepatic P-enolpyruvate carboxykinase (GTP) during development. *Fed. Proc.* **34**: 166-171.
- Haschemeyer, R. H. and De Harven, E. (1974) Electron microscopy of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **43**: 279-301.
- Heinrich, R. and Rapoport, T. A. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.* **42**: 89-95.
- Henning, H. V., Stumpe, B., Ohly, B. and Seuber, W. (1966) On the mechanism of gluconeogenesis and its regulation. III. The gluconeogenic capacity and the activities of pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase of rat kidney and rat liver after cortisol treatment and starvation. *Biochem. Z.* **344**: 274-288.
- Henrikson, K. P., Allen, S. H. G. and Malloy, W. L. (1979) An avidin monomer affinity column for the purification of biotin-containing enzymes. *Anal. Biochem.* **94**: 366-370.
- Hers, H. G. and Hue, L. (1983) Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 617-653.
- Hohmann, B. and Scharer, K. (1975) Gluconeogenesis in isolated nephron segment of the rabbit. *Curr. Probl. Clin. Biochem.* **4**: 47-50.

- Hortelano, P., Faus, M. J., Morata, P. and Sanchez-Medina, F. (1979) Evolution of liver and kidney gluconeogenesis during acute liver intoxication by carbon tetrachloride. *Rev. Esp. Fisiol.* **35**: 341-346.
- Hortelano, P., Faus, M. J., Mu_Oz-Clares, R. and Sanchez-Medina, F. (1980) Influence of dietary manipulations on rat kidney gluconeogenesis during acute intoxication with carbon tetrachloride. *Gen. Pharmacol.* **11**: 503-506.
- Hue, L. (1981) The role of futile cycles in the regulation of carbohydrate metabolism in the liver. *Adv. Enzymol.* **52**: 247-331.
- Hue, L. (1987). *Diabet. Metab. Rev.* **3**: 111-126.
- Hurn, B. A. L. and Chantler, S. M. (1980) Production of reagent antibodies. *Methods Enzymol.* **70**: 104-142.
- Irias, J. J., Olmsted, M. R. and Utter, M. F. (1969) Pyruvate carboxylase. XIII. Reversible inactivation by cold. *Biochemistry* **8**: 5136-5148.
- Iynedjian, P. B. and Jacot, M. M. (1980) Glucocorticoid-dependent induction of mRNA coding for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in rat kidney. Its inhibition by cicloheximide. *Eur. J. Biochem.* **111**: 89-98.
- Iynedjian, P. B., Ballard, F. J. and Hanson, R. W. (1975) The regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) synthesis in rat kidney cortex. The role of acid-base balance and glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* **250**: 5596-5603.
- Jakoby, W. B. (1971) Crystallization as a purification technique. *Methods Enzymol.* **XXII**: 248-252.
- Jakovcic, S., Haddock, J., Getz, G. S., Rabinowitz, M. and Swift, H. (1971) Mitochondrial development in liver of foetal and newborn rats. *Biochem. J.* **121**: 341-347.
- Jiang, W. and Bond, J. S. (1992) Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Lett.* **312(2-3)**: 110-114.
- Jitrapakdee, S. G.W. Booker, A.I. Cassady, J.C. Wallace. (1996) Cloning, sequencing and expression of rat liver pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **316**: 631- 637.
- Jitrapakdee, S.; Booker, G. W.; Cassady, A. I., and Wallace, J. C. (1997) The rat pyruvate carboxylase gene structure. Alternate promoters generate multiple transcripts with the 5'-end heterogeneity. *J Biol Chem.* **272(33)**: 20522-20530.
- Jitrapakdee, S.; Walker, M. E., and Wallace, J. C. (1996) Identification of novel alternatively spliced pyruvate carboxylase mRNAs with divergent 5'-untranslated regions which are expressed in a tissue-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun.* **223(3)**: 695-700.
- Johnson, D. and Lardy, H. (1967) Isolation of liver or kidney mitochondria. *Methods Enzymol.* **X**: 94-96.
- Johnson, M. E. M., Das, N. M., Butcher, R. W. and Fain, J. N. (1972) The regulation of gluconeogenesis in isolated rat liver cells by glucagon, insulin, dibutyryl cyclic adenosine monophosphate and fatty acids. *J. Biol. Chem.* **247**: 3229-3235.
- Joseph, P. K. and Subrahmanyam, K. (1972) Evaluation of the rate-limiting steps in the pathway of glucose metabolism in kidney cortex of normal, diabetic, cortisone-treated and growth hormone-treated rats. *Biochem. J.* **128**: 1293-1301.
- Jungerman, K. and M_Hler, H. (1984) *Bioqu_mica*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1984.
- Kacser, H. and Burns, (1973) In *Rate control of biological processes* (D. D. Davies, Ed.) Cambridge University press. London. pp 65-104
- Kamm, D. E. and Cahill, G. F. (1969) Effect of acid base status on renal and hepatic gluconeogenesis in diabetes and fasting. *Am. J. Physiol.* **216**: 1207-1212.

- Kamm, D. E., Strobe, G. L. and Kuchmy, B. L. (1974) Renal cortical and hepatic phosphoenolpyruvate carboxylase in the diabetic rat: Effect of acid-base status. *Metabolism* **23**: 1073-1079.
- Keech, B. and Barrit, G. J. (1967) Allosteric activation of sheep kidney pyruvate carboxylase by the magnesium ion (Mg²⁺) and the magnesium adenosine triphosphate ion (MgATP²⁻). *J. Biol. Chem.* **242**: 1983-1987.
- Keech, D. B. and Farrant, R. K. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **151**: 493-501.
- Keech, D. B. and Utter, M. F. (1963) Pyruvate carboxylase. II. Properties. *J. Biol. Chem.* **238**: 2609-2614.
- Kempson, S. A., Kowalski, J. C. and Puschett, J. B. (1983) Inhibition of renal brush border phosphate transport and stimulation of renal gluconeogenesis by cyclic AMP and parathyroid hormone. *Biochem. Pharmacol.* **32**: 1533-1537.
- Kessar, P. and Saggerson, R. (1982) Effect of α -adrenergic agonist on gluconeogenesis and ⁴⁵Ca efflux in rat kidney tubules. *Biochem. Pharmacol* **31**: 2331-2337.
- Kida, K., Nakajo, S., Kamiya, F., Toyama, Y., Nishio, T. and Nakagawa, H. (1978) Renal net glucose release in vivo and its contribution to blood glucose in rats. *J. Clin. Invest.* **62**: 721-726.
- Kientsch-Engel, R. I., Siess, E. A. and Wieland, O. H. (1982) *Anal. Biochem.* **123**: 270-275.
- Kimmich, G. A. and Rasmussen, H. (1969) Regulation of pyruvate carboxylase activity by calcium in intact rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **244**: 190-199.
- Klahr, S., Nawar, T. and Schoolwerth, A. C. (1973) Effect of catecholamines on ammoniogenesis and gluconeogenesis by renal cortex in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **304**: 161-168.
- Klein, K. L., Wang, M. S., Torikai, S., Davidson, W. D. and Kurokawa, K. (1981) Substrate utilization in the isolated perfused cortical thick ascending limb of rabbit nephron. *Kidney Int.* **20**: 29-35.
- Kleinzeller, A. and Mcavoy, E. M. (1986) Glucose transport and metabolism in rat renal proximal tubules: multicomponent effects of insulin. *Biochim. Biophys. Acta* **856**: 545-555.
- Kozak, M. (1988) A profusion of controls. *J. Cell. Biol.* **107**: 1-7.
- Krebs, H. A., Bennet, D. A. H., De Gasquet, P., Gascoyne, T. and Yoshida, T. (1963) Renal gluconeogenesis. The effect of diet on the gluconeogenic capacity of rat kidney cortex slices. *Biochem. J.* **86**: 22-27.
- Ku, D. D., Sellers, B. M. and Meezan, E. (1986) Development of renal hypertrophy and increased renal Na,K-ATPase in streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* **119**: 672-679.
- Kuby, S. A. and Noltmann, E. A. (1966) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Crystalline) from Brewer's yeast. *Methods Enzymol.* **IX**: 116-125.
- Kunjara, S., Beardsley, S. J. and Greenbaum, A. L. (1988) Renal hypertrophy in experimental diabetes. The activity of de novo and salvage pathways of protein synthesis. *Biochem. J.* **249**: 911-914.
- Kurokawa, K. (1985) Cellular mechanisms and sites of hormone action in the kidney. In *The Kidney: Physiology and pathophysiology.* (D. W. Seldin and G. Giebisch Eds.) Raven Press, New York. pp 739-773.
- Kurokawa, K. and Massry, S. G. (1973) Evidence for stimulation of renal gluconeogenesis by catecholamines. *J. Clin. Invest.* **52**: 961-964.
- Lacey, J. H. and Randle, P. J. (1978) Inhibition of lactate gluconeogenesis in rat kidney by dichloroacetate. *Biochem. J.* **170**: 551-560.
- Laemmli, U. K. (1970) The cleavage of the bacteriophage t-13. *Nature* **227**, 680-687.

- Lahoz, J. M. (1986) Purificación de piruvato carboxilasa de corteza renal de rata. Memoria de Licenciatura. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Granada.
- Lamhonwah, A. M., Quan, F. and Gravel, R. A. (1987) Sequence homology around the biotin-binding site of human propionyl-CoA carboxylase and pyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* **254**: 631-636.
- Lang, C. A. (1965) Respiratory enzymes in the heart and liver of the prenatal and postnatal rat. *Biochem. J.* **95**: 365-371.
- Lardy, H. A., Paetkau, W. and Walter, P. (1965) Paths of carbon in gluconeogenesis and lipogenesis. The role of mitochondria in supplying precursors of phosphoenolpyruvate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**: 1410-1415.
- Lau, E. P., Cochran, B. C., Munson, L. and Fall, R. R. (1979) Bovine kidney 3-methylcrotonyl-CoA and propionyl-CoA carboxylases: Each enzyme contains nonidentical subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 214-218.
- Le Bouffant, F., Hus-Citharel, A. and Morel, F. (1982) In vitro ¹⁴CO₂ production by single pieces of rat cortical thick ascending limbs and its coupling to active salt transport. In *Biochemistry of Kidney Functions* (F. Morrel, Ed.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. pp 363-370.
- Li, S. J. and Cronan, J. E. Jr. (1992) The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.* **267**(2): 855-63.
- Libor, S. M., Sundaram, T. K. and Scrutton, M. C. (1978) Pyruvate carboxylase from a thermophilic *Bacillus*. Studies on the specificity of activation by acyl derivatives of coenzyme A and on the properties of catalysis in the absence of activator. *Biochem. J.* **169**: 543-558.
- Libor, S., Warwick, R. and Sundaram, T. K. (1975) Pyruvate carboxylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. Soc. Trans.* **3**: 309-311.
- Lim, F., Morris, C. P., Occhiodoro, F. and Wallace, J. C. (1988) Sequence and domain structure of yeast pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **263**: 11493-11497.
- Livingston, D. M. (1974) Immunoaffinity chromatography of proteins. *Methods Enzymol.* **XXXIV**: 723-731.
- Longshaw, I. D. and Pogson, C. I. (1972) The effect of steroid and ammonium chloride acidosis on phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat kidney cortex. *J. Clin. Invest.* **51**: 2277-2283.
- Longshaw, I. D., Alleyne, G. A. O. and Pogson, C. I. (1972) Effect of steroids and ammonium chloride acidosis on phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat kidney cortex. II. Kinetics of enzyme induction. *J. Clin. Invest.* **51**: 2284-2291.
- Lopez-Casillas, F.; Bai, D. H.; Luo, X. C.; Kong, I. S.; Hermodson, M. A., and Kim, K. H. (1988) Structure of the coding sequence and primary amino acid sequence of acetyl-coenzyme A carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**(16): 5784-5788.
- Lupiañez, J. A., Faus, M. J., Muñoz-Clares, R. and Sanchez-Medina, F. (1976) Stimulation of rat kidney gluconeogenic ability by inhibition of liver gluconeogenesis. *FEBS Lett.* **61**: 277-281.
- Lynen F. (1979) New experiments of biotin enzymes. *CRC Crit Rev Biochem.* **7**:103-119.
- Macdonald, D. W. R. and Saggerson, E. D. (1977) Hormonal control of gluconeogenesis in tubule fragments of renal cortex of feed rats. *Biochem. J.* **168**: 33-42.
- Macievicz, R. A. and Knight, P. J. (1988) Transmission densitometry of stained nitrocellulose paper. *Analytical Biochemistry* **175**: 85-90.

- Mackall, J. C. and Lane, D. (1977) Role of pyruvate carboxylase in fatty acid synthesis: alterations during preadipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**: 720-725.
- Mackay, N.; Rigat, B.; Douglas, C.; Chen, H. S., and Robinson, B. H. (1994) cDNA cloning of human kidney pyruvate carboxylase. *Biochem Biophys Res Commun.* **202(2)**: 1009-14.
- Mahan, D. E., Mushahwar, I. K. and Koeppe, R. E. (1975) Purification and properties of rat brain pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **145**: 25-35.
- Maleque, A., Endou, H., Koseki, C. and Sakai, F. (1980) Nephron heterogeneity: Gluconeogenesis from pyruvate in rabbit nephron. *FEBS Lett.* **116**: 154-156.
- Martin A. D. and Titheradge, M. A. (1984) Stimulation of mitochondrial pyruvate metabolism and citruline synthesis by dexamethasone. Effect of isolation and incubation media. *Biochem. J.* **222**:
- Martin, A. D. and Titheradge, M. A. (1983) Hormonal stimulation of gluconeogenesis through increased mitochondrial metabolic flux. *Biochem. Soc. Trans.* **II**: 78-81.
- Martin, A. D., Allan, E. H. and Titheradge, M. A. (1984) The stimulation of mitochondrial pyruvate carboxylation after dexamethasone treatment of rats. *Biochem. J.* **219**: 107-115.
- Martin-Requero, A. and Parrilla, R. (1987) Papel del flujo a través de piruvato carboxilasa en la regulación de la ureogénesis. XIV Congreso Nacional de la SEB. Malaga.
- Martin-Requero, A., Ayuso, M. S. and Parrilla, R. (1986) Interaction of oxamate with the gluconeogenic pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**: 114-127.
- Martin-Requero, A., Ayuso, M. S. and Parrilla, R. (1986) Rate limiting steps for hepatic gluconeogenesis. Mechanism of oxamate inhibition of mitochondrial pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* **261**: 13973-13978.
- Maurer, H. R. (1971) Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamidegelelectrophoresis, Walter de Gruyter, Berlin .
- Mayer, F., Wallace, J. C. and Keech, D. B. (1980) Further electron microscope studies on Pyruvate Carboxylase. *Eur. J. Biochem.* **112**: 265-272.
- McCann, W. P. and JUDE, J. R. (1958) The synthesis of glucose by the kidney. *Bull. John Hopkins Hosp.* **103**: 77-93.
- McClure, W. R. and Lardy, H. A. (1971) Rat liver pyruvate carboxylase. IV. Factors that affecting the regulation in vivo. *J. Biol. Chem.* **246**: 3591-3596.
- McClure, W. R., Lardy, H. A. and Cleland, W. W. (1971) Rat liver pyruvate carboxylase. III. Isotopic exchange studies of the first partial reaction. *J. Biol. Chem.* **246**: 3584-3590.
- McClure, W. R., Lardy, H. A. and Kneifel, H. P. (1971) Rat liver Pyruvate Carboxylase. I. Preparation, properties, and cation specificity. *J. Biol. Chem.* **246**: 3579-3583.
- Medina, J. M., Cuezva, J. M. and Mayor, F. (1980) Non-gluconeogenic fate of lactate during the early neonatal period in the rat *FEBS Lett.* **114**: 132-134.
- Mehlman, M. A. (1968) Fate of isotopic carbon in kidney mitochondria synthesizing precursors for glucose from pyruvate and bicarbonate. *J. Biol. Chem.* **243**: 3289-3295.
- Mellanby, J. and Willianson, D. H. (1974) Acetoacetate. In: *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer, H. U. ed.) pp 1840-1843. Velay Chemie Academic Press Inc. New York and London.
- Menendez J, Gancedo C. (1998) Regulatory regions in the promoters of the *Saccharomyces cerevisiae* PYC1 and PYC2 genes encoding isoenzymes of pyruvate carboxylase. *FEMS Microbiol. Lett.* **164(2)**: 345-52
- Milrad De Forchetti, S. and Cazzulo, J. J. (1976) Some properties of the Pyruvate Carboxylase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.* **93**: 75-81.

- Moon, T. W. (1987) Adaptation, constraint and the function of the gluconeogenic pathway. *Can. J. Zool.* **66**: 1059-1068.
- Morel, F. and Doucet, A. (1986) Hormonal control of kidney functions at the cell level. *Physiol. Rev.* **66**: 377-467.
- Morris, C. P., Lim, F. and Wallace, J. C. (1987) Yeast pyruvate carboxylase: Gene isolation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**: 390-396.
- Muñoz-Clares, R., Vargas, A., Morata, P. and Sanchez-Medina, F. (1978) Evidence for the mediation of metabolic acidosis in the stimulation of rat kidney phosphoenolpyruvate carboxykinase activity by exercise. *J. Mol. Med.* **3**: 299-303.
- Muller, M., Thamm, R. and Rapoport, S. (1974) On the formation of acetyl-CoA from glutamine and the mutual interconversion between oxalacetate and pyruvate in rabbit reticulocytes. *FEBS Lett.* **42**: 279-281.
- Nielsen, B. L. and Brown, L. R. (1984) The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels *Analytical Biochemistry* **141**: 311-315.
- Nordlie, R. C. and Lardy, H. A. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**: 2259-2264.
- Nyhan, W. L. (1987) Inborn errors of biotin metabolism. *Arch. Dermatol.* **123**: 1696-1698.
- Obermayer, M. and Lynen, F. (1976) Structure of biotin enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **1**: 169-171.
- Oliver, J. (1984) Estimulación α -adrenérgica del transporte mitocondrial de piruvato en corteza renal de rata. Tesina de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Univ. Granada : .
- Oliver, J. (1988) Regulación α -adrenérgica del transporte mitocondrial de piruvato y su implicación en el control de la gluconeogénesis renal. Tesis Doctoral, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Granada
- Ormstad, K., Orrenius, S. and Jones, P. (1981) Preparation of characteristics of isolated kidney cells. *Meth. Enzymol.* **77**: 137-146.
- Osmani, S. A. and Scrutton, M. C. (1984) The effect of EDTA on the apparent hysteretic properties of pyruvate carboxylase from *Rhizopus arrhizus*. *FEBS Lett.* **177**: 157-160.
- Osmani, S. A. and Scrutton, M. C. (1985) The subcellular localization and regulatory properties of pyruvate carboxylase from *Rhizopus arrhizus*. *Eur. J. Biochem.* **147**: 119-128.
- Osmani, S. A., Mayer, F., Marston, F. A. O., Selmes, I. P. and Scrutton, M. C. (1984) Pyruvate carboxylase from *Aspergillus nidulans*. Effects of regulatory modifiers on the structure of the enzyme. *Eur. J. Biochem* **139**: 509-518.
- Pacheco-Alvarez, D., Solórzano-Vargas, R. S. and Del Río, A. L. (2002) Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Archives of Medical Research* **33**: 439-447.
- Palacian, E., De Torrontegui, G. and Losada, M. (1966) Inhibition of yeast pyruvate carboxylase by L-aspartate and oxaloacetate. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **24**: 644-649.
- Patel, M. S. and Tilghman, S. M. (1973) Regulation of pyruvate metabolism via pyruvate carboxylase in rat brain mitochondria. *Biochem. J.* **132**: 185-192.
- Peragon, J., Aranda, F. Garcia-Salgero, L. and Lupia_Ez, J. A. (1989) Influence of experimental diabetes on the kinetic behaviour of renal cortex hexose monophosphate dehydrogenases. *Int. J. Biochem.* **21**: 689-694.
- Peragon, J., Aranda, F. Garcia-Salgero, L. and Lupia_Ez, J. A. (1989) Long-term adaptative response to dietary protein of hexose monophosphate shunt dehydrogenases in rat-kidney tubules. *Cell Biochem. Function*, In press.
- Peuhkurinen, K. J. and Hassinen, I. E. (1982) Pyruvate carboxylation as an anaplerotic mechanism in perfused rat heart. *Biochem. J.* **202**: 67-76.

- Phillips, N. F. B., Keech, D. B. and Wallace, J. C. (1981) Proc. Aust. Biochem. Soc. **14**: 21.
- Pilkis, S. J., El-Mahghrabi, M. R. and Claus, T. H. (1988) Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. Ann. Rev. Biochem. **57**: 755-783
- Pilkis, S. J., Exton, J. H., Johnson, R. A. and Park, C. R. (1974) Effects of glucagon on cyclic AMP and carbohydrate metabolism in liver from diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta* **343**: 250-267.
- Prpic, J., Spencer, T. L. and Bygrave, F. L. (1978) Stable enhancement of Calcium retention in mitochondria isolated from rat liver after the administration of glucagon to the animal. *Biochem. J.* **176**: 705-714.
- Pryor, H. J., Smith, J. E., Quinlan, P. T. and Halestrap, A. P. (1987) Evidence that the flux control coefficient of the respiratory chain is high during gluconeogenesis from lactate in hepatocytes from starved rat. *Biochem. J.* **247**: 449-457.
- Quinlan, P. T., Thomas, A. P., Armston, A. E. and Halestrap, A. P. (1983) Measurement of the intramitochondrial volume in hepatocytes without cells disruption and its evaluation by hormones and valinomycin. *Biochem. J.* **214**: 395-404.
- Raison, J. K. (1973) Temperature-induced phase changes in membrane lipids and their influence on metabolic regulation. Symp. Soc. Exp. Biol. **27**: 485-512.
- Ramirez, A. and Eyaquieree, J. (1973) Pyruvate Carboxylase of *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and properties. Arch. Biol. Med. Exp. **9**: 20-28.
- Reche, P.; Li, Y. L.; Fuller, C.; Eichhorn, K., and Perham, R. N. (1998) Selectivity of post-translational modification in biotinylated proteins: the carboxy carrier protein of the acetyl-CoA carboxylase of *Escherichia coli*. *Biochem J.* **329**(Pt 3):589-596.
- Reynolds, J. A. and Tanford, C. (1970) Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. Proc. Acad. Sci. USA **66**: 1002-1003.
- Rikofer-Zwez, M. S., Kunin, A. S. and Walter, P. (1973) Effects of Calcium and sucrose on pyruvate carboxylase activity in intact rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **248**: 7588-7594.
- Rohde, M., Lim, F. and Wallace, J. C. (1986) Pyruvate carboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Quaternary structure, effects of allosteric ligands and binding of avidin. Eur. J. Biochem. **156**: 15-22.
- Roobol, A. and Alleyne, G. A. O. (1973) Regulation of renal gluconeogenesis by calcium ion hormones and adenosine 3'5'-cyclic monophosphate. *Biochem. J.* **134**: 157-165.
- Ross, B. D., Espinal, J. and Silva, P. (1986) Glucose metabolism in renal tubular function. *Kidney Int.* **29**: 54-67.
- Ross, B. D., Hems, R. and Krebs, H. A. (1967) The rates of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver. *Biochem. J.* **102**: 942-951.
- Rossier, B. C., Geering, K., Atkinson, J. and Roch-Ramel, F. (1985) Renal receptors. In *The kidney: Physiology and pathophysiology* (D. W. Seldin and G. Gielnish eds.) Raven Press, New York. pp 775-806.
- Rothe, G. M. (1982) Applicability of the log MM- D relationship to linear polyacrylamide gradient gel electrophoresis under a wide range of experimental conditions. *Electrophoresis* **3**: 255-262.
- Rothman, D. L.; Magnusson, I.; Katz, L. D.; Shulman, R. G., and Shulman, G. I. (1991) Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ¹³C NMR. *Science*. **254**(5031): 573-6.
- Saggerson, E. D. and Carpenter, C. A. (1980) Effects of compound D-600 (Methoxy vearpamil) on gluconeogenesis and on aceleration of the process by α -adrenergic stimuli in rat kidney tubules. *Biochem. J.* **190**: 283-291.

- Salto, R. (1989) Piruvato carboxilasa de corteza renal de rata. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Salto, R.; Giron, M. D.; del Mar Sola, M., and Vargas, A. M. (1999) Evolution of pyruvate carboxylase and other biotin containing enzymes in developing rat liver and kidney. *Mol Cell Biochem.* **200(1-2)**:111-117.
- Salto, R.; Sola, M.; Oliver, F. J., and Vargas, A. M. (1996) Effects of starvation, diabetes and carbon tetrachloride intoxication on rat kidney cortex and liver pyruvate carboxylase levels. *Arch Physiol Biochem.* **104(7)**: 845-850.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor. New York. 1989.
- Samols, D.; Thornton, C. G.; Murtif, V. L.; Kumar, G. K.; Haase, F. C., and Wood, H. G. (1988) Evolutionary conservation among biotin enzymes. *J. Biol. Chem.* **263(14)**: 6461-6464.
- Sanchez-Medina, F., García-Ruiz, J. P., Lupiañez, J. A., Faus, M. J. and Hortelano, P. (1977) Induction of rat kidney gluconeogenic ability after impairment of liver gluconeogenesis. *Curr. Probl. Clin. Biochem.* **8**: 310-317.
- Sanchez-Urrutia, J. P., Garcia-Ruiz, F., Sanchez-Medina, F. and Mayor, F. (1975) Lactic acidosis and renal phosphoenolpyruvate carboxykinase activity during exercise. *Biochem. Med.* **14**: 355-367.
- Sarawut Jitrapakdee, Grant W. Booker, A. Ian Cassady, and John C. Wallace. (1997) The Rat Pyruvate Carboxylase Gene Structure. Alternate promoters generate multiple transcripts with the 59-end heterogeneity. *Biochem J.* **272**: 20522-20530.
- Sarawut Jitrapakdee, Michelle E. Walker, and John C. Wallace. (1996) Identification of Novel Alternatively Spliced Pyruvate Carboxylase mRNAs with Divergent 59-Untranslated Regions Which Are Expressed in a Tissue-Specific Manner. *Biochemical and biophysical research communications.* **223**: 695-700
- Sasaki, K., Cripe, T. P., Koch, S. R., Andreone, T. L., Peterson, D. D., Beale, E. G. and Granner, D. K. (1984) Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. The dominant role of insulin. *J. Biol. Chem.* **259**: 15242-15251.
- Scrutton, M. C. (1971) Possible regulatory factors for pyruvate carboxylase with particular reference to enzyme from chicken liver. *Metabolism* **20**: 168-186.
- Scrutton, M. C. (1974) Pyruvate carboxylase. Studies of activator independent catalysis and on the specificity of activation by acyl derivatives of coenzyme A for the enzyme of rat liver. *J. Biol. Chem.* **249**: 7057-7067.
- Scrutton, M. C. (1978) Fine control of the conversion of pyruvate (phosphoenolpyruvate) to oxaloacetate in various species. *FEBS Lett.* **89**: 1-9.
- Scrutton, M. C. and Fatebene, F. (1976) Inhibition of rat liver pyruvate carboxylase by acetoacetyl-CoA. *FEBS Lett.* **62**: 220-225.
- Scrutton, M. C. and Utter, M. F. (1965) Pyruvate carboxylase. III. some physical and chemical properties of the highly purified enzyme. *J. Biol. Chem.* **240**: 1-9.
- Scrutton, M. C. and Utter, M. F. (1967) Pyruvate carboxylase. IX. Some properties of the activation by certain acyl derivatives of coenzyme A. *J. Biol. Chem.* **242**: 1723-1735.
- Scrutton, M. C. and Utter, M. F. (1968) Regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues. *Ann. Rev. Biochem.* **37**: 249-302.
- Scrutton, M. C. and White, M. D. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**: 85-93.
- Scrutton, M. C. and White, M. D. (1973) Pyruvate carboxylase. Specific inactivation of acetyl coenzyme A-dependent oxalacetate synthesis during modification of the enzyme by trinitrobenzene sulfonate. *J. Biol. Chem.* **248**: 5541-5544.

- Scrutton, M. C. and White, M. D. (1974) Pyruvate carboxylase. Inhibition of the mammalian and avian liver enzymes by α -Ketoglutarate and L-glutamate. *J. Biol. Chem.* **249**: 5405-5415.
- Scrutton, M. C., Griminger, P. and Wallace, J. C. (1972) Pyruvate carboxylase. Bound metal content of the vertebrate liver enzyme as a function of diet and species. *J. Biol. Chem.* **247**: 3305-3313.
- Scrutton, M. C., Keech, D. B. and Utter, M. F. (1965) Pyruvate carboxylase. IV. Partial reactions and the locus of activation by acetyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.* **240**: 574-581.
- Scrutton, M. C., Mildvan, A. S. and Utter, M. F. (1966) Pyruvate carboxylase. IV. The presence of tightly bound manganese. *J. Biol. Chem.* **241**: 3480-3487.
- Scrutton, M. C., Olmsted, M. R. and Utter, M. F. (1969) Pyruvate carboxylase from chicken liver. *Methods Enzymol.* **XIII**: 235-249.
- Scrutton, M. C., Pearce, P. H. and Fatebene, F. (1977) Pyruvate carboxylase: Effect of reaction components and analogues of acetyl-coenzyme A on the rate of inactivation in the presence and absence of trinitrobenzene sulphonate. *Eur. J. Biochem.* **76**: 219-231.
- Scrutton, M. C., Young, M. R. and Utter, M. F. (1970) Pyruvate carboxylase from baker's yeast. Presence of bound zinc. *J. Biol. Chem.* **245**: 6220-6227.
- Schaefer, P. C. and Veneziale, C. M. (1973) Regulation of pyruvate metabolism in rat-liver mitochondria by K^+ and P_i . *Eur. J. Biochem.* **35**: 18-22.
- Scholer, D. W. and Edelman, I. S. (1979) Isolation of rat kidney cortical tubules enriched in proximal and distal segments. *Am. J. Physiol.* **237**: F350-F359.
- Schoolwerth, A. C., Smith, B. C. and Culpiper, R. M. (1988) Renal gluconeogenesis. *Miner. Electrolyte Metab.* **14**: 347-361.
- Schwarz, E.; Oesterhelt, D.; Reinke, H.; Beyreuther, K., and Dimroth, P. (1988) The sodium ion translocating oxalacetate decarboxylase of *Klebsiella pneumoniae*. Sequence of the biotin-containing alpha-subunit and relationship to other biotin-containing enzymes. *J Biol Chem.* **263(20)**: 9640-9645.
- Seitz, H. J., Mueller, M. J., Krone, W., Tarnowski, W., Carsten, D., Dunkelmann, B. and Harneit, A. Coordinate control of intermediary metabolism in rat liver by insulin/glucagon ratio during starvation and after glucose refeeding. Regulatory significance of long chain acyl-CoA and cyclic AMP. *Arch. Biochim. Biophys.* **183**: 647-663.
- Seubert, W. (1968) Cortisol as enzyme inductor with special consideration to gluconeogenesis. *Colloq. Ges. Physiol. Chem.* **5**: 158-191.
- Seubert, W. and Remberger, U. (1961) Purification and mode of action of pyruvate carboxylase from *Pseudomonas citronellolis*. *Biochem. Z* **334**: 401-414.
- Seufert, D., Herlemann, E-M., Albrecht, E. and Seubert, W. (1971) Mechanism of gluconeogenesis and its regulation. VII. Purification and properties of Pyruvate Carboxylase from rat liver. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**: 459-478.
- Shank, R. P.; Leo, G. C., and Zielke, H. R. (1993) Cerebral metabolic compartmentation as revealed by nuclear magnetic resonance analysis of D-[1- ^{13}C]glucose metabolism. *J Neurochem.* **61(1)**:315-23.
- Shen, C. S. and Mistry, S. P. (1979) Effect of fasting and fasting and refeeding on hepatic and renal gluconeogenic enzymes in the chicken. *Poult Sci.* **58**: 890-895.
- Siess, E. A. (1985) Stimulation by 3-hydroxybutyrate of pyruvate carboxylation in mitochondria from rat liver. *Eur. J. Biochem.* **152**: 131-136.
- Siess, E. A. and Wieland, O. H. (1978) Glucagon-induced stimulation of 2-oxoglutarate metabolism in mitochondria from rat liver. *FEBS Lett.* **93**: 301-306.

- Siess, E. A., Banik, E. and Neugebauer, S. (1988) Control of pyruvate carboxylase activity by the pyridine-nucleotide redox state in mitochondria from rat liver. *Eur. J. Biochem.* **173**: 369-374.
- Siess, E. A., Brocks, D. G., Lattke, H. K. and Wieland, O. H. (1977) Effect of glucagon on metabolite compartmentation in isolated rat liver cells during gluconeogenesis from lactate. *Biochem. J.* **166**: 225-235.
- Siess, E. A., Kientsch-Engel, R. I. and Wieland, O. H. (1982) *Eur. J. Biochem.* **121**: 493-499.
- Silva, P., Hallac, R., Spokes, K. and Epstein, F. H. (1982) Relationship among gluconeogenesis, Q_{O_2} , and Na^+ transport in the perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* **242**: F508-F513.
- Snell, K. (1974) Pyruvate carboxylation in liver mitochondria of the developing neonatal rat *Int. J. Biochem.* **5**: 463-469.
- Snell, K. and Walker, D. G. (1973) Glucose metabolism in the newborn rat. Temporal studies in vivo. *Biochem. J.* **132**: 739-752.
- Sochor, M., Baquer, N. Z. and Mclean, P. (1979) Glucose overutilization in diabetes: Evidence from studies on the changes in hexokinase, the pentose phosphate pathway and glucuronate-xylulose pathway in rat kidney cortex in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **86**: 32-39.
- Sochor, M., Baquer, N. Z. and Mclean, P. (1985) Glucose over- and underutilization in diabetes: Comparative studies on the change in activities of enzymes of glucose metabolism in rat kidney and liver. *Mol. Physiol.* **7**: 51-68.
- Sochor, M., Kunjara, S., Greenbaum, L. and Mclean, P. (1986) Renal hypertrophy in experimental diabetes. Effect of diabetes on the pathway of glucose metabolism: differential response in adult and immature rats. *Biochem. J.* **234**: 573-577.
- Spydevold, O., Davis, E. J. and Brenner, J. (1976) Replenishment and depletion of citric acid cycle intermediates in skeletal muscle. Indication of pyruvate carboxylation. *Eur. J. Biochem.* **71**: 155-165.
- Srivastava, G.; Borthwick, I. A.; Brooker, J. D.; May, B. K., and Elliott, W. H. (1983) Evidence for a cytosolic precursor of chick embryo liver mitochondrial delta-aminolevulinate synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* **110(1)**:23-31.
- Steer, K. A., Sochor and Mclean, P. (1985) Renal hypertrophy in experimental diabetes. Changes in pentose phosphate pathway activity. *Diabetes*, **34**: 485-490.
- Steer, K. A., Sochor, M., Gonzalez, A. M. and Mclean, P. (1982) Regulation of pathways of glucose metabolism in kidney. Specific linking of pentose phosphate pathway activity with kidney growth in experimental diabetes and unilateral nephrectomy. *FEBS Lett.* **150**: 494-498.
- Stollar, D. and Levine, L. (1963) radial Immunodiffusion. *Methods Enzymol.* **VI**: 848-854.
- Stucka, R., Dequin, S., Salmon, J. and Gancedo, C. (1991) DNA sequences in chromosomes II and VII code for pyruvate carboxylase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of pyruvate carboxylase-deficient strains. *Mol. Gen. Genet.* **229(2)**: 307-315.
- Sundaram, T. K., Wood, P. H., Blackburn, N. J. and Marsh, A. E. (1983) Pyruvate carboxylase from a thermophilic *Bacillus*: Effect of depletion of bound metal on catalytic activity and structures. *Biochem. Soc. Trans.* **11**: 740-741.
- Taylor, B. L., Barden, R. E. and Utter, M. F. (1972) Identification of the reacting form of pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **247**: 7383-7390.
- Taylor, W. M., Reinhart, P. H. and Bygrave, F. L. (1983) Stimulation by β -adrenergic agonists of Ca^{2+} fluxes, mitochondrial oxidation and gluconeogenesis in perfused rat liver. *Biochem. J.* **212**: 555-565.

- Thienen, W. D. and Davis, E. J. (1981) The effects of energetic steady state, pyruvate concentration and octanoil(-)-carnitine on the relative rates of carboxylation and decarboxylation of pyruvate by rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **256**: 8371-8378.
- Tilghman, S. M., Hanson, R. W. and Ballard, F. J. (1976) Hormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in mammalian tissues. In *Gluconeogenesis. Its regulation in mammalian species* (R. W. Hanson and M. A. Mehlman, Eds.) Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, London. pp 47-91.
- Titheradge, M. A. and Coore, H. G. (1976) Hormonal regulation of liver mitochondrial pyruvate carrier in relation to gluconeogenesis and lipogenesis. *FEBS Lett.* **71**: 73-78.
- Titheradge, M. A. and Coore, H. G. (1976) The mitochondrial pyruvate carrier, its exchange properties and its regulation by glucagon. *FEBS Lett.* **63**: 45-60.
- Titheradge, M. A. and Haynes, R. C. (1980) The hormonal stimulation of ureogenesis in isolated hepatocytes through increases in mitochondrial ATP production. *Arch. Biochem. Biophys.* **201**: 44-45.
- Titheradge, M. A., Binder, S. B., Yamazaki, R. K. and Haynes, R. C. (1978) Glucagon treatment stimulates the metabolism of hepatic submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* **253**: 3357-3360.
- Titheradge, M. A., Stringer, J. L. and Haynes, R. C. (1979) The stimulation of the mitochondrial uncoupler-dependent ATPase in isolated hepatocytes by catecholamines and glucagon and its relationship to gluconeogenesis. *Eur. J. Biochem.* **102**: 117-124.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- Tu, Z. and Hagedorn, H. H. (1994) GenBank accession number **L 36530**.
- Ui, M., Claus, T. H., Exton, J. H. and Park, C. R. (1973) Studies on the mechanism of action of glucagon on gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* **248**: 5344-5349.
- Ui, M., Exton, J. H. and Park, C. R. (1973) Effects of glucagon on glutamate metabolism in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **248**: 5350-5359.
- Utter, M. F. (1970) In *Metabolic regulation and enzyme action*. (A. Sols and S. Grisolia Eds) Academic Press, London. pp 91..
- Utter, M. F. and Fung, C. H. (1971) In *Regulation of gluconeogenesis* (H. D. Sling and B. Willms, Eds.) Academic Press, New York. pp 1-21.
- Utter, M. F. and Keech, D. B. (1963) Pyruvate carboxylase. I. Nature of the reaction. *J. Biol. Chem.* **238**: 2603-2608.
- Utter, M. F. and Scrutton, M. C. (1969) Pyruvate Carboxylase. *Curr. Tops. Cell. Reg.* **1**: 253-296.
- Utter, M. F., Barden, R. E. and Taylor, B. L. (1975) Pyruvate carboxylase. An evaluation of the relations between structure and mechanism and between structure and catalytic activity. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **42**: 1-72.
- Utter, M. F., Keech, D. B. and Scrutton, M. C. (1964) In *Advances in enzyme regulation*, Vol 2 (G. Weber, Ed.) Pergamon Press, New York. pp 49-68.
- Valcarce, C. (1988) *Diferenciación postnatal de la mitocondria de hígado de rata*. Tesis Doctoral, Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid.
- Valentine, R. C., Wrigley, N. G., Scrutton, M. C., Irias, J. J. and Utter, M. F. (1966) Pyruvate carboxylase. VIII. The subunit structure as examined by electron microscopy. *Biochemistry* **5**: 3111-3116.
- Vallee, B. L. and Auld, D. S. (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*. **29(24)**: 5647-5659.

- Van Schaffingen, E., Hue, L. and Hers, H. G. (1980) Control of the fructose-6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle in the isolated hepatocytes by glucose and glucagon. *Biochem. J.* **192**: 887-895.
- Van Schaffingen, E., Hue, L. and Hers, H. G. (1980) Study of the fructose-6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle in the liver in vitro. *Biochem. J.* **192**: 263-271.
- Vanderwalle, A., Withenshon, G., Heidrich, H. G. and Guder, W. G. (1981) Distribution of hexokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase along the rabbit nephron. *Am. J. Physiol.* **240**: F492-F500.
- Vargas, A. M., Lupiani, M. J., Lupia_Ez, J. A. and Sanchez-Medina, F. (1981) Stimulation of rat renal phosphoenolpyruvate carboxykinase activity after an intravenous lactic acid load. *FEBS Lett.* **127**: 121-124.
- Vargas, A., Muñoz-Clares, R., Sanchez-Pozo, A. and Sanchez-Medina, F. (1981) Evolución de la concentración de metabolitos gluconeogénicos en hígado y riñón de rata a lo largo del ejercicio. *Rev. Esp. Fisiol.* **37**: 277-284.
- Villela, G. G. (1964) Biochemical aspects of carbon tetrachloride poisoning. *Biochem. Pharmacol.* **13**: 665-676.
- Vinay, P., Gougoux, A. and Lemieux, G. (1981) Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *Am. J. Physiol.* **241**: F403-F411.
- Waldrop, G. L., Rayment, I. and Holden, H. M. (1994) Three-dimensional structure of the biotin carboxylase subunit of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemistry.* **33**: 10249-10256.
- Walker, M. E.; Baker, E.; Wallace, J. C., and Sutherland, G. R. (1995) Assignment of the human pyruvate carboxylase gene (PC) to 11q13.4 by fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet Cell Genet.* **69(3-4)**:187-189.
- Walker, M. E.; Val, D. L.; Rohde, M.; Devenish, R. J., and Wallace, J. C. (1991) Yeast pyruvate carboxylase: identification of two genes encoding isoenzymes. *Biochem Biophys Res Commun.* **176(3)**:1210-1217.
- Wallace , J.C, S. Jitrapakdee, A. Chapman-Smith (1998) Pyruvate carboxylase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* **30**: 1-5
- Warren, G. B. and Tipton, K. F. (1974) Pig liver pyruvate carboxylase. Purification, properties and cation specificity. *Biochem. J.* **139**: 297-310.
- Warren, G. B. and Tipton, K. F. (1974) Pig liver pyruvate carboxylase. The reaction pathway for the carboxylation of pyruvate. *Biochem. J.* **139**: 311-320.
- Weber, G., Singhal, R. L., Stamm, N. B., Lea, M. A. and Fisher, E. A. (1966) Synchronous behaviour pattern of key glycolytic enzymes. Glucokinase, phosphofructokinase, and pyruvate kinase. *Adv. Enzyme Regul.* **4**: 59-81.
- Weinberg, M. and Utter, M. F. (1979) Effect of Thyroid hormone on the turnover of rat liver pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **254**: 9492-9499.
- Weinberg, M. B. and Utter, M. F. (1980) Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on the turnover of rat liver pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem. J.* **188**: 601-608.
- Weinhouse, S. (1976) Regulation of glucokinase in liver. *Curr. Topics Cell. Regul.* **11**: 1-46.
- Werneburg, B. G. and Ash, D. E. (1993) Chemical modifications of chicken liver pyruvate carboxylase: evidence for essential cysteine-lysine pairs and a reactive sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys.* **303(2)**:214-21.

- Wexler, I. D.; Du, Y.; Lisgaris, M. V.; Mandal, S. K.; Freytag, S. O.; Yang, B. S.; Liu, T. C.; Kwon, M.; Patel, M. S., and Kerr, D. S. (1994) Primary amino acid sequence and structure of human pyruvate carboxylase. *Biochim Biophys Acta*. **1227(1-2)**: 46-52.
- Whipps, D. E. and Halestrap, A. P. (1984) Rat liver mitochondria prepared in mannitol media demonstrated increased mitochondrial volumes compared with mitochondria prepared in sucrose media. Relationship to the effect of glucagon on mitochondrial function. *Biochem. J.* **221**: 147-152.
- Wiesinger, H.; Hamprecht, B., and Dringen, R. (1997) Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia*. **21(1)**: 22-34.
- Wilson, K. P.; Shewchuk, L. M.; Brennan, R. G.; Otsuka, A. J., and Matthews, B. W. (1992) Escherichia coli biotin holoenzyme synthetase/bio repressor crystal structure delineates the biotin- and DNA-binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89(19)**: 9257-9261.
- Williamson, D. H. and Mellanby, J. (1974) D-(-)-3-Hydroxybutyrate. In *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer, H. U. Ed.) Velay Chemie Academic Press Inc. New York and London pp 1836-1839
- Williamson, J. R., Browning, E. T. and Scholz, R. (1969) Control of mechanisms of gluconeogenesis and ketogenesis. I. Effects of oleate on gluconeogenesis in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **244**: 4607-4616.
- Williamson, J. R., Rostand, S. G. and Peterson, M. J. (1970) Control mechanisms of gluconeogenesis and ketogenesis. VI. Control factors affecting gluconeogenesis in perfused rat liver. Effects of 4-pentenoic acid. *J. Biol. Chem.* **245**: 3242-3251.
- Wimhurst, J. R. and Manchester, K. L. (1970) Kinetics of rat liver pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **120**: 79-93.
- Winter, A., Ek, K. and Andersson, U. B. (1977) Analytical electrofocusing in thin layers of polyacrylamide gels. LKB application Note 250
- Wolf B. Disorders of biotin metabolism. In: Scriver C, Beaudet AL, William S, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Vol. III. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division. **2001**. pp: 3935-3962.
- Wood, H. G. and Barden, R. E. (1977) Biotin enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **46**: 385-413.
- Wood, H. G. and Werkman (1940) The fixation of carbon dioxide by cell suspensions of *Propionibacterium pentosaceum*. *Biochem. J.* **34**: 7-14.
- Wood, P. H., Sundaram, T. K., Blackburn, N. J. and Marsh, A. E. (1983) Isolation and characterization of pyruvate carboxylase of the extremely thermophilic *Bacillus caldotenax*. *Biochem. Soc. Trans.* **11**: 741-742.
- Woronick, C. L. and Johnson, M. J. (1960) Carbon dioxide fixation by cell-free extracts of *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* **235**: 9-15.
- Yamazaki, R. K. (1975) Glucagon stimulation of mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* **250**: 7924-7930.
- Yeung, D. and Oliver, I. T. (1968) Induction of phosphoenolpyruvate carboxylase in neonatal rat liver by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Biochemistry* **7**: 3231-3239.
- Yeung, D., Stanley, R. S. and Oliver I. T. (1967) The development of gluconeogenesis in neonatal rat liver: Effect of triamcinolone. *Biochem. J.* **105**: 1219-1227.
- Zammit, V. A. (1980) The effect on glucagon treatment and starvation of virgin and lactating rats on the rates of oxidation of octanoyl-L-carnitine and octanoate by isolated liver mitochondria. *Biochem. J.* **190**: 293-300.
- Zhang, J.; Xia, W. L.; Brew, K., and Ahmad, F. (1993) Adipose pyruvate carboxylase: amino acid sequence and domain structure deduced from cDNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90(5)**:1766-1770.