

Jorge Hidalgo Gracia

Modulación de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PEPCK-C) porcina por efectores alostéricos, por mutagénesis y por las regiones reguladoras de la expresión

Departamento

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Director/es

López Buesa, Pascual

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606





Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASA
CITOSÓLICA (PEPCK-C) PORCINA POR
EFECTORES ALOSTÉRICOS, POR MUTAGÉNESIS
Y POR LAS REGIONES REGULADORAS DE LA
EXPRESIÓN

Autor

Jorge Hidalgo Gracia

Director/es

López Buesa, Pascual

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

2018

Modulación de la actividad de la
fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
citosólica (PEPCK-C) porcina por efectores
alostéricos, por mutagénesis y por las
regiones reguladoras de la expresión

Jorge Hidalgo Gracia



1542

Universidad
Zaragoza

En algún lugar, algo increíble está esperando a ser descubierto

Carl Sagan



Universidad
Zaragoza

D. PASCUAL LÓPEZ BUESA, Profesor Titular del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICA:

Que la tesis titulada: **“Modulación de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PEPCK-C) porcina por efectores alostéricos, por mutagénesis y por las regiones reguladoras de la expresión”**, de la que es autor D. Jorge Hidalgo Gracia, ha sido realizada bajo mi dirección y cumple los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, 17 de Mayo de 2018

Fdo: Prof. Dr. Pascual López Buesa

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director de tesis, el Dr. Pascual López Buesa, la oportunidad de poder haber realizado esta tesis bajo su guía. Sus enseñanzas y consejos a lo largo de todo este tiempo han sido fundamentales para el desarrollo satisfactorio de esta tesis.

A la Dra. Carmen Burgos le agradezco enormemente todo su apoyo y compañía durante el día a día en el laboratorio, así como su inmensa ayuda en toda la parte genética.

Al Dr. Pedro Latorre le agradezco su apoyo en los primeros momentos de laboratorio en los que uno siempre va perdido, así como las charlas científicas y consejos que hemos tenido a lo largo de todos estos años.

Al Dr. José Alberto Carrodegua le agradezco su ayuda y explicaciones en los experimentos de cultivo celular. Al Dr. Luis Varona le agradezco los análisis del estudio de asociación realizados con tanta presteza. Al Dr. Javier Sancho y al Dr. Adrián Velázquez les agradezco sus excelentes explicaciones sobre los métodos y la ayuda en la interpretación de los resultados de CD e ITC. Al Dr. Miguel Pérez Enciso le agradezco la cesión de los datos de la base de datos porcina que de tanta utilidad ha sido para la detección de SNPs. Al Dr. Ramón Hurtado le agradezco la cesión de una modificación del vector pET22bSUMO diseñada por él para intentar expresar alguna proteína “rebelde”.

Tampoco puedo olvidarme de agradecer a todos los compañeros del BIFI antiguos (Jorge, Mati, María, Sandra, Alejandro etc) y nuevos (Pepe, Pablo, etc) los buenos momentos pasados ahí. Ha sido un gustazo poder trabajar en el BIFI con tan buena compañía y “buen rollo”.

Por último, quiero agradecer a toda mi familia y en especial a mis padres Agustín y Ángeles todo su cariño y apoyo a lo largo de estos años que han hecho posible que esté aquí escribiendo estas palabras.

Índice

Abreviaturas.....	13
Resumen.....	15
Introducción y objetivos.....	17
1. Revisión bibliográfica.....	19
1.1 Relevancia del sector porcino.....	21
1.2 Características de calidad.....	21
1.2.1. pH y retención de agua.....	21
1.2.2. Color.....	23
1.2.3. Presencia de grasa.....	24
1.3 Infiltración grasa.....	25
1.3.1. Control por manejo de la infiltración grasa.....	26
1.3.2. Control nutricional de la infiltración grasa.....	27
1.3.2.1. Contenido proteico en la dieta.....	27
1.3.2.2. Suplementación con lípidos.....	28
1.3.2.3. Restricción de vitamina A.....	29
1.3.3. Control genético de la infiltración grasa.....	31
1.3.3.1. IGF2.....	31
1.3.3.2. MC4R.....	32
1.3.3.3. Leptina y receptor de leptina.....	32
1.3.3.4. Perilipinas.....	33
1.3.3.5. Gen asociado a la obesidad y masa adiposa (FTO)...	34
1.3.3.6. <i>PRKAG3</i>	35
1.4. Ruta biosintética de la infiltración grasa.....	36
1.4.1. Adipogénesis	36
1.4.2. Síntesis de ácidos grasos.....	37
1.4.3. Desaturación de ácidos grasos.....	39
1.4.4. Esterificación de los ácidos grasos.....	40
1.5. El “Ratón-PEPCK”.....	41

1.6. PEPCK.....	43
1.6.1. Estructura.....	45
1.6.2. Mecanismo de acción.....	46
1.6.3. Relevancia metabólica.....	48
1.6.4. Regulación.....	51
1.7. Relevancia de la PEPCK-C en la infiltración grasa.....	54
1.8. Importancia de la PEPCK-C como moduladora de los procesos de cataplerosis y anaplerosis.....	57
2. Material y métodos.....	59
2.1. Vectores de clonación.....	61
2.2. Clonación del gen de la PEPCK-C y sus mutantes.....	62
2.3. Formación de quimeras.....	65
2.4. Prueba de expresión y crecimiento a gran escala.....	66
2.5. Purificación de PEPCK-C.....	66
2.6. Ensayos enzimáticos de la PEPCK-C.....	68
2.7. Búsqueda de efectores de PEPCK-C en quimioteca.....	70
2.8. Determinación del IC ₅₀ de los compuestos.....	71
2.9. Ensayos de inhibición.....	72
2.10. Determinación de los parámetros de inhibición.....	73
2.11. Dicroísmo circular.....	75
2.12. Calorimetría isoterma de titulación (ITC).....	76
2.13. Docking.....	77
2.14. Estabilidad de PEPCK-C y mutantes in vivo.....	78
2.15. Extracción de ADN y secuenciación del promotor de la PEPCK-C porcina.....	80
2.16. Genotipado del SNP g.65100606G>A por RT-PCR.....	81
2.17. Análisis estadísticos.....	82
3. Búsqueda de efectores de la PEPCK-C.....	85
3.1. Estudio de la inhibición del 3-MP.....	88
3.2. Búsqueda de efectores de la PEPCK-C.....	94
3.3. Estudio del efecto de los compuestos 1 y 2.....	96

3.3.1. Compuesto 1.....	96
3.3.2. Compuesto 2.....	99
3.4. Determinación de la unión de los inhibidores a las isoenzimas de PEPCK-C mediante métodos físico-químicos.....	102
3.4.1 Dicroísmo circular.....	102
3.4.2 Calorimetría isoterma de titulación.....	103
3.4.3 Docking.....	105
4. Mutantes de PEPCK-C con la actividad cataplerótica o la anaplerótica inhibida.....	109
4.1. Generación de mutantes de la PEPCK-C porcina con disminución de la velocidad de un sentido de la reacción.....	111
4.2. Análisis cinético de la PEPCK-C pentamutante y p.Y235F.....	113
4.3. Dicroísmo circular de la PEPCK-C pentamutante.....	116
4.4. Estudios de inhibición de la PEPCK-C pentamutante.....	118
4.5. Análisis cinético de las mutaciones de la pentamutante.....	121
4.6. Dicroísmo circular de p.V85A y p.F130L.....	124
4.7. Análisis cinético de dobles mutantes.....	126
4.8. Quimera cerdo-rata de PEPCK-C.....	129
4.9. Estabilidad de PEPCK-C y mutantes <i>in vivo</i>	130
5. Búsqueda de SNPs en las regiones reguladoras de la PEPCK-C.....	133
5.1. Secuenciación del promotor de la PEPCK-C porcina.....	136
5.2. Nuevos SNPs en el gen de la PEPCK-C porcina.....	138
5.3. SNP g.65100606G>A.....	143
5.4. Caracterización del SNP g.65100606G>A en una población de cerdos y estudio de asociación.....	146
6. Discusión general.....	149
7. Conclusiones.....	161
Bibliografía.....	164

Abreviaturas

3-MP	Ácido 3-mercaptopicolínico	PEPCK-M	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa mitocondrial
3'UTR	Región no traducida al final del gen	PPAR	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
ANS	Ácido 8-anilinaftaleno-1-sulfónico	<i>PRKAG3</i>	Gen de la subunidad reguladora γ de la proteína quinasa activada por adenosina monofosfato
ATP	Adenosín trifosfato	PSE	Carne pálida, blanda y exudativa
CD	Dicroísmo circular	PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
DFD	Carne oscura, firme y seca	QTL	Locus de caracteres cuantitativos
DMSO	Dimetilsulfóxido	RT-PCR	PCR en tiempo real
FBS	Suero fetal bovino	RYR1	Receptor de 1 rianodina
FTO	Gen de la dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato	SNP	Polimorfismo de nucleótido único
GDP	Guanosín difosfato	TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
GIM	Grasa intramuscular	V_{max}	Velocidad máxima
GTP	Guanosín trifosfato	WT	Isoforma salvaje
IGF2	Factor de crecimiento insulínico tipo 2		
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido		
ITC	Calorimetría isoterma de titulación		
k_{cat}	Número de recambio		
K_i	Constante de inhibición		
K_m	Constante de Michaelis		
LEPR	Receptor de leptina		
MC4R	Receptor 4 de melanocortina		
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina		
OAA	Oxaloacetato		
PEP	Fosfoenolpiruvato		
PEPCK-C	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica		

Resumen

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PEPCK-C) porcina es una enzima relevante en la determinación de los caracteres de calidad de la carne y de la canal, como el espesor de la grasa dorsal, la grasa intramuscular o la exudación. En un trabajo previo de nuestro grupo demostramos la importancia de la mutación p.M139L de la PEPCK-C porcina y el probable papel *in vivo* de los dos sentidos de la reacción. En esta tesis se exploran nuevas formas de regulación de la actividad de la PEPCK-C.

La primera forma de regulación estudiada fue el uso de efectores enzimáticos. Mediante el uso del inhibidor ácido 3-mercaptopicolínico se ha determinado que la sustitución M139L produce modificaciones en el sitio de unión de GTP/GDP al enzima causantes de las diferencias en la actividad enzimática. A su vez se han descrito dos nuevos inhibidores no competitivos de la PEPCK-C, los cuales podrían modificarse químicamente para hacerlos más solubles y ser utilizados *in vivo* para modular la actividad de la PEPCK-C.

La segunda forma de regulación estudiada fue la creación de mutantes artificiales de la PEPCK-C con una de sus dos actividades inhibida y la otra sin modificar. Estos mutantes son estables en cultivo celular, por lo que podrían utilizarse para estudiar *in vivo* como ambos sentidos de la reacción catalizada por la PEPCK-C modifican las variaciones en la infiltración grasa del cerdo.

La tercera forma de regulación estudiada fue la búsqueda de nuevos SNPs en las regiones reguladoras del gen de la PEPCK-C. Se han descrito 62 SNPs, de los cuales uno situado en la región 3'UTR era interesante por aparecer en cerdos Duroc y por estar en el sitio de unión de un microARN que regula el metabolismo de la glucosa. Al analizar el SNP se observó que aparece en poblaciones Duroc x Landrace/Large White actuales pero no está asociado a ningún carácter fenotípico de infiltración grasa.

Introducción y objetivos

Nuestro grupo de investigación lleva estudiando la influencia de diversos genes en la infiltración grasa desde hace casi 15 años. Empezamos poniendo a punto métodos de análisis masivo de mutaciones (Burgos *et al.*, 2005, 2006; Carrodegua *et al.*, 2005). Seguimos evaluando el efecto de estas mutaciones sobre la infiltración grasa de la canal y de la carne (Burgos *et al.*, 2012; Galve *et al.*, 2012) y, finalmente, nos lanzamos a la búsqueda de mutaciones en otros genes utilizando la estrategia de los genes candidatos. Este enfoque consiste en buscar variabilidad en aquellos genes que, por su función biológica, pueden tener la capacidad de modular caracteres de interés como, por ejemplo, por estar implicados en rutas biosintéticas de lípidos o por modular el metabolismo de los carbohidratos.

En una de esas búsquedas encontramos un SNP en el gen de la PEPCK-C porcina. Esta mutación estaba asociada a cambios muy interesantes en la infiltración grasa y en la calidad de la carne. Estos cambios se debían probablemente a cambios en las propiedades cinéticas y en la estabilidad de la enzima (Latorre *et al.*, 2016). Posteriormente, en una tesis recientemente defendida (Latorre, 2018), hemos demostrado nuevos papeles biológicos de la PEPCK-C.

El haber encontrado un regulador general de la calidad de la carne y el hecho de que este se encuentre en una enzima clave del metabolismo, implicada además en procesos patológicos tan relevantes como la diabetes y el cáncer, nos llevó a profundizar en el estudio de la modulación de su actividad. Esto lo hemos llevado a cabo en esta tesis trabajando a tres niveles:

- 1) Buscando nuevos efectores alostéricos que modulen la actividad de la enzima y utilizándolos para profundizar en el estudio de las propiedades bioquímicas de las isoformas de la PEPCK-C porcina.
- 2) Generando mutantes y estudiando sus propiedades cinéticas y estructurales
- 3) Buscando mutaciones en las regiones reguladoras del gen

I. Revisión bibliográfica

1.1 Relevancia del sector porcino

El sector porcino español es el sector ganadero más importante. Supone el 36,4% de la producción final ganadera y el 12,7% de la producción final agraria. Su volumen anual de negocio se sitúa en los 6.000 millones de euros. El número de cerdos sacrificados ha aumentado notablemente en los últimos años, situándose actualmente en los 47 millones de animales (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2016).

España es el cuarto productor porcino mundial, sólo por detrás de China, EEUU y Alemania. Un 47% de la producción porcina española se dedica a la exportación a terceros países, una tendencia que ha ido en aumento en los últimos años.

Dentro de los productos derivados del cerdo, el jamón curado tiene especial relevancia, tanto cualitativa como cuantitativa, por ser el producto de calidad de referencia de todo el sector. En el año 2015 se produjeron 273.550 toneladas métricas de jamón y paleta curados, de las cuales se exportaron al exterior 41.948 toneladas con un valor aproximado de 350 millones de euros (Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España, 2017). Este volumen de negocio se ha incrementado paulatinamente a lo largo de los años y, con el gran aumento de las exportaciones al pujante mercado asiático, se espera que este crecimiento se mantenga a lo largo de los próximos años.

1.2 Características de calidad de la canal y de la carne

El espesor de la grasa dorsal es uno de los principales criterios para determinar la calidad de la canal cuando se hacen los pagos a los ganaderos. Sin embargo, en los puntos de venta, el elemento más relevante es la calidad de la carne, que está determinada por otros parámetros como el color o la capacidad de retención de agua.

1.2.1. pH y capacidad de retención de agua

El músculo del cerdo vivo es de color rojo, tiene un pH de alrededor de 7 y un metabolismo generalmente aerobio. A la muerte del animal, cesa el aporte de oxígeno al

músculo, por lo que éste, para poder mantener los niveles energéticos, entra en metabolismo anaerobio. La glucólisis a partir del glucógeno almacenado en el tejido muscular es la ruta metabólica que se produce en el ambiente anaerobio *post-mortem*. Esta ruta produce ácido láctico, el cual se va acumulando en el músculo y disminuyendo el pH del mismo. La caída de la concentración de ATP también contribuye a la caída del pH. El pH a las 24 horas (pH_{24}) cae hasta valores de 5,4 o incluso menores. A su vez, el color del músculo se vuelve rosa y hay un aumento del exudado muscular (Belitz, Grosch y Schieberle, 2012).

Variaciones en el metabolismo *post-mortem* producen carnes poco deseadas en la industria como son las carnes DFD (“Dark, Firm, Dry”; oscuras, firmes, secas) y las carnes PSE (“Pale, Soft, Exudative”; pálidas, blandas, exudativas) (Fig. 1.1).



Fig. 1.1. Imágenes de carnes PSE (izquierda), normal (centro) y DFD (derecha). Imágenes tomadas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Las carnes DFD se producen principalmente por estrés crónico o *pre-mortem* del animal. Durante el estrés se produce un gran consumo del glucógeno muscular, por lo que tras el sacrificio se produce poco ácido láctico y el pH_{24} desciende sólo a valores próximos a 6,5. Estos valores de pH_{24} altos hacen a la carne más susceptible al crecimiento bacteriano. Su excesiva capacidad de retención de agua convierte a la carne en poco adecuada para preparar ciertos derivados cárnicos. La aparición de carnes DFD es poco frecuente en los últimos tiempos por las mejoras en las condiciones de los animales.

Las carnes PSE se producen en cerdos con una susceptibilidad genética al estrés, cuando el sacrificio se realiza en condiciones no óptimas o cuando no se refrigera la canal correctamente. En ellos, el estrés agudo produce una degradación muy rápida del ATP intracelular que induce un aumento del metabolismo energético. A consecuencia de este

intenso metabolismo la temperatura muscular, en vez de descender tras el sacrificio, aumenta hasta 40-41°C. La combinación del aumento de la temperatura junto con el pH bajo produce desnaturalización de las proteínas solubles, daños en las membranas y salida de líquido al espacio extracelular (Adzitey y Nurul, 2011).

La susceptibilidad genética al estrés que determina la aparición de las carnes PSE se debe sobre todo a la mutación c.C1843T en el receptor de rianodina (RyR1) del músculo esquelético, también llamado gen del halotano (Fujii *et al.*, 1991). La proteína RyR1 mutada produce un aumento continuado de la concentración de Ca²⁺ intracelular, lo cual provoca un incremento en el metabolismo energético (Küchenmeister *et al.*, 1999). El 12% de la carne europea tiene tendencia a ser PSE, por lo que la detección y la selección de animales con tendencia a desarrollarla tienen un gran interés económico (Whittemore, 1996; Burgos *et al.*, 2005; Barbut *et al.*, 2008).

1.2.2. Color

El color de la carne es primer criterio del consumidor a la hora de comprar carne. La principal responsable del color en la carne es la mioglobina. Los músculos implicados en movimientos repetitivos, como el diafragma, tienen más mioglobina y por tanto son de un color rojo más intenso. La selección de animales para la producción de carne ha llevado a una hipertrofia muscular pero no a un aumento de la cantidad de mioglobina, por lo que los animales fuertemente seleccionados para la producción de carne tienen un color más pálido en su carne (Young y West, 2005).

Al sacrificio, el oxígeno deja de llegar al músculo y la mioglobina pierde el oxígeno que une, transformándose en desoximioglobina, que tiene un color púrpura. Con la maduración de la carne, el oxígeno ambiental empieza a difundirse en la superficie de la pieza de carne, transformándose la desoximioglobina en oximioglobina, que tiene color rojo brillante. Con maduraciones más largas, la mioglobina sufrirá reacciones de oxidación y se transformará en metmioglobina, que tiene color marrón (Young y West, 2005).

Factores como la genética o la dieta afectan al color de la carne porcina. Edwards, Bates y Osburn (2003) demostraron que los cerdos de raza Duroc tienen un color de la carne más apetecible que los Piétrain. El color de la carne fresca está negativamente afectado

por la presencia del gen del halotano por la difracción de la luz y por la desnaturalización proteica (Van Oeckel *et al.*, 2001; Fàbrega *et al.*, 2002; Fernandez *et al.*, 2002). Sin embargo, este efecto no se detecta cuando la carne está cocinada (Moelich, Hoffman y Conradie, 2003). A día de hoy, existen más de 500 QTLs (*quantitative trait locus*) descritos que afectan al color de la carne porcina. Li *et al.* (2016) describen algunos genes candidatos que afectan al color de la carne, como el receptor de transferrina, la glucógeno sintasa 2 o la glutatión peroxidasa 2.

La suplementación de la dieta de cerdos con oligoelementos como el magnesio (Apple *et al.*, 2000) o el manganeso (Apple *et al.*, 2004) se ha demostrado que tiene efecto sobre el color de la carne. La suplementación con vitamina C, D o E también hacen a la carne más apetecible para el consumidor (Wiegand *et al.*, 2002; Peeters, Driessen y Geers, 2006).

1.2.3. Presencia de grasa

Otra de las principales características de calidad de la carne es la presencia de grasa. En los países occidentales, aunque varía el grado, existe una tendencia de los consumidores a demandar carnes magras. La adiposidad de la canal se determina midiendo el espesor de la grasa subcutánea en el punto P2, situado a nivel de la última costilla del cerdo.

En los años 60, en un cerdo de 100 kilos un 30% de su peso era grasa. En la actualidad la grasa representa un 15% o menos de su peso total. Los espesores de la grasa dorsal subcutánea se han reducido unos 0,5 mm anuales debido a la selección genética y a la nutrición (Whittemore, 1996).

La carne de cerdo posee menos grasa que la carne ovina y que la de vacuno. Además la grasa del cerdo posee más ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). En concreto, la grasa del cerdo posee mucho más ácido linoleico, que es un ácido graso esencial ya que el ser humano no es capaz de sintetizarlo por sí mismo. También contiene más ácido araquidónico (Tabla 1.1) (Wood *et al.*, 2008).

Tipo ácido graso	Porcino	Ovino	Vacuno
14:0 (ác. mirístico)	1,3	3,3	2,7
16:0 (ác. palmítico)	23,2	22,2	25
16:1 <i>cis</i> (ác. palmitoleico)	2,7	2,2	4,5
18:0 (ác. esteárico)	12,2	18,1	13,4
18:1 <i>cis</i> – 9 (ác. oleico)	32,8	32,5	36,1
18:2 ω – 6 (ác. linoleico)	14,2	2,7	2,4
18:3 ω – 3 (ác. α -linolénico)	0,95	1,37	0,70
20:4 ω – 6 (ác. araquidónico)	2,21	0,64	0,63
20:5 ω – 3 (ác. eicosapentanoico)	0,31	0,45	0,28

Tabla 1.1. Contenido en ácidos grasos (g/ 100 g ácidos grasos) del músculo porcino, ovino y vacuno. Tabla tomada de Wood *et al.* (2008).

En la industria, la mayor presencia de PUFA en la carne de cerdo favorece algunos procesos de curación, aunque dificulta el loncheado de la carne por su mayor blandura y reduce la vida útil del producto por su tendencia a la oxidación (Whittemore, 1996).

1.3 Infiltración grasa

Los lípidos en el cerdo se acumulan en diversas localizaciones anatómicas. Hay un considerable acúmulo subcutáneo y visceral y un contenido notable de grasa inter e intramuscular cuyos límites a veces no son demasiado precisos. La grasa intramuscular (GIM) está constituida por depósitos de células adiposas que se encuentran entre las fibras musculares y por acúmulo de lípidos en el interior de las células musculares. El tamaño y número de los adipocitos intramusculares determina el contenido en lípidos del tejido muscular porcino (Gardan, Gondret y Louveau, 2006).

La tendencia a la selección de cerdos cada vez menos grasos ha provocado un efecto colateral, la disminución del contenido de GIM debido a que existe una correlación genética positiva de hasta 0,6 entre ambos caracteres (Sellier, 1998). Las mejores cualidades sensoriales (jugosidad, sabor) aparecen cuando la GIM supone alrededor de un 3% del peso muscular (Fernandez *et al.*, 1999). Sin embargo, la selección actual la ha

conducido a valores por debajo del 1% (Wood *et al.*, 2008). La GIM tiene especial interés en la industria del jamón curado ya que aporta características sensoriales importantes como el brillo y la jugosidad y es precursora de sustancias sápidas y aromáticas (Ruiz-Carrascal *et al.*, 2000).

La deposición de GIM es un complejo proceso regulado por múltiples interacciones genéticas, nutricionales y hormonales entre el músculo, el tejido adiposo, el tejido conjuntivo y órganos reguladores como el hígado y el riñón.

1.3.1. Modulación de la infiltración grasa mediante el manejo

El cruce selectivo es uno de los métodos más efectivos con el que se puede conseguir aumentar el contenido de GIM en los cerdos. Los cerdos de raza Duroc tienen tendencia a tener más GIM que otras razas, por lo que un cruce usado en la industria es el de machos Duroc con hembras Large White/Landrace, las cuales aportan un mayor crecimiento magro. Este cruce aumenta el contenido de GIM sin disminuir otros caracteres de calidad importantes (McGloughlin *et al.*, 1988; Blanchard *et al.*, 1999), siendo por ejemplo el cruce utilizado por la Denominación de Origen “Jamón de Teruel”.

Los animales castrados muestran un gran incremento de la cantidad de grasa corporal (Wood y Riley, 1982; Knudson *et al.*, 1985) debido a la hipertrofia de los adipocitos (Lee, Kauffman y Grummer, 1973). En cuanto a la localización de la grasa, se ha observado que la castración aumenta el contenido de GIM en cerdos (Morales *et al.*, 2011; Peinado Pino, 2015) y vacuno (Mach *et al.*, 2009).

La temperatura ambiental en la que se mantiene a los cerdos tiene influencia en el tejido adiposo, la ingesta de alimentos y la ganancia de peso diaria. Las altas temperaturas durante un largo tiempo producen acumulación de grasa visceral y perirrenal y disminución de la grasa subcutánea (Le Dividich, Noblet y Biwaka, 1987; Lefaucheur *et al.*, 1991). Witte *et al.* (2000) no encuentran variaciones en la GIM entre los cerdos mantenidos a una temperatura media (18°C) y los mantenidos a una temperatura alta (32°C).

El peso al sacrificio es otra de las formas de modular la infiltración grasa mediante el manejo. La deposición de lípidos es un proceso tardío en el crecimiento porcino, por tanto,

el incremento del peso al sacrificio producirá un aumento del contenido de GIM (Whittemore, 1996). Sin embargo, este aumento del peso del animal puede comprometer la viabilidad económica del proceso debido al aumento del índice de conversión de los animales más pesados.

1.3.2. Control nutricional de la infiltración grasa

Otra de las formas de controlar la infiltración grasa en los cerdos es mediante la modificación de la dieta, ya sea eliminando o añadiendo componentes de ella. Algunas de las principales modificaciones en la dieta que son capaces de modificar la composición de la grasa porcina son las siguientes.

1.3.2.1. Contenido proteico en la dieta

El uso de dietas con bajo contenido en proteínas para incrementar el contenido de GIM en los cerdos ha conseguido producir más ternera y jugosidad en la carne cocinada. En el estudio de Teye *et al.* (2006) se observó que una dieta baja en proteínas incrementaba el contenido de GIM de 1,7 g GIM/100 g de músculo a 2,9 g GIM/100 g de músculo y aumentaba la ternera y la jugosidad de la carne. Sin embargo, estos animales tenían una ganancia de peso diaria menor, un menor índice de conversión de alimentos, un menor ratio ácidos grasos insaturados/saturados y un incremento de la oxidación lipídica. Madeira *et al.* (2017) observaron que la restricción proteica en cerdos de raza Alentejana aumentaba el contenido de GIM un 15,7%, un 3,2% los ácidos grasos saturados y un 5,2% los monoinsaturados y disminuía un 14,8% los poliinsaturados.

El efecto producido en el contenido de GIM por la restricción proteica en la dieta es debido a la restricción de lisina que afecta a la expresión de la esteroil-CoA desaturasa, el PPAR γ y otras proteínas implicadas en la regulación del metabolismo energético, que incluso son capaces de inducir cambios en las propiedades metabólicas de las fibras (de glucolíticas a oxidativas) (Madeira *et al.*, 2013; Pires *et al.*, 2016). La restricción proteica también aumenta el funcionamiento de la ruta de señalización de mTOR (Y. Li *et al.*,

2016; Yin *et al.*, 2017), la cual es la reguladora central del metabolismo celular, del crecimiento, de la proliferación y de la supervivencia (Laplante y Sabatini, 2009).

El *N*-carbamilglutamato incrementa la síntesis endógena de arginina (Wu, Knabe y Woo, 2004). Su suplementación a una dieta baja en proteínas reduce la cantidad de grasa dorsal, aumenta el área muscular del lomo y aumenta la cantidad de leucina sin cambios negativos en el perfil de ácidos grasos del cerdo (Ye *et al.*, 2017).

Cuando se analizó en jamones curados el efecto que produce la restricción proteica, Gallo *et al.* (2016) observaron un incremento del 15% en el espesor de la grasa subcutánea, un descenso del 5% en el contenido de ácido linoleico y PUFA en la grasa subcutánea y un descenso del 7% en la pérdida de peso al salado del jamón. Grassi *et al.* (2017) observaron que aumentaba el contenido graso y el espesor de la grasa subcutánea en los jamones curados provenientes de cerdos con restricción proteica.

1.3.2.2. Suplementación con lípidos

Los cerdos incorporan en su tejido adiposo los ácidos grasos consumidos, siempre y cuando el aporte de carbohidratos en la dieta sea suficiente para el mantenimiento del animal (Chwalibog *et al.*, 1992). Por tanto, la dieta influye en gran medida en la composición de ácidos grasos de su tejido adiposo. Los cerdos ibéricos criados en la dehesa tienen mayor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados debido a que este tipo de ácidos grasos son muy abundantes en las bellotas de las que se alimentan (Ruiz *et al.*, 1998). La diferente oxidación de ácidos grasos insaturados, que varían dependiendo de la dieta del animal, tiene importancia en la calidad del jamón curado ya que producen cambios en el aroma (Chizzolini, Novelli y Zanardi, 1998).

La adición de ácido linoleico conjugado en la dieta no afecta al peso corporal ni a la ingesta de alimento por el animal. Además estos cerdos tienen reducido el espesor de grasa dorsal y aumentada la cantidad de grasa intra e intermuscular (Dugan *et al.*, 1997; Wiegand, Parrish, *et al.*, 2002). El incremento de GIM producido por la adición de ácido linoleico está mediado por el aumento de tamaño de los adipocitos intramusculares (Barnes *et al.*, 2012).

El ratio ω -6/ ω -3 de los PUFA tiene una gran importancia en la salud humana. Un ratio ω -6/ ω -3 bajo, que se puede conseguir aumentando la concentración de ω -3, está asociado a un menor riesgo de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, un ratio ω -6/ ω -3 alto está asociado al riesgo de aparición de cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades autoinmunes. La dieta occidental actual tiene un ratio ω -6/ ω -3 demasiado alto (alrededor de 15:1), algo que no sucedía hace 200 años cuando el ratio era de 1:1 (Simopoulos, 2002). Por tanto, cualquier forma de aumentar los niveles de PUFA ω -3 en la dieta humana tiene un gran interés en la salud humana. Por ello, se han intentado varias aproximaciones para modificar el ratio ω -6/ ω -3 en la carne porcina y hacerla así más saludable.

Una de las formas de aumentar el contenido de PUFA ω -3 es la adición de aceite de pescado a la dieta de los cerdos. Sin embargo, cuando la adición es muy alta, la carne de cerdo empieza a tener sabor y olor a pescado (Hallenstvedt *et al.*, 2010). El uso de aceite de linaza, que tiene gran cantidad de ácidos grasos ω -3 y ω -6, le proporciona al jamón curado una gran cantidad de PUFA ω -3. Sin embargo, estos jamones no son fácilmente aceptados por los consumidores por su sabor y olor peculiares (Musella *et al.*, 2009; De Tonnac, Karim-Luisset y Mourot, 2017). Burgos *et al.* (2010) mostraron que el uso de aceite de pescado y de linaza combinados producía un incremento significativo de los PUFA y un descenso de los ácidos grasos saturados en el lomo del cerdo. El uso de otros aceites como el de soja, el de colza o el de palma también han demostrado su eficacia en el aumento de la cantidad de ácidos grasos saludables en la carne (Brooks, 1967; Teye *et al.*, 2006; Bertol *et al.*, 2013).

1.3.2.3. Restricción de vitamina A

Las necesidades de vitamina A en cerdos en la fase final de engorde son de 1300 IU/kg (NRC, 1998). La restricción de vitamina A en cerdos en la fase final de engorde produce aumento del contenido de GIM sin modificar otras características de la canal ni de crecimiento. Olivares *et al.* (2009, 2011) mostraron que la composición lipídica de la GIM no se ve modificada, pero sí la de la grasa subcutánea donde aumentan los niveles de ácidos grasos saturados. Sin embargo, Ayuso, Óvilo, *et al.* (2015) sí que encontraron cambios significativos en la composición lipídica de la GIM debido a un incremento de

los ácidos grasos monoinsaturados y a un descenso de los ácidos grasos saturados. Estas diferencias las atribuyen a los diferentes tiempos de restricción de vitamina A o al uso de diferentes razas de cerdos. La restricción de vitamina A también puede realizarse en las fases tempranas del crecimiento, donde se observa un aumento de la cantidad de preadipocitos (Ayuso, Óvilo, *et al.*, 2015). Estos efectos producidos por la restricción de vitamina A no se observan en el ganado vacuno (Pyatt, Berger y Nash, 2005). Los efectos de altos niveles de vitamina A en el cerdo no están claros, ya que existen estudios contradictorios (D'Souza *et al.*, 2003; Pyatt, Berger y Nash, 2005).

Está establecido que más de 500 genes están regulados por la vitamina A (Balmer y Blomhoff, 2002). Varios autores han estudiado como se modifica la expresión génica de varios genes clave en cerdos sometidos a restricción de vitamina A. Ayuso, Óvilo, *et al.* (2015) estudiaron como variaba la expresión en músculo de genes implicados en el control de la adipogénesis mediada por vitamina A (*RARA*, *RXRG* y *CRABP1*), en la diferenciación de adipocitos (*CEBP*, *PPARG* y *SREBP1C*) y en el metabolismo de ácidos grasos (*SCD*). De ellos sólo *CRABP1* tiende a expresarse menos en los animales sometidos a restricción de vitamina A, en el resto no se observa ninguna diferencia en la expresión. *CRABP1* codifica una proteína citosólica que une ácido retinoico. Una posible razón para esta falta de cambios en la expresión génica podría ser que se necesitan tiempos más largos de dos meses en la restricción de vitamina A.

Ayuso, Fernández, *et al.* (2015) estudiaron como variaba la expresión de 19 genes en tejido adiposo y hepático. En el tejido hepático, tres genes ven aumentada su expresión en cerdos sometidos a restricción de vitamina A; *ACOX1*, *CEBPB* e *IGF1*. *ACOX1* codifica para la acyl-CoA oxidasa 1 peroxisomal, la primera enzima del ciclo de la β -oxidación de ácidos grasos, *CEBPB* codifica para un factor de transcripción e *IGF1* codifica para el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) implicado en mecanismos de crecimiento y anabolismo. En el tejido adiposo, observan que *CRABP1* y *SCD* ven aumentada su expresión en cerdos sometidos a restricción de vitamina A y *RXRG* ve disminuida su expresión. *SCD* codifica para la esteoril-CoA desaturasa y *RXRG* para el receptor gamma de ácido retinoico.

Tous *et al.* (2014) estudiaron como variaba la expresión en músculo de ocho genes (*PPAR α* , *PPAR γ* , *SREBP1*, *FAS*, *ACC*, *LPL*, *D6D* y *SCD*). De ellos, sólo observan una tendencia al aumento de la expresión de *PPAR α* en cerdos sometidos a restricción de vitamina A.

La discrepancia en los resultados de expresión génica muestra lo compleja que es la regulación del metabolismo de la vitamina A y que posiblemente los efectos que se observan en la GIM sean debidos a la interacción de varios genes, lo cual hace muy complicada la detección de los genes responsables. Además, existe la dificultad de estandarizar estos estudios debido al carácter lipofílico de la vitamina A, que hace que se acumule en el hígado, lo cual dificulta la eliminación completa en la dieta y el establecimiento de grupos experimentales claramente diferenciados.

1.3.3. Control genético de la infiltración grasa

La infiltración grasa está regulada por varias rutas metabólicas en las que participan multitud de proteínas. Escaneos en el genoma han mostrado que existen más de 500 QTLs implicados en la infiltración grasa en el genoma del cerdo (Switonski *et al.*, 2010). Además se han analizado varios polimorfismos asociados con la infiltración grasa. Algunas de las proteínas y sus polimorfismos más importantes implicados en la infiltración grasa son los siguientes.

1.3.3.1. IGF2

El factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF2) es una proteína que está implicado en la formación del tejido muscular (miogénesis). La sustitución A>G en la posición 3072 del intrón 3 ha sido descrita como la responsable del 10-20% de la variación en la grasa dorsal y de un 15-30% de la variación en la masa muscular, siendo el alelo A aquel que confiere una mayor musculatura y una reducción de la grasa dorsal (Nezer *et al.*, 1999; Van Laere *et al.*, 2003).

La selección genética hacia cerdos más magros ha provocado una intensa selección del alelo A de IGF2, siendo así que un 99% de los cerdos Piétrain (Carrodegas *et al.*, 2005) y más de un 80% de los cerdos Duroc (Burgos *et al.*, 2008) portan dos alelos A. Fontanesi *et al.* (2015) muestran que en cerdos Large White italianos la presencia del alelo A ha pasado de un 65% a principios de los años 90, a un 94% en el año 2010. Debido a un

fenómeno de impronta genética sólo se expresa el alelo de IGF2 procedente de la vía paterna (Li *et al.*, 2008), por lo que la selección genética es mucho más sencilla.

1.3.3.2. MC4R

El gen del receptor 4 de melanocortina (MC4R) codifica un receptor acoplado a proteínas G que une la hormona estimulante de melanocitos α (α -MSH). Esta hormona está implicada en la formación de melanina, en la homeostasis energética y en la ingesta de alimentos (Olszewski *et al.*, 2007; Krashes, Lowell y Garfield, 2016).

La sustitución c.1426G>A produce un cambio de ácido aspártico por asparagina en la posición 298 de la proteína (Asp298Asn). Los animales que poseen esta mutación tienen una mayor ingesta de alimentos, una mayor ganancia de peso diaria y una mayor cantidad de grasa dorsal (Kim *et al.*, 2000; Houston, Cameron y Rance, 2004). Esta sustitución se ha encontrado en varias razas, como en la Ibérica, la Piétrain o la Duroc (Burgos *et al.*, 2006). A principios de los años 90, en poblaciones de Large White italianos, el alelo mutado tenía una presencia del 57% y en el año 2010 esta presencia había aumentado hasta un 82% (Fontanesi *et al.*, 2015).

Galve *et al.* (2012) mostraron que los animales con la mutación en MC4R tienen un menor número de piezas ricas en tejido muscular y un mayor número de piezas ricas en tejido adiposo. En los jamones poseen una menor fracción muscular y más tejido adiposo inter e intramuscular. En cuanto a la composición lipídica, Galve *et al.* (2012) observaron un aumento de los ácidos grasos saturados (14:0 y 18:0) y una disminución de los PUFA (ácido linoleico y ácido α -linolénico).

1.3.3.3. Leptina y receptor de leptina

La leptina es una hormona proteica sintetizada por el tejido adiposo. La leptina es un mediador de la regulación energética cuya función es inhibir el apetito, por lo que evita una mayor ganancia de peso. La correcta unión de la leptina a su receptor situado en el

tejido nervioso del hipotálamo permite la inhibición neuronal de los circuitos que regulan el apetito (Friedman, 2002).

Se han descubierto varias mutaciones tanto en la cascada de señalización activada por leptina como en el receptor de leptina (LEPR). Entre ellas, Ovilo *et al.* (2005) describieron la mutación c.1987C>T en el LEPR en cerdos ibéricos y observaron que la mutación reduce la unión de la leptina a su receptor, consiguiendo así que los cerdos tengan menos inhibición en el apetito, coman más y presenten un mayor contenido graso en la canal (Ovilo *et al.*, 2010). Esta mutación se encuentra fijada en cerdos de raza Ibérica (Muñoz *et al.*, 2009).

Galve *et al.* (2012) estudiaron los efectos en caracteres relacionados con el tejido adiposo que produce la mutación c.1987C>T en el gen del LEPR en un cruce de razas distintas a la ibérica (Duroc x Landrace/Large White). Se observó que los cerdos portadores de la mutación tienen mayor cantidad de tejido adiposo en jamones y paletillas, una mayor cantidad de grasa dorsal, un aumento de los ácidos grasos saturados y un descenso de los insaturados. Estos efectos observados podrían tener interés para la industria de los jamones y paletillas curados, aunque también tiene alguna desventaja. El incremento de tejido adiposo en los jamones y las paletillas junto con la mayor presencia de grasa intramuscular favorece su curado y su calidad. Sin embargo, la mayor cantidad de grasa dorsal y los lomos más ligeros que poseen estos animales tienen consecuencias económicas negativas. El descenso del contenido de ácido oleico en estos animales también es una desventaja ya que el ácido oleico es un precursor de compuestos volátiles positivamente valorados organolépticamente (Martin *et al.*, 1999). El aumento del tejido adiposo producido por la mutación en el gen del LEPR se mantiene constante a lo largo de toda la fase de engorde del animal. Sin embargo, los cambios en la composición de ácidos grasos se van produciendo a medida que aumenta el peso del animal (Henriquez-Rodriguez *et al.*, 2016).

1.3.3.4. Perilipinas

Las perilipinas son unas proteínas que se expresan en varios tejidos, entre ellos el tejido muscular esquelético (Brasaemle *et al.*, 1997). Estas proteínas están implicadas en la

captación de ácidos grasos de cadena larga y su almacenamiento como triglicéridos (Bickel, Tansey y Welte, 2009).

La perilipina 1 se expresa en la periferia de los adipocitos que se encuentran entre los miocitos del tejido muscular esquelético porcino y la perilipina 2 se expresa en el interior de los miocitos porcinos. La expresión de perilipina 2 es más alta en aquellos miocitos que tienen un contenido lipídico mayor y es más alta en cerdos con alto contenido en GIM. La expresión de perilipina 1 no varía en animales con diferente contenido en GIM (Gandolfi *et al.*, 2011).

Davoli *et al.* (2011) describen seis SNP en el gen de la perilipina 2, dos de ellos localizadas en intrones, dos de ellos en la región 3'UTR y dos mutaciones que cambian un aminoácido (*missense mutation*) en los exones. La mutación 98G>A situada en la región 3'UTR está asociada en cerdos de raza Duroc italianos a una mayor ganancia de peso diaria y peso de los jamones y a un menor índice de transformación del alimento (FCR).

Cui *et al.* (2016) no encuentran, en los cerdos de raza Laiwu (raza asiática con alto contenido en GIM), correlación directa entre la expresión de perilipina 2 y la presencia de GIM, sin embargo sí que la encuentran con la expresión de PPAR γ . Motomura *et al.* (2006) demuestran en humanos que la expresión de las perilipinas está mediada por PPAR γ , lo cual podría explicar los resultados de Gandolfi *et al.* (2011) y Cui *et al.* (2016).

1.3.3.5. Gen asociado a la obesidad y masa adiposa (FTO)

El gen FTO codifica la enzima dioxigenasa dependiente de α -cetoglutarato. Esta enzima repara el ADN y el ARN metilado mediante una desmetilación oxidativa. En humanos, se ha observado que variaciones en este gen están asociadas con la obesidad en varias poblaciones (Fawcett y Barroso, 2010). En cerdos es probable que esté implicado en la regulación del balance energético y de la ingesta de alimentos y que esto afecte a la infiltración grasa.

Fan, Du y Rothschild (2009) estudiaron el gen FTO en una población Berkshire x Yorkshire descubriendo doce variaciones, de las cuales el SNP c.46-139A>T en el intrón 1 y la mutación sinónima c.594C>G (Ala198Ala) en el exón 3 están significativamente

asociadas con la ganancia diaria de peso y el total de lípidos en el músculo (grasa inter e intramuscular conjuntamente). Fontanesi *et al.* (2009) estudiaron la mutación g.276T>G en las razas Large White italianos y Duroc y observaron que estaba significativamente asociada con la ganancia de peso diario y con la deposición de grasa intermuscular. Este alelo g.276T>G ha aumentado su presencia en la raza Large White italianos, pasando de un 18% a principios de los 90, a un 48% en el año 2010 (Fontanesi *et al.*, 2015). Dvořáková *et al.* (2012) establecen la asociación de la mutación g.400C>G en el gen FTO con el espesor de la grasa dorsal en cerdos Meishan × Piétrain.

1.3.3.6. *PRKAG3*

El gen Rendement Napole (RN) se corresponde al gen *PRKAG3* que codifica una isoforma exclusiva del músculo de la subunidad reguladora γ de la proteína quinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) implicada en el metabolismo del glucógeno (Milan *et al.*, 2000).

Se han descrito dos sustituciones en el gen de la *PRKAG3* asociadas a cambios fenotípicos en el cerdo, la R200Q y la V199I. La primera sustitución (R200Q) se corresponde al alelo RN⁻ que causaba aumento del contenido de glucógeno muscular, a consecuencia de lo cual el descenso del pH₂₄ era muy pronunciado y daba lugar a las llamadas carnes ácidas. (Fernandez *et al.*, 1992; Le Roy *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2000). La segunda sustitución (V199I) se corresponde al alelo rn* descrito por Milan *et al.* (2000), el cual producía un descenso del contenido de glucógeno muscular, a consecuencia de lo cual el descenso de pH₂₄ era menor, produciendo además una carne con un mayor contenido en tejido adiposo y con un color más intenso (Ciobanu *et al.*, 2001; Enfält *et al.*, 2006; Škrlep *et al.*, 2010).

Este alelo no ha cambiado su frecuencia en la raza Large White italianos entre principios de los años 90 y el año 2010 (Fontanesi *et al.*, 2015). Además se ha observado que mutaciones en la región promotora del gen son capaces de modificar la expresión del gen y la calidad de la carne (Ryan *et al.*, 2012).

1.4. Rutas biosintéticas de la infiltración grasa

1.4.1. Adipogénesis

La adipogénesis es el proceso mediante el cual los preadipocitos se diferencian en los adipocitos. Este proceso es fundamental para comprender la dinámica celular de la infiltración grasa en el músculo esquelético. La diferenciación de los preadipocitos en adipocitos está inducida principalmente por la presencia de IGF1 y de glucocorticoides. La IGF1 a través de su receptor (IGFR) produce la activación de varias vías de transducción como la Akt y la Ras, las cuales inducen la expresión de genes implicados en la adipogénesis, mientras que los glucocorticoides a través de su receptor (GR) se unen directamente al ADN genómico para activar o reprimir la expresión de genes implicados en la adipogénesis (Rosen y Spiegelman, 2000; Zhang *et al.*, 2009).

Inmediatamente después de la inducción, la proteína CREB se fosforila y activa la expresión de C/EBP β , el cual se encuentra inactivo durante unas horas. En el preadipocito, al pasar de fase G₁ del ciclo celular a la fase S o de síntesis de ADN, se produce la activación de C/EBP β , el cual activa a su vez a C/EBP α y PPAR γ (Tang y Lane, 2012). PPAR γ se considera el regulador maestro de la adipogénesis ya que su expresión regula la mayoría de los genes implicados en ella (Tontonoz y Spiegelman, 2008; Lefterova *et al.*, 2014). Se conocen más de 2000 sitios de unión de PPAR γ al genoma de los adipocitos (Siersbæk, Nielsen y Mandrup, 2010). Algunos de los genes inducidos por PPAR γ durante la adipogénesis son *Fabp4* que codifica para la proteína de unión de ácidos grasos 4 o *Tmem143* que codifica para la proteína transmembrana 143 (Nakachi *et al.*, 2008).

El metabolismo energético de los adipocitos intramusculares difiere bastante del metabolismo de los adipocitos de otros tejidos, ya que los adipocitos intramusculares tienen un metabolismo a partir de la glucosa y los adipocitos de otros tejidos tienen un metabolismo a partir de los ácidos grasos producidos en otros tejidos (S. Wang *et al.*, 2013). Los adipocitos intramusculares tienen una expresión más baja de las enzimas implicadas en los procesos de lipogénesis y lipólisis, un tamaño menor y un menor contenido en lípidos, sin embargo, tienen una expresión mayor de algunos factores de crecimiento como el BMP4, el BMP7 o el IGF2 (Lee y Kauffman, 1974; Gardan, Gondret

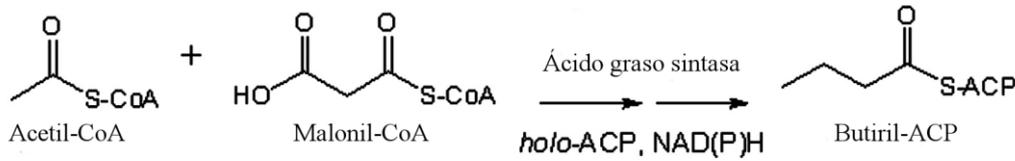
y Louveau, 2006; Zhou *et al.*, 2010). El proceso de adipogénesis en los preadipocitos intramusculares difiere del resto de adipocitos del organismo debido a las diferencias en el microambiente extracelular. La circulación sanguínea proporciona las hormonas, citoquinas y nutrientes necesarios para la adipogénesis en los preadipocitos no musculares, mientras que los preadipocitos intramusculares solo reciben las hormonas y moléculas provenientes de la actividad paracrina de las células musculares esqueléticas que los rodean (Han *et al.*, 2017).

1.4.2. Síntesis de ácidos grasos

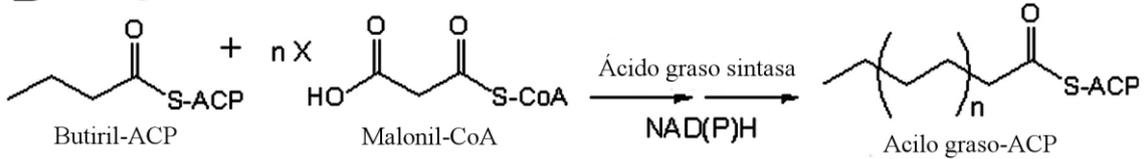
La biosíntesis y la degradación de ácidos grasos tienen lugar en diferentes partes de la célula y están catalizadas por diferentes enzimas. La unidad básica en la síntesis de ácidos grasos es el malonil-CoA de tres carbonos de longitud, el cual se forma a partir del acetil-CoA proveniente del ciclo del ácido cítrico mediante la acción de la acetil-CoA carboxilasa. Esta reacción es la limitante en la velocidad de síntesis de ácidos grasos y por tanto, se encuentra muy regulada. Esta enzima se activa alostéricamente por la presencia de citrato en el citosol y se inhibe por el producto final de la síntesis de ácidos grasos y por la fosforilación mediada por glucagón y adrenalina (Munday, 2002).

Las cadenas de ácidos grasos se forman mediante un ciclo de cuatro reacciones catalizadas por la ácido graso sintasa, en el que se incorporan dos carbonos a la molécula en cada ciclo. Tras siete ciclos, se alcanza el tamaño del ácido palmítico (16:0) y la molécula abandona el ciclo (ver Fig. 1.2). Estas reacciones se producen en el citosol. La ácido graso sintasa de eucariotas consta de dos cadenas polipeptídicas multifuncionales, cada una de las cuales posee siete dominios funcionales que participan secuencialmente en la síntesis de ácidos grasos (Smith, 1994).

A Iniciación



B Elongación



C Terminación

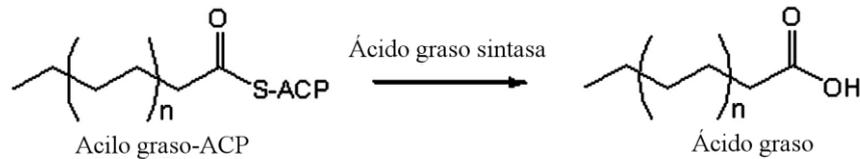


Fig. 1.2. Etapas de la síntesis de ácidos grasos. Imagen tomada y modificada de Yu *et al.* (2011).

Por tanto, el correcto funcionamiento de la biosíntesis de ácidos grasos requiere un aporte constante de acetil-CoA proveniente del ciclo del ácido cítrico para hacer de esqueleto, de ATP como fuente de energía y el aporte del poder reductor del NADPH. El NADPH se forma en los adipocitos mediante la acción de la enzima málico, que transforma malato en piruvato formando NADPH, y en la ruta de las pentosas-fosfato (Wise y Ball, 1964). El acetil-CoA proviene del ciclo del ácido cítrico generado en las mitocondrias por lo que para estar disponible en el citosol para la síntesis de ácidos grasos necesita salir de ellas. El acetil-CoA reacciona con el oxaloacetato para formar citrato y salir al citosol mediante el transportador de citrato (Spencer y Lowenstein, 1962). El correcto balance de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico tiene entonces una gran importancia en la biosíntesis de ácidos grasos.

1.4.3. Desaturación de ácidos grasos

La desaturación de ácidos grasos es la serie de reacciones por las que se introducen insaturaciones en éstos. El esquema de las rutas metabólicas se puede observar en la Figura 1.3.

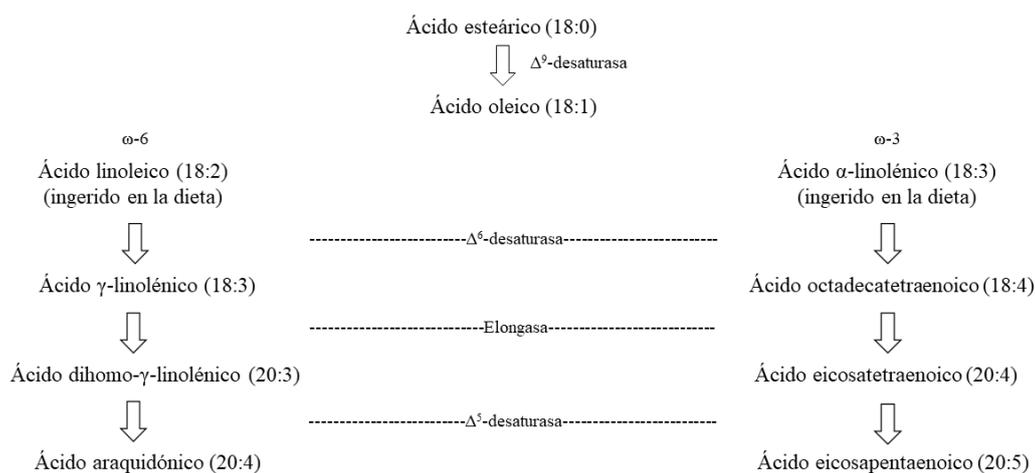


Fig. 1.3. Síntesis de ácidos grasos insaturados.

La principal reacción de desaturación que se produce en los cerdos es la formación de ácido oleico (18:1) a partir de ácido esteárico (18:0). El ácido oleico es el ácido graso mayoritario en el músculo porcino (Wood *et al.*, 2008). Esta reacción está catalizada por la Δ^9 -desaturasa o estearoil-CoA desaturasa (SCD), una proteína integral de la membrana del retículo endoplasmático. La expresión de la SCD está positivamente regulada por el colesterol y por las dietas ricas en carbohidratos o en ácidos grasos saturados y está negativamente regulada por la cantidad de PUFA (Ntambi, 1999). Se han descrito mutaciones en el promotor de esta enzima en el cerdo que producen una mayor cantidad de ácido oleico en la GIM, lo cual mejora la calidad de la carne (Estany *et al.*, 2014).

El ácido linoleico (18:2, ω -6) y el ácido α -linolénico (18:3, ω -3) se han de ingerir en la dieta ya que los mamíferos no expresan las enzimas implicadas en su síntesis. La falta de estos ácidos grasos esenciales en la dieta del cerdo provoca lesiones cutáneas, lesiones aórticas y la muerte del animal (Hill *et al.*, 1957).

La Δ^6 -desaturasa cataliza la transformación del ácido linoleico en ácido γ -linolénico (18:3) y la transformación del ácido α -linolénico en ácido octadecatetraenoico (18:4). Estas reacciones son lentas y por tanto son las reacciones limitantes en la ruta de síntesis de los PUFA. Dos de los reguladores clave de la expresión de esta enzima son el factor de transcripción SREBP-1c, el cual es también factor de transcripción de varias enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos (Brown y Goldstein, 1997), y el PPAR α que es inductor de su actividad (Li, Nara y Nakamura, 2005). El aumento en la cantidad de PUFA inhibe la acción del SREBP-1c mediante una inhibición por competición por el sustrato y por tanto se deja de producir más síntesis de PUFA (Nakamura y Nara, 2003; Tu *et al.*, 2010).

La elongasa cataliza la transformación del ácido γ -linolénico en ácido dihomo- γ -linolénico (20:3) y la transformación del ácido octadecatetraenoico en ácido eicosatetraenoico (20:4). La Δ^5 -desaturasa cataliza la transformación del ácido dihomo- γ -linolénico en ácido araquidónico (20:4) y la transformación del ácido eicosatetraenoico en ácido eicosapentaenoico (20:5). El ácido araquidónico es el segundo PUFA más abundante en el músculo porcino (Wood *et al.*, 2008).

1.4.4. Esterificación de los ácidos grasos

La mayor parte de los ácidos grasos sintetizados tienen como destino servir de almacenamiento de energía en forma de triglicéridos. Los triglicéridos se forman a partir de la condensación de dos unidades de acil graso-CoA con una de glicerol-3-fosfato mediante dos acil transferasas para dar lugar al intermediario ácido fosfatídico. El ácido fosfatídico se transforma en 1,2-diacilglicerol mediante la acción de la ácido fosfatídico fosfatasa. Por último, la acilo transferasa añade el tercer acil graso-CoA al 1,2-diacilglicerol para formar el triglicérido (Coleman y Lee, 2004) (Fig. 1.4).

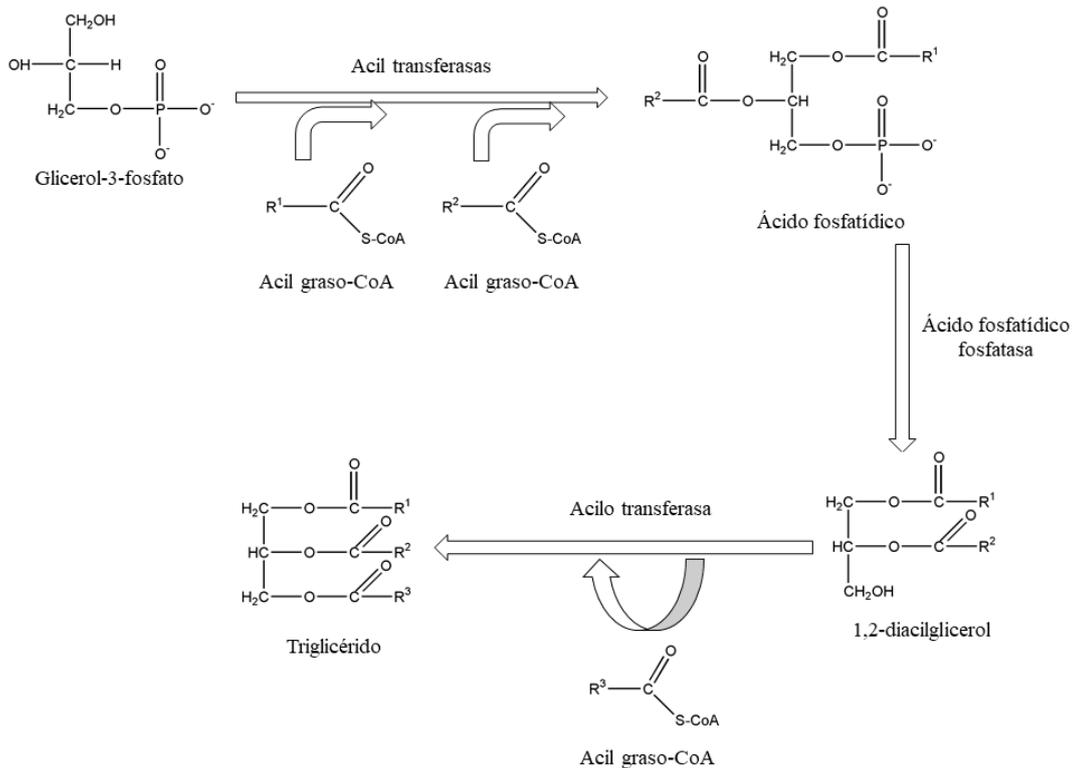


Fig. 1.4. Esterificación de los ácidos grasos

El glicerol-3-fosfato necesario para la síntesis de triglicéridos puede provenir de la glucólisis a partir de la glucosa o puede provenir a partir de precursores distintos de la glucosa mediante una ruta conocida como gliceroneogénesis. La gliceroneogénesis es la principal fuente de glicerol-3-fosfato en el tejido hepático, en el tejido adiposo y en el tejido muscular (Nye, Hanson y Kalhan, 2008). En humanos sujetos a ayuno, hasta el 60% del glicerol que forma los triglicéridos está sintetizado mediante la ruta de la gliceroneogénesis (Kalhan *et al.*, 2008).

1.5. El “Ratón-PEPCK”

En 2007, Hakimi *et al.* sobreexpresaron el gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PEPCK-C, EC 4.1.1.32) en el tejido muscular esquelético de ratones. La sobreexpresión de este gen en el tejido adiposo había dado lugar previamente a ratones obesos debido a un incremento de la gliceroneogénesis y de la re-esterificación de los ácidos grasos libres (Franckhauser *et al.*, 2002).

Los ratones con la PEPCK-C sobreexpresada en el tejido muscular esquelético poseían una serie de características diferenciadoras con respecto a los ratones control (Tabla 1.2).

Carácter	Ratón control	Ratón con PEPCK-C sobreex.
Grasa intramuscular	5 μ mol/g músculo	20 μ mol/g músculo
Grasa subcutánea	2,7 ml	1,3 ml
Grasa visceral	2,7 ml	0,4 ml
Longevidad	24 meses	48 meses
Vida reproductiva	12-18 meses	30-35 meses
Peso del animal	35 g	20 g
Consumo de alimento	11% del peso corporal	18% del peso corporal
Resistencia en carrera	0,2 km y 10 min	6 km y 5 horas

Tabla 1.2. Características de ratones control y con la PEPCK-C sobreexpresada. Los valores se han tomado de Hakimi *et al.* (2007)

Estos animales eran mucho más activos en sus jaulas que los ratones control, recorriendo hasta 6 veces más distancia con una velocidad mayor. En las cintas de correr, los ratones con la PEPCK-C sobreexpresada llegaban a correr 6 km durante 5 horas de ejercicio continuo, mientras que los ratones control tras recorrer 0,2 km en 10 minutos se cansaban. La concentración de lactato en sangre tras el ejercicio en los ratones control era de 8,1 mM, mientras que en los ratones con la PEPCK-C sobreexpresada era de 3,7 mM. La producción de lactato tiene lugar cuando la fosforilación oxidativa no es suficiente para alcanzar los requerimientos de energía en el ejercicio (Hermansen y Saltin, 1969). Los ratones con la PEPCK-C sobreexpresada consiguen mantener los niveles de capacidad oxidativa debido al uso de ácidos grasos como fuente de energía durante el ejercicio. Además durante el ejercicio se tiende a acumular metabolitos intermediarios del ciclo del ácido cítrico, pudiendo llegar a inhibir el funcionamiento del ciclo (Sahlin, Katz y Broberg, 1990). La PEPCK-C contribuye a que esto no suceda, retirando a estos intermediarios del ciclo mediante su actividad cataplerótica.

En cuanto a la composición corporal, el fenómeno que nos llamó más la atención fue que los ratones con la PEPCK-C sobreexpresada poseían un 400% más de grasa intramuscular, un 50% menos de grasa subcutánea y un 85% menos de grasa visceral, a pesar de que tienen una ingesta de alimento un 60% mayor que los ratones control (Fig.

1.5 A-B). Histológicamente, los ratones con la PEPCK-C sobreexpresada poseen un mayor número de mitocondrias (Fig. 1.5 C). Estas diferencias permiten a estos ratones mantener un metabolismo oxidativo a lo largo de un gran periodo de tiempo.

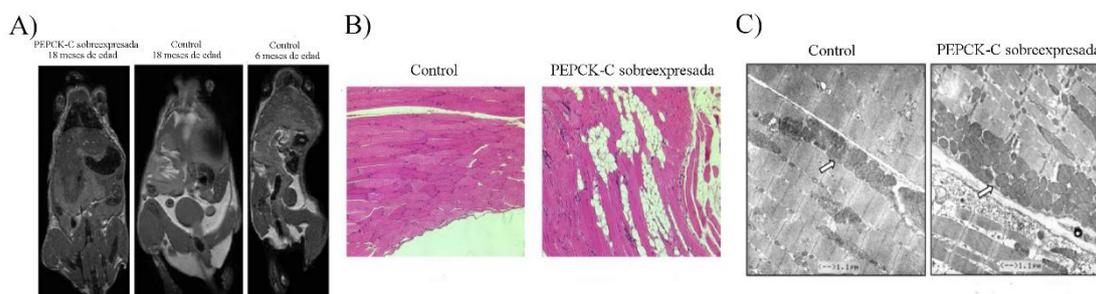


Fig. 1.5. Imágenes corporales e histológicas de ratones control y ratones con la PEPCK-C sobreexpresada. Imágenes tomadas y modificadas de Hakimi *et al.* (2007). (A) Resonancias magnéticas de ratones control de 6 y 18 meses de edad y de ratones con la PEPCK-C sobreexpresada de 18 meses de edad. (B) Tejido muscular esquelético teñido con hematoxilina-eosina. La grasa intramuscular se observa como glóbulos de color blanco. (C) Imágenes de microscopía electrónica de células musculares esqueléticas. Las flechas blancas señalan las mitocondrias.

El fenotipo observado en los ratones con la PEPCK-C sobreexpresada consistente en poseer una gran cantidad de grasa intramuscular y poca cantidad de grasa visceral y subcutánea tiene un gran interés para la industria cárnica. Por tanto, consideramos que la PEPCK-C era un buen gen candidato para buscar variabilidad en el cerdo.

1.6. PEPCK

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK, EC 4.1.1.32) cataliza la fosforilación dependiente de guanósín trifosfato (GTP) del oxaloacetato (OAA) para obtener fosfoenolpiruvato (PEP), guanósín difosfato (GDP) y CO₂ (Fig. 1.6).

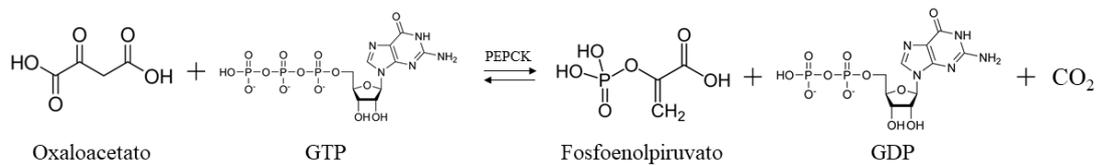


Fig. 1.6. Reacción catalizada por la PEPCK.

La PEPCK también cataliza la reacción reversa, es decir, la conversión de PEP y CO₂ en OAA usando al GDP como aceptor de grupos fosfato. Esta reacción reversa de síntesis de OAA ocurre fácilmente *in vitro* con PEPCK de todas las especies que se han estudiado pero es menos eficiente que la reacción de síntesis de PEP (Goto *et al.*, 1979; Sato, Suzuki y Kochi, 1986; Ríos y Nowak, 2002; Case y Mukhopadhyay, 2007; Johnson y Holyoak, 2010; Latorre *et al.*, 2016).

La enzima presenta dos isoformas, una que se encuentra en el citosol (PEPCK-C) y otra que se encuentra en la mitocondria (PEPCK-M). Mientras que en ratón y rata, la PEPCK-C constituye el 90% o más de la actividad PEPCK total, en humanos y en cerdos cada isoforma es responsable del 50% de la misma (Hanson y Garber, 1972). La forma citosólica ha sido la más estudiada; de hecho es una de las enzimas modelo para el estudio de la regulación transcripcional de la expresión génica. Se conoce menos la función metabólica de la isoforma mitocondrial

La PEPCK-M es la única isoforma que tiene actividad en el páncreas debido a que actúa en el proceso de liberación de insulina después de la alimentación, uniendo así la producción de GTP en la mitocondria por la succinil-CoA sintetasa con el reciclaje anaplerótico del PEP (Stark *et al.*, 2009).

En los últimos años se ha observado que la actividad de la PEPCK-M está muy implicada en procesos patológicos como el cáncer o la diabetes (Beale, Harvey y Forest, 2007; Stark *et al.*, 2014; Leithner *et al.*, 2015; Chu *et al.*, 2017). En cáncer esto es debido a que la PEPCK-M es una proteína pro-supervivencia que permite a las células cancerígenas adaptarse a los ambientes bajos en glucosa (Méndez-Lucas *et al.*, 2014; Vincent *et al.*, 2015)

Recientemente, en nuestro grupo hemos conseguido purificar y caracterizar por primera

vez la PEPCK-M humana (Escós *et al.*, 2016). Las propiedades cinéticas y los requerimientos iónicos de la isoforma mitocondrial humana son muy similares a los de la citosólica (Case y Mukhopadhyay, 2007). La sobreexpresión de la forma mitocondrial en células HEK293 incrementa significativamente la producción de glucosa y de lípidos (Escós *et al.*, 2016).

1.6.1. Estructura de la PEPCK-C

La PEPCK-C porcina es una proteína monomérica de 622 aminoácidos con un peso molecular de 67 KDa. Destaca en su estructura la presencia de 13 cisteínas que se encuentran en su forma reducida (-SH) y sin formar ningún puente disulfuro (Lewis, Seyer y Carlson, 1989). Una de estas cisteínas juega un importante papel en el mecanismo de catálisis de la enzima (Makinen y Nowak, 1989). Esta cantidad considerable de cisteínas en su estructura hacen al enzima altamente sensible a la presencia de oxidantes en el medio.

Las bacterias, las plantas C4 y algunos hongos tienen una PEPCK-C que usa el ATP como donante de grupos fosfato, con una estructura y un mecanismo de acción diferente (Tortora, Hanozet y Guerritore, 1985; Finnegan y Burnell, 1995). La mayoría de eucariotas usan el GTP como donante de grupos fosfato y existe un alto grado de identidad y homología entre las diferentes especies (Reymond *et al.*, 1992).

Todas las PEPCK-C de diversos orígenes necesitan para su correcto funcionamiento dos iones divalentes que juegan diferente papel. Uno de los iones se une directamente a los aminoácidos del centro activo y el otro estabiliza los grupos fosfato cargados negativamente del GTP o del ATP. El primer ion debe ser Mn^{2+} para que la enzima funcione correctamente, mientras que el segundo puede ser Mg^{2+} o Mn^{2+} , aunque la enzima tiene mayor actividad si es Mg^{2+} (Carlson y Holyoak, 2009).

La estructura tridimensional de la PEPCK-C porcina no se ha conseguido determinar por la imposibilidad de cristalizar la proteína, a pesar de que se probaron más de 600 condiciones de cristalización diferentes (Latorre *et al.*, 2016). Sin embargo, sí que han conseguido determinar la estructura de la PEPCK-C de otras especies, como la rata (Sullivan y Holyoak, 2007), el ser humano (Dunten *et al.*, 2002) (Fig. 1.7) o el pollo (Holyoak, Sullivan y Nowak, 2006).

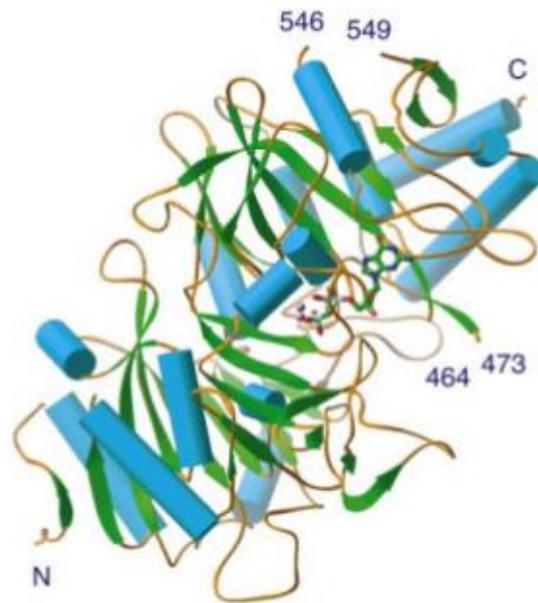


Fig. 1.7. Estructura de la PEPCK-C humana. Imagen tomada de (Dunten *et al.*, 2002)

La PEPCK-C no posee una clara separación en dominios aunque se considera que está formada por dos dominios poco definidos; un dominio N-terminal que va del residuo 1 al 259 y un dominio C-terminal que va del residuo 260 al 622, estando el sitio activo en una hendidura formada entre ambos. El dominio C-terminal puede subdividirse en el sitio de unión del nucleótido (de los residuos 260 al 325 y del 426 al 622) y el dominio específico de la PEPCK-C (del residuo 326 al 425). La enzima posee tres bucles móviles que participan en la catálisis; el bucle R (residuos 85-92), bucle P (residuos 284-292) y el bucle Ω (residuos 464-474) (Carlson y Holyoak, 2009; Johnson y Holyoak, 2010).

1.6.2. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la PEPCK-C se muestra en la Fig. 1.8.

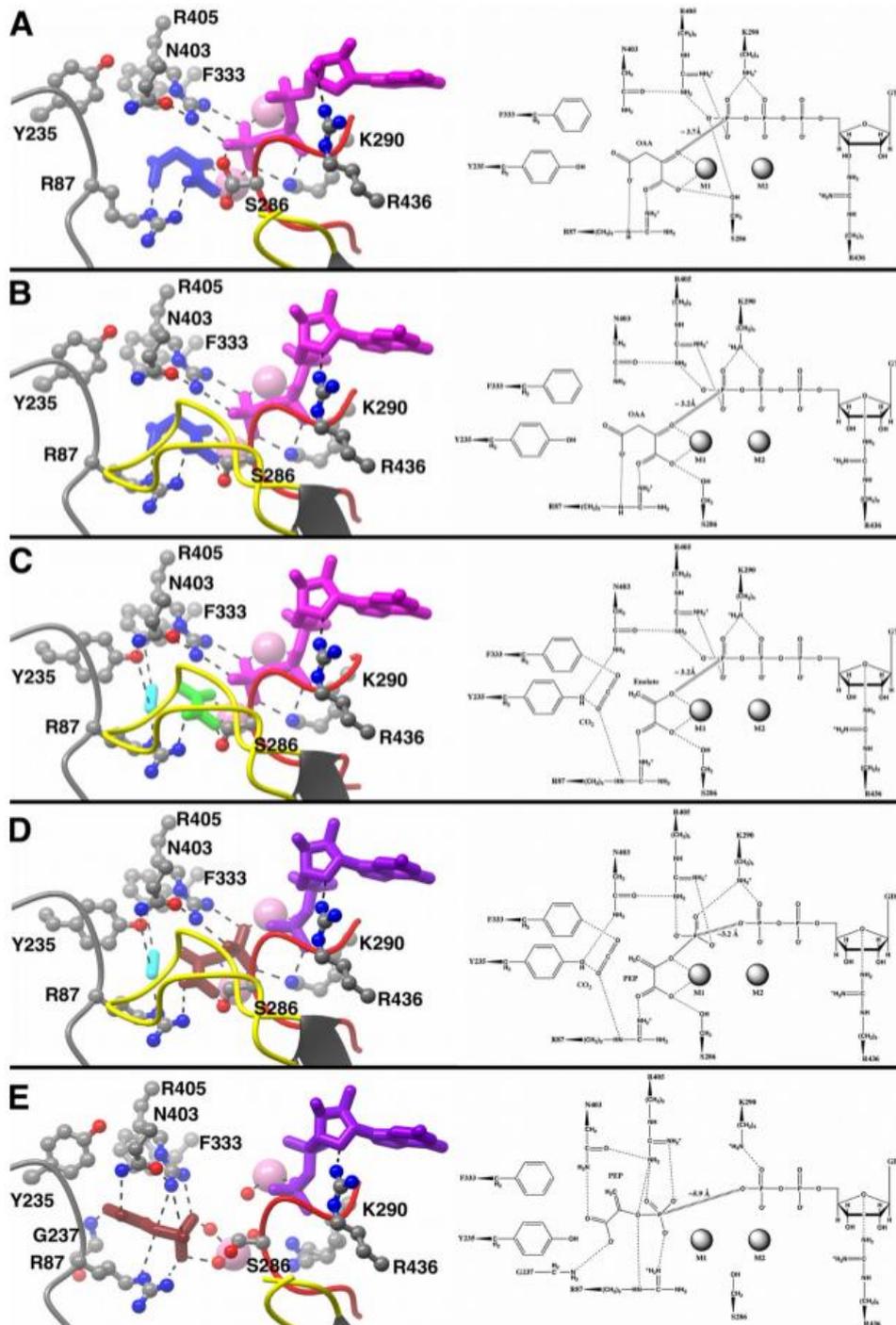


Fig. 1.8. Mecanismo de acción de la PEPCK-C. Imagen tomada de Holyoak, Sullivan y Nowak (2006). Las moléculas que intervienen en la reacción están coloreadas. El OAA está coloreado de azul, el PEP de rojo oscuro, el GTP de rosa, el GDP de morado, el CO₂ de azul claro y el intermediario enolato de verde. Además, el bucle Ω está coloreado de amarillo y el bucle P de rojo claro.

El OAA se une al enzima mediante coordinación con el ion manganeso (M1) e interaccionando con los residuos R87 y S286. El GTP se une al enzima en un sitio de unión específico en coordinación con el ion magnesio (M2) y el residuo T291 (Fig. 1.8A). Cuando se une el GTP al complejo PEPCK-C-GTP se forma el complejo enzima sustrato, acercándose entre sí el OAA y el GTP. Sin embargo, la distancia aún es insuficiente para que reaccionen. La K290 del bucle P ayuda al anclaje del GTP y la R405 se une al grupo fosfato del GTP que va a reaccionar (fosfato- γ).

Una vez se forma el complejo enzima-sustrato, el bucle Ω se cierra (Fig. 1.8B), lo cual provoca que la interacción entre el residuo R486 y el GTP cambie, reduciendo la distancia entre el OAA y el GTP y cerrando a su vez el bucle P. La existencia de los bucles es totalmente necesaria para el funcionamiento de la PEPCK-C, ya que la eliminación de estos inhibe completamente su actividad (Johnson y Holyoak, 2012). A continuación, el OAA se descarboxila espontáneamente para formar el intermediario enolato. Esta descarboxilación está facilitada por los residuos R87, N403 e Y235 (Fig. 1.8C). El cierre de los bucles evita que el intermediario enolato que es muy inestable se protone y forme ácido pirúvico en vez de PEP. Esta estabilización del intermediario enolato es la clave del mecanismo catalítico.

La fosforilación del enolato ocurre por el ataque nucleofílico entre el carbono 3 del enolato y el fosfato- γ del GTP, facilitado por los iones M1 y M2 y por los residuos R405 y K290, formándose así el PEP (Fig. 1.8D). La formación del PEP favorece la apertura de los bucles Ω y P produciéndose así la liberación de los productos PEP, GDP y CO₂ (Fig. 1.8E) (Holyoak, Sullivan y Nowak, 2006).

1.6.3. Relevancia metabólica

La reacción catalizada por la PEPCK-C se encuentra en una encrucijada metabólica y desempeña un papel regulador en varios procesos metabólicos. Las rutas metabólicas en las que la PEPCK-C tiene un papel relevante son la gluconeogénesis, la gliceroneogénesis, la síntesis de serina y en el reciclaje de los esqueletos carbonados provenientes de los aminoácidos (Fig. 1.9).

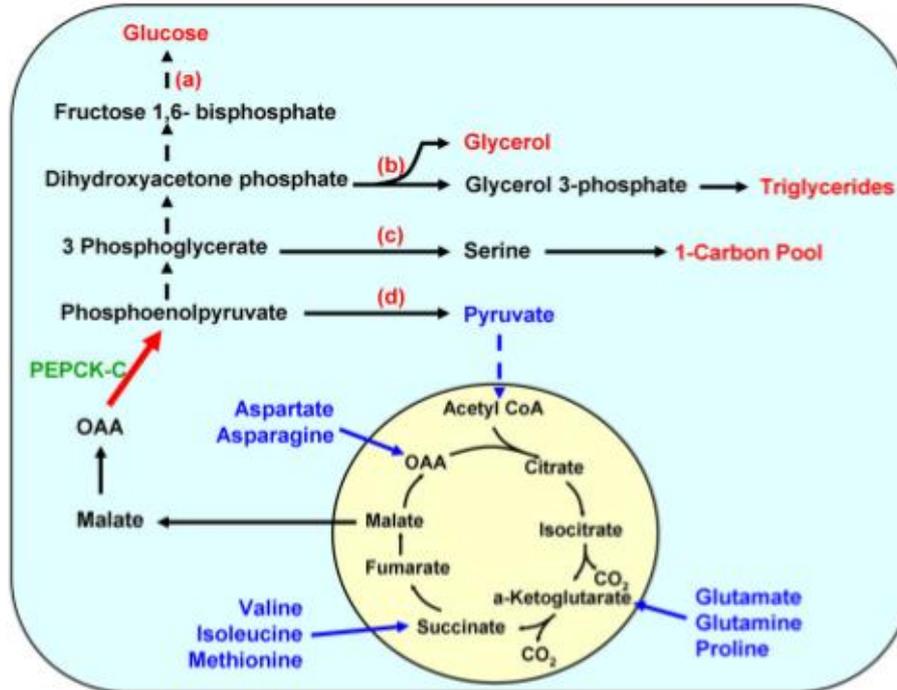


Fig. 1.9. Rutas metabólicas en las que participa la PEPCK-C. Figura tomada de Yang, Kalhan y Hanson (2009). A) Gluconeogénesis. B) Gliceroneogénesis. C) Síntesis de serina. D) Reciclaje de los esqueletos carbonados provenientes de los aminoácidos

La gluconeogénesis es la generación de glucosa a partir de sustratos que no son carbohidratos. Esta ruta metabólica es importante para mantener estables los niveles de glucosa en el organismo durante el ayuno o el ejercicio (Chandramouli *et al.*, 1997; Petersen, Price y Bergeron, 2004) y se produce sobre todo en los tejidos renal y hepático (Yang, Kalhan y Hanson, 2009). La reacción catalizada por la PEPCK-C es la reacción clave y limitante de la gluconeogénesis (Rognstad, 1979). El tratamiento a animales en ayuno con ácido 3-mercaptopicolínico, un inhibidor de la PEPCK-C, les produce hipoglucemia (DiTullio *et al.*, 1974). La sobreexpresión de la PEPCK-C en el hígado de ratones conduce a una producción excesiva de glucosa (Beale, Harvey y Forest, 2007). Sin embargo en el hígado de ratones con una reducción del 90% en la actividad PEPCK-C la gluconeogénesis sólo se reduce un 40%, por lo que hay más factores que regulan esta ruta metabólica (Burgess *et al.*, 2007). Las enzimas que catalizan la gluconeogénesis son las mismas que las que participan en la glucólisis con la excepción de unos pocos pasos como la conversión del piruvato en PEP. Esta reacción se consigue transformando primero el piruvato en OAA mediante la acción de la piruvato carboxilasa y

transformando el OAA en PEP mediante la PEPCK-C (Hanson y Garber, 1972).

La expresión de la PEPCK-C en el hígado está muy regulada por hormonas como la insulina, el glucagón o los glucocorticoides. Este control falla durante la diabetes, tanto es así que la PEPCK-C se encuentra sobreexpresada en aquellas diabetes que tienen la tasa de gluconeogénesis muy alta (Veneziale, Donofrio y Nishimura, 1983). La gluconeogénesis es también esencial en el cáncer debido a la gran necesidad de glucosa que tienen las células cancerígenas y al ambiente bajo en oxígeno en el que están (Warburg, 1956; Vander Heiden, Cantley y Thompson, 2009). La PEPCK-C tiene un papel importante en esta patología (Montal *et al.*, 2015). La proteína p53, una de las proteínas supresoras de tumores más importante (Biegging, Spano Mello y Attardi, 2014), regula negativamente la expresión de la PEPCK-C (Zhang *et al.*, 2014), por lo cual los fallos en la actividad de la p53 descritos en multitud de cánceres podrían ayudar a que las células cancerígenas sobreexpresen la PEPCK-C y tengan una gluconeogénesis elevada.

La gliceroneogénesis es la síntesis del glicerol-3-fosfato a partir de precursores distintos de la glucosa. El glicerol-3-fosfato será utilizado para esterificar los ácidos grasos y formar los triglicéridos, la forma en la que se almacenan las grasas en el organismo (ver apartado 1.4.4). La etapa limitante en esta ruta es la catalizada por la PEPCK-C (Hanson y Reshef, 2003) y de ahí la importancia de este enzima en esta ruta metabólica. La gliceroneogénesis inducida por PEPCK-C en el tejido adiposo influye en la diabetes. La administración de rosiglitazona, un fármaco contra la diabetes, induce la actividad de la PEPCK-C, lo que favorece la formación de triglicéridos y se evita la salida de ácidos grasos libres a la sangre, lo cual es un factor de riesgo asociado a esta patología (Hanson y Reshef, 2003). Esta ruta tiene también gran importancia en el tejido muscular ya que podría explicar la gran cantidad de GIM observada por Hakimi *et al.* (2007) al sobreexpresar PEPCK-C en el músculo de un ratón (ver apartado 1.5) y podría ser de interés para aumentar la GIM en los músculos del cerdo.

Yang, Kalhan y Hanson (2009) sugieren que la síntesis de serina tiene importancia para la supervivencia de animales sometidos a dietas bajas en proteínas. En estos casos, se ve aumentada la expresión de la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, que cataliza una etapa de la biosíntesis de serina y la PEPCK-C regula la ruta al catalizar la primera reacción de la ruta. Además la serina contribuye al metabolismo de los grupos metilo y es necesaria para la síntesis de cisteína.

La última ruta en la que participa la PEPCK-C es en el reciclaje de los esqueletos carbonados provenientes de los aminoácidos. En esta ruta la PEPCK-C tiene un papel cataplerótico, es decir, retira del ciclo del ácido cítrico intermediarios provenientes de los aminoácidos para que el ciclo no se sature. El intermediario del ciclo del ácido cítrico malato abandona la mitocondria y se transforma en el citosol en OAA. El OAA mediante la acción de la PEPCK-C se transforma en PEP, el cual se convierte en piruvato mediante la piruvato quinasa y por último en acetil-CoA por la piruvato deshidrogenasa. El acetil-CoA podrá entrar en el ciclo del ácido cítrico o usarse para sintetizar ácidos grasos. En el riñón, este ciclo es usado para procesar la glutamina y usarla para formar glucosa (Tannen, 1978; Stumvoll *et al.*, 1999).

En el músculo del gusano *Caenorhabditis elegans*, se ha observado que la expresión de la PEPCK-C disminuye con la edad, a la vez que aumenta la expresión de la piruvato quinasa. Esta bajada en la expresión de la PEPCK-C produce un desvío del metabolismo celular hacia la glucólisis disminuyendo el metabolismo mitocondrial, lo cual produce pérdida de la integridad celular y muscular y senescencia celular (Feng *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2016). Hakimi *et al.* (2007) también observaron en sus ratones con la PEPCK-C sobreexpresada en el músculo que tendían a vivir mucho más tiempo que los ratones control. Por tanto, parece claro que la PEPCK-C juega un papel relevante en los procesos de envejecimiento.

1.6.4. Regulación

La regulación de la PEPCK-C se produce a dos niveles; a nivel transcripcional y a nivel post-traducciona. De ellas, la regulación más estudiada es la transcripcional, habiéndose convertido el gen de la PEPCK-C en uno de los modelos generales para estudiar la regulación de la transcripción. En general, la expresión de la PEPCK-C está controlada metabólicamente por diferentes hormonas y por la dieta. La expresión de PEPCK-C en el hígado y en el tejido adiposo se ve favorecida por la restricción calórica, el glucagón, los glucocorticoides y la hormona tiroidea. Por el contrario, la expresión se ve reducida por una dieta rica en carbohidratos y por la insulina (Tilghman *et al.*, 1974; Gunn *et al.*, 1975; Iynedjian y Hanson, 1977; Loose *et al.*, 1985). Otra forma de control de la expresión del gen es mediante la metilación ya que el gen se encuentra altamente metilado en tejidos

donde su expresión es muy baja o inexistente, como en el corazón o los pulmones (Benvenisty *et al.*, 1985).

Los elementos regulatorios de la transcripción que se unen en la región promotora del gen de la PEPCK-C se pueden observar en la Fig. 1.10. La unión de estos factores de transcripción dependen del tejido, de la etapa del desarrollo del individuo y de la regulación hormonal.

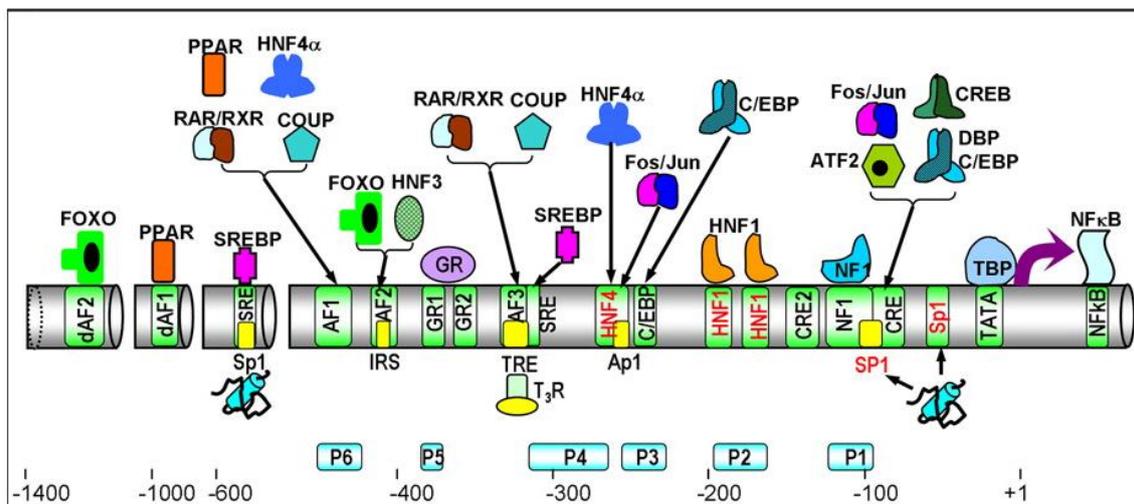


Fig. 1.10. Regulación transcripcional del promotor de la PEPCK-C. Imagen tomada de Yang *et al.* (2009).

En el hígado se han identificado 8 sitios de unión para factores de transcripción identificados como P1 al P6, CRE-1 y CRE-2. A 4 de estos sitios de unión se unen factores de transcripción expresados específicamente en el hígado (P2, P3(I), P4 y P6) y a los otros 4 se unen proteínas reguladoras inespecíficas que se expresan en todos los tejidos. En el sitio P1 se unen elementos de la familia del factor nuclear 1 (NF-1) y en el sitio P2 se une el factor hepático HNF-1. El sitio P3(I) es el sitio de unión más importante en el hígado y a él se unen los miembros de la familia C/EBP. En el sitio P4 se une AP1, en el sitio P5 se unen las proteínas GR y en el sitio P6 se unen HNF4 α , COUP-TF, el receptor del ácido retinoico α (RAR α) y RXR α . En el sitio CRE-1 se unen CREB y AP1 (Roesler, Vandenbark y Hanson, 1989; Hall *et al.*, 1992; Hall, Sladek y Granner, 1995). En los 4 sitios de unión inespecíficos en el tejido adiposo se unen las mismas proteínas que en el hígado. En el resto, se unen proteínas del tejido adiposo, como el PPAR γ 2 que se une al sitio de unión P6 (Tontonoz *et al.*, 1995; Hanson y Reshef, 1997). Los efectos de cada

sitio de unión también varían dependiendo del tejido. Mutaciones en el sitio de unión P3(I) en el hígado producen una reducción de hasta el 50% en la expresión de la PEPCK-C, mientras que esas mutaciones en P3(I) si se producen en riñón provocan un aumento de la expresión de la enzima (Eisenberger *et al.*, 1992; Patel *et al.*, 1994).

La regulación de la PEPCK-C por modificaciones post-traduccionales es un fenómeno descubierto en tiempos recientes y es mucho menos conocido que la regulación transcripcional. La acetilación de las lisinas es uno de los procesos claves por los cuales se regulan post-traduccionalmente las enzimas metabólicas (Wang *et al.*, 2010). Prácticamente todas las enzimas que participan en las rutas de gluconeogénesis, glucólisis, ciclo del ácido cítrico, metabolismo de los ácidos grasos, metabolismo del glucógeno y ciclo de la urea se encuentran acetiladas en algún momento (Zhao *et al.*, 2010). La acetilación de la PEPCK-C está aumentada en células sometidas a altas concentraciones de glucosa, mientras que disminuye al añadir aminoácidos a un medio libre de glucosa. La acetilación reduce la actividad catalítica de la PEPCK-C (Zhao *et al.*, 2010). La acetilación de la PEPCK-C por la acetiltransferasa p300 induce la ubiquitinización de la PEPCK-C y, por tanto, su degradación en el proteosoma. Por otro lado, la sirtuina 2 deacetila la PEPCK-C y por tanto promueve su estabilidad y actividad (Jiang *et al.*, 2011). Esto se ha visto confirmado con el uso del sirtinol, un inhibidor de la sirtuina 2, que produce una hiperacetilación de la PEPCK-C que provoca una mayor degradación de la enzima y una inhibición de la gluconeogénesis (Zhang *et al.*, 2017). En levaduras se ha observado que la acetilación modifica la velocidad catalítica de la PEPCK-C, en concreto, la PEPCK-C acetilada tiene casi 10 veces menos actividad que la PEPCK-C sin acetilar en la reacción reversa (Lin *et al.*, 2009).

Otra forma de modificación post-traduccionales de la PEPCK-C descubierta recientemente es la sumoilación. La sumoilación es la reacción mediante la cual se añaden a la enzima los SUMOs o modificaciones pequeños similares a la ubiquitina. En la PEPCK-C, la sumoilación disminuye también la estabilidad de la proteína y promueve su degradación en el proteosoma (Bian *et al.*, 2017).

1.7. Relevancia de la PEPCK-C en la infiltración grasa

Estudiando como la expresión de varios genes afectan al contenido de GIM y la composición lipídica en el músculo porcino, Wang *et al.* (2013) descubrieron que la expresión de la PEPCK-C estaba asociada al contenido de GIM en el cerdo. También observaron que la expresión de la PEPCK-C estaba negativamente asociada con el contenido total de PUFA. Este cambio en la grasa corporal producido por la PEPCK-C ha sido descrito también en otras especies por diferentes autores (She *et al.*, 2000; Franckhauser *et al.*, 2002; Olswang *et al.*, 2002)

Teniendo en consideración los descubrimientos de Hakimi *et al.* (2007) de sobreexpresión de la PEPCK-C en el músculo de ratón y los de Wang *et al.* (2013) sobre la asociación de la expresión de la PEPCK-C porcina con la GIM, así como el conocimiento de los roles de la PEPCK-C en el metabolismo, nuestro grupo decidió estudiar este gen en diferentes razas porcinas (Piétrain, Duroc x Landrace/Large White, Duroc e Ibéricos) para buscar polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) que pudieran segregarse de forma diferencial (Latorre *et al.*, 2016). En la región codificante se encontró el SNP c.A2456C, el cual segrega de forma diferente dependiendo de la raza. El alelo C se encuentra en mayor proporción en las razas fuertemente seleccionadas para la producción de una carne magra, como el Piétrain. Posteriormente se realizó un estudio de asociación entre los dos alelos usando 202 cerdos de raza Duroc x Landrace/Large White en el que se encontró que el alelo A está asociado a un mayor contenido (20%) de GIM y a un descenso del 10% del espesor de la grasa dorsal, un fenotipo que recuerda al obtenido en el ratón con la PEPCK-C sobreexpresada por Hakimi *et al.* (2007). Además, la carne de los animales con el alelo A tenía una mayor capacidad de retención de agua y un valor pH₂₄ más alto que la de los portadores del alelo C, lo cual producía carnes de una mayor calidad en animales con el alelo A.

El SNP produce un cambio de metionina a leucina en el aminoácido 139 de la proteína. Este aminoácido 139 se encuentra en una lámina β en una zona bastante alejada del centro activo y bastante conservada entre especies muy alejadas filogenéticamente (Fig. 1.11A). Cinéticamente esta sustitución produce una disminución significativa en los valores de k_{cat} en la mutación p.139Leu para los dos sustratos que participan en la síntesis de PEP (OAA y GTP). Sin embargo, los valores de k_{cat} en el otro sentido de la reacción son

significativamente más altos en la mutación p.139Leu (Fig. 1.11B). En cultivo celular, la isoforma p.139Met produce una mayor cantidad de glucosa y lípidos que la isoforma p.139Leu. Por tanto, la PEPCK-C p.139Leu es significativamente más lenta en catalizar la reacción de formación de PEP que está implicada en las rutas metabólicas de gluconeogénesis y gliceroneogénesis.

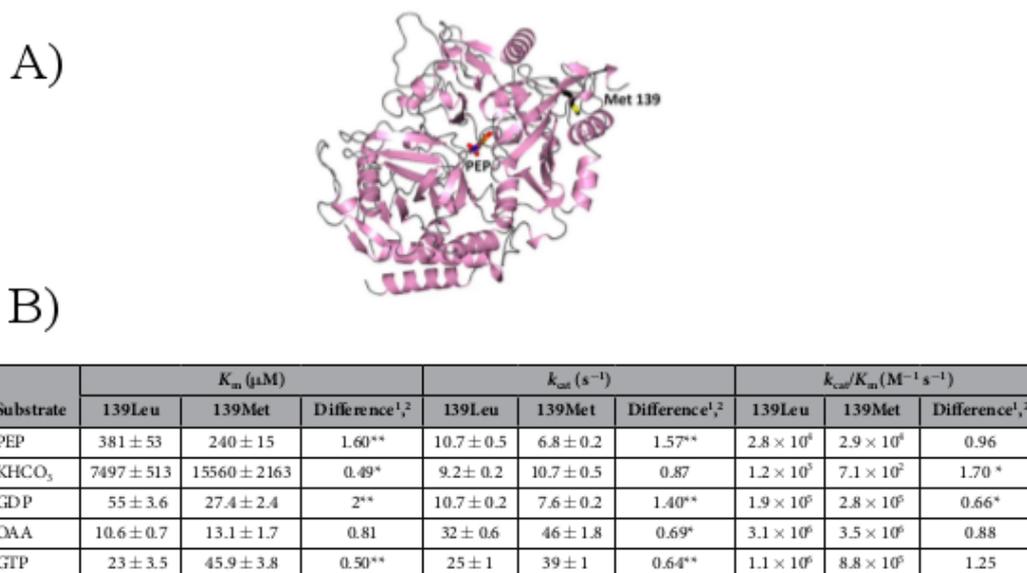


Fig. 1.11. Localización y actividades enzimáticas de PEPCK-C p.139Met y p.139Leu. A) Localización de la sustitución Met139Leu en la proteína. B) Tabla con los valores cinéticos de las isoenzimas. Imágenes tomadas de Latorre *et al.* (2016).

Estructuralmente, también se encuentran diferencias entre ambas enzimas. No se pudo llegar a cristalizar la PEPCK-C porcina a pesar de que se probaron más de 600 condiciones distintas de cristalización. Con el uso del dicróismo circular (CD) se observó que las isoenzimas difieren sobre todo en la estructura secundaria de la proteína. La PEPCK-C p.139Met presenta además una mayor resistencia térmica que el mutante. El estudio de la resistencia térmica es un método que puede utilizarse para estudiar cambios en la estructura primaria de una enzima (Hidalgo, 2014). A su vez, se añadieron los sustratos al enzima para ver si el cambio de conformación inducida por los sustratos modificaba la resistencia térmica de la enzima. De todos los sustratos, el PEP es el que confiere una mayor resistencia térmica y el OAA el que menos, pero no se produce ninguna diferencia entre isoenzimas. Sin embargo, al añadir los nucleótidos

(GTP y GDP) sí que se observa una gran diferencia entre las isoenzimas, siendo otra vez la p.139Met la que posee una mayor resistencia térmica. Los nucleótidos se unen en el lugar del centro activo, por lo que parece que la sustitución Met139Leu, aunque se encuentra bastante alejada del centro activo, podría afectar al sitio de unión de los nucleótidos. Debido al gran interés de esta mutación, se realizaron más pruebas para determinar si esta afecta al sitio de unión de los nucleótidos o no que se describirán en los próximos capítulos.

Por otro lado, en un experimento similar al de Hakimi *et al.* (2007), Ren *et al.* (2017) generaron cerdos transgénicos en los que sobreexpresaban la PEPCK-C en el tejido muscular esquelético. Esta sobreexpresión producía un gran aumento de la cantidad de GIM en el cerdo (Fig. 1.12). En cuanto a la composición de ácidos grasos, no observaron ninguna diferencia entre los ratios ω -6/ ω -3 de los cerdos control y los que tienen la PEPCK-C sobreexpresada.

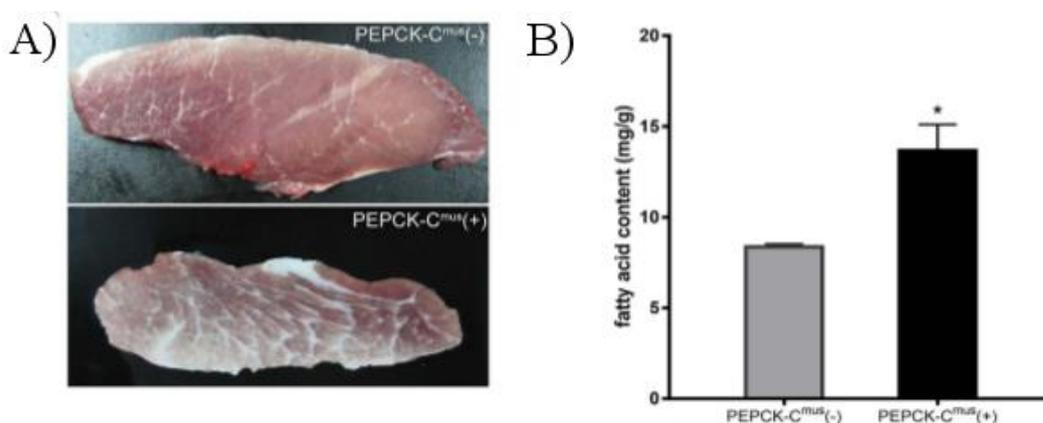


Fig. 1.12. Infiltración grasa en cerdos con la PEPCK-C sobreexpresada. A) Imagen del músculo de cerdos control (superior) y de cerdos con la PEPCK-C sobreexpresada (inferior). B) Contenido en lípidos en el músculo de cerdos control (gris) y con la PEPCK-C sobreexpresada (negro). Imagen tomada de Ren *et al.* (2017).

Por tanto, todos los experimentos anteriores apuntan a que la modificación de la expresión o de la actividad de la PEPCK-C en el músculo esquelético de los cerdos cambia de forma significativa la cantidad de GIM en ellos. Este aumento de GIM podría usarse, como se ha visto anteriormente, para mejorar la calidad de la carne.

1.8. Importancia de la PEPCK-C como moduladora de los procesos de cataplerosis y anaplerosis

La PEPCK-C participa en los procesos de anaplerosis y cataplerosis. La anaplerosis es el proceso por el que se repone al ciclo del ácido cítrico de sus intermediarios y la cataplerosis es el proceso opuesto, es decir, la salida del ciclo del ácido cítrico de sus intermediarios. El rol metabólico de los procesos de cataplerosis y anaplerosis consiste en el reciclaje de los esqueletos carbonados de los aminoácidos y es dependiente del tejido y del estado metabólico del individuo (Owen, Kalhan y Hanson, 2002). Por ejemplo, en el músculo en periodos de restricción calórica se usan aminoácidos como fuente de energía. Estos aminoácidos entran en el ciclo del ácido cítrico como intermediarios, por lo que es necesario que se produzca un proceso de cataplerosis para evitar que el ciclo de saturación de intermediarios (Chang y Goldberg, 1978).

La cataplerosis, o salida de intermediarios del ciclo del ácido cítrico, la realizan varias enzimas y cada una de ellas se encarga de retirar un intermediario del ciclo del ácido cítrico. Estas enzimas son la PEPCK-C, la aspartato aminotransferasa y la glutamato deshidrogenasa (Owen, Kalhan y Hanson, 2002). De todas ellas la que tiene una mayor importancia es la PEPCK-C, ya que convierte el intermediario OAA en PEP, el cual puede usarse en la gluconeogénesis o en la gliceroneogénesis.

La anaplerosis cumple la función de volver a reponer los intermediarios al ácido cítrico para asegurar el correcto funcionamiento del ciclo. La enzima encargada de la actividad anaplerótica es la piruvato carboxilasa, la cual transforma el piruvato en OAA (Jitrapakdee y Wallace, 1999).

La PEPCK-C además de su reacción de síntesis de PEP a partir de OAA puede realizar la reacción reversa, es decir, formar OAA a partir de PEP usando GDP como aceptor de fosfatos. Esta reacción reversa ocurre *in vitro* en todas las especies que se han estudiado hasta el momento pero es una reacción menos eficiente que la reacción de síntesis de PEP (Goto *et al.*, 1979; Sato, Suzuki y Kochi, 1986; Ríos y Nowak, 2002; Case y Mukhopadhyay, 2007; Johnson y Holyoak, 2010; Latorre *et al.*, 2016). Aunque se ha sugerido que la reacción reversa podría introducir OAA en el ciclo del ácido cítrico durante periodos de biosíntesis intensa, actuando así la PEPCK-C como una enzima

anaplerótica (Hakimi *et al.*, 2005, 2007), no existían evidencias experimentales de este hecho hasta que recientemente, Latorre *et al.* (2018) observaron que, dependiendo del estado de acetilación de la PEPCK-C de rata, la enzima se comportaba de forma cataplerótica o anaplerótica.

A altos niveles de glucosa en el medio, la actividad de formación de PEP disminuía significativamente, mientras que la actividad de formación de OAA o reversa subía ligeramente. Además, las enzimas encargadas de la acetilación (p300) y la deacetilación (sirtuina 1) tenían modificada su expresión dependiendo del nivel de glucosa disponible. Así pues, a altos niveles de glucosa se ve aumentada la expresión de la p300, mientras que la expresión de la sirtuina 1 desciende. Por tanto, a altos niveles de glucosa, la p300 aumenta su expresión, lo que hace que la PEPCK-C esté más acetilada y dirija su actividad hacia la síntesis de OAA o reacción reversa actuando así de forma anaplerótica. En el estado metabólico con alta glucosa, se produce una salida de intermediarios del ciclo del ácido cítrico para los procesos de biosíntesis. La PEPCK-C, mediada por la acetilación por la p300, dirige su actividad hacia la anaplerosis para recuperar el nivel de los intermediarios y que así pueda seguir funcionando el ciclo del ácido cítrico. Cuando los niveles de glucosa vuelven a ser bajos, la expresión de p300 desciende y aumenta la de la sirtuina 1, haciendo que la PEPCK-C se deacete y vuelva a realizar la actividad de formación de PEP usada en los procesos de gluconeogénesis y gliceroneogénesis.

El hecho de que la enzima sea funcional *in vivo* en los dos sentidos de la reacción refuerza el interés por modular de manera independiente ambas reacciones. La publicación reciente de un cerdo transgénico en el que se sobreexpresa la PEPCK-C y en el que se modifican propiedades fenotípicas relevantes de su carne (Ren *et al.*, 2017), indica que contar con isoenzimas de la PEPCK-C con uno de los sentidos de la reacción inhibido puede ser interesante para ampliar el conocimiento de las funciones biológicas de la enzima o incluso para sentar la base de nuevos transgénicos de cerdo.

II. Material y métodos

2.1. Vectores de clonación

La PEPCK-C porcina *wild-type* (WT), así como las diferentes mutaciones usadas a lo largo del proyecto, se clonaron rutinariamente en el vector pET-15b con el que se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5 α . Este vector posee una región de resistencia a ampicilina, una región de corte y una región reguladora de la expresión. Su estructura aparece en la Fig. 2.1 A.

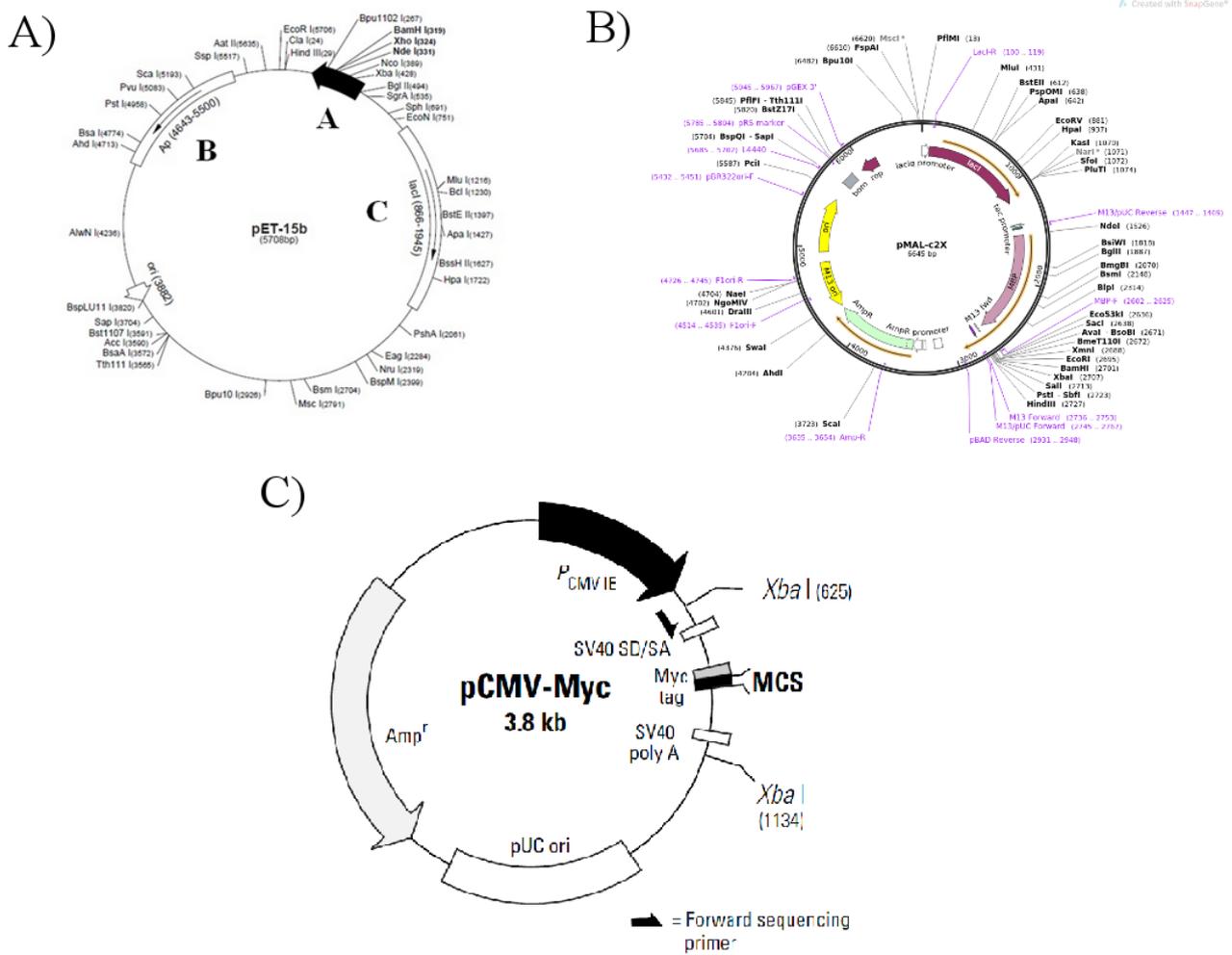


Fig. 2.1. Vectores de clonación. A) Vector pET-15b. Posee una región de corte (A), una de resistencia a la ampicilina (B) y una región reguladora de la expresión (C). Imagen tomada de Hidalgo (2014). B) Vector pMALC2x. Posee una región de resistencia a la ampicilina (*Amp^r*) y una región que codifica la proteína de unión a maltosa (MBP). Imagen tomada de Addgene. C) Vector pCMV-Myc. Posee una región de resistencia a la

ampicilina (Amp^r), una región de expresión de la proteína Myc (Myc tag) y una región con el promotor de citomegalovirus (P_{CMV}). Imagen tomada de Addgene.

Cuando no se consiguió una correcta expresión con el vector pET-15b se utilizó una modificación del vector pET22bSUMO descrita en Escós *et al.* (2016) que utilizaba la proteína SUMO para mejorar la solubilidad de la proteína y el vector pMALC2x que coexpresaba la proteína de unión a maltosa (Fig. 2.1 B). Para los experimentos de cultivo celular se utilizó el vector pCMV-Myc que coexpresaba la proteína Myc en el extremo N-terminal de la PEPCK-C y poseía el promotor de citomegalovirus para que se expresara continuamente la PEPCK-C en las células eucariotas (Fig. 2.1 C).

2.2. Clonación del gen de la PEPCK-C y sus mutantes

La producción de los mutantes de la PEPCK-C porcina se realizó a partir del gen WT mediante mutagénesis dirigida. La mutagénesis dirigida es un método mediante el cual se pueden introducir mutaciones puntuales en el nucleótido que se desee a partir de una PCR con unos primers específicos con las siguientes características. Los primers forward (FW) y reverse (RV) deben alinear la misma secuencia y acabar en guanina o citosina. La mutación debe estar en el centro del primer con unas 10-15 bases a cada lado y el contenido de guanina-citosina debe ser superior al 40%. Se obtuvieron por mutagénesis dirigida PEPCK-C pentamutante (p.V85A-F130L-M139L-G185R-K510R), p.V85A, p.F130L, p.G185R, p.Y235F, p.K510R y los dobles mutantes (p.V85A-F130L, p.V85A-M139L, p.V85A-G185R, p.F130L-M139L, p.F130L-G185R y p.M139L-G185R).

La PCR utilizada para la mutagénesis dirigida tenía los siguientes componentes (Tabla 2.1).

PCR
38 µl H ₂ O MilliQ
2,5 µl DMSO
5 µl PFU Ultra II reaction buffer
0,5 µl DNTP mix
1 µl ADN molde (pET-15b + PEPCCK WT)
1 µl primer Forward
1 µl primer Reverse
1 µl PFU Ultra II fusión HS (ADN polimerasa)

Tabla 2.1. Componentes de la PCR utilizada para mutagénesis dirigida.

El ADN molde (pET-15b + PEPCCK-C WT) y la mutación p.M139L se obtuvieron a partir de bacterias *Escherichia coli* DH5α almacenadas a -80°C (Latorre *et al.*, 2016). Para ello, se crecieron estas bacterias en 10 ml de medio Luria-Bertani (LB) con 100 µg/ml ampicilina en agitación a 37°C durante 24 horas. El ADN molde se obtuvo con el kit FavorPrep Plasmid DNA Extraction (Favorgen, Austria) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los primers utilizados para producir todos los mutantes son los siguientes (Tabla 2.2).

	Forward	Reverse
p.V85A	5'-gacccaggagcgcggcccagaattgaaagc-3'	5'-gcttcaattctggccgcgtccctggggtc-3'
p.F130L	5'-gccttaatgccggctccgggtgcatgaag-3'	5'-cttcatgcaccccggaagccgggcattgaaggc-3'
p.M139L	5'-catgaagggtcgcacgctgtatgcatcccgtc-3'	5'-gaacgggatgacatacagcgtgcaccctcatg-3'
p.G185R	5'-gtcctggacgcgctgcggcgggcgagttcatc-3'	5'-gatgaactcggcccccgcagcgcgtccaggac-3'
p.Y235F	5'-ccttcgggagcgggttcggcggaactcactc-3'	5'-gagtgattcccgccgaaccgctcccgaagg-3'
p.K510R	5'-gcgccaagctgccagaatctccacgtcaac-3'	5'-gttgacgtggaagattctgggcagctggccgc-3'
BamHI	5'-ctaggatcggatccatgcctcctcagctctcaaacggcc-3'	-
Sall	-	5'-ctaggatcgtcgactcacatctggctgattctctgctcagg-3'
EcoRI	5'-ctaggatcgaattcgtatgcctcctcagctctcaaa-3'	-
XhoI	-	5'-ctaggatcctcagtcacatctggctgattctct-3'

Tabla 2.2. Secuencia de los primers utilizados.

La PCR en primer lugar tuvo 1 ciclo a 95°C durante 2 min para desnaturalizar completamente el ADN. A continuación se realizaron 25 ciclos, cada uno de los cuales consistió en 20 segundos a 95°C para desnaturalizar el ADN, 20 segundos a 60°C para que se unan los primers al ADN y 4 minutos a 72°C para que la ADN polimerasa elongue la cadena. Por último, tuvo lugar 1 ciclo de elongación final que consistió en 5 minutos a 72°C.

Los productos de PCR resultantes fueron digeridos a continuación con la enzima de restricción *DpnI*, la cual digiere ADN metilado. El plásmido utilizado como ADN molde proviene de las bacterias y se encuentra metilado, por lo que la digestión con la *DpnI* digerirá este ADN molde que ya no es necesario. Para realizar la digestión con *DpnI* se añadió 5 µl de buffer Tango (Thermo Scientific, EEUU) y 1 µl de *DpnI* (Thermo Scientific, EEUU) a 45 µl del producto de PCR. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 2 horas. Tras las 2 horas, se desnaturalizó la *DpnI* calentando la muestra 20 minutos a 80°C.

La mutación p.G185R también se clonó en los vectores pET22bSUMO y pMALC2x. Para ello se digirió el vector pET15b + PEPCK-C p.G185R con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* (Thermo Scientific, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante para liberar el gen de la PEPCK-C del resto del plásmido. A continuación se añadieron los sitios de corte *BamHI* y *Sall* mediante una PCR con los primers correspondientes (Tabla 2.2). El producto de PCR y los plásmidos fueron digeridos con *BamHI* y *Sall* (Thermo Scientific, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante y se unieron en una sola molécula mediante la acción de la ligasa T4 (Thermo Scientific, EEUU) que actuó toda la noche a 18°C.

De forma similar se clonaron PEPCK-C WT, pentamutante y p.Y235F en el vector pCMV-Myc. Se añadieron mediante PCR los sitios de corte para *EcoRI* y *XhoI* utilizando los correspondientes primers (Tabla 2.2). Los productos de digestión y el plásmido pCMV-Myc fueron digeridos con *EcoRI* y *XhoI* (Thermo Scientific, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos obtenidos posteriormente a la digestión con *DpnI* se introdujeron en el interior de bacterias *Escherichia coli* DH5α mediante transformación por shock térmico. En primer lugar, los diferentes plásmidos se incubaron con las bacterias descongeladas

durante 30 minutos en hielo. A continuación se realizó el shock térmico, el cual consistía en mantener las bacterias a 42°C durante 1 minuto y a 4°C durante 2 minutos. Las bacterias se dejaron recuperando durante 1 hora en medio LB a 37°C para aumentar el número de bacterias viables. Tras la recuperación, se sembraron las bacterias en placas de LB agar con ampicilina y se tuvieron a 37°C hasta el día siguiente. Entonces, se seleccionaron 4 colonias aisladas de cada placa y se tuvieron creciendo en 10 ml de medio LB con ampicilina a 37°C en agitación hasta el día siguiente. Las bacterias se almacenaron a -80°C añadiendo un 20% de glicerol para evitar el daño celular. El plásmido se extrajo con el kit FavorPrep Plasmid DNA Extraction (Favorgen, Austria) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos se mandaron a secuenciar a Sistemas Genómicos (Valencia, España) según las instrucciones dadas por la empresa. Esta secuenciación se realizó para comprobar que las mutaciones se habían introducido correctamente y que la polimerasa no había generado mutaciones al azar. Tras comprobar que las mutaciones eran correctas se procedió a introducir los plásmidos en bacterias *Escherichia coli* BL21, cepa especializada en la producción a gran escala de proteína en su interior, del mismo modo que el explicado anteriormente para las DH5 α . La mutación p.G185R también se transformó en bacterias *Escherichia coli* de la cepa Artic Express. Esta cepa sobreexpresa las chaperonas Cpn10 y Cpn60 de *Oleispira antarctica* cuando se encuentra a bajas temperaturas (Kube *et al.*, 2013) lo cual facilita el plegado y la estabilidad de las proteínas.

2.3. Formación de quimeras

Se partió de una PEPCK-C quimérica cerdo-rata compuesta por la secuencia porcina del residuo 1 al 260 y de la de rata del residuo 261 al 622 (Latorre *et al.*, datos sin publicar). Se introdujeron las cuatro mutaciones que estaban en la parte porcina. Para ello se realizaron cuatro mutagénesis dirigidas tal y como se describe en el apartado 2.2., de una en una y de forma secuencial. Los primers utilizados se encuentran en la Tabla 2.2. La mutación K510R no se introdujo debido a su nulo efecto (ver capítulo 4).

Se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5 α con este plásmido mediante transformación por shock térmico (42°C durante 1 min y 4°C durante 2 min) para

posteriormente secuenciar la proteína en Sistemas Genómicos (Valencia, España) para comprobar si se habían introducido correctamente las mutaciones deseadas y no se había introducido ninguna adicional. Tras comprobar que no había ningún error en la secuencia, se transformaron bacterias *Escherichia coli* BL21 con el plásmido para la posterior síntesis de proteínas.

2.4. Prueba de expresión y crecimiento a gran escala

La prueba de expresión es la inducción de la síntesis de una proteína a pequeña escala (5 mL) para comprobar que se sintetiza correctamente en las bacterias. Para ello se crecieron bacterias BL21 o Artic Express con los plásmidos correspondientes en medio LB con ampicilina a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente se indujo la expresión proteica con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM (Carbosynth, Reino Unido) a 37°C durante 3 horas. Se comprobó la correcta expresión mediante SDS-PAGE viendo si aparecía una proteína del tamaño adecuado en las muestras inducidas con IPTG.

Una vez comprobado mediante la prueba de expresión que se expresaban las proteínas correctamente se procedió a realizar el crecimiento a gran escala para producir suficiente cantidad de proteína para futuros experimentos. Para ello en primer lugar se puso un precultivo de 100 ml de medio LB con ampicilina y se tuvieron creciendo las bacterias en agitación a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente se añadió el precultivo a un matraz con 2 litros de medio LB con ampicilina y se mantuvo creciendo en agitación a 37°C hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 0,5. En ese momento se añadió IPTG 1 mM para inducir la expresión de proteínas y se dejó en agitación hasta el día siguiente a 18°C en el caso de las bacterias BL21 y a 12°C en el caso de las bacterias Artic Express. Por último se centrifugaron los matraces para recoger las células y guardarlas a -80°C hasta el momento de uso.

2.5. Purificación de PEPCK-C

El pellet de bacterias congelado a -80°C se resuspendió en 20 ml de tampón de lisis, consistente en HEPES 25 mM pH 7.4, NaCl 500 mM e imidazol 10 mM (Scharlab,

España) al que se le añadió β -mercaptoetanol 2 mM (Scharlab, España), 1 mg de lisozima (Sigma-Aldrich, EEUU), 20 μ L de ADNasa (Novagen, EEUU) y un cóctel de inhibidores de proteasas compuesto de benzamidina 10 μ M, PMSF 1 μ M y leupeptin 0,5 μ M (Sigma-Aldrich, EEUU). Tras ser resuspendido el pellet, se incubó 20 minutos a 37°C. Las bacterias se lisaron a 4°C mediante 12 ciclos de sonicación de 30 segundos encendido-30 segundos apagado en un sonicador Vibra-Cell (Sonics & Materials, EEUU). El lisado bacteriano se centrifugó 3 veces a 40.000 xg durante 15 minutos para eliminar los restos celulares. Después de cada centrifugación, se filtró el sobrenadante con un filtro de 0,45 μ M para eliminar las partículas de mayor tamaño.

Para realizar la purificación se utilizaron los siguientes tampones (Tabla 2.3).

Tampón A	Tampón B	Tampón C
HEPES 25 mM pH 7,4	HEPES 25 mM pH 7,4	HEPES 25 mM pH 7,4
NaCl 500 mM	NaCl 500 mM	TCEP 1 mM
Imidazol 10 mM	Imidazol 400 mM	
β -mercaptoetanol 2 mM	β -mercaptoetanol 2 mM	

Tabla 2.3. Composición de los tampones utilizados para la purificación de la PEPCK-C.

La PEPCK-C se purifica mediante una cromatografía de afinidad que une específicamente la cola de histidinas, que tiene la proteína unida a su porción N-terminal, a una columna de 5 ml que tiene ligados átomos de cobalto (FF crude HisTrap Talon, GE Healthcare, Reino Unido) usando el sistema FPLC ÄKTA Start (GE Healthcare, Reino Unido). La columna se equilibra pasando varios (5 ó 6) volúmenes de columna de tampón A. A continuación se carga el sobrenadante bacteriano en la columna y se lava con buffer A hasta que dejan de eluir proteínas bacterianas de la columna. En ese momento se lava con tampón B hasta que eluye la PEPCK-C, ya que la gran cantidad de imidazol del tampón compite con la cola de histidinas por la unión al cobalto. Esta gran cantidad de imidazol podría hacer precipitar la proteína, por lo que hay que sustituir el tampón B por el C, que solo tiene HEPES y TCEP como el obligado antioxidante. Esto se logra con

varias centrifugaciones con centricones Amicon Ultra Centrifugal Filters de 30 kDa (Millipore, EEUU). En cada centrifugación se reduce a una décima parte la cantidad de imidazol presente, por lo que a la quinta o sexta centrifugación la cantidad de imidazol es despreciable. Por último, se comprobó el grado de pureza de la proteína usando SDS-PAGE y se diluyó a una concentración de 2 mg/ml. Estas preparaciones se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

En la PEPCK-C utilizada para los experimentos cinéticos este era el último paso, ya que la PEPCK-C con y sin cola de histidinas se comportan prácticamente igual cinéticamente (Case y Mukhopadhyay, 2007). En la PEPCK-C utilizada para los experimentos estructurales se eliminó la cola de histidinas incubándola con la PreScission Protease (GE Healthcare, Reino Unido) a 4°C hasta el día siguiente. A continuación se realizó una cromatografía de afinidad como la anterior, pero en este caso la PEPCK-C sin la cola de histidinas eluye en el lavado de la columna con tampón A y la cola de histidinas se queda pegada en la columna. La preparación se vuelve a dejar en tampón C.

Para lograr una mayor pureza en las preparaciones de PEPCK-C utilizadas para pruebas estructurales, después de haber eliminado la cola de histidinas, se realizó una filtración en gel que separa a las proteínas por tamaños. La columna utilizada fue una HiLoad Superdex 75 (GE Healthcare, Reino Unido) equilibrada en tampón C. Tras el paso de un volumen concreto de tampón C por la columna se recogió el pico que correspondía a la PEPCK-C, se congeló en N₂ líquido y se almacenó a -80°C.

2.6. Ensayos enzimáticos de la PEPCK-C

La actividad PEPCK-C se mide en los dos sentidos de la reacción mediante ensayos enzimáticos acoplados (Fig. 2.2). En el ensayo de formación de PEP (A), la piruvato quinasa transforma el PEP generado en la reacción de la PEPCK-C en piruvato y este es transformado inmediatamente en lactato por la lactato deshidrogenasa en una reacción que consume NADH y genera NAD⁺. La diferencia de absorbancia a 340 nm entre NADH y NAD⁺ se utiliza para calcular la actividad de la enzima sabiendo que el coeficiente de extinción molar del NADH es 6220 M⁻¹ cm⁻¹. En el ensayo de formación de OAA (B), el OAA generado en la reacción de la PEPCK-C se transforma en malato por la acción de la malato deshidrogenasa con gasto de NADH. Todos los ensayos se realizaron a 30°C en

un espectrofotómetro UNICAM 500 (UNICAM Analytical Systems, Reino Unido).

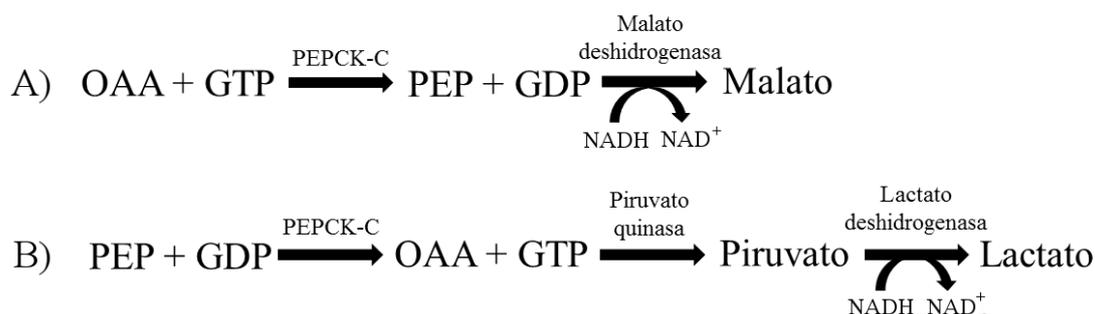


Fig. 2.2. Esquema de los ensayos enzimáticos de la PEPCK-C.

Los ensayos en el sentido de la síntesis de OAA fueron realizados en un volumen total de 1 ml, conteniendo 100 mM HEPES pH 7,4, 10 mM DTT (Sigma-Aldrich, EEUU), 100 mM KHCO₃ (1-75 mM cuando se usaba como sustrato variable) (Panreac, España), 2 mM GDP (0,005-0,5 mM cuando se usaba como sustrato variable) (Sigma-Aldrich, EEUU), 2 mM PEP (0,025-2 mM cuando se usaba como sustrato variable) (Bachem, Suiza), 0,2 mM MnCl₂ (Panreac, España), 2 mM MgCl₂ (Panreac, España), 0,2 mM NADH (Sigma-Aldrich, USA) y 4 unidades de malato deshidrogenasa (Sigma-Aldrich, USA).

Los ensayos en el sentido de la síntesis de PEP fueron realizados en un volumen total de 1 ml, conteniendo 100 mM HEPES pH 7,4, 10 mM DTT, 1 mM GTP (0,005-0,5 mM cuando se usaba como sustrato variable) (Sigma-Aldrich, EEUU), 0,4 mM OAA (0,001-0,1 mM cuando se usaba como sustrato variable) (Sigma-Aldrich, EEUU), 0,2 mM MnCl₂, 2 mM MgCl₂, 1 mM ADP (Sigma-Aldrich, EEUU), 0,2 mM NADH y 5 unidades de piruvato quinasa y 5 de lactato deshidrogenasa (Sigma-Aldrich, USA).

Las medidas de actividad se calculan midiendo la pendiente a 340 nm después de restar la velocidad de un control que contiene todos los sustratos menos la PEPCK-C. En el caso de la reacción de síntesis del PEP tiene especial importancia ya que el OAA se descarboxila de manera espontánea a una velocidad considerable (Tsai, 1967). Para obtener los valores cinéticos (K_m y k_{cat}) de cada sustrato los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten mediante regresión no lineal con el software Graphpad Prism 6.

2.7. Búsqueda de efectores de PEPCK-C

La búsqueda de efectores de la PEPCK-C se realizó usando el ensayo de variación de temperatura (*termal-shift assay*) en una quimioteca que contenía 10.000 compuestos diferentes (HitFinder, Maybridge, Reino Unido). En los ensayos se desnaturizó la proteína lentamente mientras se monitorizaba la fluorescencia de ANS (ácido 8-anilinoftaleno-1-sulfónico). El ANS se une a la parte hidrofóbica de la proteína, por lo que cuanto más desplegada esté la proteína mayor cantidad de ANS se unirá a ella y mayor señal fluorescente se emitirá. La unión de efectores a la molécula de PEPCK-C modificará la dinámica de desnaturalización de la enzima y por tanto se observará un cambio en la temperatura de desnaturalización.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos en un fluorímetro FluoDia T70 High Temperature (Photon Technology International, Reino Unido). En cada pocillo se añadió 4 μ M PEPCK-C WT, 20 mM HEPES pH 7,4, 1 mM TCEP, 100 μ M ANS, 10% DMSO y los compuestos de la quimioteca a una concentración de 25 μ M. Para prevenir la evaporación se cubrieron los pocillos con 50 μ l de aceite mineral. En una primera ronda de experimentos se añadían 5 compuestos diferentes a un mismo pocillo y se observaba si se producían variaciones en la temperatura de desnaturalización (T_m). Para obtener los valores de T_m de cada pocillo, las curvas de desnaturalización se ajustaron a la función de Boltzmann (Ecuación 2.1) usando el software OriginPro 9.1.

$$y(T) = \frac{A_1 - A_2}{1 + \exp\left(\frac{T - T_m}{S}\right)} + A_2$$

Ecuación 2.1. Función de Boltzmann

En la función de Boltzmann, los valores A_1 y A_2 se corresponden a los valores asintóticos en la zona inferior y superior de la curva de desnaturalización (Fig. 2.3). El valor S es un parámetro asociado con la pendiente de la curva de desnaturalización y relacionado con la entalpía de desnaturalización de la enzima.

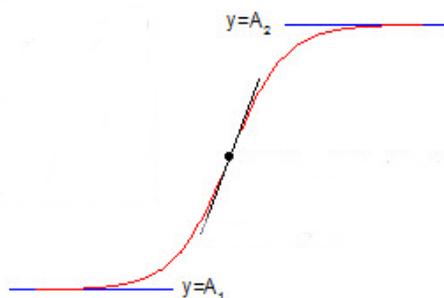


Fig. 2.3. Representación de la función de Boltzmann. Imagen tomada y modificada del manual de instrucciones del software OriginPro 9.1.

Un pocillo se consideró positivo cuando el valor de T_m era 8°C más alto que los obtenidos en los controles que no poseían ningún efector. Este valor tan alto se eligió para disminuir en la medida de lo posible el número de falsos positivos y asegurar que los efectores seleccionados se unen a la PEPCK-C. En una segunda ronda de experimentos, se analizaron individualmente los pocillos positivos añadiendo por separado cada uno de los potenciales efectores para comprobar si realmente eran efectores o el efecto observado era por una sinergia entre los compuestos o un falso positivo.

2.8. Determinación del IC_{50} de los compuestos

El IC_{50} es un parámetro que mide la efectividad de la inhibición de un compuesto y se define como la concentración de inhibidor que inhibe el 50% de la actividad de la enzima en unas condiciones preestablecidas. Los ensayos cinéticos para calcular la IC_{50} se realizaron en la dirección de síntesis de OAA para evitar las complicaciones derivadas del ensayo en dirección de síntesis PEP debido a la inestabilidad del OAA.

Los ensayos se realizaron en un volumen total de 1 ml conteniendo HEPES 100 mM pH 7,4, 10 mM DTT, 0,2 mM MnCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 100 mM KHCO_3 , 2 mM PEP, 2 mM GDP, 0,2 mM NADH y 4 unidades de malato deshidrogenasa. Los efectores se añadieron a concentraciones entre 0-200 μM . Los ensayos se iniciaban por la adición de PEPCK-C. Las medidas de actividad se calculan midiendo la pendiente a 340 nm después de restar la velocidad de oxidación espontánea del NADH. Los datos de estos ensayos se ajustaban

a una función lineal o cuadrática para calcular el IC₅₀ usando el software Graphpad Prism 6.

2.9. Ensayos de inhibición

El estudio de la inhibición se llevó a cabo con el ácido 3-mercaptopicolínico (3-MP), un conocido inhibidor de la PEPCK-C (Robinson y Oei, 1975) y los dos compuestos encontrados en la quimioteca; N1-cyclohexyl-2-{1-[4-methyl-2-(2-thienyl)-1,3-thiazol-5-yl]ethylidene}hydrazine-1-carbothiamide o compuesto 1 y N'1-({5-[1-methyl-5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2-thienyl}methylidene)-2,4-dichlorobenzene-1-carbohydrazide o compuesto 2.

Los ensayos en el sentido de la síntesis de OAA fueron realizados en un volumen total de 1 ml, conteniendo 100 mM HEPES pH 7,4, 10 mM DTT, 100 mM KHCO₃, 2 mM GDP (10-100 μM cuando se usaba como sustrato variable), 2 mM PEP (50-600 μM cuando se usaba como sustrato variable), 0,2 mM MnCl₂, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM NADH y 4 unidades de malato deshidrogenasa. El 3-MP (Sta. Cruz Biotechnology, EEUU) se utilizó a una concentración variable de 10-100 μM. Las reacciones se iniciaron por la adición de la PEPCK-C

Los ensayos en el sentido de la síntesis de PEP fueron realizados en un volumen total de 1 ml, conteniendo 100 mM HEPES pH 7,4, 10 mM DTT, 0,2 mM MnCl₂, 2 mM MgCl₂, 1 mM GTP (25-500 μM cuando se usaba como sustrato variable), 400 μM OAA (5-50 μM cuando se usaba como sustrato variable), 1 mM ADP, 0,2 mM NADH y 5 unidades de lactato deshidrogenasa y 5 de piruvato quinasa. Las reacciones se iniciaron por la adición de OAA.

Las medidas de actividad se calcularon midiendo la pendiente a 340 nm después de restar la velocidad de un control que contiene todos los sustratos menos la PEPCK-C.

Para comprobar si los nuevos compuestos podrían inhibir también a las enzimas auxiliares usadas para evaluar la actividad de la PEPCK-C (malato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa y piruvato quinasa) se llevaron a cabo las siguientes reacciones. El ensayo se realizaba en un volumen final de 1 ml que contenía 100 mM HEPES pH 7,4, 10 mM DTT, 0,2 mM MnCl₂, 2 mM MgCl₂, 2 mM GDP, 0,2 mM NADH, 2 mM PEP, 1 mM

ADP, 100 mM KHCO₂ y una concentración variable de 25-200 μM de compuesto 1 o de compuesto 2. Las reacciones se iniciaban con la adición de 0,5 unidades de lactato deshidrogenasa y 0,5 de piruvato quinasa.

Los ensayos de inhibición de los compuestos 1 y 2 se realizaron en la dirección de síntesis de PEP de la misma forma que la descrita para los ensayos del 3-MP. En este caso los sustratos variables eran 10-100 μM de OAA y 25-500 μM de GTP. Las concentraciones de los inhibidores utilizadas eran similares al IC₅₀ de cada compuesto; 100 μM para el compuesto 1 y 50 μM para el compuesto 2. Las unidades de lactato deshidrogenasa y piruvato quinasa se incrementaron 4 veces, hasta las 20 unidades por ensayo, debido a que el compuesto 1 y 2 interaccionan ligeramente con estas enzimas auxiliares.

2.10. Determinación de los parámetros de inhibición

Los valores de actividad obtenidos en los ensayos de inhibición del 3-MP se representaron en una gráfica de dobles recíprocos (Fig. 2.4). La ecuación de los dobles recíprocos para el tipo de inhibición no competitiva mixta observada para el 3-MP se puede escribir de la siguiente forma (Ecuación 2.2)

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right)$$

Ecuación 2.2. Ecuación de la inhibición no competitiva mixta

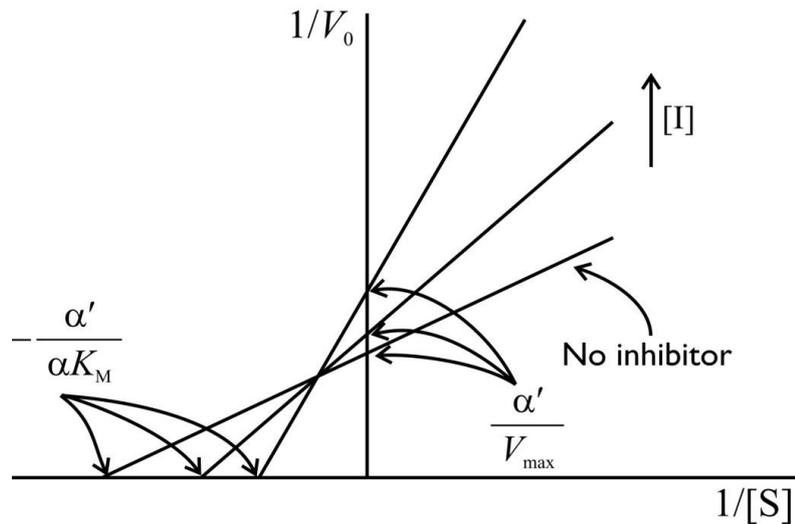


Fig. 2.4. Representación de dobles recíprocos de la inhibición no competitiva mixta
 Imagen tomada de Hegyi *et al.* (2013).

Los gráficos secundarios usados para calcular K_i y αK_i tienen las siguientes ecuaciones (Ecuación 2.3 y 2.4)

$$Pendiente = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{K_m[I]}{V_{max}K_i}$$

Ecuación 2.3. Ecuación para calcular K_i

$$Corte con el eje Y = \frac{1}{V_{max}} + \frac{1}{\alpha K_i V_{max}} [I]$$

Ecuación 2.4. Ecuación para calcular αK_i

Los valores de K_i y αK_i son las constantes de disociación del complejo enzima-inhibidor y del complejo enzima-inhibidor-sustrato, respectivamente.

Los valores K_i del 3-MP con respecto a los nucleótidos (GTP y GDP) se calcularon usando la representación de Dixon (Dixon, 1953) con todos los sustratos a concentración

de saturación debido a que el 3-MP producía una inhibición acompetitiva para estos sustratos (Fig. 2.5). La ecuación para el gráfico de Dixon es la siguiente (Ecuación 2.5).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}[S]K_i}$$

Ecuación 2.5. Ecuación de las representaciones de Dixon

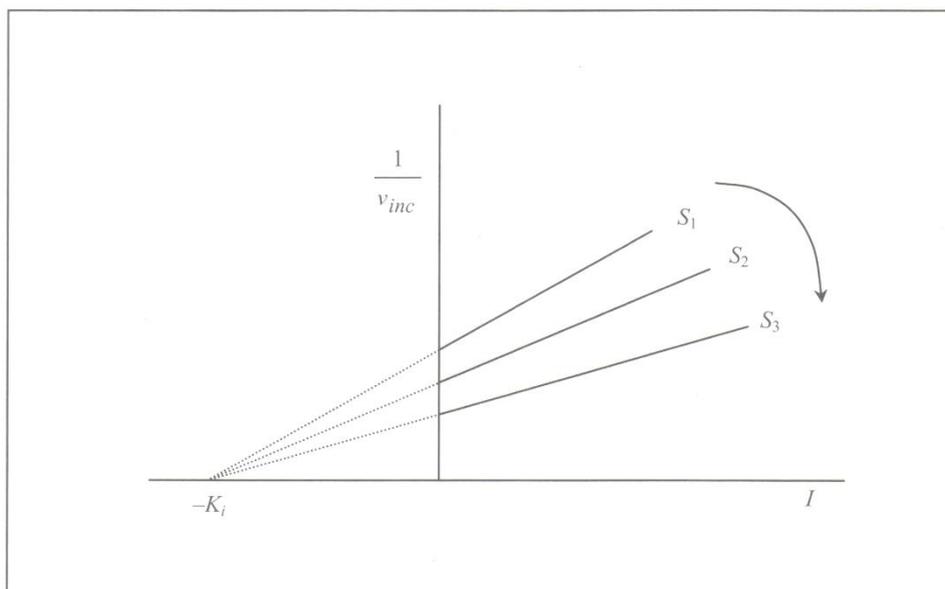


Fig. 2.5. Representación de Dixon. Imagen tomada de Núñez de Castro (2000).

Los valores obtenidos en los ensayos de inhibición con los compuestos 1 y 2 se representaron en gráficos de dobles recíprocos y se calcularon los valores de K_m y V_{max} .

2.11. Dicroísmo circular

La PEPCK-C WT y los diferentes mutantes se prepararon para el dicroísmo circular (CD) a una concentración de 20 μM en un tampón 20 mM HEPES pH 7,4 que contenía 1 mM TCEP como antioxidante. En los ensayos usados para ver si la adición de 3-MP, compuesto 1 o compuesto 2 modificaban el espectro de CD indicando así su unión, se utilizaron los inhibidores a una concentración de 50 μM . En los ensayos para buscar

diferencias en la estructura entre la PEPCK-C WT y sus mutantes se añadieron los sustratos PEP, OAA, GDP y GTP a una concentración de 1 mM.

Los ensayos de CD se realizaron a una temperatura constante de 25°C en una cubeta que tenía 0,1 cm de longitud de paso en un espectrofotómetro Chirascan CD (Applied Photophysics, Reino Unido). El rango de espectros utilizado para los ensayos fue de 320 a 250 nm (espectro cercano) y de 250 a 200 nm (espectro lejano). El espectro de dicroísmo, expresado como elipticidad ($\text{mdeg cm}^{-1} \text{M}^{-1}$) por longitud de onda (nm), se calculó mediante la ecuación 2.6, donde θ es el valor obtenido del aparato, C es la concentración molar y l es la longitud de paso (0,1 cm).

$$\text{Elipticidad} = \frac{\theta}{C * l * 10 * 672}$$

Ecuación 2.6. Ecuación para calcular los valores de elipticidad en CD

El porcentaje de hélice- α y lámina- β no se pudo calcular debido a la baja resolución del aparato de CD por debajo de 200 nm.

2.12. Calorimetría isoterma de titulación (ITC)

La calorimetría isoterma de titulación (ITC) es un método físico usado para determinar los parámetros termodinámicos de una interacción entre sustancias, proteína-inhibidor en este caso. Los experimentos de ITC se realizaron en un microcalorímetro Auto-ITC200 (MicroCal, Reino Unido). La célula de referencia se rellenó con agua destilada. La célula de muestra contenía 10 μM PEPCK-C, 20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, un 6,7% de DMSO y en los experimentos pertinentes se añadía 2 mM GTP. La jeringuilla con la cual se inyecta poco a poco el compuesto a analizar contenía 400 μM 3-MP o 100 μM de compuesto 2, 20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP y un 6,7% de DMSO.

En todos los ensayos se realizaron secuencialmente 19 inyecciones de 2 μl de volumen cada una a la célula de muestra. Entre inyección e inyección se dejaron 150 segundos de tiempo para dar tiempo a que la línea base se recuperara. Los ensayos de ITC se realizaron

al menos por duplicado. En las gráficas obtenidas se normalizó el efecto del calor como función del ratio molar y se analizaron usando un modelo de un solo sitio de unión mediante el software Origin 7 (OriginLab, EEUU). Los parámetros obtenidos fueron la constante de disociación (K_d), el incremento de la entalpía (ΔH) y el parámetro estequiométrico (n). La K_d describe la afinidad entre una proteína y su ligando. La entalpía (ΔH) describe el calor intercambiado en una reacción. El parámetro estequiométrico (n) describe la cantidad de moléculas de inhibidor que se unen a la proteína.

2.13. Docking

El docking, o acoplamiento molecular, es un método computacional que predice la unión de un ligando a un receptor, en este caso de un efector a una enzima. Debido a la imposibilidad de cristalizar la PEPCK-C porcina se decidió hacer un docking para tratar de simular informáticamente donde se podría unir el compuesto 1 y el compuesto 2. Para hacer los análisis se escogió como modelo el cristal de PEPCK-C de rata debido al alto grado de homología entre la PEPCK-C de ambas especies y por ser la especie más estudiada. Los cristales utilizados son el de la PEPCK-C de rata (pdb: 2QF1), proveniente del trabajo de Sullivan y Holyoak (2007).

Para trabajar con el compuesto 1 y el compuesto 2 se obtuvieron los archivos de formato SMILES con la estructura de los compuestos en la base de datos ZINC (<http://zinc.docking.org/>). Los códigos son ZINC01047596 para el compuesto 1 y ZINC02142218 para el compuesto 2. Para tener el formato adecuado con el que realizar el docking, el formato SMILE de los inhibidores se convirtió en formato pdb con el programa Cactus diseñado por el NCI/NIH, EEUU (<https://cactus.nci.nih.gov/translate/>).

Para realizar el docking se prepararon tanto la proteína como los inhibidores transformándolos del formato pdb en formato pdbqt con el programa AutoDockTools. Para ello se eliminaron las moléculas de agua de la proteína, se añadieron los hidrógenos correspondientes a la proteína y se añadieron las cargas parciales. Se observó que cada uno de los inhibidores tenía cinco enlaces rotables que podían hacer variar su posición. La cuadrícula o grid para analizar las posibles uniones se estableció para abarcar la totalidad de la molécula de PEPCK-C (64 (x), 80 (y), 84 (z)). El centro del grid se situó

en el centro activo de la molécula, en 0.46 (x), -2.447 (y), 13.21 (z).

El docking se realizó con el programa Autodock Vina (Trott y Olson, 2010) y los resultados se analizaron con el programa USCF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). Se desecharon los resultados en los que no se produce unión del inhibidor a la proteína. El análisis computacional se realizó por duplicado y se eligió el que tenía una energía de unión menor, ya que una baja energía de unión indica que es una unión estable y por tanto una mayor posibilidad de unión entre inhibidor y enzima. La hidrofobicidad de los aminoácidos de superficie de la PEPCK-C se calculó con el programa USCF Chimera con el comando: “rangecolor kdHydrophobicity min dodger blue 0 white max orange red”, donde el color azul indicaba un aminoácido hidrofílico y el rojo un aminoácido hidrófobo.

2.14. Estabilidad de PEPCK-C y de mutantes *in vivo*

Las células eucariotas utilizadas para todos los experimentos de cultivo celular fueron las HEK293T. Estas células provienen de células de riñón de un embrión humano y son muy utilizadas para evaluar la expresión de un gen de interés tras su transfección (Graham *et al.*, 1977).

La estabilidad *in vivo* de la PEPCK-C WT, de pentamutante y de Y235F se realizó mediante un experimento en el que tras la transfección y síntesis de proteínas se inhibía la síntesis de nuevas proteínas con cicloheximida, un inhibidor de la etapa de elongación en la traducción proteica (Schneider-Poetsch *et al.*, 2010). Esto permitía observar como descendía la cantidad de proteína a lo largo del tiempo, infiriendo así la estabilidad de cada una de los mutantes de PEPCK-C.

Las células HEK293T se sembraron en placas de 24 pocillos con 2×10^5 células por pocillo que contenían medio DMEM suplementado con 10% FBS, 4 mM L-glutamina, 0,1 mg/ml estreptomomicina y 100 U/m penicilina (PAN-Biotech, Alemania). Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente las células se transfectaron usando GeneJuice (Novagen, EEUU) y 10 ng del vector pCMV-Myc correspondiente, siguiendo las instrucciones del fabricante y se mantuvieron las células 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

24 horas después de la transfección, los pocillos correspondientes al tratamiento a 0 horas se recogieron en 1x PBS pH 7,4, se centrifugaron a 500 *xg* para recoger las células y se congelaron a -80°C. En el resto de pocillos se sustituyó el medio por DMEM fresco suplementado con lo anterior más 100 µg/ml de cicloheximida para inhibir la síntesis proteica. A las 4 y a las 8 horas se recogieron los pocillos correspondientes de la misma forma que los pocillos del tratamiento a 0 horas.

El análisis de la estabilidad se realizó mediante detección de las proteínas con anticuerpos. Las células se lisaron y las proteínas se desnaturalizaron añadiendo 80 µl de tampón de carga y sometiénolas a una desnaturalización a 100°C durante 5 min y realizando un SDS-PAGE. A continuación del SDS-PAGE, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de PVDF mediante un Western blot o electrotransferencia. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 hora en agitación a 25°C con un 5% de seroalbúmina bovina (BSA) disuelta en 1x PBS y 0.1% de Tween-20 (PBST) para bloquear los lugares de unión en la membrana que han quedado libres de proteína y así evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. Después del bloqueo se incubó la membrana con 1:1000 de anticuerpo primario anti-Myc (Invitrogen, EEUU) a 4°C en agitación durante toda la noche. Este anticuerpo detecta el epítipo c-Myc unido a la PEPCK-C mediante el plásmido pCMV-Myc. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBST y se incubaron durante 1 hora en agitación a 25°C con 1:5000 del anticuerpo secundario anti-mouse-HRP (Invitrogen, EEUU), el cual se une específicamente al anticuerpo primario. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados con PBST para eliminar los restos de anticuerpo sin unir. La detección de las bandas se realizó mediante quimioluminiscencia usando placas fotográficas y el kit de detección SuperSignal West Pico PLUS Substrate (ThermoFisher, EEUU).

Para ver si se había producido la transferencia y que los reactivos funcionaban correctamente, evitando así falsos negativos, es necesario el uso de un control de carga con una proteína que se expresa constantemente en las células, para lo que se utilizó la α -tubulina. Para ello en primer lugar se eliminaron de la membrana utilizada anteriormente todos los anticuerpos unidos mediante el uso de un reactivo de stripping (ThermoFisher, EEUU) según las instrucciones del fabricante. A continuación se bloqueó la membrana con 5% BSA durante 30 minutos en agitación a 25°C. El anticuerpo primario utilizado fue 1:2000 de anti- α -tubulina (Invitrogen, EEUU) durante 2 horas a 25°C en agitación. Tras los 3 lavados con PBST, se incubó la membrana con 1:5000 de anti-mouse-HRP como

anticuerpo secundario durante 1 hora en agitación a 25°C. Por último, tras 3 nuevos lavados con PBST, se detectó la señal de la misma forma que anteriormente.

La disminución de la cantidad de proteína con el tiempo se analizó usando el software ImageJ (NIH, EEUU). Para ello se dividió la intensidad de banda de la PEPCK-C entre la intensidad de banda de α -tubulina para cada punto y se representó este ratio a lo largo del tiempo de experimento (0, 4 y 8 horas).

2.15. Extracción de ADN y secuenciación del promotor de la PEPCK-C porcina

En el caso de la secuenciación del promotor se extrajo el ADN de 9 cerdos de raza Piétrain, 9 cerdos de raza Ibérica y 9 cerdos de raza Duroc x Landrace/Large White. En el caso del genotipado del SNP de la región 3'UTR, se extrajo el ADN de 202 cerdos de raza Duroc x Landrace/Large White. El ADN genómico se obtuvo a partir de muestras musculares utilizando el kit de extracción de ADN Realpure (Durviz, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se inactivaron las ADNasas mediante un tratamiento térmico de 100°C durante 10 minutos. La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (ThermoFisher, EEUU).

El estudio de la región promotora de PEPCK se llevó a cabo por secuenciación del fragmento de esta región amplificado con los primers PEPCKprom2 Forward y Reverse (Tabla 2.4). Cada reacción contenía 1 unidad (0,2 μ l) de AccuPrimeTMTaqPolymerase High Fidelity (Invitrogen, EEUU), 5 μ l del tampón II 10 x incluido con el enzima, 0,5 μ l de cada uno de los primers (20 μ M), 3,75 μ l de DMSO, 36,05 μ l de agua milliQ y 4 μ l de ADN del extracto de ADN diluido a 50 ng/ μ l. La amplificación de este fragmento se llevó a cabo en un termociclador UNO-Thermoblock (Biometra, Alemania) con el siguiente programa de temperaturas: 94° C durante 2 min, seguida de 35 ciclos de 94° C durante 30 s, 57° C durante 2 min y 30 s y 68° C durante 30s, y una etapa final de extensión de 10 min a 68° C. Tras comprobar que la amplificación produjo un único amplicón del tamaño esperado, el producto de la PCR se purificó con el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se envió a secuenciar a Sistemas Genómicos (Paterna, España) con los siguientes primers:

	Forward	Reverse
PEPCKprom2	5'-gtgtcaggattctccagttggc-3'	5'-cctgtagctctgccctttgtag-3'
PEPCKprom3	5'-tggtactgctgtagtgtgtg-3'	5'-gcacgtcttgtgtacagatg-3'
PEPCKprom4	5'-ctcattgctcaaggtaatc-3'	5'-ttgcccttgcaaatctgagc-3'
PEPCKprom5	5'-acagctcaccatcgtggttg-3'	5'-ttggccatgccaagggatg-3'

Tabla 2.4. Secuencias de los primers utilizados para la secuenciación del promotor de la PEPCK-C porcina

2.16. Genotipado del SNP g.65100606G>A por RT-PCR

El genotipado de los cerdos para el SNP g.65100606G>A se realizó por PCR a tiempo real (RT-PCR). Para el genotipado se utilizaron 202 cerdos Duroc x Landrace/Large White cuyo manejo y caracterización se describe en Burgos *et al.* (2012). El ensayo de RT-PCR fue diseñado usando el software Assay by Design de Applied Biosystems y se usaron sondas Taqman marcadas con fluorocromos VIC o FAM. Las secuencias de los primers y las sondas Taqman se muestran en la Tabla 2.5. Cada ensayo contenía 6,25 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix, 0,3 µL de 40x Assay Mix, 2,5 µL de ADN genómico (1 ng/µL) y agua MilliQ hasta alcanzar los 12,5 µL de volumen total. El ensayo de RT-PCR se realizó con un ciclo inicial a 95°C durante 3 min seguido de 32 ciclos, cada uno de los cuales consistía en 5 s a 95°C y 20 s a 60°C. Las reacciones se realizaron en un aparato CFX96 Real-Time System (Bio-rad, EEUU). Las muestras utilizadas como controles de cada uno de los genotipos se analizaron previamente por secuenciación.

	Secuencia
3'UTR-Forward	5'-gcgacgtatttaacacctttggaaa-3'
3'UTR-Reverse	5'-cgtgtaatgacaaagccacatgac-3'
VIC	5'-ctgctagttgtgctagaaa-3'
FAM	5'-actgctagttgttactagaaa-3'

Tabla 2.5. Secuencias de los primers y las sondas TaqMan utilizados para genotipar el SNP g.65100606G>A de la región 3'UTR de la PEPCK-C porcina

2.17. Análisis estadísticos

Todos los ensayos, excepto que se indique otra cosa, se realizaron por triplicado de forma independiente y los resultados mostrados son la media \pm desviación estándar.

Las comparaciones en los ensayos de inhibición con 3-MP, compuesto 1 y compuesto 2, ya sea para comparar WT con 139Leu como WT con pentamutante fueron realizadas usando un test *t* de dos muestras con el software GraphPad Prism 6. $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Las comparaciones entre los ensayos cinéticos de pentamutante, Y235F, los monomutantes y los dobles mutantes fueron realizadas usando un test ANOVA de una vía seguido por un test *post-hoc* de Tukey con el software GraphPad Prism 6. $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

El estudio de asociación entre la mutación g.65100606G>A de la región 3'UTR del gen de la PEPCK-C porcina y 55 caracteres fenotípicos de importancia en la carne porcina (GIM, espesor grasa dorsal, pH₂₄, exudado, entre otros) se analizaron con modelos unicarácter mediante un enfoque bayesiano (Ecuación 2.7).

$$p(y|\mathbf{b}, \mathbf{p}, \mathbf{u}, \sigma_e^2) = \prod_{i=1}^n \frac{1}{(2\pi\sigma_e^2)^{\frac{1}{2}}} \exp\left(-\frac{(y_i - x_i\mathbf{b} - w_i\mathbf{p} - z_i\mathbf{u})}{2\sigma_e^2}\right)$$

Ecuación 2.7. Ecuación de la probabilidad bayesiana asumida.

En la Ecuación 2.7, y es el vector de los registros fenotípicos del carácter analizado, \mathbf{b} es el vector de efectos sistemáticos, que incluye las covariables edad y efecto de sustitución del polimorfismo analizado, un efecto lote con cuatro niveles y un efecto sexo con dos niveles, \mathbf{p} es el vector del efecto camada y \mathbf{u} recoge los efectos poligénicos. Además, x_i , w_i y z_i son las filas de las matrices de incidencia (\mathbf{X} , \mathbf{W} y \mathbf{Z}) correspondientes al registro fenotípico i ésimo y σ_e^2 la varianza residual.

Las distribuciones a priori de camada y de los efectos poligénicos fueron las siguientes distribuciones gaussianas multivariantes (MVN; Ecuación 2.8).

$$p(\mathbf{p}|\sigma_p^2) = MVN(0, I\sigma_p^2) \text{ y } p(\mathbf{u}|\sigma_a^2) = MVN(0, A\sigma_a^2)$$

Ecuación 2.8. Distribuciones gaussianas multivariantes.

En la Ecuación 2.8, σ_p^2 y σ_a^2 se corresponden a las varianzas de camada y poligénica aditiva, respectivamente, y A a la matriz de parentescos. Además, las distribuciones a priori de los efectos sistemáticos y de los componentes de varianza se asumieron uniformes con unos límites adecuados.

El análisis se realizó mediante una única cadena de 500.000 iteraciones Gibbs Sampler (Gelfand y Smith, 1990), con el programa TM, después de descartar las primeras 25.000 (Legarra, Varona y López de Maturana, 2008). Posteriormente, se utilizaron las muestras del efecto de sustitución para calcular las probabilidades *a posteriori* por encima de cero.

III. Búsqueda de efectores de la PEPCK-C

El principal mecanismo de regulación de la PEPCK-C y el más estudiado es la regulación transcripcional del gen (ver apartado 1.6.4). Sin embargo también se ha descrito la existencia de regulación a nivel post-traducciona, siendo la modificación más importante la acetilación reversible de las lisinas, la cual induce la ubiquitinización y la degradación de la proteína (Wang *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010). Otra forma de regulación post-traducciona es la regulación alostérica, es decir, la modulación de la actividad enzimática debido a cambios conformacionales producidos por la unión de activadores o inhibidores a la enzima (Núñez de Castro, 2000).

El ácido 3-mercaptopicolínico (3-MP) es un inhibidor de la PEPCK-C conocido desde hace décadas (Robinson y Oei, 1975). Se ha visto que su uso en ratas y en cobayas produce una inhibición de la gluconeogénesis (DiTullio *et al.*, 1974). La cristalización de la PEPCK-C con el 3-MP unido permitió comprobar que el inhibidor tiene dos sitios de unión a la enzima; uno de ellos en el que actúa de forma competitiva respecto al OAA/PEP y otro sitio de unión no competitivo (Balan *et al.*, 2015). Además del 3-MP, también se han descrito otros inhibidores de la PEPCK-C que actúan como análogos de alguno de los sustratos, produciendo una inhibición competitiva (Foley *et al.*, 2003; Stiffin *et al.*, 2008).

A pesar de su importancia metabólica no se ha descrito ningún efector alostérico que sea fisiológicamente relevante *in vivo*. La búsqueda de efectores alostéricos tiene importancia como modulador de la actividad de la PEPCK-C en humanos, ya que la PEPCK-C interviene en procesos patológicos tan importantes como la diabetes o el cáncer (Beale, Harvey y Forest, 2007; Stark *et al.*, 2014; Leithner *et al.*, 2015; Chu *et al.*, 2017) y también en el envejecimiento (Yuan *et al.*, 2016). Además, la modulación de la actividad de la PEPCK-C también tiene importancia en el cerdo, debido a su participación en los procesos de infiltración grasa (ver apartado 1.7) y a la existencia de isoformas porcinas de la PEPCK-C con diferentes características cinéticas y estructurales (Latorre *et al.*, 2016). Las diferencias entre las isoformas sugieren que el residuo 139, a pesar de estar lejos del centro activo, podría modificar el sitio de unión de los nucleótidos. Por tanto, los objetivos de este capítulo fueron la búsqueda de nuevos efectores de la PEPCK-C, especialmente activadores, y poner de manifiesto nuevas diferencias bioquímicas entre las isoformas p.139Met y p.139Leu.

3.1. Estudio de la inhibición del 3-MP

El análisis de la acción de inhibidores sobre una determinada enzima puede permitir el estudio de propiedades bioquímicas de la misma. En este sentido, se utilizó el inhibidor 3-MP para estudiar en profundidad las propiedades bioquímicas de las dos isoformas de la PEPCK-C porcina; la p.139Met y la p.139Leu. El uso de este inhibidor tiene como ventaja el conocimiento de sus sitios de unión exactos a la enzima y su modo de actuación (Balan *et al.*, 2015).

En primer lugar se determinó el IC₅₀ del 3-MP estudiando la reacción de la PEPCK-C en la dirección de síntesis de OAA con todos los sustratos a saturación. El IC₅₀ se define como la concentración de inhibidor a la que la velocidad de la enzima es el 50% de la velocidad máxima. El valor de IC₅₀ es útil para determinar el rango de acción de la enzima para futuros experimentos. El valor de IC₅₀ obtenido para el 3-MP fue de $65 \pm 6 \mu\text{M}$ (Fig. 3.1).

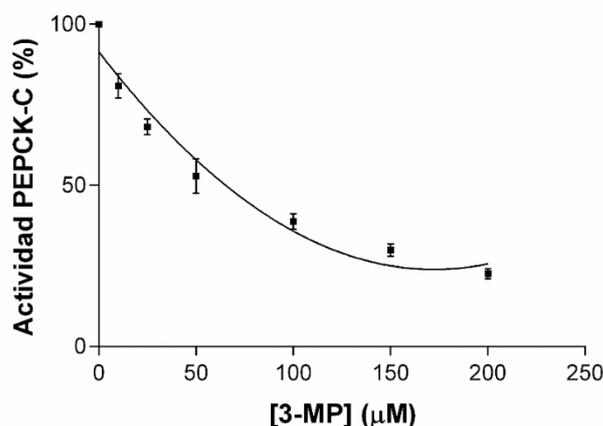


Fig. 3.1. Determinación del IC₅₀ del 3-MP. Los datos son la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes. Los datos se ajustaron a una ecuación cuadrática con el software Graphpad Prism 6.

Conociendo el dato de IC₅₀, se procedió a realizar los estudios de inhibición del 3-MP sobre las dos isoformas de la PEPCK-C. Los estudios de inhibición sobre los sustratos que participan en la reacción reversa (o de síntesis de OAA) muestran la diferencia en los patrones de inhibición entre sustratos. Al usar el PEP como sustrato variable en la inhibición se observó que el 3-MP se comportaba como un inhibidor no competitivo

mixto, mientras que si se utilizaba al GDP como sustrato variable, el 3-MP se comportaba aparentemente como un inhibidor acompetitivo (Fig. 3.2).

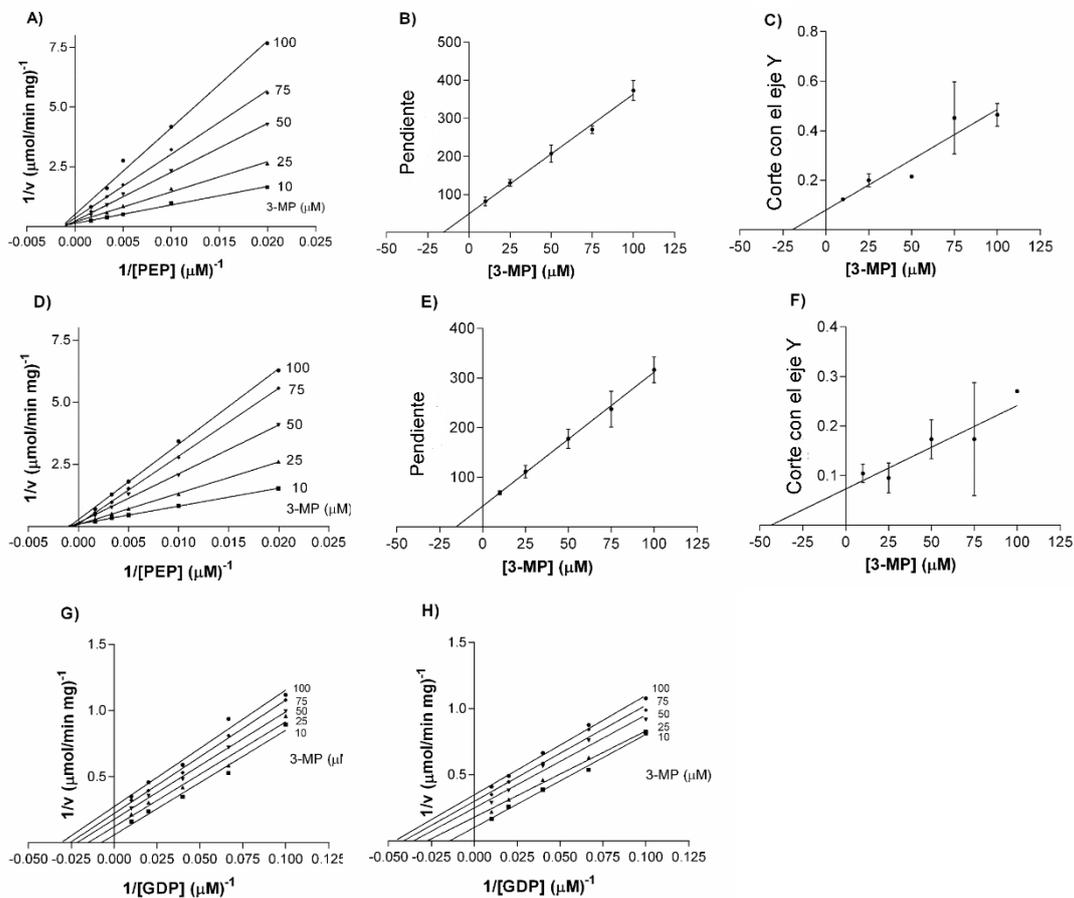


Fig. 3.2. Representaciones de dobles recíprocos y representaciones secundarias de la inhibición con 3-MP añadiendo PEP o GDP como sustrato variable. (A-C) Representaciones de dobles recíprocos, pendiente y corte con el eje Y de p.139Met con PEP como sustrato variable. (D-F) Representaciones de dobles recíprocos, pendiente y corte con el eje Y de p.139Leu con PEP como sustrato variable. (G) Representación de dobles recíprocos de p.139Met con GDP como sustrato variable. (H) Representación de dobles recíprocos de p.139Leu con GDP como sustrato variable. Los ensayos se realizaron por triplicado como se describe en el apartado 2.9 con las concentraciones crecientes de 50-600 μM para el PEP, 10-100 μM para el GDP y 10-100 μM para el 3-MP.

La inhibición no competitiva se produce cuando la unión del inhibidor al enzima libre o al complejo enzima-sustrato se produce en un sitio diferente del centro activo. La inhibición no competitiva se puede dividir en no competitiva pura cuando el inhibidor disminuye el valor de V_{\max} pero el valor de K_m se mantiene constante y en no competitiva mixta cuando disminuyen ambos valores de V_{\max} y K_m . La inhibición acompetitiva se produce cuando el inhibidor se une sólo al complejo enzima-sustrato y es un tipo de inhibición muy infrecuente (Núñez de Castro, 2000). Mediante la representación de dobles recíprocos se puede determinar el tipo de inhibición ya que en la inhibición no competitiva las líneas de actividad se unen todas en un mismo punto en el eje x (Fig. 3.2 A y D) y en la acompetitiva se producen líneas paralelas entre sí (Fig. 3.2 G-H).

Los valores de K_i y αK_i son las constantes de disociación del complejo enzima-inhibidor y del complejo enzima-inhibidor-sustrato, respectivamente. En el caso de la inhibición no competitiva se calculan mediante las representaciones secundarias de las pendientes y de las intersecciones con el eje y (Fig. 3.2 B-C y E-F). Los valores obtenidos en las representaciones de las pendientes corresponden a los valores de K_i , mientras que los valores obtenidos en las representaciones de las intersecciones con el eje y corresponden a los valores de αK_i .

Otra forma de abordar los estudios de inhibición es mediante el uso de las representaciones de Dixon, en las cuales se representa $1/v$ frente a la concentración de inhibidor, con concentraciones fijas de sustratos (Fig. 3.3 A-B) (Núñez de Castro, 2000). Estas representaciones son muy informativas ya que permiten un cálculo rápido y aproximado de las K_i en las inhibiciones competitiva y no competitiva. En el caso de la inhibición acompetitiva, debido a que el inhibidor sólo se une al complejo enzima-sustrato, para calcular el valor de K_i es necesario utilizar las representaciones de Dixon con todos los sustratos a saturación, ya que así todo el enzima está en forma de complejo enzima-sustrato y se puede unir el inhibidor (Fig. 3.3 C-D).

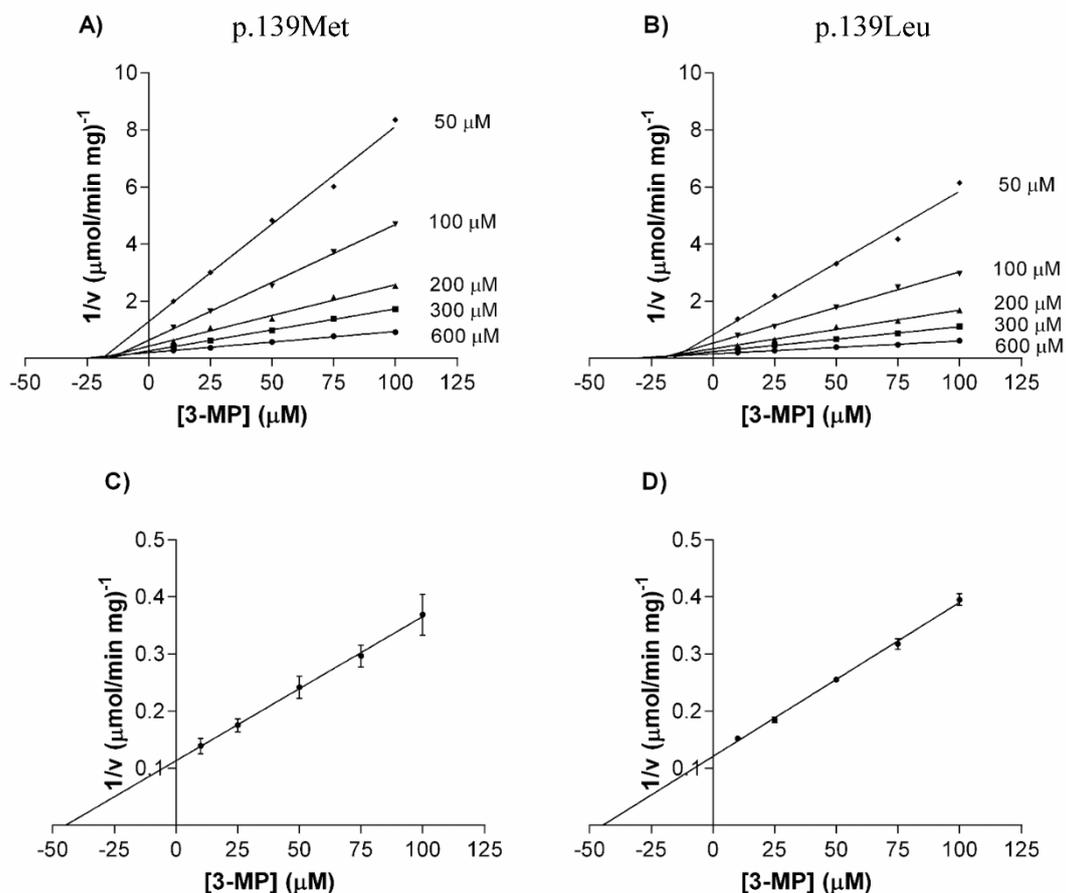


Fig. 3.3. Representaciones de Dixon de la inhibición con 3-MP añadiendo PEP o GDP como sustrato variable. (A) Representación de Dixon de p.139Met añadiendo PEP. (B) Representación de Dixon de p.139Leu añadiendo PEP. (C) Representación de Dixon de p.139Met a saturación de GDP. (D) Representación de Dixon de p.139Leu a saturación de GDP.

Los estudios de inhibición usando los sustratos que participan en la reacción de síntesis de PEP (OAA y GTP) producían los mismos patrones de inhibición que los de la reacción reversa, es decir, con el OAA como sustrato variable el 3-MP se comportaba como un inhibidor no competitivo mixto y con el GTP como un inhibidor acompetitivo (Fig 3.4 y 3.5).

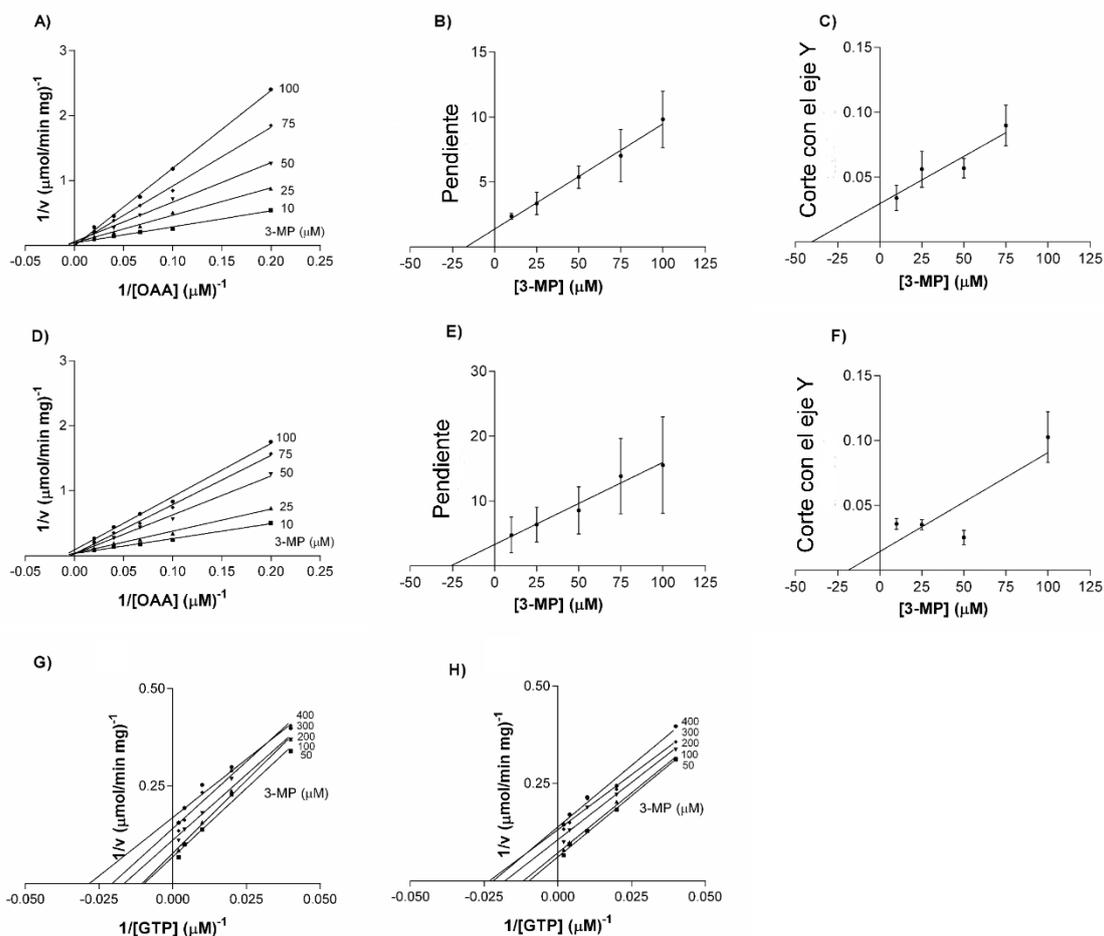


Fig. 3.4. Representaciones de dobles recíprocos y representaciones secundarias de la inhibición con 3-MP añadiendo OAA o GTP como sustrato variable. (A-C) Representaciones de dobles recíprocos, pendiente y corte con el eje Y de p.139Met con OAA como sustrato variable. (D-F) Representaciones de dobles recíprocos, pendiente y corte con el eje Y de p.139Leu con OAA como sustrato variable. (G) Representación de dobles recíprocos de p.139Met con GTP como sustrato variable. (H) Representación de dobles recíprocos de p.139Leu con GTP como sustrato variable. Los ensayos se realizaron por triplicado como se describe en el apartado 2.9 con las concentraciones crecientes de 5-50 μM para el OAA, 25-500 μM para el GTP. Se utilizó 3-MP en concentraciones entre 10-100 μM cuando se usaba junto con el OAA variable y entre 50-400 μM cuando se usaba junto con el GTP.

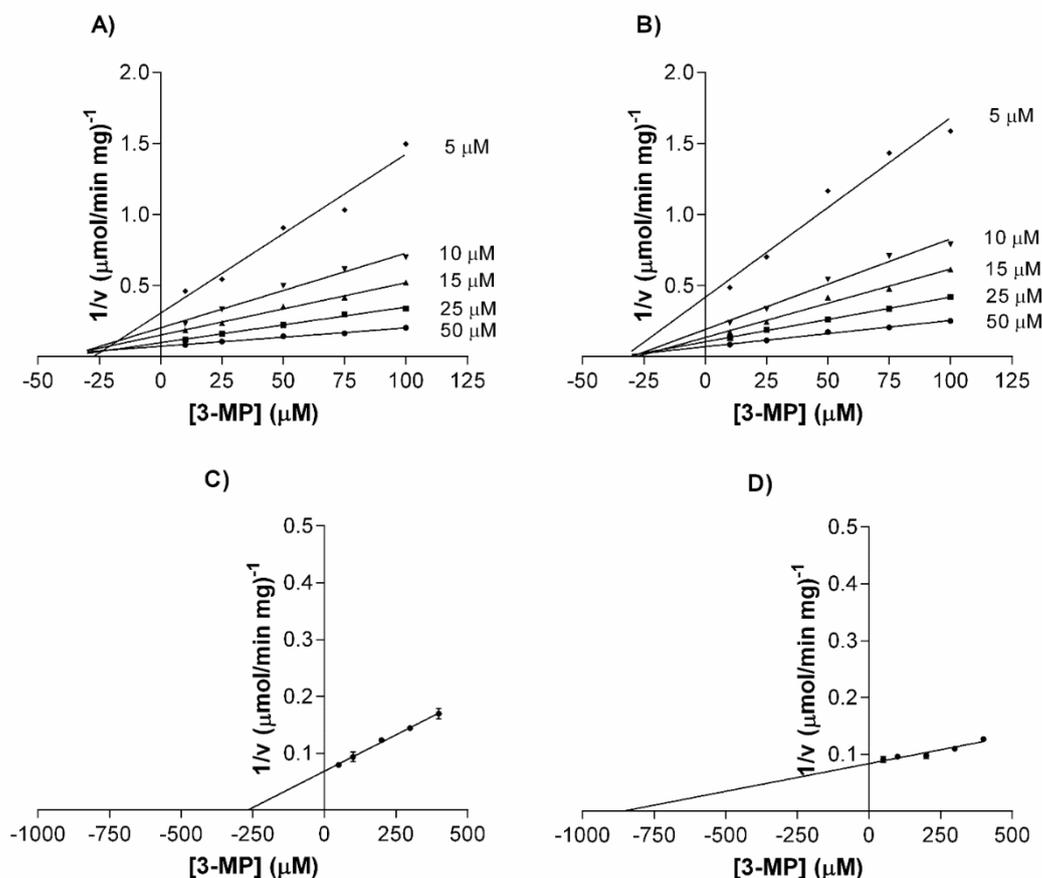


Fig. 3.5. Representación de Dixon de la inhibición con 3-MP añadiendo OAA o GTP como sustrato variable. (A) Representación de Dixon de p.139Met añadiendo OAA. (B) Representación de Dixon de p.139Leu añadiendo OAA. (C) Representación de Dixon de p.139Met a saturación de GTP. (D) Representación de Dixon de p.139Leu a saturación de GTP.

Los valores de K_i y αK_i para la inhibición de 3-MP sobre p.139Met y p.139Leu se describen en la Tabla 3.1. En la reacción de síntesis de OAA no se encontraron diferencias significativas entre ambas isoenzimas para ningún sustrato (PEP y GDP). Los valores de K_i con el PEP como sustrato variable fueron de $16 \pm 2 \mu\text{M}$ y $19 \pm 4 \mu\text{M}$ y los de αK_i fueron $20 \pm 4 \mu\text{M}$ y $31 \pm 5 \mu\text{M}$ para 139Met y 139Leu, respectivamente. Usando el GDP como sustrato variable, los valores de K_i fueron $45 \pm 3 \mu\text{M}$ y $45 \pm 0,8 \mu\text{M}$. En la reacción de síntesis de PEP se encuentran diferencias significativas entre ambos en la K_i para el OAA ($18 \pm 4 \mu\text{M}$ y $29 \pm 1 \mu\text{M}$; $p < 0,05$) y sobre todo en el valor K_i para el GTP ($273 \pm 68 \mu\text{M}$ y $873 \pm 144 \mu\text{M}$; $p < 0,01$). No se encuentran diferencias significativas entre p.139Met y p.139Leu en la αK_i usando OAA como sustrato variable ($49 \pm 18 \mu\text{M}$ y $21 \pm$

13 μM , respectivamente). El que las mayores diferencias se observen en el GTP coincide con los datos obtenidos en Latorre *et al.* (2016), en los cuales la sustitución Met139Leu afecta sobre todo al sitio de unión del GTP al enzima.

	PEP			GDP		OAA			GTP	
	K _i (μM)	αK_i (μM)	Patrón de inhibición	K _i (μM)	Patrón de inhibición	K _i (μM)	αK_i (μM)	Patrón de inhibición	K _i (μM)	Patrón de inhibición
139Met	16 \pm 2	20 \pm 4	NC mixto	45 \pm 3	Acompetitivo	18 \pm 4	49 \pm 18	NC mixto	273 \pm 68	Acompetitivo
139Leu	19 \pm 4 <i>ns</i>	31 \pm 5 <i>ns</i>	NC mixto	45 \pm 0,8 <i>ns</i>	Acompetitivo	29 \pm 1 *	21 \pm 13 <i>ns</i>	NC mixto	873 \pm 144 **	Acompetitivo

Tabla 3.1. Valores de K_i, αK_i y patrones de inhibición de PEPCK-C p.139Met y p.139Leu en presencia de 3-MP. Los valores corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes. Las diferencias entre p.139Met y p.139Leu se calcularon usando un test-*t* de dos muestras, donde *ns*: no significativo, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. NC: No competitivo.

3.2. Búsqueda de efectores de la PEPCK-C

La búsqueda de efectores para un enzima puede basarse en varios principios, como la búsqueda de análogos de los sustratos o el diseño de compuestos basándose en la estructura 3D de la proteína (Lyne, 2002). Sin embargo con esta estrategia se encuentran sobre todo inhibidores. Otra estrategia muy utilizada es el uso de grandes librerías de compuestos químicos o quimiotecas con los que ensayar *in silico* o *in vitro* si algún compuesto de la librería se une a la proteína estudiada (Shoichet, 2004; Vedadi *et al.*, 2006). En nuestro caso, la búsqueda de efectores de la PEPCK-C se realizó mediante ensayos *in vitro* sobre una librería química de 10.000 compuestos (HitFinder, Maybridge).

En primer lugar se ensayaron los compuestos de 5 en 5 para descartar a la mayoría que no son capaces de unirse a la proteína. El ensayo consistió en medir la fluorescencia de un compuesto (ANS) que se une a las zonas hidrofóbicas de la proteína conforme la proteína se va desplegando por el aumento gradual de la temperatura. La unión de un

compuesto a la proteína modificará el patrón de desplegamiento y eso se podrá apreciar en las gráficas de desnaturalización y en la temperatura de desnaturalización (T_m). Se consideró a un pocillo positivo cuando la T_m estaba muy desplazada (unos 8°C) respecto de los controles, para evitar la aparición de falsos positivos y para asegurar una unión fuerte del efector a la PEPCK-C.

En la primera ronda de ensayos, añadiendo los compuestos de 5 en 5 a los pocillos, se obtuvieron 7 pocillos positivos. Sus T_m fueron $55,5 \pm 0,1$; $56,4 \pm 0,3$; $48,1 \pm 0,1$; $53,9 \pm 0,2$; $56,9 \pm 0,2$; $53,0 \pm 0,3$ y $52,6 \pm 0,1^\circ\text{C}$, todos ellos muy por encima de los valores de T_m de los controles ($41,8 \pm 0,1^\circ\text{C}$). Los 35 compuestos de los 7 pocillos positivos se analizaron de nuevo pero esta vez individualmente, obteniéndose finalmente dos compuestos positivos con unas T_m de $50,9 \pm 0,1$ y $50,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (Fig. 3.6). La ausencia de compuestos positivos individualmente cuando los pocillos habían dado positivo de 5 en 5 puede deberse a que había algún tipo de sinergia entre los compuestos o a que eran falsos positivos.

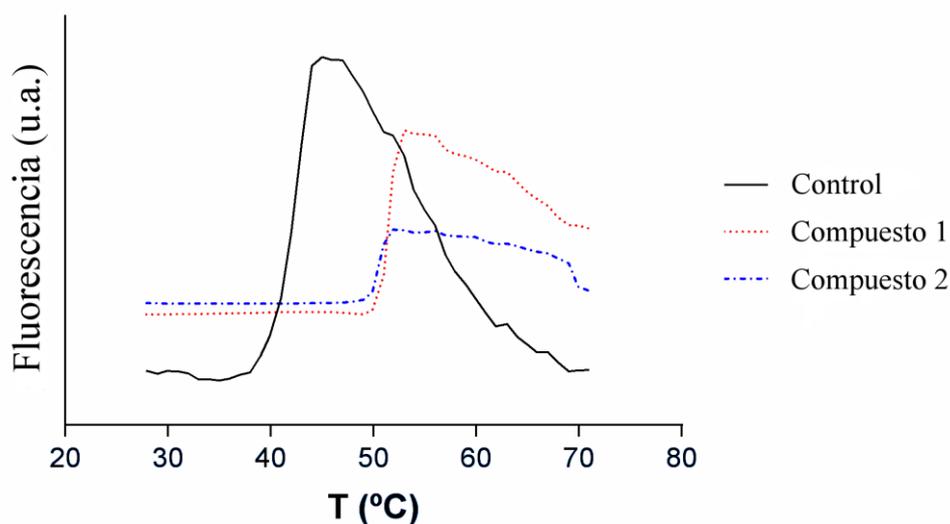


Fig. 3.6. Desplegado térmico de la PEPCK-C en presencia y ausencia de compuesto 1 y 2.

Los compuestos positivos fueron el N1-ciclohexyl-2-{1-[4-methyl-2-(2-thienyl)-1,3-thiazol-5-yl]ethylidene}hydrazine-1-carbothiamide, o compuesto 1, y el N'1-({5-[1-methyl-5-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2-thienyl}methylidene)-2,4-dichlorobenzene-1-carbohydrazide, o compuesto 2 (Fig. 3.7). Tras descubrir mediante la

búsqueda en la quimioteca los compuestos 1 y 2 como potenciales efectores de la PEPCK-C se realizó un estudio de su efecto sobre la actividad de la enzima.

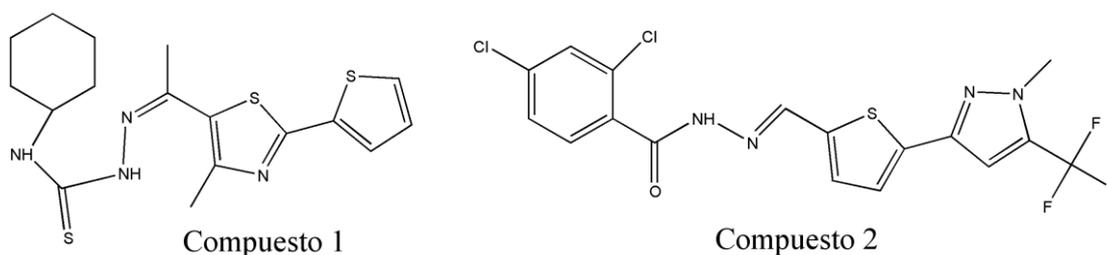


Fig. 3.7. Estructura química de los compuestos 1 y 2.

Ambos compuestos se caracterizan por tener varios anillos heterocíclicos, grupos en común como el tiofeno y un gran tamaño (alrededor de 400 g/mol). El compuesto 2 además tiene varios grupos halogenados, los cuales suelen ser bastante reactivos. El compuesto 1 posee un color amarillo intenso que se mantiene también en solución acuosa.

3.3. Estudio del efecto de los compuestos 1 y 2

3.3.1. Compuesto 1

Para una primera aproximación del potencial como efector del compuesto 1 se obtuvo en primer lugar el valor de IC_{50} (Fig. 3.8).

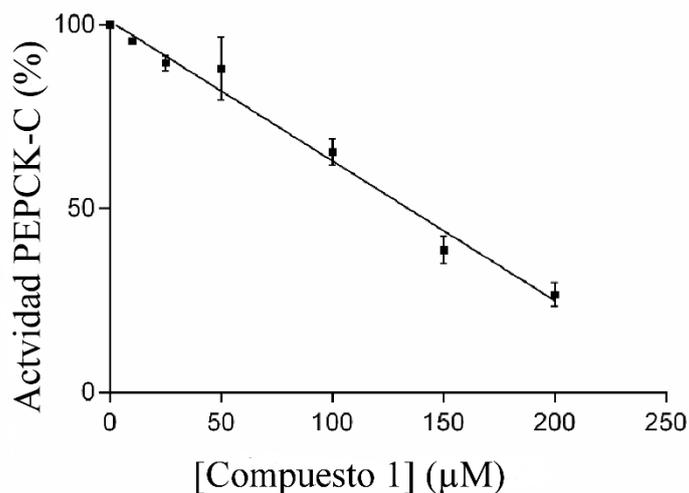


Fig. 3.8 Determinación del IC₅₀ del compuesto 1. Los datos son la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes. Los datos se ajustaron a una ecuación lineal con el software Graphpad Prism 6.

El valor de IC₅₀ para el compuesto 1 fue de $134 \pm 4 \mu\text{M}$. No se pudo llegar a valores de inhibición más bajos al realizar la determinación del IC₅₀ debido a que el compuesto 1 precipitaba en solución acuosa cuando se encontraba a concentraciones superiores a $250 \mu\text{M}$ debido a su baja solubilidad. El valor de IC₅₀ es bastante más alto que el obtenido para el 3-MP ($65 \pm 6 \mu\text{M}$), lo cual indica que en principio el compuesto 1 es peor inhibidor que el inhibidor de referencia. Además de los problemas de solubilidad referidos, al estudiar si este compuesto afectaba a las enzimas auxiliares (piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa) usadas en el ensayo de actividad de la PEPCK-C se observó que las inhibía también ligeramente, lo cual indica que este compuesto no tiene sólo especificidad por la PEPCK-C si no que se podría unir a más proteínas. El problema de la unión del inhibidor con las enzimas auxiliares se solventó añadiendo 4 veces más cantidad de enzimas auxiliares a los ensayos para evitar que su posible inhibición afectara a los ensayos de actividad enzimática.

Debido a los problemas de solubilidad y a los de especificidad mostrados por el compuesto 1 se decidió realizar un estudio de inhibición menos completo que el realizado para el 3-MP, estudiando como una concentración similar al IC₅₀ del inhibidor ($100 \mu\text{M}$) modificaba los valores de K_m y V_{max} de la PEPCK-C p.139Met y p.139Leu en el sentido de la reacción que produce gliceroneogénesis (reacción de síntesis de PEP) (Fig. 3.9).

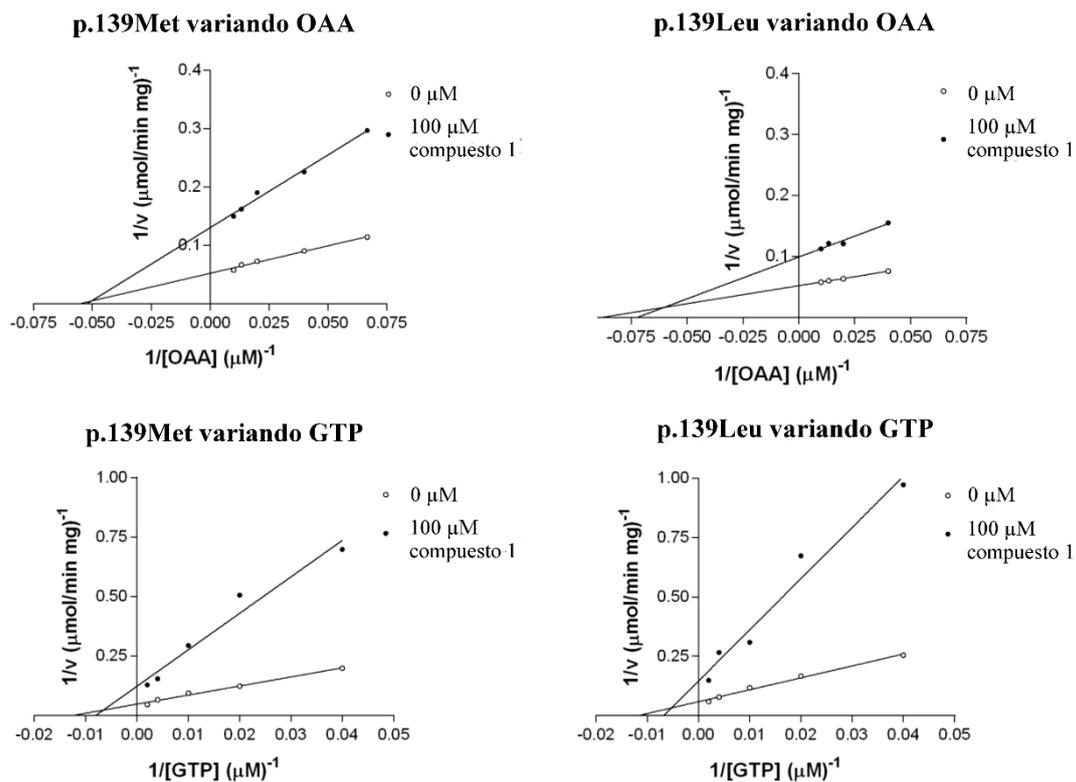


Fig. 3.9. Representaciones de dobles recíprocos de la inhibición con el compuesto 1 variando OAA y GTP. Los datos son una muestra representativa de tres experimentos independientes.

Los datos de la inhibición del compuesto 1 frente a p.139Met y p.139Leu se muestran en la tabla 3.2. Cuando se usa tanto el OAA como el GTP como sustratos variables se observa un descenso importante en la V_{\max} pero no se observan cambios en el valor de K_m , lo cual permite clasificar al compuesto 1 como un inhibidor no competitivo puro. Al comparar la inhibición entre ambas isoenzimas no se observa ninguna diferencia significativa entre los valores de V_{\max} y de K_m .

Los valores de V_{\max} usando el OAA como sustrato variable descienden de $21,3 \pm 3,7$ a $6,7 \pm 1,4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para el p.139Met y de $21,8 \pm 1,8$ a $9,4 \pm 1,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para el p.139Leu. Los valores de K_m usando el OAA son de $22 \pm 14 \mu\text{M}$ sin compuesto 1 y $13 \pm 5 \mu\text{M}$ con $100 \mu\text{M}$ de compuesto 1 para el p.139Met y para el p.139Leu son de $14 \pm 4 \mu\text{M}$ sin compuesto 1 y $11 \pm 3 \mu\text{M}$ con $100 \mu\text{M}$ de compuesto 1. Usando GTP como sustrato variable, los valores de V_{\max} descienden de $20,0 \pm 1,9$ a $7,8 \pm 0,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para el p.139Met y de $22,5 \pm 4,2$ a $7,2 \pm 0,4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para el p.139Leu. Los

valores de K_m usando el GTP como sustrato variable son de $96 \pm 15 \mu\text{M}$ sin compuesto 1 y $118 \pm 14 \mu\text{M}$ con $100 \mu\text{M}$ de compuesto 1 para el p.139Met y de son de $99 \pm 14 \mu\text{M}$ sin compuesto 1 y $155 \pm 30 \mu\text{M}$ con $100 \mu\text{M}$ de compuesto 1 para el p.139Leu.

	[Compuesto 1] (μM)	OAA		GTP	
		V_{\max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (μM)	V_{\max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (μM)
139Met	0 μM	$21,3 \pm 3,7$	22 ± 14	$20,0 \pm 1,9$	96 ± 15
139Met	100 μM	$6,7 \pm 1,4$	13 ± 5	$7,8 \pm 0,5$	118 ± 14
139Leu	0 μM	$21,8 \pm 1,8$ <i>ns</i>	14 ± 4 <i>ns</i>	$22,5 \pm 4,2$ <i>ns</i>	99 ± 14 <i>ns</i>
139Leu	100 μM	$9,4 \pm 1,3$ <i>ns</i>	11 ± 3 <i>ns</i>	$7,2 \pm 0,4$ <i>ns</i>	155 ± 30 <i>ns</i>

Tabla 3.2. Valores de V_{\max} y K_m de PEPCK-C p.139Met y p.139Leu en presencia de OAA, GTP y compuesto 1. Los valores dados son la media \pm DE de tres experimentos independientes. Las diferencias en V_{\max} y K_m entre las isoenzimas se calcularon usando un test-*t* de dos muestras. *ns*: no significativo.

3.3.2. Compuesto 2

El valor de IC_{50} obtenido para el compuesto 2 fue de $30 \pm 2 \mu\text{M}$ (Fig. 3.10). Este valor es bastante más bajo que el obtenido para el 3-MP ($65 \pm 6 \mu\text{M}$), por lo que el compuesto 2 podría ser un mejor inhibidor que el 3-MP y que el compuesto 1.

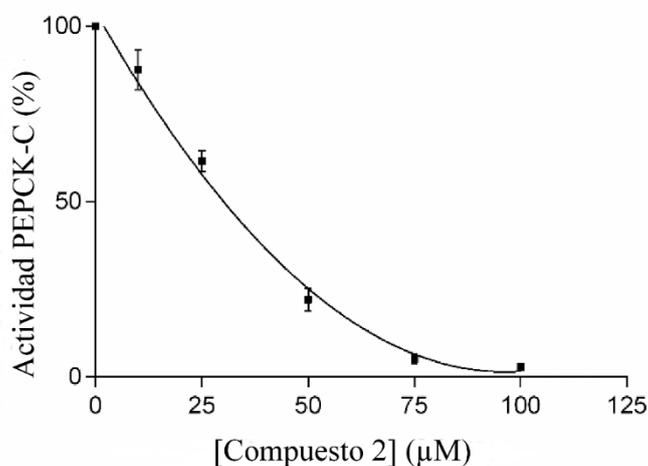


Fig. 3.10 Determinación del IC₅₀ del compuesto 2. Los datos son la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes. Los datos se ajustaron a una ecuación cuadrática con el software Graphpad Prism 6.

Sin embargo, el compuesto 2 a pesar de ser mejor inhibidor sigue teniendo los mismos problemas que el compuesto 1. En fase acuosa, a concentraciones superiores a 250 μM , el compuesto 2 precipita. Sin embargo, esto tiene menor importancia en los ensayos *in vitro* ya que su IC₅₀ está bastante alejado de ese valor. Cuando se analiza su unión a las enzimas auxiliares también se observa que las inhibe ligeramente, por lo que su especificidad no sería total para la PEPCK-C. Sabiendo esto, se realizó el mismo tipo de estudios de inhibición que los realizados con el compuesto 1 (Fig. 3.11).

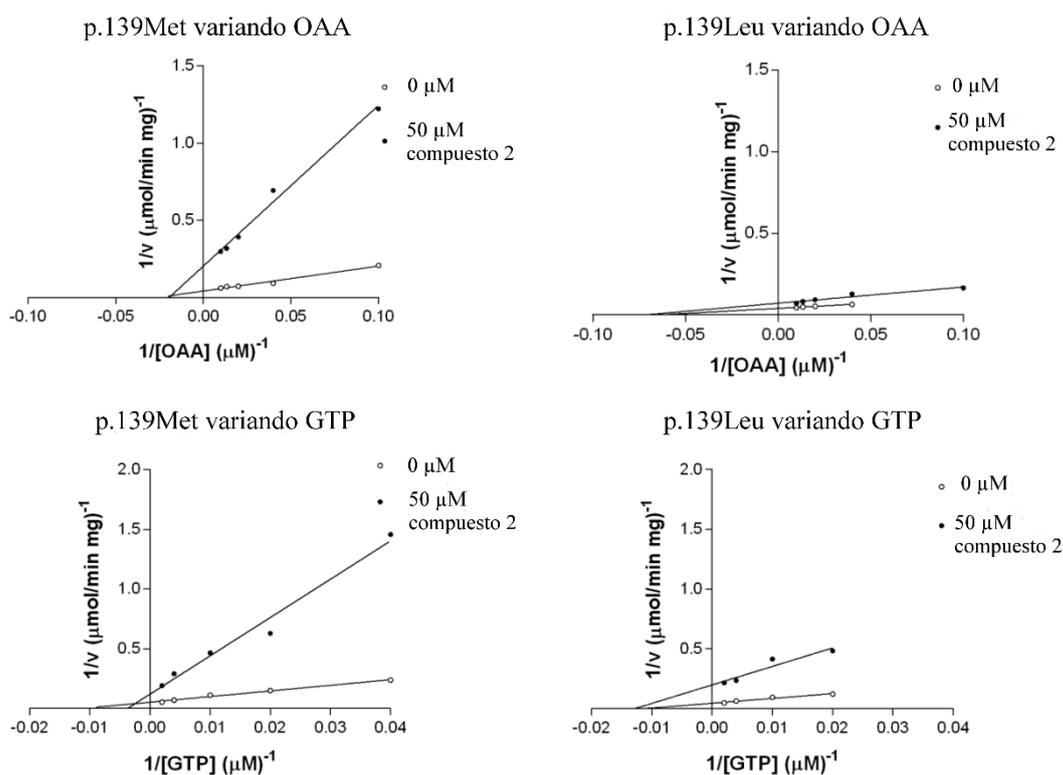


Fig. 3.11. Representaciones de dobles recíprocos de la inhibición con el compuesto 2 variando OAA y GTP. Los datos son una muestra representativa de tres experimentos independientes.

Los datos de la inhibición del compuesto 2 frente a p.139Met y p.139Leu se muestran en la tabla 3.3. Cuando se usa tanto el OAA como el GTP como sustratos variables se observan cambios importantes tanto en los valores de V_{max} como en los de K_m , por lo que el compuesto 2 se podría clasificar como un inhibidor no competitivo mixto. En el caso del compuesto 2, sí que se observan diferencias significativas entre isoenzimas. Usando el OAA como sustrato variable, la V_{max} desciende significativamente de aproximadamente $21 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ sin inhibidor a $4,6 \pm 1,4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ en el caso de la p.139Met y a $12,7 \pm 1,1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ en el caso de la p.139Leu, en presencia de $50 \mu\text{M}$ de compuesto 2. Sin embargo, los valores de K_m en presencia de OAA no son diferentes significativamente entre isoenzimas. En cuanto al GTP, los valores de V_{max} no son diferentes significativamente pero los valores de K_m sí que lo son ($276 \pm 37 \mu\text{M}$ para la p.139Met y $69 \pm 10 \mu\text{M}$ para la p.139Leu).

El que las mayores diferencias entre isoenzimas, tanto con el uso del 3-MP como con el uso del compuesto 2, se encuentren en cuando se usa el GTP parecen apuntar en la misma dirección que los datos obtenidos por Latorre *et al.* (2016), es decir, que la mutación Met139Leu afecta de alguna forma al sitio de unión del GTP en la proteína. En próximos apartados se describirán más pruebas que apuntan en la misma dirección.

	[Compuesto 2] (μM)	OAA		GTP	
		V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (μM)
139Met	0 μM	$21,3 \pm 3,7$	22 ± 14	$20,0 \pm 1,9$	96 ± 15
139Met	50 μM	$4,6 \pm 1,4$	32 ± 19	$5,9 \pm 2,3$	276 ± 37
139Leu	0 μM	$21,8 \pm 1,8$ ns	14 ± 4 ns	$22,5 \pm 4,2$ ns	99 ± 14 ns
139Leu	50 μM	$12,7 \pm 1,1$ **	12 ± 4 ns	$6,1 \pm 1,0$ ns	69 ± 10 ***

Tabla 3.3. Valores de V_{max} y K_m de PEPCK-C p.139Met y p.139Leu en presencia de OAA, GTP y compuesto 2. Los valores dados son la media \pm DE de tres experimentos independientes. Las diferencias en V_{max} y K_m entre las isoenzimas se calcularon usando un test-*t* de dos muestras. ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.4. Estudio de la unión de los inhibidores a las isoenzimas de PEPCK-C mediante métodos físico-químicos

3.4.1 Dicroísmo circular

El dicroísmo circular (CD) es un método espectroscópico que permite el estudio de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas mediante la medida de la absorción diferencial de los dos componentes de la luz polarizada plana (Kelly, Jess y Price, 2005). El CD se puede dividir, dependiendo de la longitud de onda UV empleada, en lejano y cercano. El CD lejano se utiliza para elucidar la estructura secundaria de las proteínas y el cercano para la estructura terciaria. El espectro de CD cercano se produce debido a la contribución de los residuos aromáticos (Phe, Tyr y Trp) en ambientes asimétricos, lo cual es característico de la conformación de la proteína (Vuilleumier *et al.*, 1993). El espectro de CD cercano es especialmente sensible a pequeños cambios en los alrededores de los residuos aromáticos, por lo que es muy útil para estudiar los cambios físicos en la estructura de la proteína que se producen al unirse un inhibidor a ella. Por tanto, las modificaciones en el espectro de CD cercano al añadir un inhibidor indican que se produce una unión. Sin embargo, que no se produzca modificación del espectro no quiere decir obligatoriamente que no se produzca unión del inhibidor a la proteína, ya que la unión del inhibidor puede ocurrir en una zona de la proteína que no tenga residuos aromáticos. Para comprobar que tanto el inhibidor conocido 3-MP como los inhibidores que habíamos descubierto, compuesto 1 y compuesto 2, se unen a los isoenzimas de PEPCK-C se realizó un estudio del espectro de CD cercano en presencia y ausencia de 3-MP y los compuestos 1 y 2 (Fig. 3.12).

La adición del 3-MP y del compuesto 2 modifican el espectro de CD cercano al unirse a ambas isoenzimas (Fig. 3.12 A-B y E-F). Sin embargo, no se detecta modificación del espectro de CD cercano cuando se añade el compuesto 1, a una concentración de 50 o de 150 μM (Fig. 3.12 C-D). La falta de modificación del espectro de CD por el compuesto 1 podría indicar que su unión a la enzima es mucho más débil que la mostrada por el 3-MP y el compuesto 2, lo que concuerda con su menor capacidad inhibitoria.

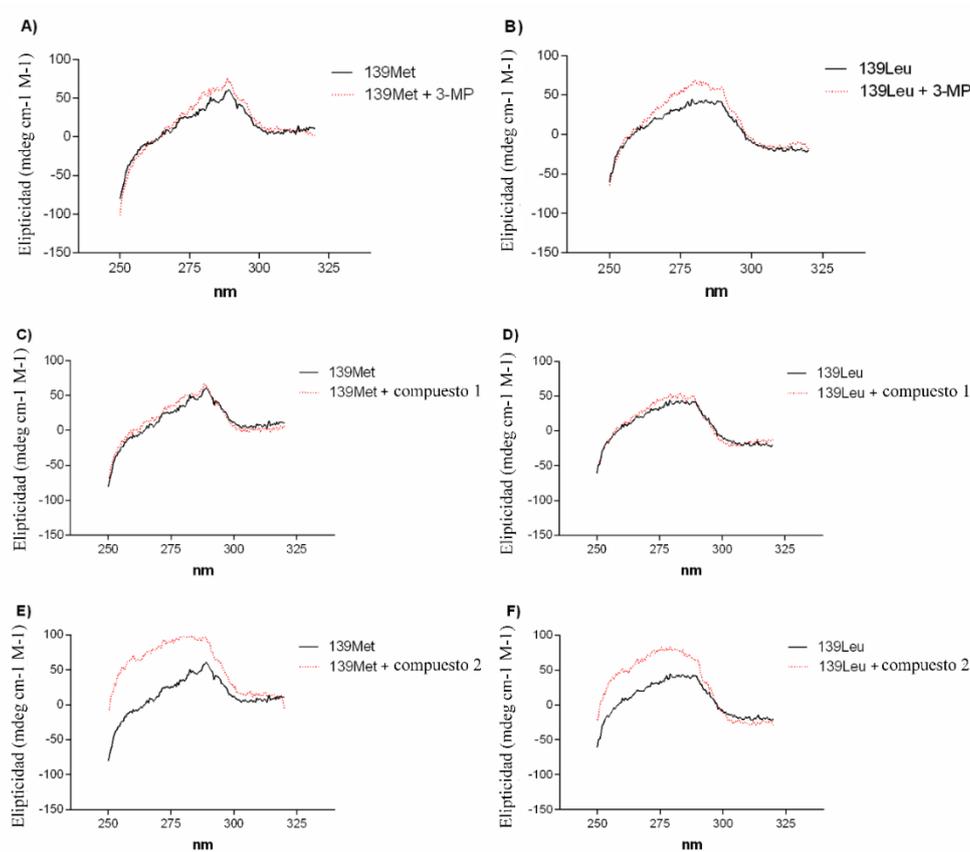


Fig. 3.12. Gráficos de espectros de CD cercano de las isoenzimas de PEPCK-C en presencia de 3-MP (A-B), compuesto 1 (C-D) y compuesto 2 (E-F).

3.4.2 Calorimetría isoterma de titulación

La calorimetría isoterma de titulación (ITC) es un método físico-químico utilizado para determinar los parámetros termodinámicos de una interacción entre proteína e inhibidor. Los experimentos de ITC, en presencia o en ausencia de nucleótidos, se realizaron para probar que la sustitución Met139Leu y la unión de los inhibidores afectan al sitio de unión de los nucleótidos y además cuantificar la intensidad de la unión del inhibidor. Las gráficas de los ITC se pueden observar en la Fig. 3.13.

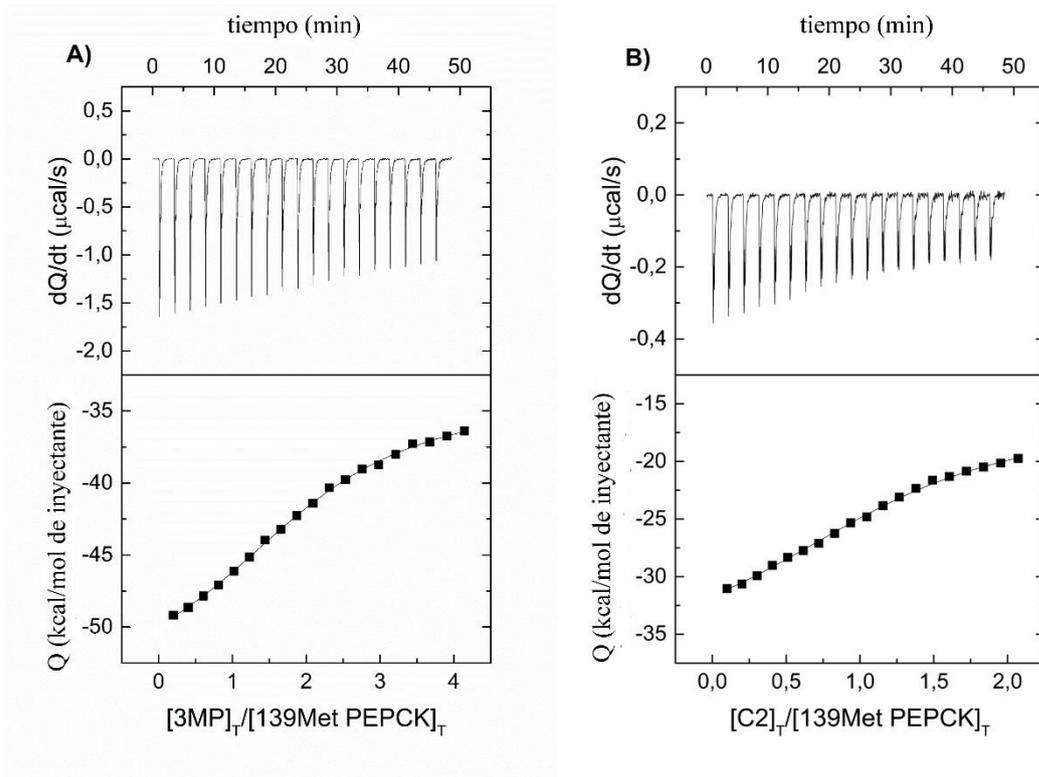


Fig. 3.13. Gráficos de las mediciones de ITC con 3-MP (A) y compuesto 2 (B). La parte superior de cada gráfico muestra el termograma después de la corrección de la línea base. La parte inferior de cada gráfico muestra la isoterma de unión ajustada al modelo de un solo sitio de unión.

Los resultados de los ITC se encuentran en la tabla 3.4. La constante de disociación (K_d) describe la afinidad entre una proteína y su ligando. En todos los experimentos, la sustitución Met139Leu reduce la afinidad por los inhibidores (aumenta el valor de K_d). En el caso del 3-MP, los valores de K_d son $7,2 \mu\text{M}$ para la p.139Met y $12 \mu\text{M}$ para la p.139Leu, mientras que en el caso del compuesto 2 los valores de K_d son $4,4 \mu\text{M}$ y $9,8 \mu\text{M}$, respectivamente. Las K_d del compuesto 2 son más bajas que las obtenidas con el 3-MP, lo que indica que la afinidad del compuesto 2 por la proteína es mayor que la afinidad del 3-MP. La adición de GTP en todos los casos aumenta los valores de K_d . Además se pueden observar diferencias entre ambos isoenzimas ya que la K_d del 3-MP en presencia de GTP es mucho más alta para la p.139Leu ($39 \mu\text{M}$) que para la p.139Met ($19 \mu\text{M}$).

La entalpía (ΔH) describe el calor intercambiado en una reacción. Los valores de ΔH obtenidos en presencia o ausencia de los inhibidores y de GTP siguen el mismo patrón de diferencias que se podía observar con los valores de K_d . La entalpía negativa que se

observa en todos los experimentos indica que las uniones del 3-MP y del compuesto 2 están favorecidas entálpicamente.

El parámetro estequiométrico (n) describe la cantidad de moléculas de inhibidor que se unen a la proteína. El valor n del 3-MP en todos los experimentos es de 2, lo cual concuerda con los dos sitios de unión de 3-MP que describen Balan *et al.* (2015) al cristalizar la PEPCK-C de rata en presencia de 3-MP. El valor n del compuesto 2 en todos los experimentos es de 1, lo cual quiere decir que el compuesto 2 tiene un solo sitio de unión a la PEPCK-C.

Isoenzima	Inhibidor	Nucleótido	K_d (μM)	ΔH (kcal/mol)	n
139Met	3-MP	-GTP	7,2	-20,4	2,0
	3-MP	+GTP	19	-31,8	2,1
	C2	-GTP	4,4	-20,5	1,2
	C2	+GTP	19	-26,6	1,1
139Leu	3-MP	-GTP	12	-32,6	2,1
	3-MP	+GTP	39	-58,2	2,1
	C2	-GTP	9,8	-16,7	1,2
	C2	+GTP	14	-13,9	1,2

Tabla 3.4. Parámetros termodinámicos obtenidos mediante experimentos de ITC con 3-MP y compuesto 2. K_d es la constante de disociación, ΔH es la entalpía y n es el parámetro estequiométrico. El error relativo en las K_d es del 20%. El error absoluto en ΔH es de 0,6 kcal/mol. El error absoluto en n es 0,1.

3.4.3 Docking

Dado que, como ya se ha comentado, no fue posible cristalizar la PEPCK-C porcina no se pudo determinar el sitio de unión los compuestos 1 y 2 mediante cristalización. Es por ello que se decidió realizar experimentos de docking. El docking es un método *in silico* usado para simular el sitio de unión de un efector a una proteína.

El docking del compuesto 1 se muestra en la figura 3.14. El análisis computacional se realizó por duplicado de forma independiente y en ambos se obtuvo como más probable el mismo sitio de unión, con una energía de unión de -7,6 kcal/mol. El sitio de unión del

compuesto 1 se encuentra en la superficie de la proteína, bastante alejado del centro activo (Fig. 3.14 A), lo cual concuerda con el tipo de inhibición no competitiva pura que produce el compuesto 1. El compuesto 1 se une a un bolsillo en la superficie de la proteína que es bastante hidrofílico, aunque hay una zona hidrófoba que rodea al ciclohexano de uno de los extremos de la molécula, el cual también es hidrofóbico (Fig 3.14 B). Los detalles del sitio de unión del compuesto 1 se pueden ver en la Fig. 3.14 C. El compuesto 1 comparte un puente de hidrógeno con la molécula de la PEPCK-C. El azufre del grupo tiofeno del compuesto 1 establece un puente de hidrógeno con el nitrógeno del grupo amino del aminoácido S179 con una distancia de 2,8 Å. La zona mayoritariamente hidrofílica alrededor del compuesto 1 la forman los aminoácidos S411, R175, S179, T178 y E50, los cuales son todos polares. En la zona hidrofóbica alrededor del grupo ciclohexano del compuesto 1 y en la zona cercana al grupo tiazol del compuesto 1 se encuentran los aminoácidos I172, P409 y L149, los cuales son apolares. Los aminoácidos E50 y L149 presentan un cierto grado de flexibilidad en sus cadenas laterales.

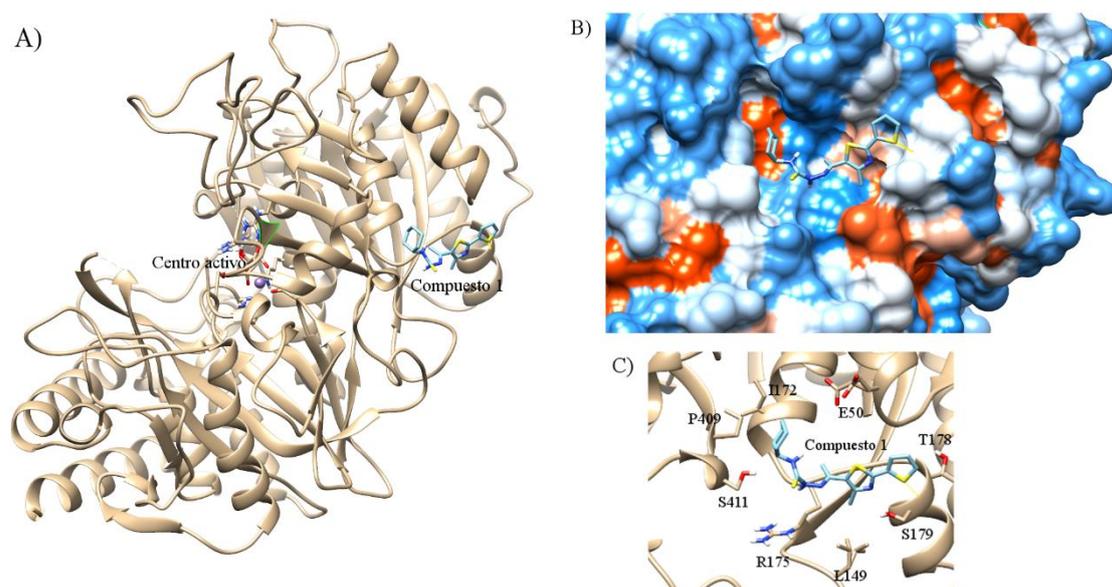


Fig. 3.14. Docking del compuesto 1 con la PEPCK-C. La estructura de la PEPCK-C empleada fue la de rata (pdb: 2QF1). El docking se realizó con el programa Autodock Vina (Trott y Olson, 2010) y los resultados se analizaron con el programa USCF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). En los residuos y en las moléculas del compuesto 1 el color azul oscuro simboliza el nitrógeno, el azul claro el carbono, el amarillo el azufre, el blanco el hidrógeno y el rojo el oxígeno. A) Localización de la unión del compuesto 1 y el centro

activo en relación al total de la estructura de PEPCK-C. B) Hidrofobicidad de los aminoácidos localizados en el sitio de unión del compuesto 1. Los colores utilizados son una gradación donde azul oscuro simboliza muy hidrófilo, blanco simboliza neutro y rojo intenso simboliza muy hidrófobo. C) Detalle del sitio de unión del compuesto 1. El puente de hidrógeno entre el azufre del grupo tiofeno y el grupo amino del aminoácido S179 se simboliza mediante una raya amarilla.

El docking del compuesto 2 se puede observar en la Fig. 3.15. El análisis de docking realizado por duplicado dio como resultado más probable un mismo sitio de unión para el compuesto 2 con una energía de unión de -7 kcal/mol. El sitio de unión del compuesto 2 se encuentra cercano al centro activo pero sin llegar a competir con los sustratos por el mismo (Fig. 3.15 A). Esto concuerda con el tipo de unión no competitiva mixta observada en los ensayos enzimáticos *in vitro*. El compuesto 2 se encuentra introducido verticalmente en una cavidad dentro de la molécula de PEPCK-C. La mitad del compuesto 2 (la parte que tiene el radical trifluoruro en un extremo) se encuentra en el interior de la cavidad mayoritariamente hidrofóbica mientras que la otra mitad (la parte que tiene el radical *m*-diclorobenceno en un extremo) se encuentra fuera de la cavidad rodeada de zonas hidrofílicas (Fig. 3.15 B). La cavidad donde se introduce el compuesto 2 se encuentra cercana a la cavidad por la que se introducen los sustratos al centro activo. Los detalles del sitio de unión del compuesto 2 se pueden observar en la Fig. 3.15 D. El compuesto 2 comparte dos puentes de hidrógeno con la molécula de PEPCK-C. El grupo tiofeno central del compuesto 2 comparte un puente de hidrógeno con el grupo amino del aminoácido G114 con una distancia de 3 Å. Esta unión es la misma que se podía observar para el compuesto 1. El otro puente de hidrógeno se establece entre el grupo -NH del compuesto 2 situado cerca del radical *m*-diclorobenceno y el oxígeno de la cadena lateral del aminoácido Q110 con una distancia de 2,3 Å. En la parte exterior de la cavidad donde se une el compuesto 2, de carácter hidrofílico, se pueden encontrar aminoácidos hidrofílicos como E89, S90, T92, Q110, Q112 o R115. En la parte interior de la cavidad, de carácter más hidrófobo se puede encontrar a los aminoácidos L113, P484, F485 y F486.

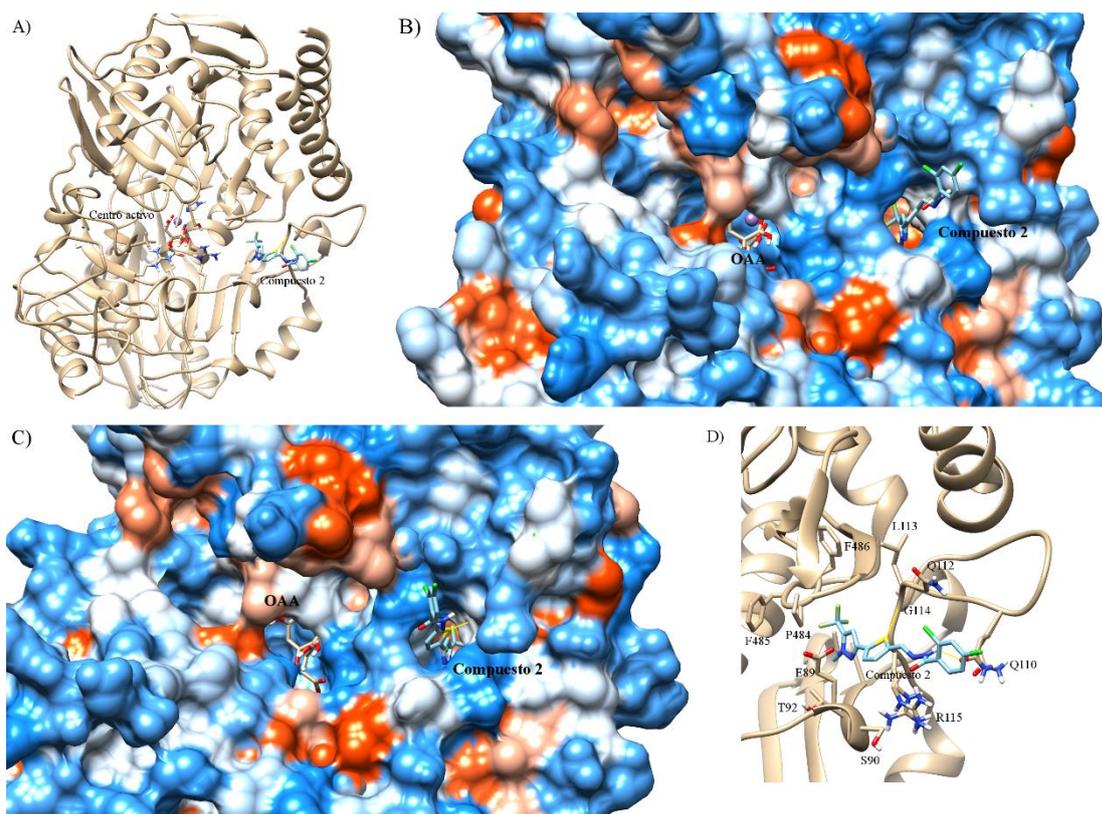


Fig. 3.15. Docking del compuesto 2 con la PEPCK-C. La estructura de la PEPCK-C empleada fue la de rata (pdb: 2QF1). El docking se realizó con el programa Autodock Vina (Trott y Olson, 2010) y los resultados se analizaron con el programa USCF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). En los residuos y en las moléculas del compuesto 2 el color azul oscuro simboliza el nitrógeno, el azul claro el carbono, el amarillo el azufre, el blanco el hidrógeno y el rojo el oxígeno. A) Localización de la unión del compuesto 2 y el centro activo en relación al total de la estructura de PEPCK-C. B-C) Hidrofobicidad de los aminoácidos localizados en el sitio de unión del compuesto 2. Los colores utilizados son una gradación donde azul oscuro simboliza muy hidrófilo, blanco simboliza neutro y rojo intenso simboliza muy hidrófobo. D) Detalle del sitio de unión del compuesto 2. Los puentes de hidrógeno entre el azufre del grupo tiofeno y el grupo amino del aminoácido G114 y entre el grupo -NH central del compuesto 2 y el oxígeno de la cadena lateral del aminoácido Q110 se simbolizan mediante una raya amarilla.

IV. Mutantes de PEPCK-C con la actividad cataplerótica o la anaplerótica inhibida

La cataplerosis es el proceso metabólico mediante el cual se retiran fuera del ciclo del ácido cítrico sus intermediarios para ser utilizados en procesos de síntesis de nuevas moléculas. La anaplerosis es el proceso opuesto a la cataplerosis, es decir, la introducción de intermediarios en el ciclo del ácido cítrico para que pueda funcionar con normalidad. Aunque el papel tradicional que se le ha atribuido a la PEPCK-C *in vitro* es el de transformar el OAA en PEP para cumplir así su papel gluconeogénico y cataplerótico, estudios recientes (Latorre *et al.*, 2018) muestran que la PEPCK-C puede jugar también un papel anaplerótico *in vivo* transformando el PEP en OAA, confirmando lo sugerido previamente por Hakimi *et al.* (2005, 2007). La tendencia a la anaplerosis se ha manifestado también en la especie porcina, en la cual la mutación p.139Leu favorece este proceso.

Estos trabajos resaltan el importante papel regulador de la PEPCK-C en el ganado porcino y se refuerzan con los hallazgos de W. Wang *et al.* (2013) y especialmente con el cerdo transgénico generado por Ren *et al.* (2017). Contar con herramientas reguladoras capaces modificar la reacción catalizada por la PEPCK-C en un sentido o en el otro puede ser de utilidad para el estudio de aquellos procesos, tanto fisiológicos como patológicos, en los que está implicada la PEPCK-C.

4.1. Generación de mutantes de la PEPCK-C porcina con disminución de la velocidad de un sentido de la reacción

La generación del mutante con la actividad de síntesis de PEP muy disminuida fue cuestión de puro azar. Cuando se intentaba reproducir por mutagénesis dirigida la isoforma 139Leu de la PEPCK-C porcina, una polimerasa que posiblemente estaba defectuosa introdujo cuatro mutaciones adicionales en la estructura primaria de la enzima, formando así la isoforma pentamutante (Latorre, 2013). La pentamutante posee las mutaciones V85A, F130L, M139L, G185R y K510R.

La mutación V85A está localizada en el bucle R en el centro activo de la proteína. Este bucle participa en la unión del sustrato y en la catálisis (Johnson y Holyoak, 2012) (Fig. 4.1 A). Las mutaciones F130L y M139L se encuentran alejadas del centro activo y próximas entre sí (Fig. 4.1 B). La mutación M139L, a pesar de estar alejada del centro

activo produce grandes cambios en la actividad enzimática asociadas a cambios fenotípicos en el cerdo (Latorre *et al.*, 2016). Las mutaciones G185R y K510R se encuentran en la superficie de la enzima, muy alejadas del centro activo (Fig. 4.1 C)

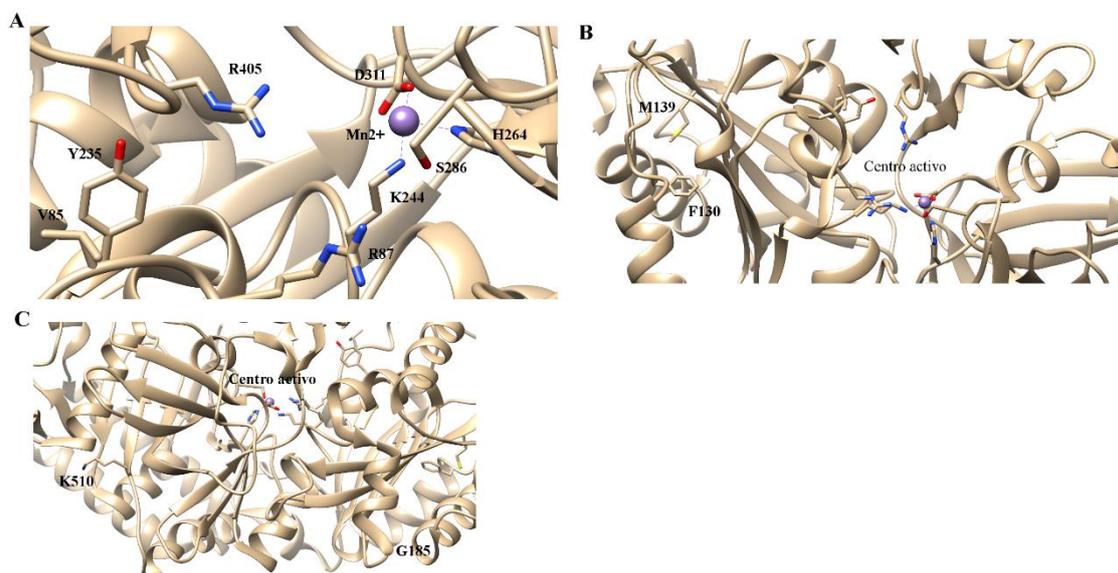


Fig. 4.1. Localización de las mutaciones de pentamutante y de p.Y235F. (A) Localización de V85 e Y235. (B) Localización de F130 y M139. (C) Localización de G185 y K510. Para construir estas imágenes se usó la estructura de la PEPCK-C de rata (PDB: 2QF1). Las imágenes se generaron usando el software UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

La generación del mutante con la actividad de síntesis de OAA reducida se realizó sin embargo mediante diseño racional. El aminoácido Y235, situado en el centro activo de la enzima (Fig. 4.1 A), facilita la reacción entre el PEP, GDP y CO₂ debido a que se forman puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la cadena lateral del aminoácido Y235 con el grupo carbonilo de la cadena lateral del aminoácido N403 y con el CO₂ (Fig. 1.8). Estos puentes de hidrógeno no se establecen en el proceso de síntesis de PEP porque el CO₂ sólo es sustrato en la reversa (Holyoak, Sullivan y Nowak, 2006; Dharmarajan *et al.*, 2008). Sabiendo esto, se decidió crear la mutación Y235F, ya que la fenilalanina no posee el grupo hidroxilo que sí posee la tirosina y por tanto no podrá establecer los puentes de hidrógeno con el aminoácido N403 y con el CO₂ que permiten la síntesis de OAA.

4.2. Análisis cinético de la PEPCK-C pentamutante y de p.Y235F

La PEPCK-C WT, la pentamutante (p.V85A-F130L-M139L-G185R-K510R) y la p.Y235F se expresaron en *Escherichia coli* BL21 y se purificaron como se describe en el apartado 2.5 para poder estudiar sus parámetros cinéticos variando los cinco sustratos que participan en la reacción (Fig 4.2).

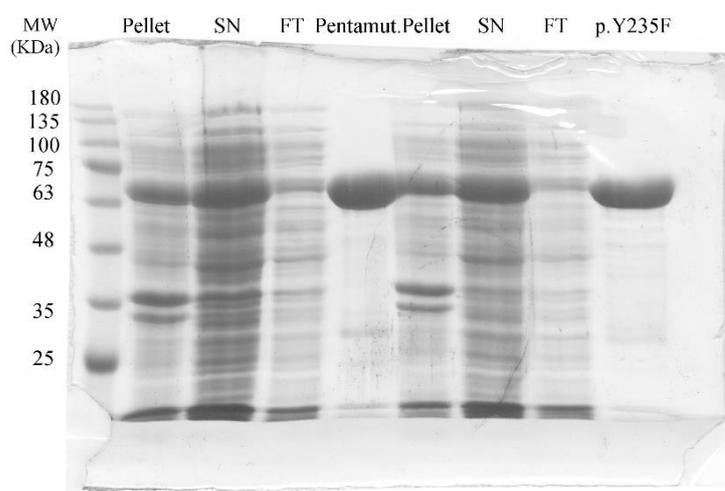


Fig. 4.2. Gel de SDS-PAGE de las purificaciones de PEPCK-C pentamutante y p.Y235F. En los carriles se encuentran los diferentes pasos de la purificación (ver apartado 2.5). En los carriles de “Pellet” se encuentran los restos celulares de bacterias que quedan tras la sonicación y posterior centrifugación a 40.000 xg. En los carriles “SN” se encuentran los sobrenadantes con las proteínas solubles que quedan tras la sonicación y posterior centrifugación a 40.000 xg. En los carriles “FT” se encuentran las proteínas que no se unen a la columna de cobalto. En los carriles de pentamutante y p.Y235F se encuentran las proteínas purificadas.

Los valores cinéticos de la PEPCK-C pentamutante y p.Y235F se pueden observar en la tabla 4.1.

Sustrato	K _m (μM)			k _{cat} (s ⁻¹)		
	WT	Pentamutante	p.Y235F	WT	Pentamutante	p.Y235F
PEP	240 ± 15	1091 ± 125***	24,8 ± 3,7***	6,8 ± 0,2	8,2 ± 0,3***	0,30 ± 0,01***
KHCO ₃	15560 ± 2163	11450 ± 1294*	4789 ± 816***	10,7 ± 0,5	8,9 ± 0,3**	0,64 ± 0,02***
GDP	27,4 ± 2,4	19,3 ± 1,6 <i>ns</i>	42,8 ± 6,5**	7,6 ± 0,2	5 ± 0,1***	0,75 ± 0,03***
OAA	13,1 ± 1,7	5,4 ± 0,6**	9,6 ± 1,5*	46 ± 1,8	6,9 ± 0,2***	20,1 ± 0,9***
GTP	45,9 ± 3,8	21,6 ± 3,9***	48,6 ± 4,3 <i>ns</i>	39 ± 1	5,9 ± 0,4***	16,1 ± 0,4***

Tabla 4.1. Parámetros cinéticos de PEPCK-C WT, de pentamutante y de p.Y235F.

Los datos de PEPCK-C WT han sido tomados de Latorre *et al.* (2016). Los valores de la tabla son la media de tres experimentos independientes ± desviación estándar. Las diferencias entre los valores fueron calculadas usando el test ANOVA de una vía seguido de un test de Tukey. *ns*: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

La PEPCK-C pentamutante tiene unos valores de k_{cat} significativamente más bajos (alrededor de un 85% más bajos) que los de la WT para los dos sustratos que participan en la síntesis del PEP (OAA y GTP). Los valores de K_m son también más bajos. Sin embargo, en la dirección de la síntesis de OAA, los valores de k_{cat} son ligeramente más bajos para el KHCO₃ y el GDP (17 y 34% más bajos, respectivamente) y más altos para el PEP (alrededor de un 17% más altos) (Fig. 4.3). Estos resultados muestran las diferencias entre las actividades que cataliza la pentamutante; mientras que la actividad de síntesis de OAA, o anaplerótica, se mantiene similar a la de WT, la actividad de síntesis de PEP, o cataplerótica, es significativamente más baja, produciendo así una enzima con una de sus actividades muy disminuida y la otra que funciona con normalidad.

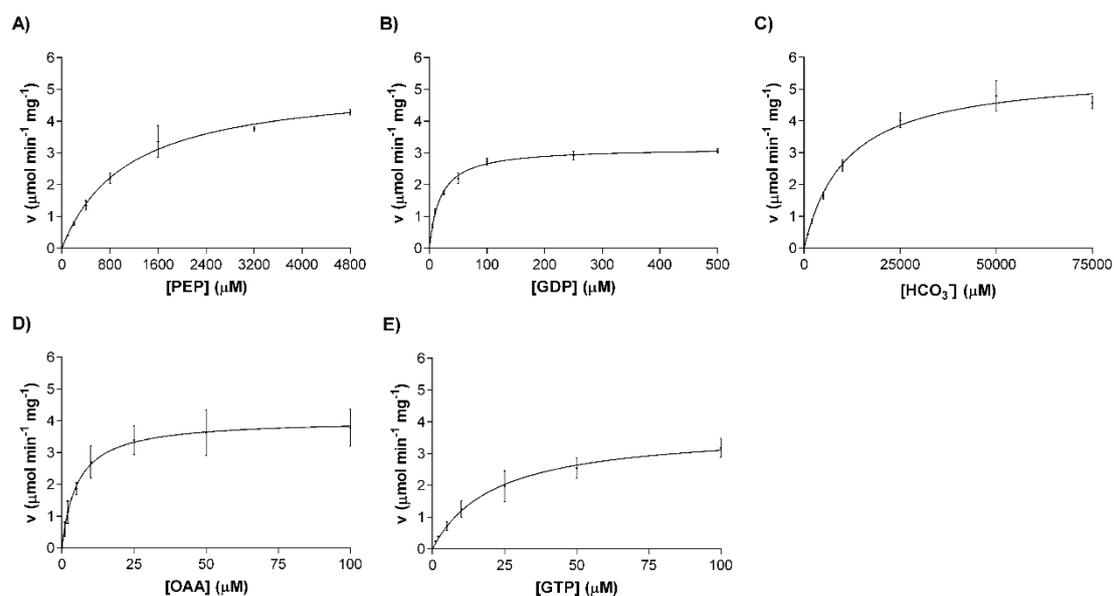


Fig. 4.3. Caracterización cinética de la PEPCK-C pentamutante. Efecto del PEP (A), GDP (B), KHCO_3 (C), OAA (D) y GTP (E) en la actividad de la pentamutante. La media \pm desviación estándar de los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten de forma no lineal.

Los valores de k_{cat} en el sentido de la síntesis de OAA para la PEPCK-C p.Y235F son un 90-95% menores en comparación con los de la PEPCK-C WT y muestran un descenso de solo el 50% en los valores de k_{cat} en el sentido de la síntesis de PEP (Tabla 4.1 y Fig. 4.4). Estos valores de k_{cat} son similares a los obtenidos por Dharmarajan *et al.* (2008) para la PEPCK-C humana al introducir una mutación similar. Entre los valores de K_m destaca el de PEP con p.Y235F, que es 10 veces inferior en comparación con el de WT. A pesar de la reducción del 50% en los valores de k_{cat} en el sentido de síntesis de PEP, la PEPCK-C p.Y235F porcina se puede usar como mutante opuesto del pentamutante ya que tiene una reducción de 10 veces en la actividad de síntesis de OAA, lo que equivale a una inhibición casi completa de esta actividad.

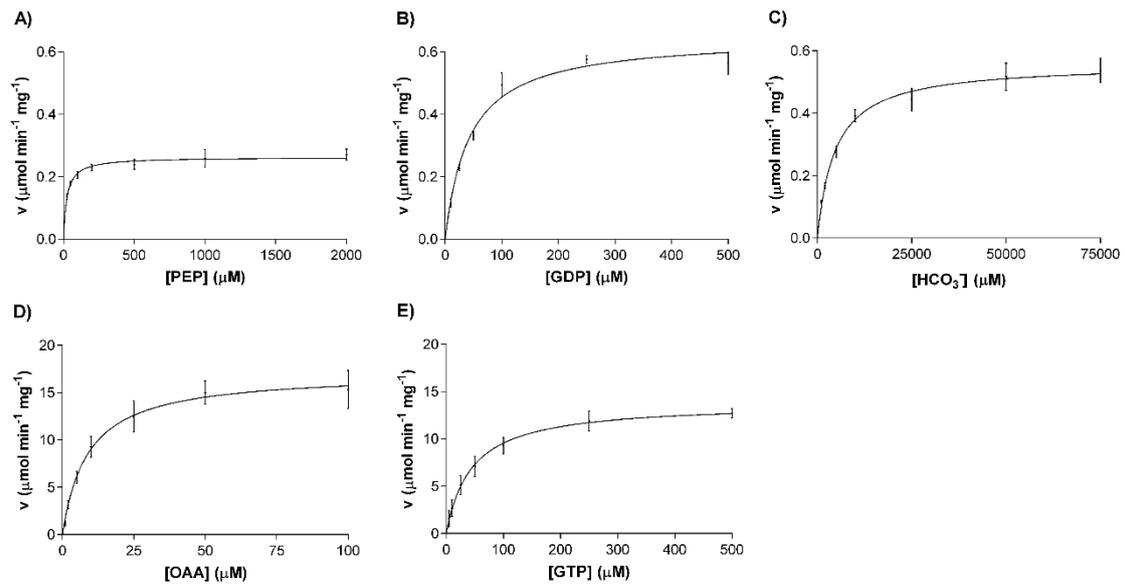


Fig. 4.4. Caracterización cinética de la PEPCK-C p.Y235F. Efecto del PEP (A), GDP (B), KHCO_3 (C), OAA (D) y GTP (E) en la actividad de la p.Y235F. La media \pm desviación estándar de los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten de forma no lineal.

4.3. Dicroísmo circular de la PEPCK-C pentamutante

Los experimentos de dicroísmo circular (CD) son una herramienta interesante para comparar proteínas similares y mutantes (Kelly, Jess y Price, 2005). Se realizaron experimentos de CD con UV cercano y lejano para observar diferencias entre la PEPCK-C WT y la pentamutante (Fig. 4.5).

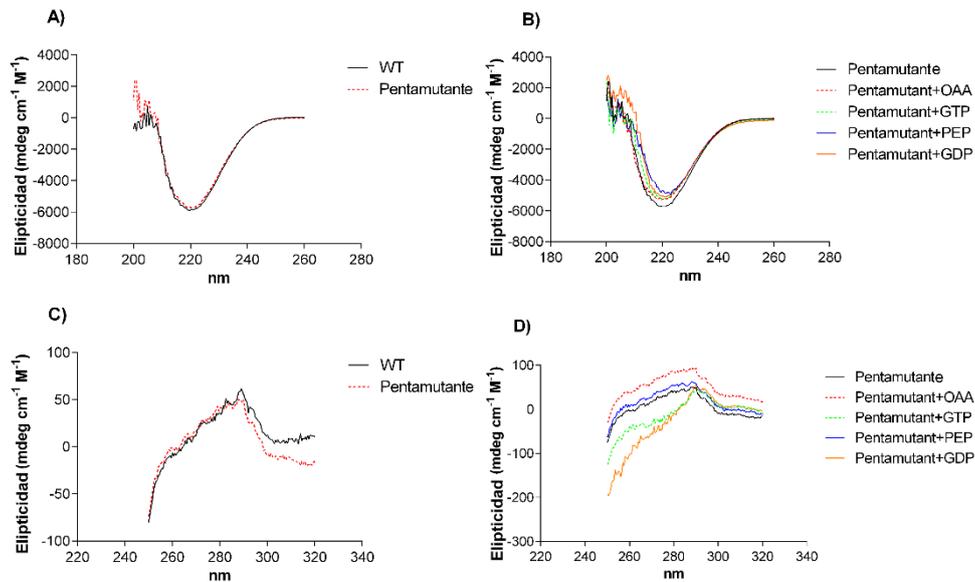


Fig. 4.5. Espectros de CD cercano y lejano de la PEPCK-C pentamutante. (A) Comparación entre WT y pentamutante en CD lejano. (B) Adición de 1 mM OAA, 1 mM GTP, 1 mM PEP y 1 mM GDP a pentamutante en CD lejano. (C) Comparación entre WT y pentamutante en CD cercano. (D) Adición de 1 mM OAA, 1 mM GTP, 1 mM PEP y 1 mM GDP a pentamutante en CD cercano.

No hay diferencias entre WT y pentamutante en el CD lejano (Fig. 4.5 A), lo cual indica que ambas isoenzimas poseen una estructura secundaria muy similar. Ambos espectros tienen un mínimo a los 220 nm. No fue posible calcular la cantidad de hélice- α y lámina β por la baja resolución del espectrofotómetro por debajo de 200 nm. La adición de los sustratos de la PEPCK-C no cambió la forma del espectro del pentamutante en el CD lejano (Fig. 4.5 B), lo cual indica que la unión de los sustratos no varía la estructura secundaria de esta isoforma.

El CD cercano de las proteínas se produce por la contribución de los aminoácidos aromáticos, los cuales poseen unos perfiles de longitud de onda característicos. La fenilalanina produce un pico sobre los 255-270 nm, la tirosina produce un pico entre los 275-282 nm y el triptófano produce un pico a los 290 nm y un descenso entre los 290-305 nm (Kelly, Jess y Price, 2005). La PEPCK-C pentamutante tiene una elipticidad más baja que la WT entre los 295-320 nm (Fig. 4.5 C), posiblemente debido a cambios en la estructura terciaria en una zona próxima a un triptófano. La adición de nucleótidos (GTP

o GDP) al enzima produce una bajada de la elipticidad entre los 250-280 nm (Fig. 4.5 D), por lo que es probable que la unión de los nucleótidos varíe la estructura terciaria del pentamutante en una zona próxima a una fenilalanina.

4.4. Estudios de inhibición de la PEPCK-C pentamutante

Los estudios de inhibición permiten profundizar en el estudio de las características bioquímicas de las diferentes isoenzimas. Para ello se usaron los inhibidores descritos en apartados anteriores, el ácido 3-mercaptopicolínico (3-MP) y el compuesto 2. Los resultados de la inhibición con el 3-MP se pueden observar en la tabla 4.2.

	PEP			GDP		OAA			GTP	
	K _i (μM)	αK _i (μM)	Patrón de inhibición	K _i (μM)	Patrón de inhibición	K _i (μM)	αK _i (μM)	Patrón de inhibición	K _i (μM)	Patrón de inhibición
WT	16 ± 2	20 ± 4	NC mixto	45 ± 3	Acompe- titivo	18 ± 4	49 ± 18	NC mixto	273 ± 68	Acompe- titivo
Pentam.	24 ± 8 <i>ns</i>	11 ± 1 *	NC mixto	22 ± 6 **	Acompe- titivo	11 ± 4 <i>ns</i>	75 ± 41 <i>ns</i>	NC mixto	396 ± 70 <i>ns</i>	Acompe- titivo

Tabla 4.2. Valores de K_i, αK_i y patrones de inhibición de PEPCK-C WT y pentamutante en presencia de 3-MP. Los valores corresponden a la media ± SD de tres experimentos independientes. Las diferencias entre WT y pentamutante se calcularon usando un test *t* de dos muestras, donde *ns*: no significativo, * *p* < 0,05 y ** *p* < 0,01. NC: No competitivo.

Los patrones de inhibición fueron los mismos para ambos isoenzimas, el 3-MP se comporta como un inhibidor acompetitivo cuando el GTP o el GDP son usados como sustratos variables y se comporta como un inhibidor no competitivo cuando el OAA o el PEP se usan como sustratos variables (Fig. 4.6). Como se explica en el capítulo anterior, Balan *et al.* (2015) demuestran que la inhibición acompetitiva que se observa en los experimentos cinéticos no se corresponde a lo que sucede estructuralmente, ya que la PEPCK-C posee dos sitios de unión para el 3-MP, uno competitivo y otro no competitivo.

En cuanto a los valores de K_i y αK_i , no se observan diferencias entre WT y pentamutante cuando se usan los sustratos que participan en la síntesis de PEP (OAA y GTP). Sin embargo, al usar los sustratos que participan en la síntesis de OAA (PEP y GDP) sí que se observan diferencias significativas entre ambas isoenzimas. El αK_i cuando se usa PEP como sustrato variable de WT fue de $20 \pm 4 \mu\text{M}$ y el de pentamutante fue de $11 \pm 1 \mu\text{M}$. Usando el GDP como sustrato variable, los valores de K_i para WT y pentamutante fueron $45 \pm 3 \mu\text{M}$ y $22 \pm 6 \mu\text{M}$, respectivamente. Los valores de K_i y αK_i cuando se usa PEP o GDP como sustratos variables son similares a los obtenidos por Balan *et al.* (2015) para el sitio de unión competitivo del 3-MP en el centro activo y un orden de magnitud inferiores a los valores atribuidos para el sitio de unión no competitivo, por lo que se puede afirmar que una gran parte de las diferencias entre WT y pentamutante se deben a cambios en los sitios de unión de PEP y GDP que afectan al centro activo. De los cinco aminoácidos sustituidos en la pentamutante, el V85A es el más próximo al centro activo y el que podría afectar en mayor medida a los cambios cinéticos de pentamutante.

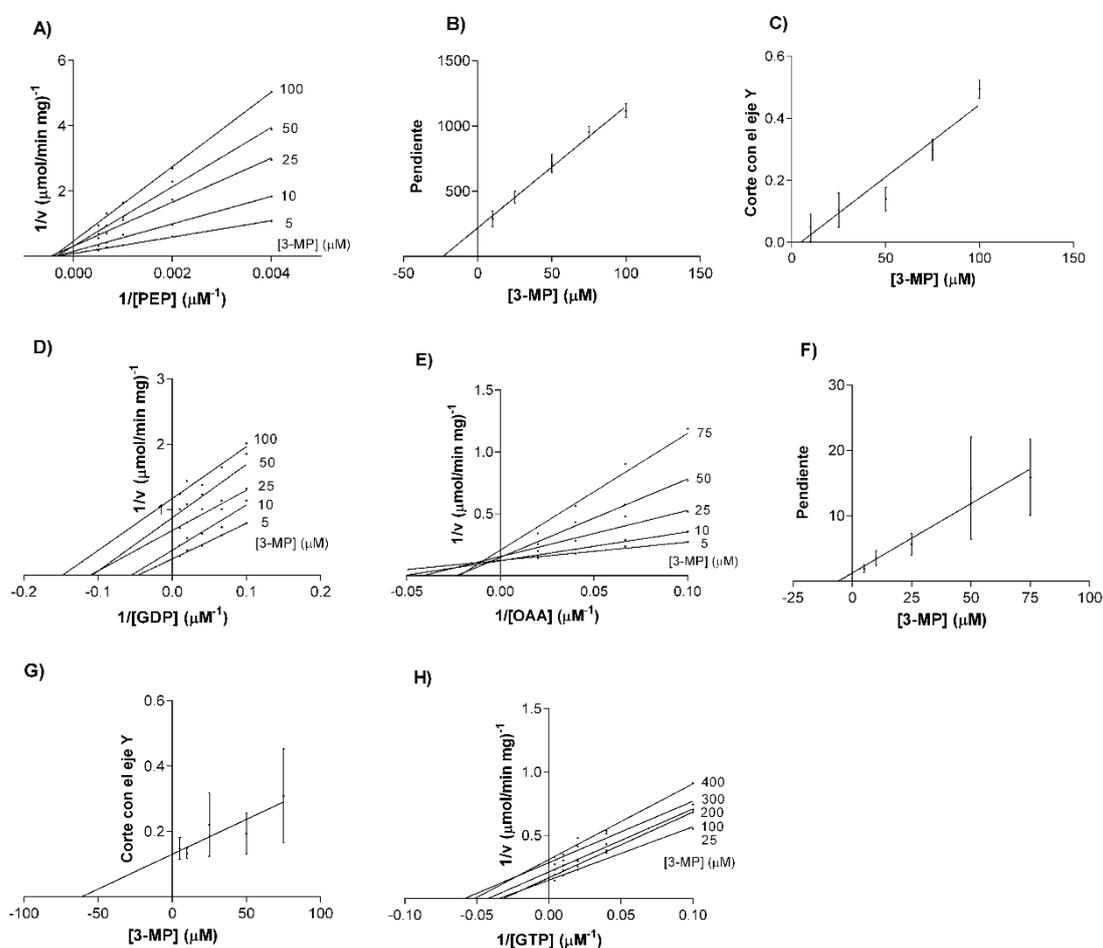


Fig. 4.6. Representaciones de dobles recíprocos y representaciones secundarias del 3-MP añadiendo PEP, GDP, OAA o GTP como sustrato variable. (A-C) Representaciones de dobles recíprocos, pendiente y corte con el eje Y de pentamutante con PEP como sustrato variable. (D) Representación de dobles recíprocos de pentamutante con GDP como sustrato variable. (E-G) Representaciones de dobles recíprocos, pendiente y corte con el eje Y de pentamutante con OAA como sustrato variable. (H) Representación de dobles recíprocos de pentamutante con GTP como sustrato variable.

Los resultados de inhibición de WT y de pentamutante usando al compuesto 2 descrito en el capítulo anterior se pueden observar en la tabla 4.3. Las únicas diferencias significativas entre isoenzimas en este experimento se observaron al comparar la V_{max} de WT y de pentamutante en ausencia de compuesto 2 para OAA ($21,3 \pm 3,7$ y $14,1 \pm 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectivamente) y GTP ($20,0 \pm 1,9$ y $14,3 \pm 2,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectivamente). Este resultado no es sorprendente ya que al analizar la cinética de ambos isoenzimas se observan grandes diferencias en los valores de k_{cat} (ver apartado 4.2). El hecho de que no se obtengan diferencias cinéticas al añadir el compuesto 2 indica que las diferencias entre ambos isoenzimas no se encuentran en el sitio de unión del compuesto 2 o que no afectan alostéricamente a este sitio.

	[Compuesto 2] (μM)	OAA		GTP	
		V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m (μM)
WT	0 μM	$21,3 \pm 3,7$	22 ± 14	$20,0 \pm 1,9$	96 ± 15
WT	50 μM	$4,6 \pm 1,4$	32 ± 19	$5,9 \pm 2,3$	276 ± 37
Pentamut.	0 μM	$14,1 \pm 1 *$	$8 \pm 1 ns$	$14,3 \pm 2,6 *$	$71 \pm 21 ns$
Pentamut.	50 μM	$7,6 \pm 3,4 ns$	$27 \pm 12 ns$	$6,3 \pm 1,8 ns$	$220 \pm 104 ns$

Tabla 4.3. Valores de V_{max} y K_m de PEPCK-C WT y pentamutante en presencia de OAA, GTP y compuesto 2. Los valores dados son la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias en V_{max} y K_m entre las isoenzimas se calcularon usando un test- t de dos muestras. *ns*: no significativo, * $p < 0,05$.

4.5. Análisis de los efectos de las mutaciones de la pentamutante

El mecanismo por el que la p.Y235F inhibe la actividad de síntesis de OAA es fácil de entender ya que falta un grupo funcional clave en la unión del CO₂. En contraste, no encontramos razón aparente para atribuir a ningún aminoácido los cambios cinéticos observados en la pentamutante. Decidimos por ello estudiar los efectos individuales de las cinco mutaciones que aparecen en esta isoforma. Los parámetros cinéticos de cada mutación individual en comparación con el pentamutante se pueden observar en la tabla 4.4.

Sustrato	K _m (μM)				k _{cat} (s ⁻¹)			
	Pentamut.	p.V85A	p.F130L	p.K510R	Pentamut.	p.V85A	p.F130L	p.K510R
PEP	1091 ± 125	1285 ± 153 <i>ns</i>	772 ± 53*	441 ± 31***	8.2 ± 0.3	16.6 ± 1***	21.5 ± 0.6***	18.5 ± 0.5***
KHCO₃	11450 ± 1294	6662 ± 1367*	20287 ± 1556***	12737 ± 1557 <i>ns</i>	8.9 ± 0.3	14.4 ± 0.8***	22.5 ± 0.6***	17.1 ± 0.6***
GDP	19.3 ± 1.6	32.4 ± 2.9*	42.7 ± 6.6***	53.1 ± 4.3***	5 ± 0.1	9.6 ± 0.2***	16.8 ± 0.7***	18.5 ± 0.4***
OAA	5.4 ± 0.6	8.5 ± 1.2 <i>ns</i>	12 ± 1.3*	20 ± 4.3***	6.9 ± 0.2	16.9 ± 0.7***	27.3 ± 0.9***	42.7 ± 3.3***
GTP	21.6 ± 3.9	70.6 ± 9.4***	60 ± 11.5**	61.3 ± 5.4**	5.9 ± 0.4	20.2 ± 1***	26.3 ± 1.6***	36.2 ± 1***

Tabla 4.4. Parámetros cinéticos de la PEPCK-C pentamutante, p.V85A, p.F130L y p.K510R. Los valores mostrados son la media de tres experimentos independientes ± desviación estándar. Las diferencias entre pentamutante y las distintas mutaciones se calcularon usando un test ANOVA de una vía seguido de un test de Tukey. *ns*: no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La sustitución p.V85A produce un intermedio entre los parámetros de WT y los de pentamutante. Los valores de k_{cat} en la dirección de síntesis de PEP de aproximadamente 20 s⁻¹ son significativamente más altos que los valores de pentamutante (≈ 6 s⁻¹) pero son un 50% más bajos que los valores de WT (≈ 40 s⁻¹). Los valores de k_{cat} en la dirección de

síntesis de OAA son sobre un 50% más altos que los valores de pentamutante. Los valores de K_m de p.V85A son similares a los de pentamutante, con la excepción de los valores de K_m del GTP que son un 70% más altos que los valores de pentamutante.

La sustitución p.F130L tampoco es la responsable de la actividad característica de la pentamutante ya que sus valores de k_{cat} en el sentido de síntesis de PEP de aproximadamente 27 s^{-1} son más cercanos a los valores de k_{cat} de la WT ($\approx 40 \text{ s}^{-1}$) que a los de pentamutante ($\approx 6 \text{ s}^{-1}$). En la dirección de síntesis de OAA, los valores de k_{cat} de p.F130L son más altos que los de pentamutante. En cuanto a los valores de K_m , se observa un notable incremento de los valores de K_m del HCO_3^- y del GDP.

Los parámetros cinéticos de la sustitución p.M139L se describieron en Latorre *et al.* (2016). Los valores de k_{cat} en la dirección de la síntesis de PEP eran aproximadamente 30 s^{-1} , bastante similares a los obtenidos para p.F130L. Los valores de k_{cat} para HCO_3^- y PEP eran muy similares a los de pentamutante y los valores para GDP eran un 50% inferiores.

No fue posible purificar la sustitución p.G185R a pesar de usar tres construcciones diferentes (en los vectores pET15b, pET22bSUMO y pMALC2x) en dos cepas bacterianas distintas (*Escherichia coli* BL21 y Artic Express).

La sustitución p.K510R es menos importante que las otras sustituciones por su localización en la superficie de la enzima y lo similares que son estructuralmente la lisina y la arginina. Los valores de K_m y k_{cat} en la dirección de síntesis de PEP son muy similares a los valores de k_{cat} de la WT. Los valores de k_{cat} en la dirección de síntesis de OAA son más altos que los valores de pentamutante.

En la Fig. 4.7 se pueden observar los gráficos de las cinéticas de p.V85A, p.F130L y p.K510R.

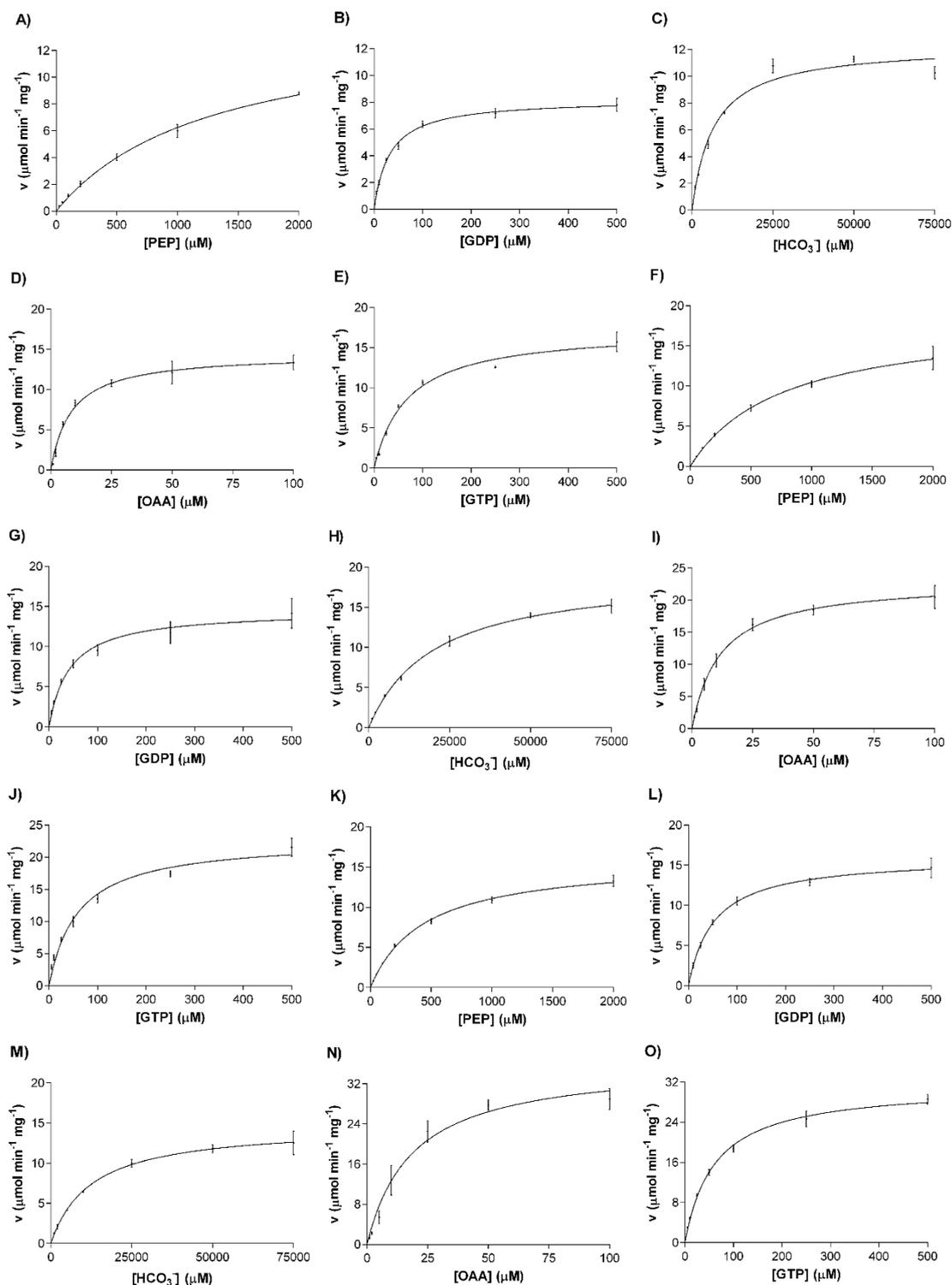


Fig. 4.7. Caracterización cinética de p.V85A, p.F130L y p.K510R. Efecto de la concentración de sustrato de PEP (A), GDP (B), HCO_3^- (C), OAA (D) y GTP (E) en la actividad de p.V85A. Efecto de la concentración de sustrato de PEP (F), GDP (G), HCO_3^- (H), OAA (I) y GTP (J) en la actividad de p.F130L. Efecto de la concentración de sustrato

de PEP (K), GDP (L), HCO_3^- (M), OAA (N) y GTP (O) en la actividad de p.K510R. Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten de forma no lineal.

4.6. Dicroísmo circular de p.V85A y p.F130L

Para buscar diferencias estructurales entre pentamutante y las mutaciones que producían algún efecto cinético (p.V85A y p.F130L) se realizaron experimentos de dicroísmo circular (CD) (Fig. 4.8).

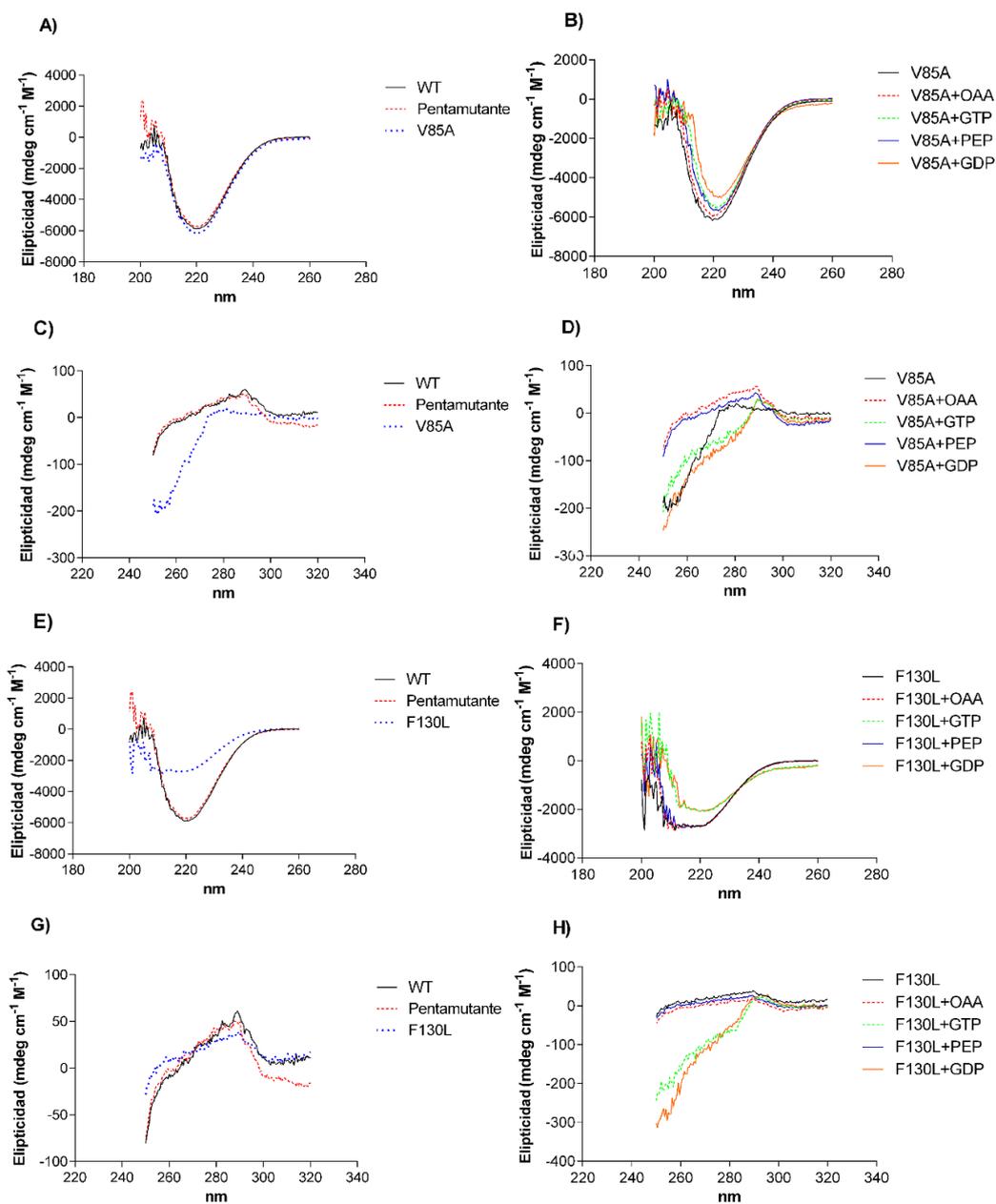


Fig. 4.8. Espectros de CD cercano y lejano de la PEPCK-C p.V85A y p.F130L. (A) Comparación entre WT, pentamutante y V85A en CD lejano. (B) Adición de 1 mM OAA, 1 mM GTP, 1 mM PEP y 1 mM GDP a V85A en CD lejano. (C) Comparación entre WT, pentamutante y V85A en CD cercano. (D) Adición de 1 mM OAA, 1 mM GTP, 1 mM PEP y 1 mM GDP a V85A en CD cercano. (E) Comparación entre WT, pentamutante y F130L en CD lejano. (F) Adición de 1 mM OAA, 1 mM GTP, 1 mM PEP y 1 mM GDP a F130L en CD lejano. (G) Comparación entre WT, pentamutante y F130L en CD cercano. (H) Adición de 1 mM OAA, 1 mM GTP, 1 mM PEP y 1 mM GDP a F130L en CD cercano.

La isoforma p.V85A tiene un espectro de CD lejano muy similar a los de WT y pentamutante (Fig. 4.8 A), lo cual indica que esta isoforma no produce cambios significativos en la estructura secundaria de la enzima. Al añadir los sustratos de la enzima (Fig. 4.8 B), las curvas de CD lejano de p.V85A no varían sustancialmente.

Al medir los espectros de CD cercano sí que se observan diferencias en la forma de la curva de la p.V85A con unas medidas de elipticidad inferiores entre los 250-280 nm (Fig. 4.8 C), lo cual corresponde a los picos producidos por fenilalanina y tirosina. Como se puede observar en la Fig. 4.1, la sustitución V85A está cercana espacialmente en la estructura tridimensional de la enzima a la Y235, por lo que es probable que el cambio conformacional de la V85A modifique a la Y235 y sea esto lo que se observa en la curva de CD cercano. Por tanto, la sustitución p.V85A varía la estructura terciaria de la enzima con respecto a la isoforma WT pero a su vez también respecto a la isoforma pentamutante. La adición de nucleótidos (GTP o GDP) produce un espectro de CD cercano similar excepto en la zona alrededor de 270-280 nm donde la elipticidad es menor. La adición de OAA o PEP produce una mayor elipticidad alrededor de 250-260 nm (Fig. 4.8 D). Esta variación de la estructura terciaria dependiendo del sustrato es debida a que los nucleótidos por un lado y el OAA y PEP por otro lado comparten sitio de unión al enzima y producen cambios estructurales similares al unirse, de la misma forma que el OAA y PEP.

El espectro de CD lejano de la isoforma p.F130L es bastante diferente del espectro de WT y pentamutante (Fig. 4.8 E). El mínimo de elipticidad en p.F130L es un 50% más

alto que el de pentamutante y está desplazado de 220 nm en pentamutante a 211 nm en p.F130L. Estas modificaciones implican que la sustitución F130L produce cambios en la estructura secundaria de la enzima con respecto a WT, sin embargo estos cambios se ven anulados en pentamutante posiblemente debido a la interacción entre varias de las mutaciones. La adición de los nucleótidos cambia significativamente la forma del espectro de CD lejano (Fig. 4.8 F), lo cual probablemente ocurre porque la sustitución F130L modifica el sitio de unión de los nucleótidos al enzima, tal y como se produce con la sustitución M139L (Latorre *et al*, 2016; ver capítulo anterior), porque ambas mutaciones están próximas en la estructura de la enzima (ver Fig. 4.1).

El espectro de CD cercano de la isoforma p.F130L tiene pequeñas variaciones respecto a WT en la zona entre 250-260 nm y con pentamutante en la zona entre 300-320 nm (Fig. 4.8 G), los cuales se corresponden a los picos de fenilalanina y triptófano, respectivamente. La adición de nucleótidos, al igual que sucedía con el CD lejano modifica considerablemente la forma de la curva, descendiendo los valores de elipticidad entre 250-280 nm. Por tanto en la estructura terciaria se vuelve a ver que la sustitución F130L, al igual que la M139L, modifica la estructura de la enzima alrededor del sitio de unión de los nucleótidos.

4.7. Análisis cinético de dobles mutantes

Debido a que ninguno de los mutantes individuales producía los efectos cinéticos peculiares que se observan en pentamutante, se decidió realizar combinaciones de dobles mutantes con cuatro de las mutaciones, descartando la K510R debido a que no producía ningún efecto cinético. Los dobles mutantes que se crearon fueron p.V85A-F130L, p.V85A-M139L, p.V85A-G185R, p.F130L-M139L, p.F130L-G185R y p.M139L-G185R. De estos dobles mutantes, aquellos que tenían la sustitución G185R fueron imposibles de obtener, al igual que sucedía con el mutante individual G185R, debido a que las bacterias no producían proteína viable. Los resultados cinéticos del resto de dobles mutantes se encuentran en la tabla 4.5.

Sustrato	K_m (μM)				k_{cat} (s^{-1})			
	Pentamut.	p.V85A-F130L	p.V85A-M139L	p.F130L-M139L	Pentamut.	p.V85A-F130L	p.V85A-M139L	p.F130L-M139L
PEP	1091 \pm 125	1209 \pm 61 <i>ns</i>	2154 \pm 167***	1266 \pm 181 <i>ns</i>	8.2 \pm 0.3	15.7 \pm 0.4***	32.6 \pm 1.5***	29.3 \pm 2.1***
KHCO ₃	11450 \pm 1294	12424 \pm 2754 <i>ns</i>	7698 \pm 2000 <i>ns</i>	17505 \pm 1766*	8.9 \pm 0.3	15.4 \pm 1.1***	24.3 \pm 1.7***	29.3 \pm 1***
GDP	19.3 \pm 1.6	25.7 \pm 2.7*	40.6 \pm 3.2***	37.2 \pm 1.7***	5 \pm 0.1	9.6 \pm 0.2***	16.6 \pm 0.4***	22.4 \pm 0.3***
OAA	5.4 \pm 0.6	8.7 \pm 1.7 <i>ns</i>	17 \pm 2.2**	24.6 \pm 4.7***	6.9 \pm 0.2	13.9 \pm 0.8**	29.7 \pm 1.3***	36.1 \pm 2.8***
GTP	21.6 \pm 3.9	36.7 \pm 6.3*	40.3 \pm 5.2*	38.3 \pm 5.6*	5.9 \pm 0.4	12.8 \pm 0.6***	26.7 \pm 0.8***	37.1 \pm 1.6***

Tabla 4.5. Parámetros cinéticos de la PEPCK-C pentamutante, p.V85A-F130L, p.V85A-M139L y p.F130L-M139L. Los valores mostrados son la media de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Las diferencias entre pentamutante y los distintos dobles mutantes se calcularon usando un test ANOVA de una vía seguido de un test de Tukey. *ns*: no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

El doble mutante p.V85A-F130L posee unos valores de k_{cat} en el sentido de síntesis de PEP de alrededor de 13 s^{-1} , unos valores bastante inferiores a los de WT de alrededor de 40 s^{-1} pero sin llegar a los valores de k_{cat} de pentamutante que son alrededor de 6 s^{-1} . En el sentido de síntesis de OAA, los valores de k_{cat} son más altos que en pentamutante. Los valores de K_m para todos los sustratos de p.V85A-F130L son similares a los de pentamutante (Fig. 4.9).

El doble mutante p.V85A-M139L posee unos valores de k_{cat} en el sentido de síntesis de PEP de alrededor de 27 s^{-1} , siendo unos valores más cercanos a los de WT que a los de pentamutante. En el sentido de síntesis de OAA, los valores de k_{cat} son más altos que para pentamutante. Los valores de K_m para este doble mutante son para todos los casos, excepto para el HCO_3^- , más altos que los de pentamutante.

En cuanto al doble mutante p.F130L-M139L, sus valores de k_{cat} en el sentido de síntesis de PEP son prácticamente iguales a los de WT y por tanto muy alejados a los de pentamutante y los valores de k_{cat} en el otro sentido vuelven a ser superiores a los de pentamutante. Los valores de K_m de p.F130L-M139L son ligeramente superiores a los de pentamutante.

De los tres dobles mutantes analizados, el que más se aproxima a los valores cinéticos de pentamutante es el doble mutante p.V85A-F130L que, sin embargo, no logra tener una actividad de síntesis de PEP tan baja como el pentamutante. Esta actividad peculiar de la pentamutante probablemente sea debida al efecto combinado de tres o más mutaciones. Debido al gran número de combinaciones posibles de tres o más mutantes se decidió no analizar más isoformas potenciales.

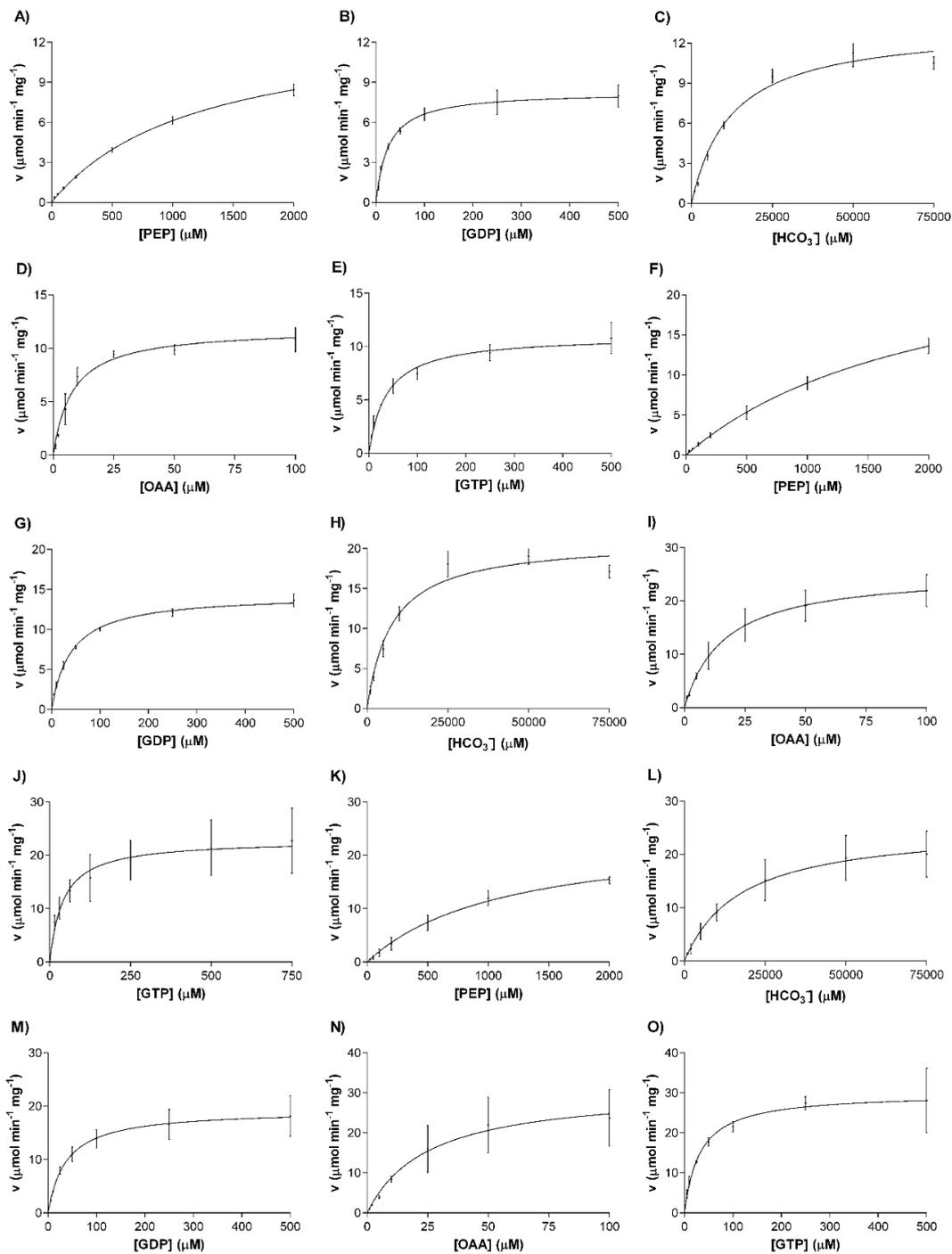


Fig. 4.9. Caracterización cinética de p.V85A-F130L, p.V85A-M139L y p.F130L-M139L. Efecto de la concentración de sustrato de PEP (A), GDP (B), HCO_3^- (C), OAA (D) y GTP (E) en la actividad de p.V85A-F130L. Efecto de la concentración de sustrato de PEP (F), GDP (G), HCO_3^- (H), OAA (I) y GTP (J) en la actividad de p.V85A-M139L. Efecto de la concentración de sustrato de PEP (K), GDP (L), HCO_3^- (M), OAA (N) y GTP (O) en la actividad de p.F130L-M139L. Los datos fueron se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten de forma no lineal.

4.8. Quimera cerdo-rata de PEPCK-C

Para seguir explorando las propiedades de la pentamutante y para intentar conseguir la cristalización de la proteína se decidió generar una quimera en la que los residuos 1-260 fueran de origen porcino y los residuos 261-622 fueran de rata. Con esta distribución, cuatro de las mutaciones de pentamutante (V85A, F130L, M139L y G185R) quedaban en la subunidad 1 porcina, mientras que la mutación que no produce ningún efecto cinético (K510R, ver apartado 4.5) quedaba en la subunidad 2 de rata.

Después de comprobar por secuenciación que las 4 mutaciones se habían introducido correctamente mediante mutagénesis dirigida se realizó una prueba de expresión para ver si las bacterias eran capaces de sintetizar la proteína. El resultado de la prueba de expresión se puede observar en la Fig. 4.10.

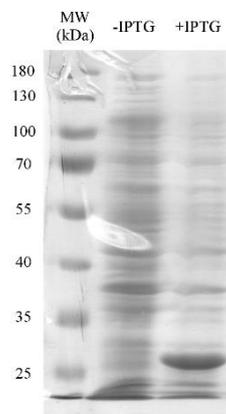


Fig. 4.10. Gel de SDS-PAGE de la prueba de expresión de la quimera cerdo-rata de PEPCK-C. El carril -IPTG se corresponde con las proteínas bacterianas antes de la inducción con IPTG. El carril + IPTG se corresponde con las proteínas bacterianas después de la inducción con IPTG.

En el carril de no inducción se observan las proteínas bacterianas antes de la inducción con IPTG. En el carril de inducción se observa la aparición de una banda que está algo por encima del marcador de 25 kDa después de la inducción con IPTG. La PEPCK-C es una proteína de aproximadamente 67 kDa, por lo que la banda que se observa puede ser otra proteína que se induzca o que la quimera de PEPCK-C ha sido imposible que se plegara correctamente debido a las mutaciones introducidas.

4.9. Estabilidad de PEPCK-C y mutantes *in vivo*

Para comprobar la estabilidad *in vivo* de las isoformas WT, pentamutante e Y235F de la PEPCK-C porcina se decidió realizar una sobreexpresión de estas isoformas en células humanas HEK293T y observar como variaba en el tiempo la cantidad de PEPCK-C tras inhibir la síntesis proteica con cicloheximida. Los resultados de este experimento se pueden observar en la Fig. 4.11.

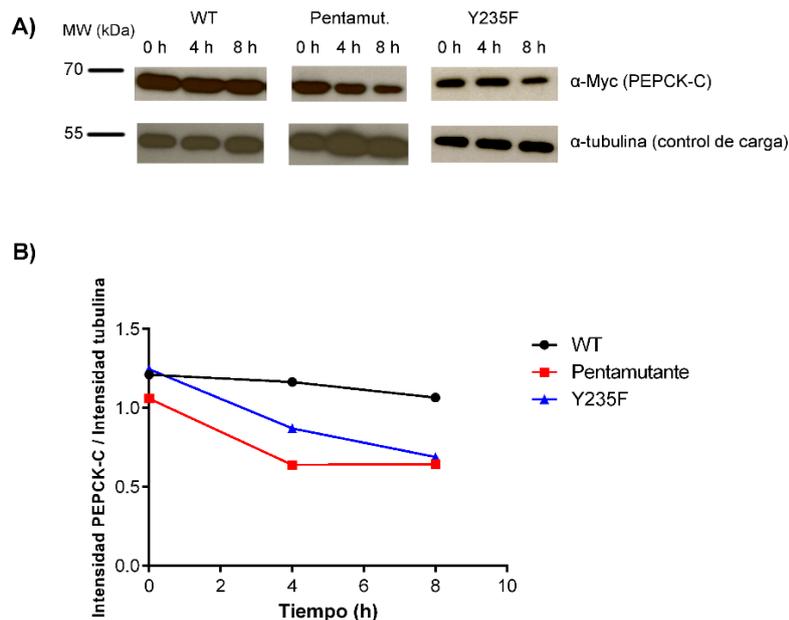


Fig. 4.11. Estabilidad de las isoformas de la PEPCK-C. (A) Western-Blot de las isoformas de PEPCK-C a las 0, 4 y 8 horas del tratamiento con cicloheximida. El nivel de PEPCK-C se detecta con un anticuerpo α -myc y el control de carga con un anticuerpo α -tubulina. El peso molecular de la PEPCK-C está sobre los 67 kDa y el de la tubulina sobre los 55 kDa. (B) Representación del cociente entre la intensidad de banda de la PEPCK-C y la intensidad de banda de la tubulina respecto al tiempo. Los resultados mostrados son la media de dos experimentos independientes.

Como se observa en la Fig. 4.11, las isoformas de la PEPCK-C son bastante estables *in vivo*. Tras 8 horas de inhibición de la síntesis proteica, en todos los casos se degradó menos de un 50% de la PEPCK-C existente en la célula. Comparando entre las distintas isoformas se puede observar que la WT es la más estable de todas y que pentamutante e Y235F son similares entre ellas y ligeramente menos estables que la isoforma WT. Estos resultados muestran la adecuación de estas isoformas para diferentes experimentos *in vivo* ya que no son proteínas que se degraden con facilidad en la célula.

V. Búsqueda de SNPs en las regiones reguladoras de la PEPCK-C

Encontrar SNPs asociados, o mejor aún, responsables de cambios fenotípicos es una estrategia de mejora genética. La mayoría de los SNPs no tienen ningún efecto fenotípico en los animales pero con algunos se han observado grandes cambios fenotípicos, que pueden ser positivos o negativos y que han servido para realizar programas de selección a favor o en contra de determinado alelo produciendo una mejora de caracteres interesantes para la industria alimentaria.

En el cerdo se han descrito varios SNPs importantes a los que se atribuyen efectos fenotípicos relevantes (ver apartado 1.3.3 para más detalles). Entre ellos destacan la sustitución en la posición 3072 del gen IGF2, a la que se atribuye el 15-30% de la variación en la masa muscular y el 10-20% de la variación en la grasa dorsal de cerdos (Nezer *et al.*, 1999; Van Laere *et al.*, 2003); la sustitución en la posición 1426 en el gen del receptor 4 de melanocortina, asociada a una mayor cantidad de grasa dorsal, a una mayor ingesta de alimentos y a una mayor ganancia de peso diaria (Kim *et al.*, 2000; Houston, Cameron y Rance, 2004; Galve *et al.*, 2012) o la sustitución en la posición 1987 en el gen del receptor de leptina, la cual produce una mayor cantidad de grasa dorsal, un descenso de los ácidos grasos insaturados y un aumento de los ácidos grasos saturados (Galve *et al.*, 2012; Henriquez-Rodriguez *et al.*, 2016).

La regulación de la expresión del gen de la PEPCK-C por la región promotora ha sido profundamente estudiada y es uno de los ejemplos mejor conocidos de este tipo de mecanismo de control de la actividad enzimática (Hanson y Reshef, 1997; Yang *et al.*, 2009). Sin embargo, una región de los genes que a menudo pasa desapercibida es la región no traducida al final del gen o región 3'UTR. Esta región se encuentra a continuación del codón de stop de la secuencia codificante en el ARN mensajero (mRNA) y tiene una gran importancia en la regulación de la expresión del gen (Wilkie, Dickson y Gray, 2003). La existencia de SNPs en la región 3'UTR de los genes puede producir cambios en la estabilidad del mRNA y en la traducción debido a la interferencia en la unión de moléculas como los miRNA o de distintas proteínas reguladoras al mRNA (Mishra *et al.*, 2007; Landi, Gemignani y Landi, 2012; Skeeles *et al.*, 2013). Los microARN (miRNA) son pequeñas moléculas de ARN con un tamaño de unas 22 bases que se unen al mRNA y que regulan su estabilidad y su traducción, normalmente en un sentido negativo, es decir, reduciendo la estabilidad y la expresión de los mRNA a los que se unen (Lai, 2002; Carthew y Sontheimer, 2009). En los seres humanos se han detectado más de 800 miRNA diferentes (Bentwich *et al.*, 2005). En concreto, se ha observado la existencia de varios

sitios de unión en la región 3'UTR de la PEPCK-C que promueven la degradación del mRNA (Hajarnis, Schroeder y Curthoys, 2005). En cerdos, se han encontrado SNPs en la región 3'UTR de genes como la malato deshidrogenasa, la ácido graso sintasa o la leptina que están asociados a cambios fenotípicos en el espesor de la grasa dorsal (Bartz *et al.*, 2013; Mankowska *et al.*, 2015; Grzes *et al.*, 2016).

En la versión codificante del gen de la PEPCK-C porcina se ha descrito un SNP que produce un cambio de metionina por leucina en el aminoácido 139 y que está asociado a un aumento del contenido de grasa dorsal, a una disminución del contenido de grasa intramuscular y a un descenso de la calidad de la carne (Latorre *et al.*, 2016). Como complemento de ese trabajo, en este capítulo se estudiaron las regiones reguladoras (promotor, intrones y región 3'UTR) en búsqueda de otros SNPs que puedan modular la expresión del gen de la PEPCK-C y por lo tanto los efectos fenotípicos asociados a la actividad de la enzima.

5.1. Secuenciación del promotor de la PEPCK-C porcina

La búsqueda de SNPs en el promotor de la PEPCK-C se realizó secuenciando completamente el promotor de la PEPCK-C de 9 cerdos Piétrain, de 9 cerdos Ibéricos y de 9 cerdos Duroc x Landrace/Large White. Los SNPs encontrados se muestran en la Tabla 5.1.

Número de base	Posición respecto al gen	Cambio de base	Razas en la que aparece el SNP
65092801	-1982	A > C	Piétrain y Duroc x Landrace/Large White
65093035	-1748	A > G	Piétrain y Duroc x Landrace/Large White
65093046	-1737	A > G	Piétrain y Duroc x Landrace/Large White
65093260	-1523	C > A	Piétrain
65093634	-1149	C > T	Piétrain
65093700	-1083	T > C	Duroc x Landrace/Large White
65093991	-792	C > T	Duroc x Landrace/Large White
65094051	-732	C > T	Duroc x Landrace/Large White
65094115	-668	T > G	Duroc x Landrace/Large White
65094164	-619	T > C	Duroc x Landrace/Large White
65094175	-608	G > C	Duroc x Landrace/Large White
65094281	-502	T > C	Duroc x Landrace/Large White
65094286	-497	A > C	Duroc x Landrace/Large White
65094306	-477	A > C	Duroc x Landrace/Large White
65094400	-383	C > G	Duroc x Landrace/Large White
65094458	-325	C > A	Piétrain y Duroc x Landrace/Large White
65094477	-306	C > T	Duroc x Landrace/Large White
65094478	-305	C > T	Piétrain y Duroc x Landrace/Large White
65094564	-219	C > T	Duroc x Landrace/Large White
65094706	-77	T > G	Duroc x Landrace/Large White
65094781	-2	A > G	Duroc x Landrace/Large White

Tabla 5.1. SNPs descubiertos en el promotor de la PEPCK-C porcina. Localizador del gen en Genbank: NC_010459.4 (65094783..65100751).

Los 21 SNPs descubiertos en el promotor de la PEPCK-C porcina aparecen en cerdos de la raza Piétrain y/o en cerdos de la raza Duroc x Landrace/Large White al ser comparados con los cerdos de la raza Ibérica. Sin embargo, la mayoría de estos SNPs aparecen en heterocigosis y en un bajo número de animales.

Al estudiar la localización en el promotor de cada SNP y los sitios de unión de los factores de transcripción (ver apartado 1.6.4) destacan tres SNP. El SNP g. 65094400C>G situado 383 bases antes del comienzo del gen de la PEPCK-C se encuentra en el sitio de unión de GR1 y el SNP g. 65094458C>A situado 325 bases antes del comienzo del gen de la PEPCK-C se encuentra en el sitio de unión de AF3. Ambos sitios de unión (GR1 y AF3) forman parte de una región regulatoria de respuesta a los glucocorticoides (Croniger *et*

al., 2002). Los glucocorticoides aumentan la expresión de PEPCK-C en el hígado y el riñón pero disminuyen su expresión en el tejido adiposo (Olswang *et al.*, 2003). El SNP g. 65094706T>G situado 77 bases antes del comienzo del gen de la PEPCK-C se encuentra en el sitio de unión de CRE donde se une el AMPc para aumentar la expresión de la PEPCK-C (Croniger *et al.*, 2002). Sin embargo, la presencia de estos SNPs en los sitios de unión de factores de transcripción no quiere decir que se tenga que producir necesariamente un cambio en su unión.

5.2. Nuevos SNPs en el gen de la PEPCK-C porcina

La búsqueda de nuevos SNPs en el gen de la PEPCK-C porcina se realizó mediante una colaboración con el profesor Miguel Pérez Enciso de la Universidad Autónoma de Barcelona que dispone de una base de datos de genomas porcinos secuenciados de diferentes procedencias. Esta base de datos posee los siguientes animales (Tabla 5.2).

Raza	Origen del animal	Número de animales
Duroc	Internacional	10
Ibérico	España	8
Mangalica	Hungría	5
Yucatan	México	10
Landrace	Internacional	10
Large White	Internacional	10
Pietrain	Internacional	10
Bamaxiang	Sur de China	6
Hetao	Norte de China	5
Laiwu	Norte de China	6
Luchuan	Sur de China	6
Minzhu	Norte de China	6
Meishan	Sur de China	6
Sichuan	Tíbet	6
Tibetano	Tíbet	6
Wuzhishan	Sur de China	6
Yunnan	Tíbet	6
Jabalí salvaje europeo	Internacional	20
Jabalí salvaje del sur de Asia	Sur de China	10
Jabalí salvaje del norte de Asia	Internacional	10

Tabla 5.2. Composición de la base de datos de cerdos y jabalís usada para detectar SNPs en el gen de la PEPCK-C porcina

Esta base de datos de genomas porcinos tiene como peculiaridad la gran diversidad de razas, ya que posee datos de cerdos europeos, asiáticos y americanos y de jabalís europeos y asiáticos. A su vez, también se pueden encontrar razas de cerdos que son típicamente magras como la Pietrain y razas de cerdos con una gran infiltración grasa como la Ibérica o la Mangalica.

Al realizar la búsqueda en la base de datos se obtuvieron los siguientes SNPs (Tabla 5.3).

Número de base	Cambio de base	Cambio de aminoácido	Tipo de variante
65095006	T > C	-	Intrónica
65095007	G > A	-	Intrónica
65095010	T > A	-	Intrónica
65095013	T > C	-	Intrónica
65095037	G > A	-	Intrónica
65095042	G > A	-	Intrónica
65095496	G > A	-	Intrónica
65095535	G > A	-	Intrónica
65095571	A > G	-	Intrónica
65095820	G > T	-	Intrónica
65095982	G > A	E123K	Cambio de sentido
65096031	A > C	-	Intrónica
65096032	C > T	-	Intrónica
65096118	A > G	-	Intrónica
65096120	C > T	-	Intrónica
65096130	A > T	-	Intrónica
65096152	T > C	-	Intrónica
65097339	G > A	-	Intrónica
65097631	T > G	-	Intrónica
65097633	G > A	-	Intrónica
65097635	A > T	-	Intrónica
65097719	C > T	-	Intrónica
65097785	T > G	-	Intrónica
65097811	A > C	-	Intrónica
65097821	G > C	-	Intrónica
65097828	T > G	-	Intrónica
65097866	G > A	-	Intrónica
65097869	C > T	-	Intrónica
65097946	C > T	-	Intrónica
65098833	T > A	-	Intrónica
65098964	T > C	-	Intrónica
65098977	G > A	-	Intrónica
65099094	T > C	-	Intrónica
65099116	T > C	-	Intrónica
65099342	A > G	-	Intrónica
65099457	G > C	-	Intrónica
65099496	C > T	-	Intrónica
65099501	T > G	-	Intrónica
65100606	G > A	-	3'UTR
65100627	G > A	-	3'UTR
65100668	T > G	-	3'UTR

Tabla 5.3. SNPs del gen de la PEPCK-C porcina encontrados en la base de datos.

Localizador del gen en Genbank: NC_010459.4 (65094783..65100751).

Como se puede observar en la Tabla 5.3, la mayoría de los SNP encontrados son variantes intrónicas. En concreto, se han localizado 37 nuevos SNPs intrónicos a lo largo de todo el gen de la PEPCK-C porcina. A pesar de su abundancia, rara vez (con la notable excepción de IGF2) las variantes intrónicas consiguen producir cambios en la expresión o actividad enzimática que conlleven una asociación con unos determinados caracteres fenotípicos. Las variantes neutrales desde un punto de vista evolutivo tienden a no seleccionarse positiva o negativamente, lo cual puede producir su mayor aparición en el genoma hasta que sean fijados por la deriva genética (Kimura, 1991; Durrett, 2008).

El único SNP que producía una mutación con cambio de sentido (*missense mutation*) era g.65095982G>A. Esta mutación provoca un cambio del ácido glutámico cargado negativamente por una lisina cargada positivamente en el aminoácido 123 de la PEPCK-C. Este aminoácido se encuentra situado en una α -hélice en la superficie de la enzima y alejado del centro activo (Fig. 5.1). Sin embargo, se ha demostrado que mutaciones en zonas alejadas del centro activo de la PEPCK-C son capaces de producir cambios en la actividad de la enzima. De hecho, ésta es la base misma de los fenómenos alostéricos (Núñez de Castro, 2000). Sin embargo, en la base de datos, esta mutación aparecía solamente de forma heterocigota en un jabalí europeo, lo que hizo que no profundizáramos más en su estudio.

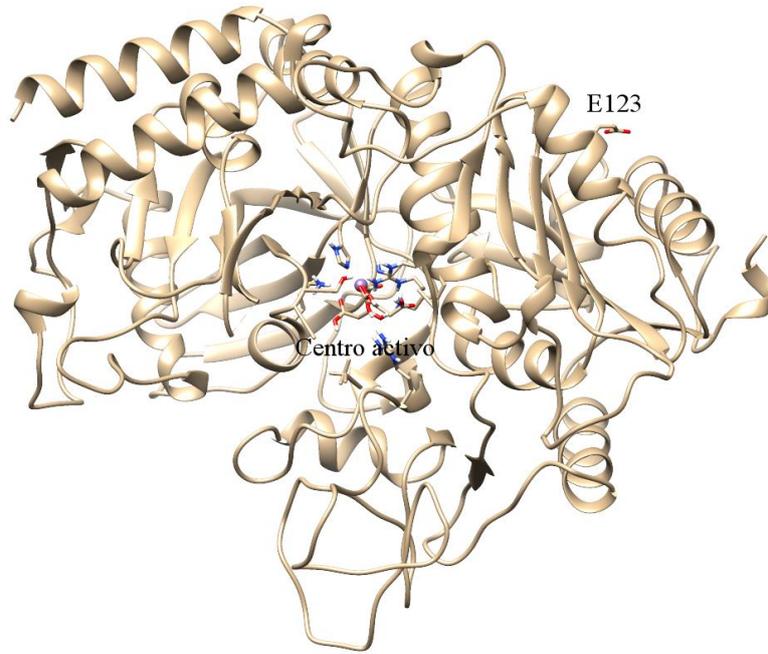


Fig. 5.1. Localización del aminoácido 123 con respecto al centro activo en la estructura de la PEPCCK-C. Para construir estas imágenes se usó la estructura de la PEPCCK-C de rata ya que no se ha conseguido cristalizar hasta la fecha la PEPCCK-C porcina (PDB: 2QF1). Las imágenes se generaron usando el software UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

En cuanto a SNPs en la región 3'UTR del gen, se encontraron 3 variantes en la base de datos. De ellos nos llamó la atención el SNP g.65100606G>A debido a la peculiar distribución entre los distintos animales de la base de datos (Tabla 5.4).

Raza	Alelos		
	GG	GA	AA
Duroc	1	6	3
Pietrain	9	1	0
Resto de razas	142	0	0

Tabla 5.4. Distribución alélica de la sustitución g.65100606G>A de la región 3'UTR de la PEPCCK-C porcina en las distintas razas de cerdos y jabalís de la base de datos.

Como se observa en la Tabla 5.4, la mutación g.65100606G>A se encuentra sobre todo en la raza Duroc, donde existen 3 animales con el alelo mutante de forma homocigota (AA), 6 animales con el alelo mutante de forma heterocigota (GA) y un animal con el alelo salvaje de forma homocigota (GG). Un animal de la raza Pietrain posee el alelo mutante de forma heterocigota y el resto de los Pietrain tienen el alelo salvaje de forma homocigota. El resto de razas de cerdos y jabalís de la base de datos poseen el alelo salvaje de forma homocigota. Conociendo el número de acceso del genoma de los cerdos Duroc de la base de datos, se ha podido averiguar que el genoma de los 10 Duroc provenía de una granja localizada en Suncheon (Corea del Sur) pero se desconoce si hay parentesco o no entre los animales (Kim *et al.*, 2015).

La presencia de esta mutación en cerdos de la raza Duroc es particularmente interesante ya que los cerdos de raza Duroc tienen tendencia a tener más GIM que otras razas empleadas en la industria cárnica española. Sabiendo que el gen de la PEPCK-C está asociado a cambios notables en el espesor de la grasa dorsal, en la grasa intramuscular y en la calidad de la carne (Latorre *et al.*, 2016), esta mutación parecía digna de ser sometida a un análisis más exhaustivo.

5.3. SNP g.65100606G>A

El SNP g.65100606G>A localizado en la región 3'UTR del gen de la PEPCK-C porcina, además de su presencia mayoritaria en cerdos de la raza Duroc, se observa que al alinear los genomas de varias especies de granja, el SNP se encuentra en una zona bastante conservada de la región 3'UTR del gen de la PEPCK-C (Fig. 5.2).

```

Cerdo      TGTAT--ATACGCGTATGTGTGCAGTGTGTGTGTGCCGACACGGTTCGTCTGCCGACGTATTT
Vaca      TGTATATATGTGTGTGTGCACATGCGTGTGTGTCTGTGTACTGTTCGTCTAAAACGTATTT
Oveja     TGTATATATGTGTGTGTGCACACGCGTGTGTGTCTGTGTACTGTTCGTCTAAAACGTATTT
          ***** ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Cerdo      AACACCTTTGGAAAAATCTTGGGCGAGATTA-CTGCTAGTTGTTGCTAGAAAAGTCATGTG
Vaca      AATGACTTTGGAAAAATCTTGGGCAAGATTACCTCCTAGTTGTTGCTAGAATGCAATGTT
Oveja     AATGACTTTGGAAAAATCTTGGGCAAGATTACCT---AGTTGTTGCTAGAATGCAATGTT
          ** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Cerdo      GCTTTGTCATTAAACACGTGTGTTTAAATTATTTTTATATACTGTGGTTCCTGCCTTTAC
Vaca      GCTTTCTTATTAATATGTGTGTTTAAATTATTTTTATATAACCATGGTTCCTTACCTTTAC
Oveja     GCTTTCTTATTAATATGTGTGTTTAAATTATTTTTATATAACCATGGTTCCTTACCTTTAC
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Fig. 5.2. Alineamiento de los genomas de cerdo, vaca y oveja en los alrededores del SNP g.65100606G>A en la región 3'UTR del gen de la PEPCK-C. Los genomas de cerdo(NC_010459.4(65094783..65100751)),vaca (AC_000170.1(59144588..59150714)) y oveja (NC_019470.2 (57807668..57813864)) se obtuvieron de GenBank. El alineamiento de los genomas se realizó con el software Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

La presencia de zonas de un gen que se mantienen bien conservadas entre especies alejadas filogenéticamente indica que la selección natural las ha preservado por su importancia biológica. Por ello, la presencia de mutaciones en zonas que están relativamente bien conservadas entre especies es indicativa de la posible aparición de cambios en la actividad o en la expresión de la proteína.

En el caso de la región 3'UTR, la existencia de una zona conservada entre especies alejadas filogenéticamente puede indicar la unión de un miRNA que modifique la expresión o la estabilidad del mRNA. Para evaluar la posible unión de miRNA a las proximidades del SNP g.65100606G>A se usó el software Targetscan (www.targetscan.org/), mediante el cual se compara la secuencia alrededor del SNP de la región 3'UTR de la PEPCK-C porcina con la base de datos de miRNA del programa (bovino en este caso ya que no tienen base de datos porcina). Los resultados del análisis con TargetScan se muestran en la Fig. 5.3.

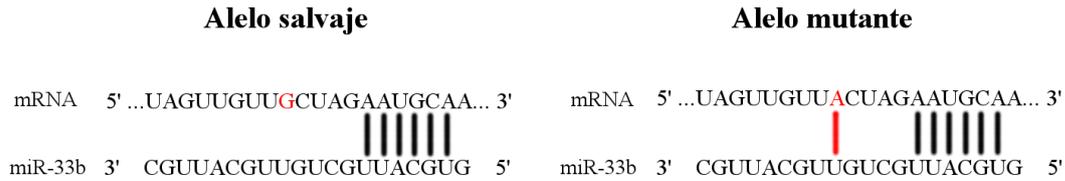


Fig. 5.3. Unión del miR-33b al mRNA alrededor de la sustitución g.65100606G>A.

En rojo aparece señalada el nucleótido responsable del SNP y el nuevo posible enlace que se formaría entre el alelo mutante y el miR-33b.

Los resultados del análisis con Targetscan mostraban que el miRNA-33b (miR-33b) se une en las proximidades de la sustitución g.65100606G>A en el mRNA de la PEPCK-C. Como se observa en la Fig. 5.3, parte del miR-33b establece seis uniones con los nucleótidos complementarios del mRNA salvaje. Al cambiar una G por una A en el alelo mutante se establece una nueva unión entre el miR-33b y el mRNA de la PEPCK-C. Esta nueva unión con el alelo mutante podría causar que la unión entre mRNA y miR-33b fuese más intensa que con el alelo salvaje. La aparición de huecos en las zonas de unión entre miRNA y mRNA (*missmatches*) es muy común en células animales (Brennecke *et al.*, 2005).

El miR-33b es, entre otras cosas, un conocido regulador del metabolismo de la glucosa al dirigirse contra la glucosa-6-fosfatasa y contra la PEPCK-C. La sobreexpresión de miR-33b en células hepáticas humanas produce una reducción significativa de la producción de glucosa y disminuye la expresión de la glucosa-6-fosfatasa y de la PEPCK-C (Ramírez *et al.*, 2013). Por tanto, el SNP g.65100606G>A que afecta a la región 3'UTR del gen de la PEPCK-C tiene el potencial de modificar la expresión o la estabilidad del mRNA de la PEPCK-C y así afectar al metabolismo de la glucosa y ácidos grasos pudiendo provocar cambios fenotípicos en los cerdos.

5.4. Caracterización del SNP g.65100606G>A en una población de cerdos y estudio de asociación

Debido a la potencial importancia del SNP g.65100606G>A de la región 3'UTR del gen de la PEPCK-C porcina, se decidió estudiar las frecuencias alélicas en una población porcina y, si se diera el caso de que hubiera suficiente variabilidad, realizar un estudio de asociación con caracteres fenotípicos de interés. Para ello se utilizó una población de 202 cerdos Duroc x Landrace/Large White previamente caracterizada en Burgos *et al.* (2012). Los resultados de la detección de los alelos por PCR en tiempo real (RT-PCR) pueden observarse en la Fig. 5.4.

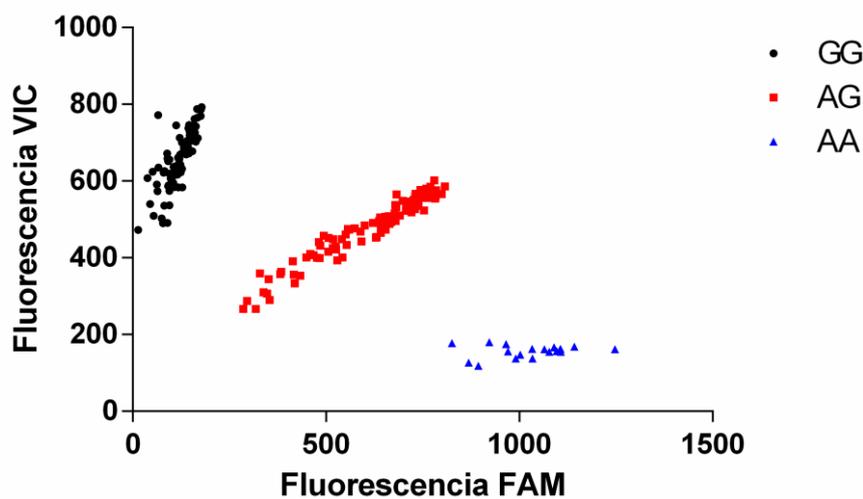


Fig. 5.4. Gráfico del ensayo de RT-PCR para discriminar alelos del SNP g.65100606G>A de la región 3'UTR del gen de la PEPCK-C porcina.

Como se puede observar en la Fig. 3.4, el ensayo por RT-PCR permite discriminar perfectamente entre los tres genotipos ya que las nubes de puntos se diferencian perfectamente entre ellas. De los 202 cerdos, se determinó que 82 animales tenían el genotipo GG, 100 el genotipo AG y 20 el genotipo AA. Así, en esta población el alelo G o salvaje tenía una frecuencia génica de 0,65 y el alelo A o mutante de 0,35. La existencia de pocos cerdos con genotipo AA no es sorprendente ya que estos cerdos Duroc x

Landrace/Large White sólo tienen padre Duroc y como se puede observar en la Tabla 5.3, es una mutación que aparece casi exclusivamente en esta raza de cerdo.

La existencia de suficientes animales de los tres genotipos permitió llevar a cabo un estudio de asociación mediante el cual se intentaría comprobar si el SNP g.65100606G>A estaba asociado a 55 caracteres fenotípicos habituales de calidad de la carne como el contenido de grasa intramuscular, el espesor de la grasa dorsal, la exudación o el pH₂₄. Sin embargo, al realizar el estudio de asociación se observó que ninguno de los múltiples caracteres fenotípicos estaba asociado positiva o negativamente con el SNP g.65100606G>A de la región 3'UTR del gen de la PEPCK-C porcina (Tabla 5.5). Por tanto, aunque prometedor, este SNP no ha demostrado ser capaz de producir ninguna variación fenotípica, al menos en la población estudiada.

Carácter	Media ± DE	Efecto de la sustitución y (PSD)	Significación
Espesor grasa dorsal (mm)	19,90 ± 5,73	-0,286 (0,610)	<i>nr</i>
GIM lomo (%)	2,66 ± 0,95	0,125 (0,107)	<i>nr</i>
SAFA lomo (%)	37,86 ± 2,44	-0,050 (0,298)	<i>nr</i>
MUFA lomo (%)	51,31 ± 2,85	-0,197 (0,362)	<i>nr</i>
PUFA lomo (%)	10,83 ± 3,16	-0,138 (0,373)	<i>nr</i>
Rendimiento de la canal (%)	78,05 ± 3,22	-0,139 (0,391)	<i>nr</i>
pH ₂₄	5,64 ± 0,15	-0,026 (0,021)	<i>nr</i>
Exudación	4,25 ± 1,90	-0,038 (0,225)	<i>nr</i>

Tabla 5.5. Resultados del estudio de asociación para los caracteres de calidad de la carne más importantes. DE: Desviación estándar. PSD: Desviación estándar posterior. *nr*: no relevante.

VI. Discusión general

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PEPCK-C) es un enzima clave en la regulación de procesos metabólicos importantes como la gluconeogénesis y la gliceroneogénesis. Cataliza la transformación de OAA en PEP con gasto de GTP y la reacción reversa de transformación de PEP a OAA con formación de GTP. También participa en la síntesis de serina y los procesos de entrada y salida de intermediarios del ciclo del ácido cítrico (cataplerosis y anaplerosis) (Yang, Kalhan y Hanson, 2009)

En el ganado porcino la expresión de la PEPCK-C está asociada al incremento de la grasa intramuscular (GIM) en el cerdo (W. Wang *et al.*, 2013). La GIM es uno de los principales parámetros de calidad en la industria cárnica (Fernandez *et al.*, 1999). Sin embargo, la demanda de los consumidores de una carne más magra ha conducido a la selección basado en el espesor de la grasa dorsal lo que ha provocado un descenso de la GIM por la correlación genética positiva (alrededor de 0,6-0,7) entre ambos caracteres. Sin embargo, hay genes como IGF2 en los que un mismo alelo es capaz de aumentar el contenido de GIM a la vez que disminuye el espesor de la grasa dorsal. Este tipo de genes tienen un gran interés para la industria porque tienen el potencial de mejorar la calidad de la carne sin empeorar la calidad de la canal y por lo tanto sin empeorar la economía de la producción cárnica.

En la búsqueda de este tipo de genes hemos encontrado un SNP en el gen de la PEPCK-C porcina que estaba asociado a un fenotipo similar al descrito para IGF2 pero que a su vez estaba asociado también a una mejora de la capacidad de retención de agua de la carne. La mutación producía la sustitución en el aminoácido 139 de la proteína. Esta sustitución provocaba cambios cinéticos y de estabilidad de la enzima que probablemente producían los cambios fenotípicos anteriores (Latorre *et al.*, 2016). A la luz de estos resultados, parece claro que la actividad PEPCK-C en el cerdo es relevante para determinar la calidad de la carne.

Tradicionalmente se ha pensado que la regulación *in vivo* de la actividad PEPCK-C se producía fundamentalmente a nivel transcripcional. Sin embargo, hace pocos años se ha descrito el control de la misma por acetilación post-traducciona, a la que se le ha atribuido sobre todo un papel regulador de la estabilidad de la enzima. Muy recientemente se ha comprobado que la acetilación participa también en la regulación *in vivo* del sentido de la reacción que cataliza la PEPCK-C (Latorre *et al.*, 2018), algo que ya había sido sugerido por el grupo de Hanson (Hakimi *et al.*, 2005, 2007) pero sin aportar evidencias experimentales de ello.

El objetivo de esta tesis es profundizar en el estudio de la regulación de la actividad PEPCK-C para lo que hemos hecho experimentos a distintos niveles: buscando efectores alostéricos de la actividad, generando mutantes con la actividad modificada y estudiando las regiones reguladoras del gen, tanto el promotor, como los intrones y la región 3'UTR.

La primera forma de regulación estudiada fue la búsqueda de nuevos efectores de la PEPCK-C. Se han descrito varios efectores de la PEPCK-C, que son básicamente inhibidores (Robinson y Oei, 1975; Foley *et al.*, 2003; Stiffin *et al.*, 2008), pero ninguno tiene relevancia *in vivo*, por lo que la búsqueda de nuevos efectores podría tener bastante interés. Debido a que los efectos fenotípicos interesantes estaban asociados a la isoforma que tenía una mayor actividad, teníamos la esperanza de encontrar activadores de la PEPCK-C. Sin embargo, al realizar la búsqueda en una librería de 10.000 compuestos, sólo hemos localizado dos nuevos inhibidores de la PEPCK-C, nombrados compuesto 1 y 2. La importancia de la regulación de la actividad de la PEPCK-C nos llevó a estudiar la cinética de la inhibición con estos compuestos y a compararla con la de un inhibidor bien conocido, el 3-MP. Además, los estudios de inhibición nos permitieron profundizar en el estudio de las diferencias bioquímicas entre las dos isoformas de PEPCK-C porcina que habíamos descubierto.

De los inhibidores encontrados, el compuesto 2 es el que ha resultado ser un inhibidor más potente (IC_{50} menor), mientras que el compuesto 1 es el que menos. Los valores de IC_{50} del compuesto 1 y 2 son bastante bajos, por lo que podrían utilizarse potencialmente como inhibidores *in vivo*. Sin embargo, tanto el compuesto 1 como el compuesto 2 son bastante insolubles en medio acuoso y presentan cierta inespecificidad, pero la importancia de la modulación de la actividad de la PEPCK-C hace que estos inhibidores sean unos buenos candidatos para ser modificados por químicos orgánicos en el futuro con el fin de estudiarlos más en profundidad y mejorar sus características.

Al realizar los estudios de inhibición con los compuestos 1 y 2 se observó que el compuesto 1 disminuía los valores de V_{max} pero mantenía los de K_m , actuando así como inhibidor no competitivo puro. El compuesto 2 disminuía los valores de V_{max} y K_m , actuando así como inhibidor no competitivo puro. Estos tipos de inhibición sugieren que los sitios de unión del compuesto 1 y 2 son diferentes a los sitios de unión del 3-MP. En cuanto a las diferencias entre isoenzimas porcinas, al usar el compuesto 1 no se observan diferencias entre isoenzimas. Sin embargo, con el compuesto 2 y usando OAA como sustrato variable, los efectos sobre los valores de V_{max} fueron significativamente distintos

(4,6 y 12,7 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) entre la isoenzima p.139Met y la p.139Leu. Esta diferencia significativa muestra que la isoforma p.139Met es más sensible al compuesto 2 que la isoforma p.139Leu. Las mayores diferencias se encontraron al usar GTP como sustrato variable donde el valor de K_m (276 y 69 μM) es significativamente diferente ($p < 0,001$) entre ambas isoenzimas.

Cuando se comparó el efecto del 3-MP sobre los dos isoenzimas se volvió a encontrar que las diferencias cinéticas más grandes aparecían al usar el nucleótido GTP, al igual que sucedía en el estudio cinético de Latorre *et al.* (2016) en ausencia de inhibidores. Cuando estudiamos los patrones de inhibición producidos por el 3-MP encontramos que al usar los nucleótidos como sustratos variables se producía una inhibición acompetitiva, que es bastante inusual. La inhibición acompetitiva se caracteriza porque el inhibidor sólo es capaz de unirse al complejo enzima-sustrato y nunca al enzima por sí mismo, es decir que la unión del sustrato hace accesible el sitio de unión del inhibidor (Núñez de Castro, 2000). Balan *et al.* (2015), al estudiar la inhibición de 3-MP sobre la PEPCK-C de rata, observaron también inhibición acompetitiva al realizar los estudios cinéticos. Sin embargo, al cristalizar la PEPCK-C de rata en presencia del 3-MP descubrieron la existencia de dos sitios de unión de este ligando. Uno de ellos era responsable del componente competitivo observado en los experimentos cinéticos ya que interfiere con la unión de los sustratos y el otro sitio de unión era responsable del comportamiento no competitivo observado en los experimentos cinéticos ya que se encuentra en una zona alejada del centro activo. Estos datos estructurales no son compatibles con la existencia de una inhibición acompetitiva al usar nucleótidos como sustrato variable ya que este tipo de inhibición requiere que los sitios de unión de los sustratos y del inhibidor sean independientes o diferentes entre sí (Copeland, 2000). Balan *et al.* (2015) intentan explicar la diferencia entre los resultados estructurales y cinéticos argumentando que el GTP se une más fuertemente al complejo enzima-inhibidor que al complejo enzima-OAA, lo cual produce una bajada aparente del valor de K_m , y que hay una comunicación física entre el sitio de inhibición alostérico y el centro activo. Los resultados de inhibición no competitiva mixta encontrados en nuestros experimentos al usar OAA o PEP como sustrato variable son consistentes con el modelo de inhibición propuesto por Balan *et al.* (2015) de la existencia de un sitio de unión del 3-MP no competitivo y de otro competitivo.

Mediante el uso del dicroísmo circular se pudo comprobar que tanto el 3-MP como el

compuesto 2 se unían claramente al enzima. Los resultados obtenidos mediante ITC concuerdan con los obtenidos en los experimentos cinéticos. Los valores de K_d en el caso del compuesto 2 son siempre más bajos que los obtenidos para el 3-MP, lo cual concuerda con la mayor capacidad inhibitoria del compuesto 2 con respecto al 3-MP. La adición de GTP en todos los casos aumenta los valores de K_d , por lo que se reduce la afinidad del inhibidor por la proteína cuando el sitio de unión de nucleótidos está ocupado por el GTP. Además se observan diferencias entre ambos isoenzimas: por ejemplo la K_d del 3-MP en presencia de GTP es mucho más alta para la p.139Leu (39 μ M) que para la p.139Met (19 μ M), un resultado que concuerda con las cinéticas de inhibición donde la K_i de la p.139Leu era mucho más alta que la del otro isoenzima.

Por tanto, a la vista de los experimentos cinéticos y los de ITC, se puede afirmar que, como se intuía en Latorre *et al.* (2016), la sustitución M139Leu aunque se encuentra bastante alejada del centro activo afecta al sitio de unión de los nucleótidos, modificando así la actividad de la enzima y provocando probablemente la serie de cambios fenotípicos en el cerdo descritos con anterioridad.

Debido a la imposibilidad de cristalizar la PEPCK-C porcina se decidió simular *in silico* mediante docking la unión del compuesto 1 y 2 al enzima. Observando las moléculas de los inhibidores se puede apreciar una cierta semejanza estructural entre ellas ya que tienen un peso molecular similar y comparten grupos como el tiofeno. Esto tiene relevancia en el docking ya que ambos compuestos establecen puentes de hidrógeno con el enzima mediante este último grupo. El grupo tiofeno aparece en multitud de fármacos utilizados actualmente para diversas dolencias (Dalvie *et al.*, 2002; Kamboj y Randhawa, 2012). Sin embargo el sitio de unión de los dos inhibidores es distinto; el compuesto 1 tiene un sitio de unión alejado del centro activo de la enzima, lo cual concuerda con el tipo de inhibición no competitiva pura que posee y, en cambio, el compuesto 2 se une en una zona muy cercana al centro activo actuando así como un inhibidor no competitivo mixto. En los experimentos de ITC se estableció que el compuesto 2 tiene un solo sitio de unión al enzima. El sitio de unión del compuesto 2 está muy cercano al bucle R de la enzima, que va desde el aminoácido 85 al 92. El bucle R se encuentra implicado en la unión del OAA al enzima, por lo que cualquier interferencia con su normal funcionamiento resultará en una pérdida de la actividad catalítica de la enzima (Carlson y Holyoak, 2009; Johnson y Holyoak, 2010). El conocimiento de sus posibles sitios de unión es útil para que en el futuro se puedan realizar modificaciones racionales en la estructura química de los

inhibidores con el fin de hacerlos más solubles y útiles.

La PEPCK-C puede, como todos los enzimas, catalizar la reacción en los dos sentidos. *In vivo*, uno de los sentidos, el de síntesis de PEP, tiene efectos gluconeogénicos, gliceroneogénicos y catapleróticos, es decir, que retira intermediarios del ciclo del ácido cítrico y es el predominante. El otro sentido de la reacción, la síntesis de OAA, es anaplerótico ya que introduce intermediarios en el ciclo del ácido cítrico. El balance metabólico *in vivo* entre ambas reacciones era desconocido hasta fechas muy recientes. Latorre *et al.* (2018) demostraron que, dependiendo del estado metabólico de la célula, la PEPCK-C era modulada para que catalizara una reacción o la otra. Así, cuando hay niveles altos de glucosa, la PEPCK-C es acetilada por la acetilasa p300 y su actividad anaplerótica se ve aumentada para que pueda reponer los intermediarios del ciclo del ácido cítrico que se están movilizandofuera del ciclo para reaccionar a las altas demandas de biosíntesis. Cuando los altos niveles de glucosa disminuyen, la sirtuina 1 deacetila la PEPCK-C y vuelve a ser predominantemente una enzima cataplerótica que retira intermediarios del ciclo del ácido cítrico.

La existencia de un balance entre ambos sentidos de la reacción se ha observado también en las isoformas 139Met y 139Leu de la PEPCK-C porcina (Latorre *et al.*, 2016). La isoforma 139Met posee una mayor actividad de formación de PEP o cataplerótica, lo cual está asociado fenotípicamente en el cerdo a una mayor cantidad de grasa intramuscular, una menor cantidad de grasa dorsal y un aumento de la calidad de la carne. Por lo tanto, la regulación de ambos sentidos de la reacción, no tiene implicaciones sólo en la ciencia básica sino que también podría ser relevante para la ciencia de la carne.

A pesar de la importancia de las actividades cataplerótica y anaplerótica y de cómo interactúan entre sí, no se conoce bien como modularlas y tampoco existen modelos adecuados para estudiar estos procesos. Es por ello que en esta tesis se describen dos nuevos mutantes de la PEPCK-C, cada uno de ellos con una sola de las actividades fuertemente inhibida (bien la síntesis de PEP, bien la síntesis de OAA) y la otra sin modificaciones sustanciales, con el fin de que se puedan usar para el estudio de la regulación *in vivo* de ambas reacciones.

El descubrimiento de la isoforma pentamutante fue casual. Durante el estudio de la PEPCK-C p.M139L, una polimerasa defectuosa introdujo cuatro mutaciones más al azar formando el pentamutante (p.V85A-F130L-M139L-G185R-K510R). La pentamutante

tenía un comportamiento cinético peculiar porque la velocidad de la reacción de síntesis de PEP era un 85% inferior que la PEPCK-C WT, mientras que la reacción de síntesis de OAA permanecía prácticamente inalteradas (ver tabla 4.1). Teniendo un mutante de la PEPCK-C creado con un sentido de la reacción inhibido se decidió crear el mutante opuesto. Para ello, sabiendo que el aminoácido Y235 se une exclusivamente al CO₂ (que sólo es sustrato en uno de los sentidos) y que facilita la interacción entre el PEP y el GDP mediante su grupo hidroxilo de la cadena lateral (Holyoak, Sullivan y Nowak, 2006; Dharmarajan *et al.*, 2008), se decidió crear el mutante Y235F (cambio de tirosina a fenilalanina) en el cual se elimina el grupo hidroxilo del anillo aromático de la cadena lateral del aminoácido. Al analizar la cinética de esta isoforma Y235F se vio que efectivamente la velocidad de reacción de síntesis de OAA se inhibía en un 95% mientras que la reacción reversa se mantenía prácticamente igual.

El mecanismo de la mutación Y235F es por lo tanto bastante claro. Sin embargo, debido a la complejidad de un sistema que posee cinco mutaciones, se decidió estudiar en mayor profundidad las características bioquímicas de la pentamutante. Los experimentos de dicroísmo circular muestran que las mutaciones de la pentamutante no cambian la estructura secundaria de la proteína con respecto a la isoforma WT. En cuanto a la estructura terciaria, se observa que la adición de nucleótidos al enzima modifica claramente la forma de la gráfica de CD entre los 250-280 nm, lo cual puede ser producido por cambios en la proximidad de una fenilalanina (Kelly, Jess y Price, 2005); en las proximidades del sitio de unión de los nucleótidos se encuentran tres fenilalaninas (F517, F525 y F530) (Carlson y Holyoak, 2009). Al realizar los experimentos de inhibición con ácido 3-mercaptopicolínico se observaron diferencias entre la WT y la pentamutante cuando se usaban PEP o GDP como sustratos variables. Estas diferencias se pueden atribuir al sitio de unión competitivo que se encuentra en el centro activo de la enzima ya que son bastante semejantes a las obtenidas por Balan *et al.* (2015) y no al segundo sitio de unión no competitivo. De todas las mutaciones de la pentamutante, la V85A es la que se encuentra más cercana al centro activo ya que se encuentra en el bucle R que participa en la actividad catalítica de la enzima (Johnson, Mcleod y Holyoak, 2016) y por tanto, según los datos de los experimentos de inhibición debería ser la que mayor influencia tuviera en los cambios cinéticos de la pentamutante.

Para determinar con exactitud que aminoácido de la pentamutante era el causante de los cambios cinéticos que se observan en esta isoforma se decidió estudiar cada mutación

individualmente. La isoforma p.V85A es un intermedio cinético entre WT y pentamutante (Tabla 4.4), ya que sus valores de k_{cat} en el sentido de síntesis de PEP ($\approx 20 \text{ s}^{-1}$) no son tan bajas como las de pentamutante ($\approx 6 \text{ s}^{-1}$) pero sí que son algo inferiores a las de WT ($\approx 40 \text{ s}^{-1}$). Esta sustitución no produce ningún cambio en la estructura secundaria pero los experimentos de CD cercano muestran un cambio en la estructura terciaria de la isoforma con una elipticidad más baja sobre 250-280 nm, lo cual se corresponde con los picos producidos por fenilalanina y tirosina (Fig. 4.8). El aminoácido V85 se encuentra en el bucle R, uno de los bucles móviles que participan en la catálisis y está muy cercano (5 Å) al aminoácido Y235 del centro activo. El bucle R, en presencia de OAA o PEP estabiliza la forma cerrada del bucle Ω , facilitando la función catalítica de la PEPCK-C (Johnson, Mcleod y Holyoak, 2016). La alanina y la valina son ambos aminoácidos hidrofóbicos pero la alanina tiene dos grupos metil menos en su estructura. Esta diferencia sutil en una zona cerca del centro activo podría ser capaz de producir las diferencias observadas en la isoforma p.V85A.

La isoforma p.M139L ha sido anteriormente descrita en Latorre *et al.* (2016) y en capítulos anteriores y no es la causante del comportamiento cinético de la pentamutante. El aminoácido F130 se encuentra bastante cercano (8 Å) al aminoácido M139 pero lejos del centro activo. La sustitución F130L cinéticamente es más similar a la WT que a la pentamutante. En cuanto a la estructura, esta sustitución produce cambios intensos en la estructura secundaria y cambios más sutiles en la estructura terciaria. El grupo de la cadena lateral del aminoácido F130 se encuentra entre dos láminas β paralelas, por lo que la sustitución F130L es probable que produzca un cambio en esas láminas β y sea ésto lo que se observa en los experimentos de CD lejano. La unión de los nucleótidos a la isoforma p.F130L modifica sustancialmente la estructura secundaria y terciaria, al igual que sucedía con la M139L, por lo que es bastante probable que el aminoácido F130 afecte al sitio de unión de los nucleótidos tal y como hace el aminoácido M139, aunque ambos se encuentren alejados del centro activo.

Los aminoácidos G185 y K510 se encuentran ambos en la superficie de la enzima. A pesar de numerosos intentos no ha sido posible expresar la isoforma G185R. La sustitución del aminoácido más pequeño y sin carga (glicina) por uno de los más grandes y con carga positiva (arginina) probablemente causa una gran perturbación en la estructura global de la enzima, impidiendo su correcta expresión. El que aparezca en pentamutante probablemente sea debido a que cambie la estructura de la enzima y la

perturbación de la sustitución G185R sea menor. K510 no es una de las lisinas susceptibles a ser acetilada (Lin *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010) y la lisina y la arginina son aminoácidos similares estructuralmente, por lo que no es sorprendente que la sustitución K510R no produzca ningún efecto cinético.

Debido a que ninguno de los aminoácidos por sí solos era capaz de producir los efectos de pentamutante se decidió analizar dobles mutantes. Como se puede observar en la Tabla 4.5 ninguno de los dobles mutantes es capaz de reproducir el comportamiento cinético de la pentamutante, siendo la isoforma p.V85A-F130L la que más se acerca, con una k_{cat} de alrededor de 7 s^{-1} para la isoforma pentamutante y de 13 s^{-1} para la p.V85A-F130L. Probablemente el comportamiento cinético de la pentamutante sea producido por una compleja sinergia entre tres o más mutaciones. Se decidió por ello mantener a pentamutante e Y235F como las mutaciones de elección para estudiar la importancia *in vivo* y la regulación entre ellas de las actividades cataplerótica y anaplerótica catalizadas por la PEPCK-C.

Se estudió si las isoformas pentamutante e Y235F podían usarse en experimentos *in vivo*. Para ello se sobreexpresaron ambas por separado en células HEK293T y se analizó su estabilidad tras inhibir la síntesis de proteínas con cicloheximida. Como se puede observar en la Fig. 4.11, al pasar 8 horas en las que no se sintetizó ninguna nueva molécula de enzima, aún quedaba más del 50% de ambas isoformas sin degradar. Este resultado muestra la adecuación del uso de estas isoformas en futuros experimentos. Tanto la isoforma pentamutante como la Y235F podrían usarse como modelos en células *in vivo* para estudiar la importancia relativa de las actividades cataplerótica y anaplerótica por separado mediante estudios metabólicos. Otra posible aplicación de estas isoformas en un futuro sería su introducción en el genoma de cerdos para el estudio de cómo las actividades de PEPCK-C influyen en los caracteres fenotípicos de interés alimentario como la cantidad de grasa intramuscular, el espesor de grasa dorsal o la calidad de la carne. La relevancia de esto último se refuerza con la publicación reciente de la sobreexpresión de PEPCK-C en cerdos y de los efectos de ésta sobre la cantidad de GIM (Ren *et al.*, 2017).

La búsqueda de nuevos SNPs en las regiones reguladoras del gen que pudieran modular su expresión fue el tercer enfoque de este trabajo. En primer lugar se secuenció el promotor de la PEPCK-C de 9 cerdos de una raza con poca grasa (Piétrain), de 9 cerdos de una raza con mucha grasa (Ibérica) y 9 cerdos de un cruce de fenotipo intermedio

(Duroc x Landrace/Large White). Se encontraron 21 nuevos SNPs en el promotor que aparecían en las razas Piétrain y/o Duroc x Landrace/Large White (Tabla 5.1). Sin embargo, la mayoría de estos SNPs aparecen en heterocigosis y en pocos animales. Al analizar los sitios de unión de factores de transcripción a los que afectan estos SNPs destacaron 3; 2 de ellos afectan a sitios de unión que forman parte de una región regulatoria de respuesta a los glucocorticoides (GR1 y AF3) y el otro afecta al sitio de unión de CRE donde se une el AMPc para regular la expresión de la PEPCK-C.

En cuanto a los intrones y la región 3'UTR, se realizó una búsqueda en una base de datos de genomas de cerdo y jabalí con razas de procedencia muy diversa a lo largo de todo el mundo (Tabla 5.1) y se encontraron 41 SNPs (Tabla 5.2). De ellos, 37 eran variantes intrónicas, las cuales a pesar de que están empezando a ser estudiados en la actualidad debido a que pueden inducir la aparición de *splicings* alternativos (Wang y Cooper, 2007; Cooper, 2010), es probable que simplemente sean variantes neutrales que al no verse sometidas a la presión de selección se mantienen en el genoma hasta que son fijadas por la deriva génica (Durret, 2008). El resto de SNP son tres en la región 3'UTR y una mutación con cambio de sentido (E123K). La mutación con cambio de sentido produce un cambio de aminoácido grande, por lo que no es descartable que pudiera tener consecuencias sobre la actividad de la enzima. Sin embargo, el que se encontrara sólo de forma heterocigota y en un jabalí salvaje europeo hizo que no la estudiáramos en profundidad.

Entre los SNPs de la región 3'UTR, el g.65100606G>A tiene una distribución peculiar ya que aparece casi exclusivamente en la raza Duroc (Tabla 5.3). Esta raza es utilizada en la industria porcina española debido a que aporta una mayor cantidad de grasa intramuscular que otras razas más magras como la Pietrain. Este SNP parecía *a priori* un buen candidato para producir cambios fenotípicos en el cerdo ya que aparecía en una zona bastante conservada entre especies del genoma (Fig. 5.2) porque se encontraba en la zona de unión del miR-33b, un miRNA que controla el metabolismo de la glucosa (Ramírez *et al.*, 2013). Al analizar su distribución alélica se observaba la presencia de los tres genotipos en la población estudiada. Sin embargo, al realizar el estudio de asociación entre el SNP y numerosos caracteres fenotípicos de interés se observó que no había ninguna asociación. Este resultado, aunque decepcionante, muestra la complejidad inherente al trabajo con muestras biológicas y describe un SNP que se encuentra en poblaciones actuales de cerdos utilizados en la industria porcina. Este SNP no produce

ningún cambio en los caracteres estudiados, lo cual no implica que pueda producir cambios en otros caracteres que lo hagan favorable a la selección, aunque lo más probable es que sea una mutación neutral desde el punto de vista evolutivo y que con el paso del tiempo acabe fijándose en las poblaciones Duroc uno de los alelos por deriva génica.

VII. Conclusiones

- 1) Se han descubierto y caracterizado dos nuevos inhibidores no competitivos de la PEPCK-C.
- 2) El estudio de la inhibición con 3-MP y los dos nuevos inhibidores con las isoformas de la PEPCK-C porcina ha mostrado que la sustitución en el aminoácido 139 que aparece en poblaciones porcinas industriales afecta al sitio de unión de los nucleótidos.
- 3) Se han generado dos isoformas de la PEPCK-C porcina (pentamutante y p.Y235F), cada una de ellas con un sentido de la reacción fuertemente inhibido y el opuesto sin modificaciones sustanciales.
- 4) El análisis cinético de los mutantes individuales de la isoforma pentamutante y de los dobles mutantes ha mostrado que el fenotipo cinético de la forma pentamutante es el producto complejo de más de dos mutaciones individuales.
- 5) Pentamutante y p.Y235F son bastante estables *in vivo* por lo que podrían utilizarse para estudiar cómo las diferentes actividades de la enzima modifican los caracteres de calidad de la carne de cerdo.
- 6) Se han detectado 62 nuevos SNPs en las regiones reguladoras del gen de la PEPCK-C porcina.
- 7) Entre ellos destaca un SNP en la región 3'UTR que tenía interés por aparecer en cerdos Duroc y estar en el sitio de unión del miR-33b implicado en la regulación del metabolismo de la glucosa
- 8) Sin embargo, no se encontró asociación entre este SNP y las características fenotípicas de la calidad de la carne de cerdo.

Bibliografía

- Adzitey, F. y Nurul, H. (2011) 'Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: causes and measures to reduce these incidences - a mini review', *International Food Research Journal*, 18, pp. 11–20.
- Apple, J. K. *et al.* (2000) 'Effect of magnesium mica on performance and carcass quality of growing-finishing swine', *Journal of Animal Science*, 78(8), pp. 2135–2143.
- Apple, J. K. *et al.* (2004) 'Effect of supplemental manganese on performance and carcass characteristics of growing-finishing swine', *Journal of Animal Science*, 82(11), pp. 3267–3276.
- Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España (2017) *Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España*. Available at: <http://www.anice.es/>.
- Ayuso, M., Óvilo, C., *et al.* (2015) 'Dietary vitamin A restriction affects adipocyte differentiation and fatty acid composition of intramuscular fat un Iberian pigs', *Meat Science*, 108, pp. 9–16.
- Ayuso, M., Fernández, A., *et al.* (2015) 'Long term vitamin A restriction improves meat quality parameters and modifies gene expression in Iberian pigs', *Journal of Animal Science*, 93, pp. 2730–2744.
- Balan, M. D. *et al.* (2015) 'Inhibition and allosteric regulation of monomeric phosphoenolpyruvate carboxykinase by 3-mercaptopycolinic acid', *Biochemistry*, 54, pp. 5878–5887.
- Balmer, J. E. y Blomhoff, R. (2002) 'Gene expression regulation by retinoic acid', *Journal of Lipid Research*, 43(11), pp. 1773–1808.
- Barbut, S. *et al.* (2008) 'Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat', *Meat Science*, 79(1), pp. 46–63.
- Barnes, K. M. *et al.* (2012) 'Effect of dietary conjugated linoleic acid on marbling and intramuscular adipocytes in pork', *Journal of Animal Science*, 90(4), pp. 1142–1149.
- Bartz, M. *et al.* (2013) 'Transcript level of the porcine ME1 gene is affected by SNP in its 3'UTR, which is also associated with subcutaneous fat thickness', *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 131, pp. 271–278.
- Beale, E. G., Harvey, B. J. y Forest, C. (2007) 'PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes', *Cell Biochemistry and Biophysics*, 48(2–3), pp. 89–95.
- Belitz, H. D., Grosch, W. y Schieberle, P. (2012) *Química de los alimentos*. 3ª edición. Editorial Acribia.
- Bentwich, I. *et al.* (2005) 'Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs', *Nature Genetics*, 37, pp. 766–770.
- Benvenisty, N. *et al.* (1985) 'Sequential changes in DNA methylation patterns of the rat phosphoenolpyruvate carboxykinase gene during development', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(2), pp. 267–271.
- Bertol, T. M. *et al.* (2013) 'Effects of genotype and dietary oil supplementation on performance, carcass traits, pork quality and fatty acid composition of backfat and intramuscular fat', *Meat Science*, 93(3), pp. 507–516.
- Bian, X.-L. *et al.* (2017) 'Nur77 suppresses hepatocellular carcinoma via switching glucose metabolism toward gluconeogenesis through attenuating phosphoenolpyruvate carboxykinase

- sumoylation', *Nature Communications*, 8(14420).
- Bickel, P. E., Tansey, J. T. y Welte, M. A. (2009) 'PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores', *Biochimica et Biophysica Acta*, 6, pp. 419–440.
- Biegging, K. T., Spano Mello, S. y Attardi, L. D. (2014) 'Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression', *Nature Reviews Cancer*, 14, pp. 359–370.
- Blanchard, P. J. *et al.* (1999) 'The influence of the proportion of Duroc genes on growth, carcass and pork eating quality characteristics', *Animal Science*, 68, pp. 495–501.
- Brasaemle, D. L. *et al.* (1997) 'Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein', *Journal of Lipid Research*, 38, pp. 2249–2263.
- Brennecke, J. *et al.* (2005) 'Principles of MicroRNA–Target Recognition', *PLoS Biology*, 3(3), p. e85.
- Brooks, C. C. (1967) 'Effect of Sex, Soybean Oil, Bagasse and Molasses on Carcass Composition and Composition of Muscle and Fat Tissue in Swine', *Journal of Animal Science*, 26(3), pp. 504–509.
- Brown, M. S. y Goldstein, J. L. (1997) 'The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor', *Cell*, 89, pp. 331–340.
- Burgess, S. C. *et al.* (2007) 'Cytosolic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Does Not Solely Control the Rate of Hepatic Gluconeogenesis in the Intact Mouse Liver', *Cell Metabolism*, 5(4), pp. 313–320.
- Burgos, C. *et al.* (2005) 'A real time PCR (RT-PCR) alternative assay to detect the T/C mutation in position 1843 of the ryanodine receptor gene', *Meat Science*, 70(2), pp. 395–398.
- Burgos, C. *et al.* (2006) 'Allelic incidence in several pig breeds of a missense variant of pig melanocortin-4 receptor (MC4R) gene associated with carcass and productive traits; its relation to IGF2 genotype', *Meat Science*, 73(1), pp. 144–150.
- Burgos, C. *et al.* (2008) 'Genética molecular y selección porcina; el caso de IGF2 y MC4R', *Eurocarne*, 170, pp. 114–120.
- Burgos, C. *et al.* (2010) 'The influence of diet, sex, IGF2 and RYR1 genotypes and anatomical location on pork loin composition', *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, pp. 307–313.
- Burgos, C. *et al.* (2012) 'The effects of two alleles of IGF2 on fat content in pig carcasses and pork', *Meat Science*, 90(2), pp. 309–313.
- Carlson, G. M. y Holyoak, T. (2009) 'Structural Insights into the Mechanism of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Catalysis', *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), pp. 27037–27041.
- Carrodeguas, J. A. *et al.* (2005) 'Incidence in diverse pig populations of an IGF2 mutation with potential influence on meat quality and quantity: An assay based on real time PCR (RT-PCR)', *Meat Science*, 71(3), pp. 577–582.
- Carthew, R. W. y Sontheimer, E. J. (2009) 'Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs', *Cell*, 136(4), pp. 642–655.
- Case, C. L. y Mukhopadhyay, B. (2007) 'Kinetic characterization of recombinant human cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase with and without a His10-tag', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, pp. 1576–1584.

- Chandramouli, V. *et al.* (1997) 'Quantifying gluconeogenesis during fasting', *American Journal of Physiology*, 273(6 Pt 1), pp. 1209–1215.
- Chang, T. W. y Goldberg, A. L. (1978) 'The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle', *Journal of Biological Chemistry*, 253, pp. 3685–3693.
- Chizzolini, R., Novelli, E. y Zanardi, E. (1998) 'Oxidation in traditional Mediterranean meat products', *Meat Science*, 49(suppl. 1), pp. S87–S99.
- Chu, P.-Y. *et al.* (2017) 'Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) regulates the cell metabolism of pancreatic neuroendocrine tumors (pNET) and de-sensitizes pNET to mTOR inhibitors', *Oncotarget*, 8(61), pp. 103613–193625.
- Chwalibog, A. *et al.* (1992) 'Estimation of quantitative oxidation and fat retention from carbohydrate, protein and fat in growing pigs', *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 68(3), pp. 123–135.
- Ciobanu, D. *et al.* (2001) 'Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated γ 3-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality', *Genetics*, 159, pp. 1151–1162.
- Coleman, R. A. y Lee, D. P. (2004) 'Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation', *Progress in Lipid Research*, 43(2), pp. 134–176.
- Cooper, D. N. (2010) 'Functional intronic polymorphisms: Buried treasure awaiting discovery within our genes', *Human Genomics*, 4(5), pp. 284–288.
- Copeland, R. A. (2000) *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. 2^a Edición. Edited by Wiley-VCH.
- Croniger, C. M. *et al.* (2002) 'Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Revisited II. CONTROL OF PEPCK-C GENE EXPRESSION', *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30(6), pp. 353–362.
- Cui, J. *et al.* (2016) 'Study on quantitative expression of PPAR γ and ADRP in muscle and its association with intramuscular fat deposition of pig', *SpringerPlus*, 5(1501).
- D'Souza, D. N. *et al.* (2003) 'Nutritional manipulation increases intramuscular fat levels in the Longissimus muscle of female finisher pigs', *Australian Journal of Agricultural Research*, 54, pp. 745–749.
- Dalvie, D. K. *et al.* (2002) 'Biotransformation Reactions of Five-Membered Aromatic Heterocyclic Rings', *Chemical Research in Toxicology*, 15(3), pp. 269–299.
- Davoli, R. *et al.* (2011) 'New SNP of the porcine Perilipin 2 (PLIN2) gene, association with carcass traits and expression analysis in skeletal muscle', *Molecular Biology Reports*, 38(3), pp. 1565–1583.
- Dharmarajan, L. *et al.* (2008) 'Tyr235 of human cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase influences catalysis through an anion-quadrupole interaction with phosphoenolpyruvate carboxylate', *FEBS Journal*, 275(23), pp. 5810–5819.
- DiTullio, N. W. *et al.* (1974) '3-Mercaptopicolinic acid, an inhibitor of gluconeogenesis', *Biochemistry Journal*, 138, pp. 387–394.
- Le Dividich, J., Noblet, J. y Biwaka, T. (1987) 'Effect of environmental temperature and dietary energy concentration on the performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs fed to equal rate of gain', *Livestock Production Science*, 17, pp. 235–246.
- Dixon, M. (1953) 'The determination of enzyme inhibitor constants', *Biochemical Journal*, 55(1), pp. 170–171.

- Dugan, M. E. R. *et al.* (1997) 'The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs', *Journal of Animal Science*, 77, pp. 723–725.
- Dunten, P. *et al.* (2002) 'Crystal structure of human cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase reveals a new GTP-binding site', *Journal of Molecular Biology*, 316(2), pp. 257–264.
- Durrett, L. (2008) 'Neutral Theory: The Null Hypothesis of Molecular Evolution', *Nature Education*, 1(1), p. 218.
- Dvořáková, V. *et al.* (2012) 'Association between polymorphism in the FTO gene and growth and carcass traits in pig crosses', *Genetics, Selection and Evolution*, 44(13).
- Edwards, D. B., Bates, R. O. y Osburn, W. N. (2003) 'Evaluation of Duroc- vs. Pietrain-sired pigs for carcass and meat quality measures', *Journal of Animal Science*, 81(8), pp. 1895–1899.
- Eisenberger, C. L. *et al.* (1992) 'Differential regulation of the rat phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in several tissues of transgenic mice', *Molecular and Cellular Biology*, 12(3), pp. 1396–1403.
- Enfält, A.-C. *et al.* (2006) 'Effects of a second mutant allele (V199I) at the PRKAG3 (RN) locus on carcass composition in pigs', *Livestock Science*, 99(2–3), pp. 131–139.
- Escós, M. *et al.* (2016) 'Kinetic and functional properties of human mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase', *Biochemistry and Biophysics Reports*, 7, pp. 124–129.
- Estany, J. *et al.* (2014) 'A Functional Variant in the Stearoyl-CoA Desaturase Gene Promoter Enhances Fatty Acid Desaturation in Pork', *PLoS One*, 9(1), p. e86177.
- Fàbrega, E. *et al.* (2002) 'Effects of halothane gene and pre-slaughter treatment on meat quality and welfare from two pig crosses', *Meat Science*, 62(4), pp. 463–472.
- Fan, B., Du, Z. Q. y Rothschild, M. F. (2009) 'The fat mass and obesity-associated (FTO) gene is associated with intramuscular fat content and growth rate in the pig', *Animal Biotechnology*, 20(2), pp. 58–70.
- Fawcett, K. A. y Barroso, I. (2010) 'The genetics of obesity: FTO leads the way', *Trends in Genetics*, 26(6), pp. 266–274.
- Feng, Z. *et al.* (2016) 'Reprogramming of energy metabolism as a driver of aging', *Oncotarget*, 7(13), pp. 15410–15420.
- Fernandez, X. *et al.* (1992) 'Bimodal distribution of the muscle glycolytic potential in French and Swedish populations of Hampshire crossbred pigs', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59, pp. 307–311.
- Fernandez, X. *et al.* (1999) 'Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat — 2. Consumer acceptability of m. longissimus lumborum', *Meat Science*, 53(1), pp. 67–72.
- Fernandez, X. *et al.* (2002) 'Effects of halothane genotype and pre-slaughter treatment on pig meat quality. Part 1. Postmortem metabolism, meat quality indicators and sensory traits of m. Longissimus lumborum', *Meat Science*, 62(4), pp. 429–437.
- Finnegan, P. M. y Burnell, J. N. (1995) 'Isolation and sequence analysis of cDNAs encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase from the PCK-type C4 grass *Urochloa panicoides*', *Plant Molecular Biology*, 27(2), pp. 365–376.
- Foley, L. H. *et al.* (2003) 'Modified 3-Alkyl-1,8-dibenzylxanthines as GTP-Competitive inhibitors of phosphoenolpyruvate carboxykinase', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(20), pp. 3607–3610.

- Fontanesi, L. *et al.* (2009) 'The porcine fat mass and obesity associated (FTO) gene is associated with fat deposition in Italian Duroc pigs', *Animal Genetics*, 40(1), pp. 90–93.
- Fontanesi, L. *et al.* (2015) 'A retrospective analysis of allele frequency changes of major genes during 20 years of selection in the Italian Large White pig breed', *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 132(3), pp. 239–246.
- Franckhauser, S. *et al.* (2002) 'Increased Fatty Acid Re-esterification by PEPCCK Overexpression in Adipose Tissue Leads to Obesity Without Insulin Resistance', *Diabetes*, 51(3), pp. 624–630. doi: 10.2337/diabetes.51.3.624.
- Friedman, J. M. (2002) 'The function of leptin in nutrition, weight and physiology', *Nutrition Reviews*, 60(10 Pt 2).
- Fujii, J. *et al.* (1991) 'Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia', *Science*, 253(5018), pp. 448–451. doi: 10.1126/science.1862346.
- Gallo, L. *et al.* (2016) 'Effect of progressive reduction in crude protein and lysine of heavy pigs diets on some technological properties of green hams destined for PDO dry-cured ham production', *Meat Science*, 121, pp. 135–140.
- Galve, A. *et al.* (2012) 'The effects of leptin receptor (LEPR) and melanocortin-4 receptor (MC4R) polymorphisms on fat content, fat distribution and fat composition in a Duroc × Landrace/Large White cross', *Livestock Science*, 145(1–3), pp. 145–152.
- Gandolfi, G. *et al.* (2011) 'Perilipin 1 and perilipin 2 protein localization and gene expression study in skeletal muscles of European cross-breed pigs with different intramuscular fat contents', *Meat Science*, 88(4), pp. 631–637.
- Gardan, D., Gondret, F. y Louveau, I. (2006) 'Lipid metabolism and secretory function of porcine intramuscular adipocytes compared with subcutaneous and perirenal adipocytes', *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 291(2), pp. 372–380.
- Gelfand, A. E. y Smith, A. F. M. (1990) 'Sampling-Based Approaches to Calculating Marginal Densities', *Journal of the American Statistical Association*, 85, pp. 398–409.
- Goto, Y. *et al.* (1979) 'Purification and Characterization of Cytosol Phosphoenolpyruvate Carboxykinase from Bullfrog (*Rana catesbeiana*) Liver', *Journal of Biochemistry*, 86(1), pp. 71–78.
- Graham, F. L. *et al.* (1977) 'Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5', *Journal of General Virology*, 36, pp. 59–72.
- Grassi, S. *et al.* (2017) 'Effect of low-protein diets in heavy pigs on dry-cured ham quality characteristics', *Meat Science*, 131, pp. 152–157.
- Grzes, M. *et al.* (2016) 'Pig fatness in relation to FASN and INSIG2 genes polymorphism and their transcript level', *Molecular Biology Reports*, 43(5), pp. 381–389.
- Gunn, J. M. *et al.* (1975) 'Glucocorticoids and the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (guanosine triphosphate) in the rat', *Biochemical Journal*, 150(2), pp. 195–203.
- Hajarnis, S., Schroeder, J. M. y Curthoys, N. P. (2005) '3'-Untranslated Region of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase mRNA Contains Multiple Instability Elements That Bind AUF1', *Journal of Biological Chemistry*, 280, pp. 28272–28280.
- Hakimi, P. *et al.* (2005) 'Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the critical role of cataplerosis in the control of hepatic metabolism', *Nutrition and Metabolism*, 2(33).
- Hakimi, P. *et al.* (2007) 'Overexpression of the Cytosolic Form of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) in Skeletal Muscle Repatterns Energy Metabolism in the Mouse', *Journal*

- of *Biological Chemistry*, 282(45), pp. 32844–32855. doi: 10.1074/jbc.M706127200.
- Hall, R. K. *et al.* (1992) ‘Activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene retinoic acid response element is dependent on a retinoic acid receptor/coregulator complex’, *Molecular and Cellular Biology*, 12(12), pp. 5527–5535.
- Hall, R. K., Sladek, F. M. y Granner, D. K. (1995) ‘The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(2), pp. 412–416.
- Hallenstvedt, E. *et al.* (2010) ‘Fish oil in feeds for entire male and female pigs: Changes in muscle fatty acid composition and stability of sensory quality’, *Meat Science*, 85(1), pp. 182–190.
- Han, H. *et al.* (2017) ‘Muscle Conditional Medium Reduces Intramuscular Adipocyte Differentiation and Lipid Accumulation through Regulating Insulin Signaling’, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), p. 1799.
- Hanson, R. W. y Garber, A. J. (1972) ‘Phosphoenolpyruvate carboxykinase. I. Its role in gluconeogenesis’, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 25, pp. 1010–1021.
- Hanson, R. W. y Reshef, L. (1997) ‘Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression’, *Annual Reviews of Biochemistry*, 66, pp. 581–611.
- Hanson, R. W. y Reshef, L. (2003) ‘Glyceroneogenesis revisited’, *Biochimie*, 85(12), pp. 1199–1205.
- Hegyí, G. *et al.* (2013) *Introduction to Practical Biochemistry*. Eötvös Loránd University.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. y Thompson, C. B. (2009) ‘Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation’, *Science*, 324(5930), pp. 1029–1033.
- Henriquez-Rodriguez, E. *et al.* (2016) ‘The effect of SCD and LEPR genetic polymorphisms on fat content and composition is maintained throughout fattening in Duroc pigs’, *Meat Science*, 121, pp. 33–39.
- Hermansen, L. y Saltin, B. (1969) ‘Oxygen uptake during maximal treadmill and bicycle exercise’, *Journal of Applied Physiology*, 26(1), pp. 31–37.
- Hidalgo, J. (2014) *Estudio de la inactivación de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PEPCK-C) mediante calor*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza.
- Hill, E. G. *et al.* (1957) ‘Effects of Essential Fatty Acid Deficiency in Young Swine’, *Experimental Biology and Medicine*, 95(2).
- Holyoak, T., Sullivan, S. M. y Nowak, T. (2006) ‘Structural Insights into the Mechanism of PEPCK Catalysis’, *Biochemistry*, 45(27), pp. 8254–8263.
- Houston, R. D., Cameron, N. D. y Rance, K. A. (2004) ‘A melanocortin-4 receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected Large White pig populations’, *Animal Genetics*, 35(5), pp. 386–390.
- Iynedjian, P. B. y Hanson, R. W. (1977) ‘Increase in level of functional messenger RNA coding for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) during induction by cyclic adenosine 3’:5’-monophosphate’, *Journal of Biological Chemistry*, 252(2), pp. 655–662.
- Jiang, W. *et al.* (2011) ‘Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase’, *Molecular Cell*, 43(1), pp. 33–44.
- Jitrapakdee, S. y Wallace, J. C. (1999) ‘Structure, function and regulation of pyruvate

- carboxylase', *Biochemical Journal*, 340(1), pp. 1–16.
- Johnson, T. A. y Holyoak, T. (2010) 'Increasing the Conformational Entropy of the Ω -Loop Lid Domain in Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Impairs Catalysis and Decreases Catalytic Fidelity', *Biochemistry*, 49(25), pp. 5176–5187.
- Johnson, T. A. y Holyoak, T. (2012) 'The Ω -loop lid domain of phosphoenolpyruvate carboxykinase is essential for catalytic function', *Biochemistry*, 51(47), pp. 9547–9559.
- Johnson, T. A., Mcleod, M. J. y Holyoak, T. (2016) 'Utilization of Substrate Intrinsic Binding Energy for Conformational Change and Catalytic Function in Phosphoenolpyruvate Carboxykinase', *Biochemistry*, 55(3), pp. 575–587.
- Kalhan, S. C. *et al.* (2008) 'Estimates of hepatic glyceroneogenesis in type 2 diabetes mellitus in humans', *Metabolism*, 57(3), pp. 305–312.
- Kamboj, A. y Randhawa, H. (2012) 'Pharmacological action and sar of thiophene derivatives: A review', *Journal of Pharmacy Research*, 5(5), pp. 2676–2682.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. y Price, N. C. (2005) 'How to study proteins by circular dichroism', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751(2), pp. 119–139.
- Kim, H. *et al.* (2015) 'Exploring the Genetic Signature of Body Size in Yucatan Miniature Pig', *PLoS One*, 10(4), p. e0121732.
- Kim, K. S. *et al.* (2000) 'A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits', *Mammalian Genome*, 11(2), pp. 131–135.
- Kimura, M. (1991) 'The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence', *Japanese Journal of Genetics*, 66(4), pp. 367–386.
- Knudson, B. K. *et al.* (1985) 'Development comparisons of boars and barrows: 1. Growth rate, carcass and muscle characteristics', *Journal of Animal Science*, 61, pp. 789–796.
- Krashes, M. J., Lowell, B. B. y Garfield, A. S. (2016) 'Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis', *Nature Neuroscience*, 19(2), pp. 206–219.
- Kube, M. *et al.* (2013) 'Genome sequence and functional genomic analysis of the oil-degrading bacterium *Oleispira antarctica*', *Nature Communications*, 4(2156).
- Küchenmeister, U. *et al.* (1999) 'Postmortem changes in Ca²⁺ transporting proteins of sarcoplasmic reticulum in dependence on malignant hypothermia status in pigs', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 195, pp. 37–46.
- Van Laere, A. S. *et al.* (2003) 'A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig', *Nature*, 425, pp. 832–836.
- Lai, E. C. (2002) 'Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation', *Nature Genetics*, 30, pp. 363–364.
- Landi, D., Gemignani, F. y Landi, S. (2012) 'Role of variations within microRNA-binding sites in cancer', *Mutagenesis*, 27(2), pp. 205–210.
- Laplante, M. y Sabatini, D. M. (2009) 'mTOR signaling at a glance', *Journal of Cell Science*, 122, pp. 3589–3594.
- Latorre, P. (2013) *Puesta a punto de métodos para el estudio de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PEPCK-C) porcina*. Universidad de Zaragoza.
- Latorre, P. *et al.* (2016) 'c.A2456C-substitution in Pck1 changes the enzyme kinetic and functional properties modifying fat distribution in pigs', *Scientific Reports*, 6(19617).

- Latorre, P. *et al.* (2018) 'Dynamic acetylation of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase toggles enzyme activity between gluconeogenic and anaplerotic reactions', *Molecular Cell*, (en revisión).
- Latorre, P. (2018) *Mecanismos moleculares de regulación de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa citosólica (Pck1) y su aplicación al metabolismo lipídico en el cerdo*. Universidad de Zaragoza.
- Lee, Y. B. y Kauffman, R. G. (1974) 'Cellularity and Lipogenic Enzyme Activities of Porcine Intramuscular Adipose Tissue', *Journal of Animal Science*, 38(3), pp. 538–544.
- Lee, Y. B., Kauffman, R. G. y Grummer, R. H. (1973) 'Effects of early nutrition on the development of adipose tissue in the pig. II. Weight constant basis', *Journal of Animal Science*, 37, pp. 1319–1325.
- Lefaucheur, L. *et al.* (1991) 'Influence of environmental temperature on growth, muscle and adipose tissue metabolism, and meat quality in swine', *Journal of Animal Science*, 69, pp. 2844–2854.
- Lefterova, M. I. *et al.* (2014) 'PPAR γ and the global map of adipogenesis and beyond', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(6), pp. 293–302.
- Legarra, A., Varona, L. y López de Maturana, E. (2008) *TM Threshold Model*. Available at: <http://snp.toulouse.inra.fr/~alegarra/%0Amanualtm.pdf>.
- Leithner, K. *et al.* (2015) 'PCK2 activation mediates an adaptative response to glucose depletion in lung cancer', *Oncogene*, 34, pp. 1044–1050.
- Lewis, C. T., Seyer, J. M. y Carlson, G. M. (1989) 'Cysteine 288: An essential hyperreactive thiol of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)', *Journal of Biological Chemistry*, 254(1), pp. 27–33.
- Li, B. *et al.* (2016) 'Identification of candidate genes associated with porcine meat color traits by genome-wide transcriptome analysis', *Scientific Reports*, 6(35224).
- Li, C. *et al.* (2008) 'Genetic imprinting of H19 and IGF2 in domestic pigs (*Sus scrofa*).', *Animal Biotechnology*, 19(1), pp. 22–27.
- Li, Y. *et al.* (2016) 'Effects of dietary protein restriction on muscle fiber characteristics and mTORC1 pathway in the skeletal muscle of growing-finishing pigs', *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(47).
- Li, Y., Nara, T. Y. y Nakamura, M. T. (2005) 'Peroxisome proliferator-activated receptor α is required for feedback regulation of highly unsaturated fatty acid synthesis', *Journal of Lipid Research*, 46, pp. 2432–2440.
- Lin, Y.-Y. *et al.* (2009) 'Protein Acetylation Microarray Reveals NuA4 Controls Key Metabolic Target Regulating Gluconeogenesis', *Cell*, 136(6), pp. 1073–1084.
- Loose, D. S. *et al.* (1985) 'Thyroid hormone regulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in rat liver', *Biochemistry*, 24(17), pp. 4509–4512.
- Lyne, P. D. (2002) 'Structure-based virtual screening: an overview', *Drug Discovery Today*, 7(20), pp. 1047–1055.
- Mach, N. *et al.* (2009) 'Burdizzo pre-pubertal castration effects on performance, behaviour, carcass characteristics, and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets', *Meat Science*, 81, pp. 329–334.
- Madeira, M. S. *et al.* (2013) 'Differential effects of reduced protein diets on fatty acid composition and gene expression in muscle and subcutaneous adipose tissue of Alentejana

- purebred and Large White × Landrace × Pietrain crossbred pigs', *British Journal of Nutrition*, pp. 216–229.
- Madeira, M. S. *et al.* (2017) 'Reduced protein diets increase intramuscular fat of psoas major, a red muscle, in lean and fatty pig genotypes', *Animal*, 11(11), pp. 2094–2102.
- Makinen, A. L. y Nowak, T. (1989) 'A reactive cysteine in avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase', *Journal of Biological Chemistry*, 264(21), pp. 12148–12157.
- Mankowska, M. *et al.* (2015) 'Novel Polymorphisms in Porcine 3'UTR of the Leptin Gene, Including a Rare Variant within Target Sequence for MIR-9 Gene in Duroc Breed, not Associated with Production Traits', *Journal of Animal Biotechnology*, 26(2), pp. 156–163.
- Martin, L. *et al.* (1999) 'Changes in intramuscular lipids during ripening of Iberian dry-cured ham', *Meat Science*, 51, pp. 129–134.
- McGloughlin, P. *et al.* (1988) 'Growth and carcass quality of crossbred pigs sired by Duroc, Landrace and Large White boars', *Livestock Production Science*, 18(3–4), pp. 275–288.
- Méndez-Lucas, A. *et al.* (2014) 'Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability', *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), pp. 22090–22102.
- Milan, D. *et al.* (2000) 'A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle', *Science*, 288, pp. 1248–1251.
- Miller, K. D. *et al.* (2000) 'Porcine longissimus glycolytic potential level effects on growth performance, carcass, and meat quality characteristics', *Journal of Muscle Foods*, 11(169–181).
- Ministerio de Agricultura y Pesca, A. y M. A. (2016) 'El sector de la carne de cerdo en cifras. Principales indicadores económicos'.
- Mishra, P. J. *et al.* (2007) 'A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), pp. 13513–13518.
- Moelich, E., Hoffman, L. C. y Conradie, P. J. (2003) 'Sensory and functional meat quality characteristics of pork derived from three halothane genotypes', *Meat Science*, 63(3), pp. 333–338.
- Montal, E. *et al.* (2015) 'PEPCK coordinates the regulation of central carbon metabolism to promote cancer cell growth', *Molecular Cell*, 60(4), pp. 571–583.
- Morales, J. I. *et al.* (2011) 'Influence of sex and castration on growth performance and carcass quality of crossbred pigs from 2 Large White sire lines', *Journal of Animal Science*, 89(11), pp. 3481–3489.
- Motomura, W. *et al.* (2006) 'Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(4), pp. 1111–1118.
- Munday, M. R. (2002) 'Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase', *Biochemical Society Transactions*, 30(6), pp. 1059–1064.
- Muñoz, G. *et al.* (2009) 'Single- and joint-population analyses of two experimental pig crosses to confirm quantitative trait loci on Sus scrofa chromosome 6 and leptin receptor effects on fatness and growth traits', *Journal of Animal Science*, 87(2), pp. 459–468.
- Musella, M. *et al.* (2009) 'Omega-3 polyunsaturated fatty acid from extruded linseed influences the fatty acid composition and sensory characteristics of dry-cured ham from heavy pigs', *Journal of Animal Science*, 87(11), pp. 3578–3588.

- Nakachi, Y. *et al.* (2008) 'Identification of novel PPAR γ target genes by integrated analysis of ChIP-on-chip and microarray expression data during adipocyte differentiation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(2), pp. 362–366.
- Nakamura, M. T. y Nara, T. Y. (2003) 'Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals', *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 68(2), pp. 145–150.
- Nezer, C. *et al.* (1999) 'An imprinted QTL with major effects on muscle mass deposition maps to the IGF locus in pigs', *Nature Genetics*, 21(2), pp. 155–156.
- NRC (1998) *Nutrient requirements of swine*. USA: National Academic Press.
- Ntambi, J. M. (1999) 'Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol', *Journal of Lipid Research*, 40, pp. 1549–1558.
- Núñez de Castro, I. (2000) *Enzimología*. Ediciones Pirámide.
- Nye, C. K., Hanson, R. W. y Kalhan, S. C. (2008) 'Glyceroneogenesis Is the Dominant Pathway for Triglyceride Glycerol Synthesis in Vivo in the Rat', *Journal of Biological Chemistry*, 283, pp. 27565–27574.
- Van Oeckel, M. J. *et al.* (2001) 'The preference of the consumer for pork from homozygous or heterozygous halothane negative animals', *Meat Science*, 58(3), pp. 247–251.
- Olivares, A. *et al.* (2009) 'Interactions between genotype, dietary fat saturation and vitamin A concentration on intramuscular fat content and fatty acid composition in pigs', *Meat Science*, 82, pp. 6–12.
- Olivares, A. *et al.* (2011) 'Low levels of dietary vitamin A increase intramuscular fat content and polyunsaturated fatty acid proportion in liver from lean pigs', *Livestock Science*, 137, pp. 31–36.
- Olswang, Y. *et al.* (2002) 'A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), pp. 625–630.
- Olswang, Y. *et al.* (2003) 'Glucocorticoids Repress Transcription of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) Gene in Adipocytes by Inhibiting Its C/EBP-mediated Activation', *Journal of Biological Chemistry*, 278, pp. 12929–12936.
- Olszewski, P. K. *et al.* (2007) 'Alpha-melanocyte stimulating hormone and ghrelin: central interaction in feeding control', *Peptides*, 28(10), pp. 2084–2089.
- Ovilo, C. *et al.* (2005) 'Fine mapping of porcine chromosome 6 QTL and LEPR effects on body composition in multiple generations of an Iberian by Landrace intercross', *Genetics Research*, 85(1), pp. 57–67.
- Ovilo, C. *et al.* (2010) 'Hypothalamic expression of porcine leptin receptor (LEPR), neuropeptide Y (NPY), and cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) genes is influenced by LEPR genotype', *Mammalian Genome*, 21(11–12), pp. 583–591.
- Owen, O. E., Kalhan, S. C. y Hanson, R. W. (2002) 'The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function', *Journal of Biological Chemistry*, 277, pp. 30409–30412.
- Patel, Y. M. *et al.* (1994) 'An analysis of regulatory elements in the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene which are responsible for its tissue-specific expression and metabolic control in transgenic mice', *Journal of Biological Chemistry*, 269, pp. 5619–5628.
- Peeters, E., Driessen, B. y Geers, R. (2006) 'Influence of supplemental magnesium, tryptophan,

- vitamin C, vitamin E, and herbs on stress responses and pork quality', *Journal of Animal Science*, 84(7), pp. 1827–1838.
- Peinado Pino, J. (2015) *Influence of castration on growth performance and carcass and meat quality of heavy female pigs*. Universidad Politécnica de Madrid.
- Petersen, K. F., Price, T. B. y Bergeron, R. (2004) 'Regulation of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during exercise: impact of type 1 diabetes', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(9), pp. 4656–4664.
- Pettersen, E. F. *et al.* (2004) 'UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis', *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), pp. 1605–1612.
- Pires, V. M. *et al.* (2016) 'Increased intramuscular fat induced by reduced dietary protein in finishing pigs: effects on the longissimus lumborum muscle proteome', *Molecular Biosystems*, 12(2247).
- Pyatt, N. A., Berger, L. L. y Nash, T. G. (2005) 'Effect of vitamin A and restricted intake on performance, carcass characteristics and serum retinol status in Angus x Simmental feedlot cattle', *Professional Animal Scientist*, 21, pp. 318–331.
- Ramírez, C. M. *et al.* (2013) 'MicroRNA 33 Regulates Glucose Metabolism', *Molecular and Cellular Biology*, 33(15), pp. 2891–2902.
- Ren, Z. *et al.* (2017) 'Enhancement of porcine intramuscular fat content by overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase in skeletal muscle', *Scientific Reports*, 7(43746).
- Reymond, P. *et al.* (1992) 'Sequence of the phosphoenolpyruvate carboxykinase-encoding cDNA from the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: comparison of the amino acid sequence with animals and yeast', *Gene*, 110(1), pp. 57–63.
- Ríos, S. E. y Nowak, T. (2002) 'Role of cysteine 306 in the catalytic mechanism of *Ascaris suum* phosphoenolpyruvate carboxykinase', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 404(1), pp. 25–37.
- Robinson, B. H. y Oei, J. (1975) '3-Mercaptopicolinic acid, a preferential inhibitor of the cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase', *FEBS Letters*, 58(1–2), pp. 12–15.
- Roesler, W. J., Vandebark, G. R. y Hanson, R. W. (1989) 'Identification of multiple protein binding domains in the promoter-regulatory region of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene', *Journal of Biological Chemistry*, 264, pp. 9657–9664.
- Rognstad, R. (1979) 'Rate-limiting steps in metabolic pathways', *Journal of Biological Chemistry*, 254, pp. 1875–1878.
- Rosen, E. D. y Spiegelman, B. M. (2000) 'Molecular Regulation of Adipogenesis', *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology*, 16, pp. 145–171.
- Le Roy, P. *et al.* (2000) 'Comparison between the three porcine RN genotypes for growth, carcass composition and meat quality traits', *Genetics, Selection and Evolution*, 32, pp. 165–186.
- Ruiz-Carrascal, J. *et al.* (2000) 'Texture and appearance of dry cured ham as affected by fat content and fatty acid composition', *Food Research International*, 33(2), pp. 91–95.
- Ruiz, J. *et al.* (1998) 'Prediction of the feeding background of Iberian pigs using the fatty acid profile of subcutaneous muscle and hepatic fat', *Meat Science*, 49, pp. 155–159.
- Ryan, M. T. *et al.* (2012) 'SNP variation in the promoter of the PRKAG3 gene and association with meat quality traits in pig', *BMC Genetics*, 13(66).

- Sahlin, K., Katz, A. y Broberg, S. (1990) 'Tricarboxylic acid cycle intermediates in human muscle during prolonged exercise', *American Journal of Physiology*, 259, pp. 834–841.
- Sato, A., Suzuki, T. y Kochi, H. (1986) 'Purification and Characterization of Cytosol-Specific Phosphoenolpyruvate Carboxykinase from Chicken Liver', *Journal of Biochemistry*, 100(3), pp. 671–678.
- Schneider-Poetsch, T. *et al.* (2010) 'Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin', *Nature Chemical Biology*, 6(3), pp. 209–217.
- Sellier, P. (1998) *The Genetics of the Pig*. Edited by M. F. Rothschild and A. Ruvinsky. CAB International Publishing.
- She, P. *et al.* (2000) 'Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism', *Molecular Cell Biology*, 20(17), pp. 6508–6517.
- Shoichet, B. K. (2004) 'Virtual screening of chemical libraries', *Nature*, 432(7019), pp. 862–865.
- Siersbæk, R., Nielsen, R. y Mandrup, S. (2010) 'PPAR gamma in adipocyte differentiation and metabolism – Novel insights from genome-wide studies', *FEBS Letters*, 584, pp. 3242–3249.
- Simopoulos, A. P. (2002) 'The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56(8), pp. 365–379.
- Skeeles, L. E. *et al.* (2013) 'The Impact of 3'UTR Variants on Differential Expression of Candidate Cancer Susceptibility Genes', *PLoS One*, 8(3), p. e58609.
- Škrlep, M. *et al.* (2010) 'Effects of a second mutant allele (V199I) at the PRKAG3 (RN) locus on carcass composition in pigs', *Livestock Science*, 128(1–3), pp. 60–66.
- Smith, S. (1994) 'The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes', *The FASEB Journal*, 8(15), pp. 1248–1259.
- Spencer, A. F. y Lowenstein, J. M. (1962) 'The supply of precursors for the synthesis of fatty acids', *The Journal of Biological Chemistry*, 237, pp. 3640–3648.
- Stark, R. *et al.* (2009) 'Phosphoenolpyruvate cycling via mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase links anaplerosis and mitochondrial GTP with insulin secretion', *Journal of Biological Chemistry*, 284, pp. 26578–26590.
- Stark, R. *et al.* (2014) 'A role for mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) in the regulation of hepatic gluconeogenesis', *Journal of Biological Chemistry*, 289, pp. 7257–7263.
- Stiffin, R. M. *et al.* (2008) 'Differential Inhibition of Cytosolic PEPCK by Substrate Analogues. Kinetic and Structural Characterization of Inhibitor Recognition', *Biochemistry*, 47(7), pp. 2099–2109.
- Stumvoll, M. *et al.* (1999) 'Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues', *Kidney International*, 55(3), pp. 778–792.
- Sullivan, S. M. y Holyoak, T. (2007) 'Structures of Rat Cytosolic PEPCK: Insight into the Mechanism of Phosphorylation and Decarboxylation of Oxaloacetic Acid', *Biochemistry*, 46(35), pp. 10078–10088.
- Switonski, M. *et al.* (2010) 'Genetics of fat tissue accumulation in pigs: a comparative approach', *Journal of Applied Genetics*, 51(2), pp. 153–168.
- Tang, Q. Q. y Lane, M. D. (2012) 'Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte', *Annual Reviews of Biochemistry*, 81, pp. 715–736.

- Tannen, R. L. (1978) 'Ammonia metabolism', *American Journal of Physiology*, 235(4), pp. 265–277.
- Teye, G. A. *et al.* (2006) 'Influence of dietary oils and protein level on pork quality. 1. Effects on muscle fatty acid composition, carcass, meat and eating quality', *Meat Science*, 73(1), pp. 157–165.
- Tilghman, S. M. *et al.* (1974) 'Rapid Loss of Translatable Messenger RNA of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase During Glucose Repression in Liver', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), pp. 1304–1308.
- De Tonnac, A., Karim-Luisset, S. and Mourot, J. (2017) 'Effect of different dietary linseed sources on fatty acid composition in pig tissues', *Livestock Science*, 203, pp. 124–131.
- Tontonoz, P. *et al.* (1995) 'PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene', *Molecular and Cellular Biology*, 15(1), pp. 351–357.
- Tontonoz, P. y Spiegelman, B. M. (2008) 'Fat and Beyond: The Diverse Biologu of PPAR γ ', *Annual Reviews of Biochemistry*, 77, pp. 289–312.
- Tortora, P., Hanozet, G. M. y Guerritore, A. (1985) 'Purification of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae* and its use for bicarbonate assay', *Analytical Biochemistry*, 144(1), pp. 179–185.
- Tous, N. *et al.* (2014) 'Effect of vitamin A depletion on fat deposition in finishing pigs, intramuscular fat content and gene expression in the longissimus muscle', *Livestock Science*, 167, pp. 392–399.
- Trott, O. y Olson, A. J. (2010) 'AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading', *Journal of Computational Chemistry*, 31, pp. 455–461.
- Tsai, C. S. (1967) 'Spontaneous decarboxylation of oxalacetic acid', *Canadian Journal of Chemistry*, 45(873).
- Tu, W. C. *et al.* (2010) 'Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression', *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 83(2), pp. 61–68.
- Vedadi, M. *et al.* (2006) 'Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(43), pp. 15835–15840.
- Veneziale, C., Donofrio, J. y Nishimura, H. (1983) 'The concentration of P-enolpyruvate carboxykinase protein in murine tissues in diabetes of chemical and genetic origin.', *Journal of Biological Chemistry*, 258, pp. 14257–14262.
- Vincent, E. *et al.* (2015) 'Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase regulates metabolic adaptation and enables glucose-independent tumor growth', *Molecular Cell*, 60, pp. 195–207.
- Vuilleumier, S. *et al.* (1993) 'Circular dichroism studies of barnase and its mutants: Characterization of the contribution of aromatic side chains', *Biochemistry*, 32(39), pp. 10303–10313.
- Wang, G.-S. y Cooper, T. A. (2007) 'Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery', *Nature Reviews Genetics*, 8, pp. 749–761.
- Wang, Q. *et al.* (2010) 'Acetylation of Metabolic Enzymes Coordinates Carbon Source Utilization and Metabolic Flux', *Science*, 327(5968), pp. 1004–1007.

- Wang, S. *et al.* (2013) 'Glucose Utilization, Lipid Metabolism and BMP-Smad Signaling Pathway of Porcine Intramuscular Preadipocytes Compared with Subcutaneous Preadipocytes', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 31, pp. 981–996.
- Wang, W. *et al.* (2013) 'Candidate gene expression affects intramuscular fat content and fatty acid composition in pigs', *Journal of Applied Genetics*, 54(1), pp. 113–118.
- Warburg, O. (1956) 'On the origin of cancer cells', *Science*, 123(3191), pp. 309–314.
- Whittemore, C. (1996) *Ciencia y práctica de la producción porcina*. Editorial Acribia.
- Wiegand, B. R., Parrish, F. C., *et al.* (2002) 'Duration of feeding conjugated linoleic acid influences growth performance, carcass traits, and meat quality of finishing barrows', *Journal of Animal Science*, 80, pp. 637–643.
- Wiegand, B. R., Sparks, J. C., *et al.* (2002) 'Short-term feeding of vitamin D3 improves pork color but does not change tenderness of pork-loin chops', *Journal of Animal Science*, 80(8), pp. 2116–2121.
- Wilkie, G. S., Dickson, K. S. y Gray, N. K. (2003) 'Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors', *Trends in Biochemical Sciences*, 28(4), pp. 182–188.
- Wise, E. M. y Ball, E. G. (1964) 'Malic enzyme and lipogenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 52, pp. 1255–1263.
- Witte, D. P. *et al.* (2000) 'Effect of dietary lysine level and environmental temperature during the finishing phase on the intramuscular fat content of pork', *Journal of Animal Science*, 78(5), pp. 1272–1276.
- Wood, J. D. *et al.* (2008) 'Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review', *Meat Science*, 78, pp. 343–358.
- Wood, J. D. y Riley, J. E. (1982) 'Comparison of boars and castrates for bacon production. I. Growth data, and carcass y joint composition', *Animal Production*, 35, pp. 55–63.
- Wu, G., Knabe, D. A. y Woo, S. (2004) 'Arginine nutrition in neonatal pigs', *Journal of Nutrition*, 134(10).
- Yang, J. *et al.* (2009) 'Aspects of the Control of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene Transcription', *Journal of Biological Chemistry*, 284, pp. 27031–27035.
- Yang, J., Kalhan, S. C. y Hanson, R. W. (2009) 'What Is the Metabolic Role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase?', *Journal of Biological Chemistry*, 284, pp. 27025–27029.
- Ye, C. *et al.* (2017) 'Dietary N-Carbamylglutamate Supplementation in a Reduced Protein Diet Affects Carcass Traits and the Profile of Muscle Amino Acids and Fatty Acids in Finishing Pigs', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(28), pp. 5751–5758.
- Yin, J. *et al.* (2017) 'Effects of Long-Term Protein Restriction on Meat Quality, Muscle Amino Acids, and Amino Acid Transporters in Pigs', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(42), pp. 9297–9304.
- Young, O. A. and West, J. (2005) *Meat Science and Applications*. Marcel Dekker, Inc.
- Yu, X. *et al.* (2011) 'In vitro reconstitution and steady-state analysis of the fatty acid synthase from *Escherichia coli*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(46), pp. 18643–18648.
- Yuan, Y. *et al.* (2016) 'Reciprocal Changes in Phosphoenolpyruvate Carboxykinase and Pyruvate Kinase with Age Are a Determinant of Aging in *Caenorhabditis elegans*', *Journal of*

Biological Chemistry, 291(3), pp. 1307–1319.

Zhang, H. H. *et al.* (2009) ‘Insulin Stimulates Adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 Pathway’, *PLoS One*, 4(7), p. e6189.

Zhang, M. *et al.* (2017) ‘Sirtinol promotes PEPCK1 degradation and inhibits gluconeogenesis by inhibiting deacetylase SIRT2’, *Scientific Reports*, 7(7).

Zhang, P. *et al.* (2014) ‘Tumor suppressor p53 cooperates with SIRT6 to regulate gluconeogenesis by promoting FoxO1 nuclear exclusion’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(29), pp. 10684–10689.

Zhao, S. *et al.* (2010) ‘Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation’, *Science*, 327(5968), pp. 1000–1004.

Zhou, G. *et al.* (2010) ‘Global comparison of gene expression profiles between intramuscular and subcutaneous adipocytes of neonatal landrace pig using microarray’, *Meat Science*, 86(2), pp. 440–450.

