

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

FACULTAD DE FARMACIA



Trabajo Fin de Grado:

Piruvato Carboxilasa como
encrucijada en el metabolismo

TITULACIÓN: GRADO EN FARMACIA

AUTORA: Estefanía Cáceres Romero

TUTOR: Marisol Guerra Marichal

ÁREA DE CONOCIMIENTO: Bioquímica y biología molecular

FACULTAD: Ciencias de la Salud – Sección de Farmacia

La Laguna, marzo 2018



	Pag.
OBJETIVO	3
MATERIAL Y MÉTODOS	3
PALABRAS CLAVE	3
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	4
RESULTADOS:	6
• 1. Carboxilasas dependientes de biotina	6
• 2. Piruvato carboxilasa: estructura	8
• 3. Piruvato carboxilasa: mecanismo de reacción	9
• 4. Piruvato carboxilasa: importancia en el metabolismo celular	11
• 5. Piruvato carboxilasa: importancia en los tejidos de mamíferos	12
• 6. Papel de una nueva vía de síntesis de Acil-CoA en islotes humanos	16
CONCLUSIONES	17
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

OBJETIVO

El presente trabajo tiene como finalidad llevar a cabo una revisión actualizada sobre la estructura, el mecanismo de reacción, la importancia en el metabolismo celular y el papel metabólico de la piruvato carboxilasa, haciendo especial hincapié en la preponderancia de esta actividad enzimática en los principales tejidos eucarióticos donde se expresa, ya que se trata de la principal enzima anaplerótica y punto de inicio de la gluconeogénesis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las fuentes de información utilizadas en la elaboración del presente trabajo han sido fuentes primarias, es decir, trabajos originales de investigadores, y fuentes secundarias como buscadores científicos y/o páginas webs tales como PubMed, CrossRef, Google Scholar, etc. y libros de texto.

PALABRAS CLAVE

Anaplerosis, gluconeogénesis, piruvato carboxilasa, acetyl-CoA, activador alostérico, enzima dependiente de biotina.

RESUMEN

La piruvato carboxilasa (PC) cataliza la carboxilación dependiente de ATP de piruvato a oxalacetato en la matriz mitocondrial. Es un miembro de la familia de carboxilasas dependiente de biotina, ampliamente distribuida en tejidos eucarióticos y muchas especies procarióticas. PC tiene un papel anaplerótico para el ciclo de Krebs cuando los intermediarios se extraen para las diferentes vías biosintéticas, además PC proporciona oxalacetato para la gluconeogénesis. PC en la mayoría de organismos es una proteína tetramérica que está regulada alostéricamente por acetyl-CoA. En hígado y riñón, PC proporciona oxalacetato para la gluconeogénesis, en adipocitos está implicada en la síntesis de novo de ácidos grasos y gliceroneogénesis. En astrocitos, PC es importante para la síntesis de novo de glutamato, un importante neurotransmisor excitatorio. En islotes de roedores, PC es necesaria para la secreción de insulina inducida por glucosa. Los islotes humanos dependen menos de la carboxilación del

piruvato que los roedores y pueden usar una vía alternativa que forma acetoaceto en la mitocondria que luego lo usa para sintetizar en el citosol acil-CoAs de cadena corta. Esta vía puede proporcionar acil-CoAs de cadena corta para la síntesis de acil-CoAs de cadena larga citosólicos que actúen como moléculas de señalización para la exocitosis de insulina^[1].

ABSTRACT

Pyruvate carboxylase (PC) catalyzes the ATP-dependent carboxylation of pyruvate to oxaloacetate. PC is a member of the family of biotin-dependent carboxylases and is found widely among eukaryotic tissues and in many prokaryotic species. PC serves an anaplerotic role for the Krebs cycle, when intermediates are removed for different biosynthetic purposes, beside PC provides oxaloacetate for gluconeogenesis. PC from most organisms is a tetrameric protein that is allosterically regulated by acetyl-CoA. In liver and kidney, PC provides oxaloacetate for gluconeogenesis. In adipocytes PC is involved in de novo fatty acids synthesis and glyceroneogenesis. In astrocytes is important for de novo synthesis of glutamate, an important excitatory neurotransmitter. In rodent islets, PC is necessary for glucose-induced insulin secretion. The human islets depend less on pyruvate carboxylation than rodents and can use alternative pathway which forms acetoacetate in the mitochondria used later for the synthesis of cytosolic short chain acyl CoAs. This pathway can provide short chain acyl CoAs for the synthesis of cytosolic long chain acyl CoAs that have long been thought to act as signaling molecules for insulin exocytosis^[1].

INTRODUCCIÓN

Como alternativa a la descarboxilación mediante la piruvato deshidrogenasa (PDH), el segundo destino principal del piruvato mitocondrial es la carboxilación irreversible y dependiente de ATP del piruvato a oxalacetato por la piruvato carboxilasa (PC), (EC 6.4.1.1),^[2 3]. La utilidad del piruvato mitocondrial no está limitada a la producción de ATP sino que también incluye el suministro de carbono a varias vías biosintéticas que intersectan el ciclo de Krebs (también denominado ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarbóxicos, TCA), muchos intermediarios del ciclo de Krebs son importantes para la biogénesis de aminoácidos no esenciales. Por ejemplo, el alfa-cetoglutarato es intermediario clave para la biogénesis de glutamina, glutamato, arginina y prolina, mientras que el oxalacetato se usa para generar aspartato y asparagina^[4]. El oxalacetato y el citrato también soportan las principales vías biosintéticas de la gluconeogénesis y la lipogénesis, respectivamente. El grupo hemo, una molécula clave

para el transporte de oxígeno a través del cuerpo, se produce de succinil-CoA^[5]. Estas reacciones que utilizan y por tanto drenan los intermediarios del ciclo de Krebs se denominan reacciones catapleróticas. Estas reacciones sirven no solamente para sintetizar productos importantes sino también para evitar la formación inapropiada de intermediarios del ciclo de Krebs, por ejemplo cuando hay una alta tasa de degradación de aminoácidos para dar intermediarios del ciclo de Krebs.

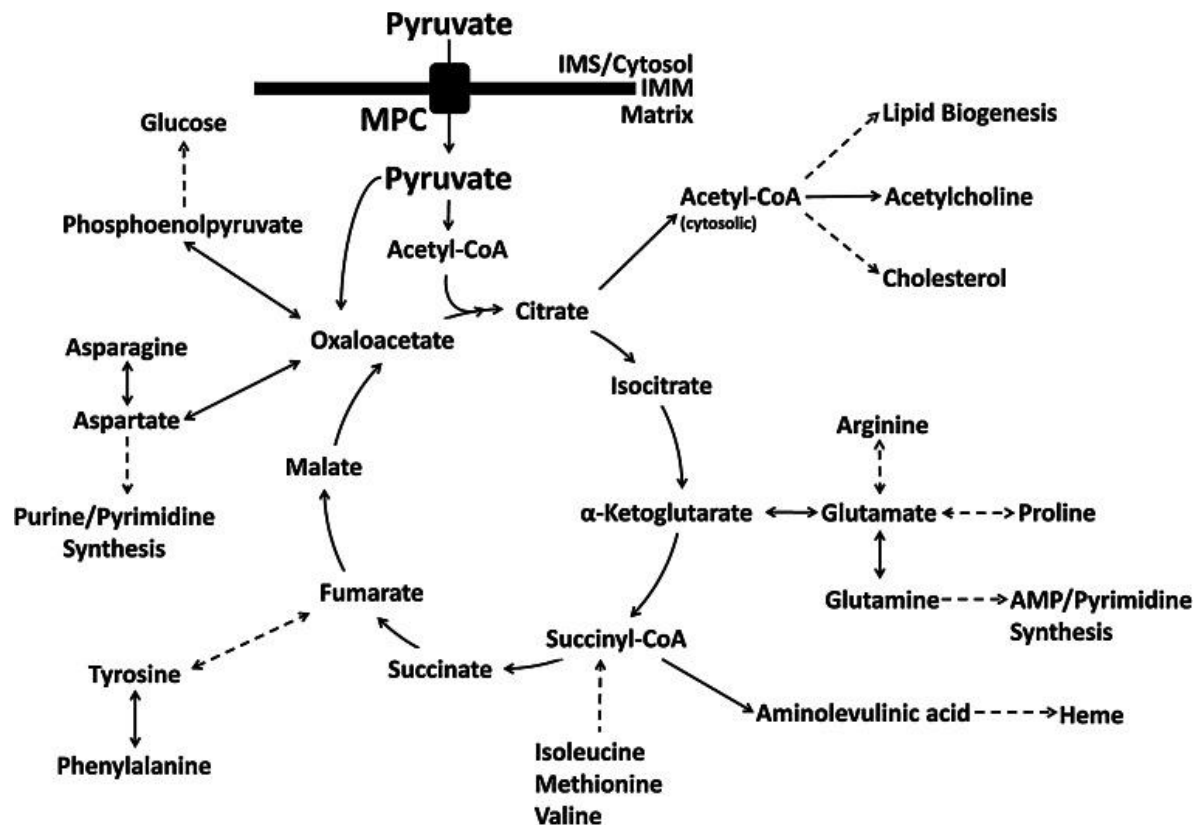


Fig.1. Anaplerosis y cataplerosis en el ciclo de TCA. El ciclo de TCA se presenta con las principales reacciones anapleróticas y catapleróticas ilustradas. Estos incluyen la entrada neta de aminoácidos en el ciclo y la generación de oxaloacetato a partir de piruvato a través de piruvato carboxilasa. Las reacciones catapleróticas en la figura ilustran el vínculo de este proceso con la gluconeogénesis y la lipogénesis.^[6]

Sin embargo, la cantidad de carbono del ciclo de Krebs es limitada. Los intermediarios extraídos para los procesos biosintéticos deben ser reemplazados para mantener el flujo de carbono del ciclo de Krebs. Las reacciones que reponen los intermediarios del ciclo de Krebs se denominan reacciones anapleróticas^[4]. El oxalacetato generado por PC tiene un papel crítico reponiendo anapleróticamente el ciclo de Krebs al servir como aceptor del acetil-CoA producido por la PDH. En humanos se expresa una única

isoforma de PC y se encuentra sólo en la matriz mitocondrial^[7,8]. Estructuralmente, PC es un homotetrámero ensamblado como un dímero de dímeros y requiere un cofactor biotina para la catálisis. La estructura cuaternaria de PC es imprescindible, PC monomérica no tiene actividad. PC contiene cuatro dominios distintos que incluye, comenzando por el extremo amino terminal, un dominio biotina carboxilasa, la primera mitad de un dominio regulador alostérico, un dominio carboxitransferasa, la segunda mitad del dominio regulador alostérico y un dominio transportador de la biotina carboxilada^[9,10,11]. La reacción comienza en el sitio activo del dominio biotina carboxilasa donde un intermedio carboxi-biotina se produce de ATP, bicarbonato y biotina. El grupo carboxibiotina se transfiere a un dominio carboxitransferasa vecino^[9,11,12]. Allí, el grupo carboxilo se transfiere desde la carboxibiotina al piruvato, produciendo oxalacetato y regenerando el cofactor biotina. Su actividad está altamente regulada y su expresión es casi ubicua, con los niveles más altos de expresión en ciertos tejidos tales como hígado, riñón, tejido adiposo y corazón. La actividad específica de PC se regula positivamente por acetil-CoA.

RESULTADOS

1. Carboxilasas dependientes de biotina

Las carboxilasas dependientes de biotina son enzimas cuya función es transferir grupos carboxilo a diferentes sustratos que intervienen en el metabolismo de ácidos grasos, aminoácidos y carbohidratos y por tanto son enzimas metabólicas ampliamente distribuidas^[14,15]. Son activas en forma de homo o heterolígmero y necesitan como cofactor a la biotina que se une covalentemente.

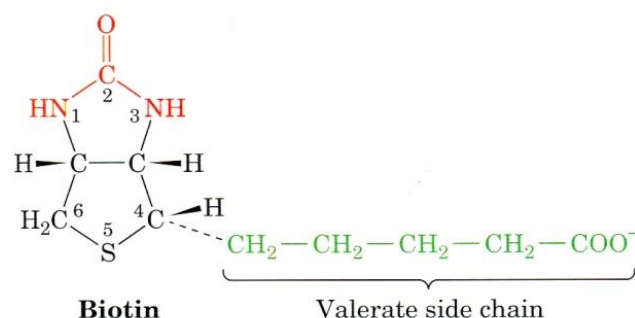


Fig.2. La biotina consiste en un anillo imidazol que está fusionado a un anillo de tetrahidrotiofeno y una cadena lateral de valerato. Las posiciones 1, 2 y 3 constituyen el grupo ureido (marcado en rojo). En la carboxibiotinil enzima, el N1 del grupo ureido de la biotina es el sitio de carboxilación. La biotina está covalentemente unida a las carboxilasas por un enlace amida entre el grupo carboxilo de su grupo valerato y el grupo ϵ -amino de la cadena lateral de una lisina de la enzima formando biocitina.^[16]

Las principales carboxilasas dependientes de biotina son:

- Piruvato carboxilasa: cataliza el primer paso de la gluconeogénesis.
- Propionil-CoA carboxilasa: genera succinato a partir de propionato para su uso en el ciclo de Krebs.
- Acetil-Coa carboxilasa: cataliza el primer paso de la lipogénesis dando malonil-CoA.

Las carboxilasas dependientes de biotina llevan a cabo su actividad en dos pasos secuenciales en dos sitios distintos^[15,17]:

- En el sitio activo biotina carboxilasa (BC) tiene lugar la carboxilación de la biotina, usa bicarbonato como donador del grupo carboxilo y requiere Mg-ATP.
- En el componente carboxitransferasa (CT) que lleva a cabo el segundo paso, el grupo carboxilo se transfiere desde la carboxibiotina a un sustrato específico para cada enzima.

El modo secuencial de actuación de BC y CT favorece que la biotina se mueva entre los centros de reacción para transferir el grupo carboxilo activado (Fig.4)

En un tercer dominio, denominado dominio transportador de la biotina carboxilada (BCCP) se une la cadena lateral de valerato de la biotina a la cadena lateral de un residuo de lisina mediante un enlace amida, lo que proporciona un brazo relativamente largo y flexible.

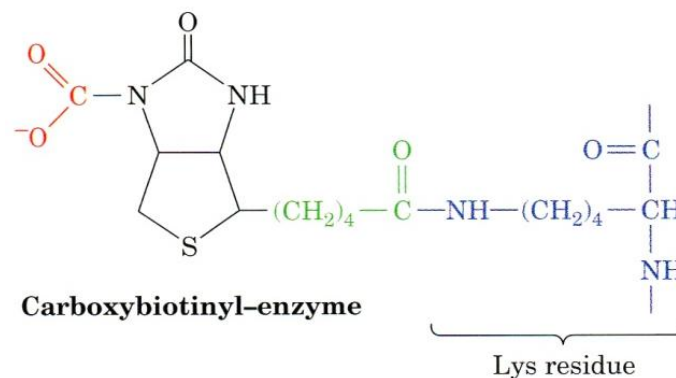


Fig.3. La imagen muestra la unión entre la cadena lateral de valerato de la biotina carboxilada (en verde) y el residuo de lisina del dominio BCCP de la enzima (en azul). Imagen tomada de^[16]

Sin embargo, dado que la distancia entre los centros de reacción BC y CT está en el rango de 45 a 85 Å^[18-25] y la biotina debe visitarlos, se observa que el brazo constituido por la lisina y la biotina resulta demasiado corto para cubrir la distancia entre BC y CT, por lo tanto las enzimas deben mover sus dominios BCCP largas distancias durante la

catálisis, aunque los datos actuales no explican este comportamiento dinámico de los dominios BCCP.

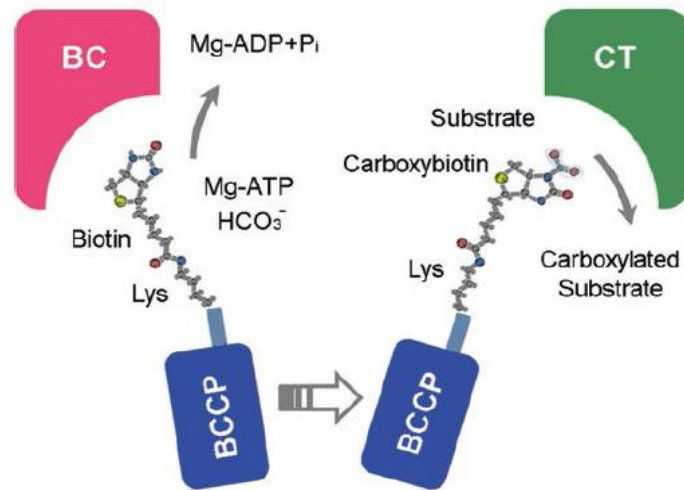


Fig.4. Reacciones enzimáticas secuenciales en carboxilasas dependientes de biotina. La biotina está unida a un residuo de lisina en el dominio BCCP. En el primer paso, la biotina se carboxila en el sitio activo BC. Luego, BCCP y la carboxibiotina unida se translocan al centro activo CT, donde el grupo carboxilo se transfiere al sustrato específico. ^[26]

Los dominios BC y BCCP están bien conservados entre las distintas carboxilasas dependientes de biotina, sin embargo, el dominio CT está especializado en la carboxilación del sustrato específico ^[14,15,17].

2. Piruvato carboxilasa: Estructura

Normalmente PC se encuentra en forma de tetrámero constituido por 4 subunidades (α 4) idénticas de aproximadamente 120-130 kDa ^[11]. Los primeros estudios cristalográficos de PC en su organización tetramérica completa se llevaron a cabo en *Rhizobium etli* (RePC) ^[25] y *Staphylococcus aureus* (SaPC) ^[24]. Se observó que el oligómero de PC es un romboedro tetramérico dispuesto en dos capas con dos monómeros opuestos en cada capa (Fig.5) donde cada subunidad contiene los tres dominios que hemos mencionado (BC, CT y BCCP). Las capas están conectadas a través de superficies de contacto BC-BC y CT-CT, pero entre las subunidades de la misma capa existe poca interacción directa. Dichas estructuras cristalinas revelaron también un dominio estructural adicional, que se denominó dominio alostérico (AL). Este dominio sirve como mediador entre los otros dominios proteicos conectando BC y CT y sirve de anclaje para un bucle flexible donde se une el dominio BCCP. El conector entre BCCP y AL debe facilitar el movimiento del grupo prostético biotina durante la catálisis, ya que los sitios BC y CT se sitúan a una distancia de unos 75Å

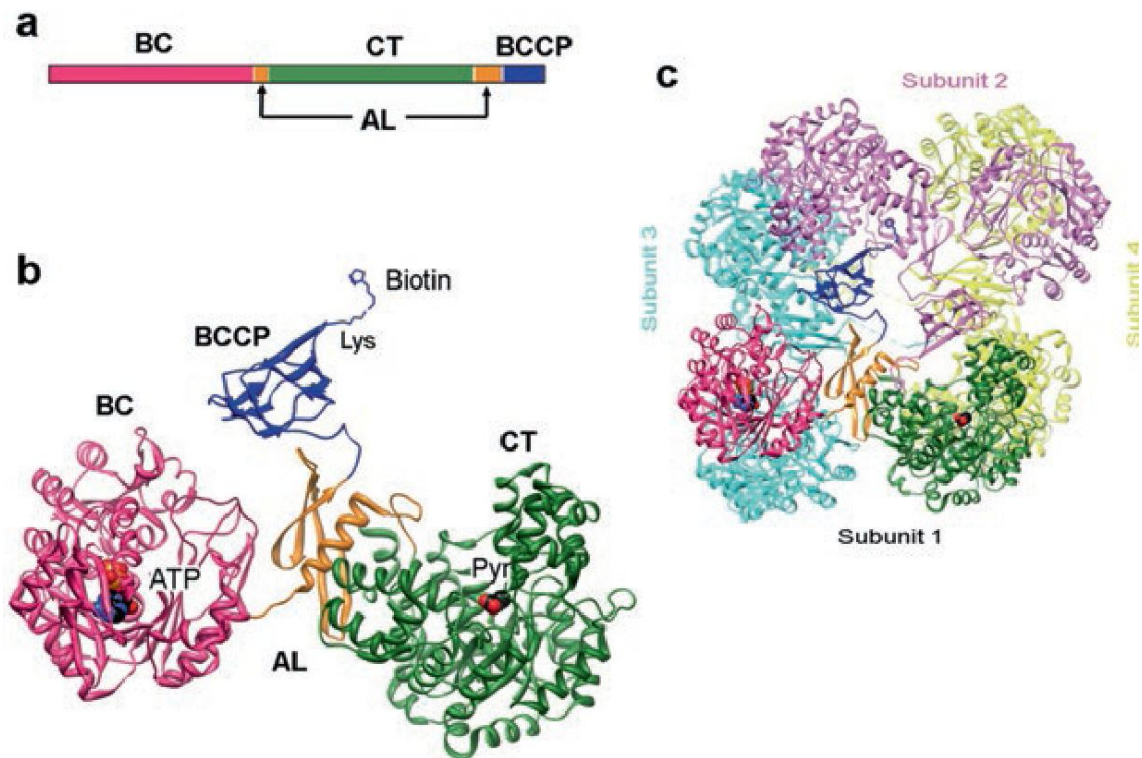


Fig.5. Estructura atómica y dominios de PC. (a) Representación esquemática de dominios estructurales en la estructura primaria de PC. Los dominios son de color: BC, magenta; CT, verde; BCCP, azul; y dominio AL, dorado. (b) Una subunidad de SaPC se representa en cintas tomadas de la estructura cristalográfica de SaPC^[24]. Se muestra una molécula de ATP que reside en el sitio activo de BC, y una molécula de piruvato en el sitio de CT. La biotina se representa unida al residuo Lys del dominio BCCP. (c) Estructura de cristal de SaPC tetramérico de longitud completa^[24]. Una de las subunidades está coloreada en el dominio (subunidad 1), mientras que las subunidades 2, 3 y 4 se ven en rosa, azul y amarillo respectivamente.^[26]

3. Piruvato carboxilasa: Mecanismo de reacción

Las reacciones que se producen en cada sitio activo de PC se dividen en:

- Fase I: reacciones llevadas a cabo en BC.
- Fase II: reacciones llevadas a cabo en CT.

En cada una de las cuales hay 3 reacciones a su vez:

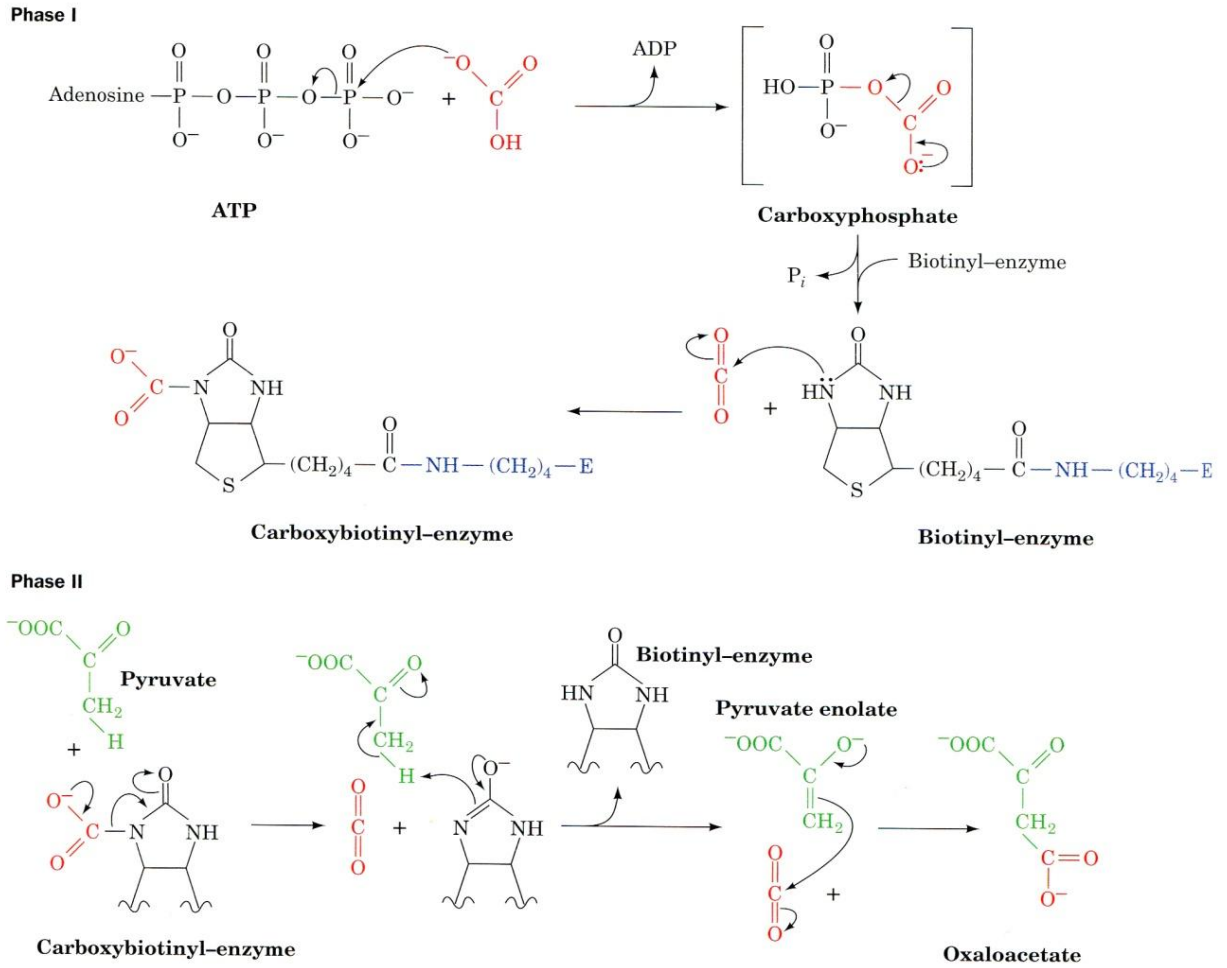


Fig.6. La fase 1 consiste en una reacción en tres pasos, en la que el bicarbonato y el ATP forman el carboxifosfato, seguido por la generación de CO₂ en la enzima, el cual carboxila a la biotina. La fase II es una reacción en tres pasos donde se produce el CO₂ en el sitio activo tras la eliminación del biotinil enzima, que acepta un protón del piruvato formándose el piruvato enolato. Éste entonces ataca nucleofílicamente al CO₂ dando oxalacetato.^[16]

El ATP que se usa en la primera reacción de la primera fase es unido a Mg²⁺:

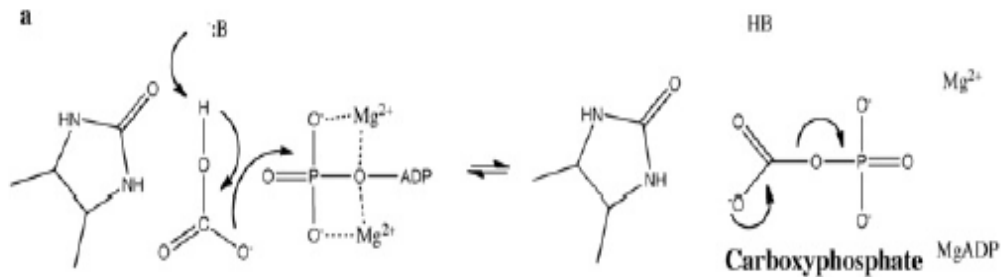


Fig.7. El bicarbonato se activa mediante fosforilación, usando MgATP, para formar el carboxifosfato intermedio en el sitio activo del dominio de BC.^[27]

4. Piruvato carboxilasa: Importancia en el metabolismo celular

En eucariotas el enzima mitocondrial PC produce oxalacetato, metabolito esencial en el ciclo de Krebs e intermediario clave en el metabolismo^[32] mediante el cual se enlazan diferentes rutas metabólicas de carbohidratos, lípidos, aminoácidos y nucleótidos^[33]. En humanos se expresa una única isoforma que se encuentra exclusivamente en la matriz mitocondrial. Esta actividad aparece en gran variedad de rutas metabólicas (fig.8), cuya significancia depende del organismo, tejido y tipo de célula.

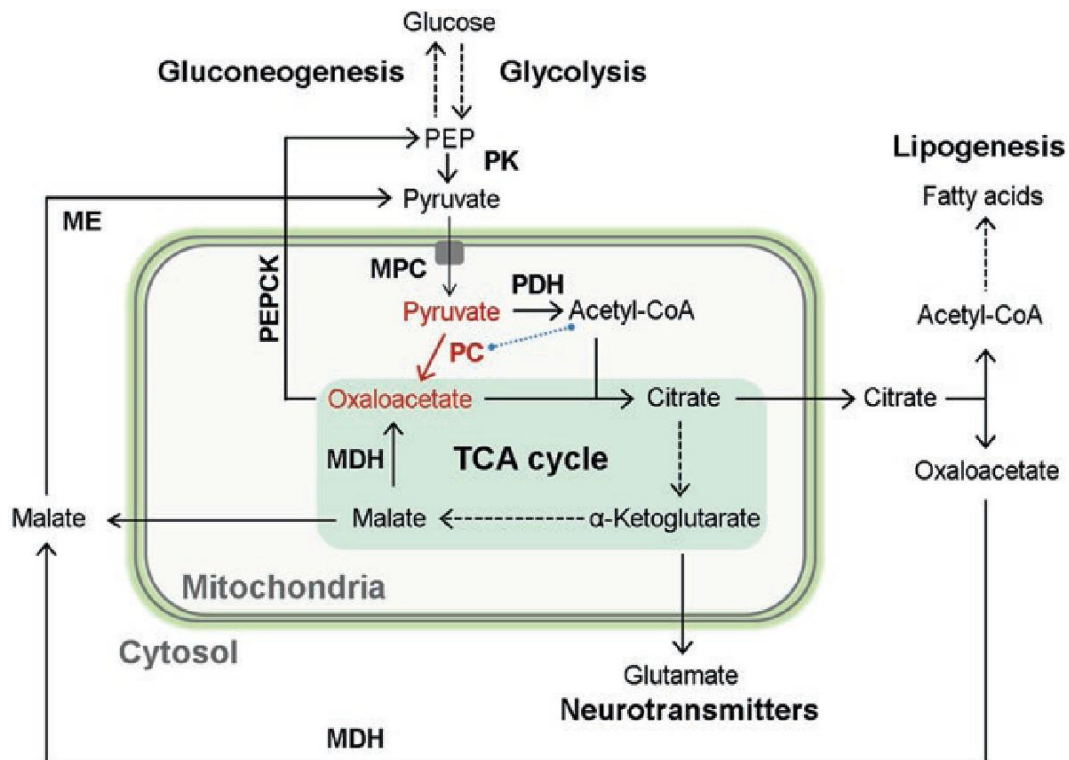


Fig.8. Esquema de las rutas metabólicas en las que interviene la PC eucariótica. La PC carboxila el piruvato en oxalacetato (coloreado en rojo) siendo ésta una enzima anaplerótica que alimenta el ciclo de TCA en las mitocondrias. Los intermediarios del ciclo TCA participan en varias rutas metabólicas. De forma alternativa el oxalacetato se puede desviar a la gluconeogénesis, donde la reacción de la PC es el primer paso. La actividad enzimática de PC es estimulada por acetil-CoA (línea azul). Las flechas negras e ininterrumpidas representan reacciones enzimáticas en un solo paso, y las flechas discontinuas resumen varios pasos. Los acrónimos en la figura representan: fosfoenolpiruvato (PEP); piruvato quinasa (PK); portador de piruvato mitocondrial (MPC); fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCCK); piruvato deshidrogenasa (PDH); piruvato carboxilasa (PC); ciclo de ácido tricarboxílico (TCA); enzima málica (ME); y malato deshidrogenasa (MDH).^[26]

El piruvato es el producto que se obtiene de la glicolisis y es la principal entrada de carbono al ciclo de los TCA. Este ciclo ocurre en la matriz mitocondrial por lo que el piruvato citosólico tiene que atravesar la membrana mitocondrial hasta la matriz a través del transportador mitocondrial de piruvato (MPC).

Una vez transportado a la matriz de la mitocondria, este piruvato puede seguir dos vías (Fig.8):

- Convertirse en Acetil-CoA mediante el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDH) y seguir el ciclo TCA.
- Convertirse en oxalacetato por PC para alimentar el ciclo TCA o para iniciar la gluconeogénesis, vía por la cual se obtendrá glucosa a partir de precursores no glucosídicos.

Dada la importancia de PC en el metabolismo celular, su actividad está estrechamente regulada. La expresión de PC es casi ubicua a través del cuerpo. Los máximos niveles de expresión se encuentran en ciertos tejidos, tales como el hígado, riñón, tejido adiposo y corazón^[3]. La actividad específica de PC está regulada positivamente por acetil-CoA^[12]. Altos niveles de acetil-CoA indican que: (1) la demanda energética celular se ha cubierto y el piruvato se utilizará para la gluconeogénesis o (2) que hay inadecuada cantidad de oxalacetato para aceptar el acetil-CoA producido por la piruvato deshidrogenasa durante el stress energético. Bajo la primera condición, PC juega el papel crítico de canalizar el carbono del piruvato hacia la gluconeogénesis. Bajo la segunda, PC proporciona una lanzadera anaplerótica crítica para mantener el flujo de carbono del ciclo de TCA. La regulación combinada de PC y piruvato deshidrogenasa, determina hacia donde se canaliza el flujo total del carbono, de acuerdo con el papel crítico de PC en la gluconeogénesis es regulada por el ayuno y la realimentación. En respuesta a la insulina la actividad PC está disminuida, ralentizando el flujo de carbono gluconeogénico durante los tiempos de altos niveles de glucosa. En respuesta al ayuno, los niveles de mRNA de PC aumentan y soportan la gluconeogénesis incrementada^[12,34,35,36].

5. Importancia de PC en los tejidos de mamífero

GLUCONEOGENESIS EN HIGADO Y RIÑON

La glucosa sintetizada en el hígado y en menor medida por corteza renal e intestino delgado a partir de precursores no carbohidratos como el lactato, la alanina, el glicerol y la glutamina, se usa como fuente de energía en los períodos de ayuno prolongado en el cerebro que la utiliza como combustible primario y en los glóbulos rojos que la

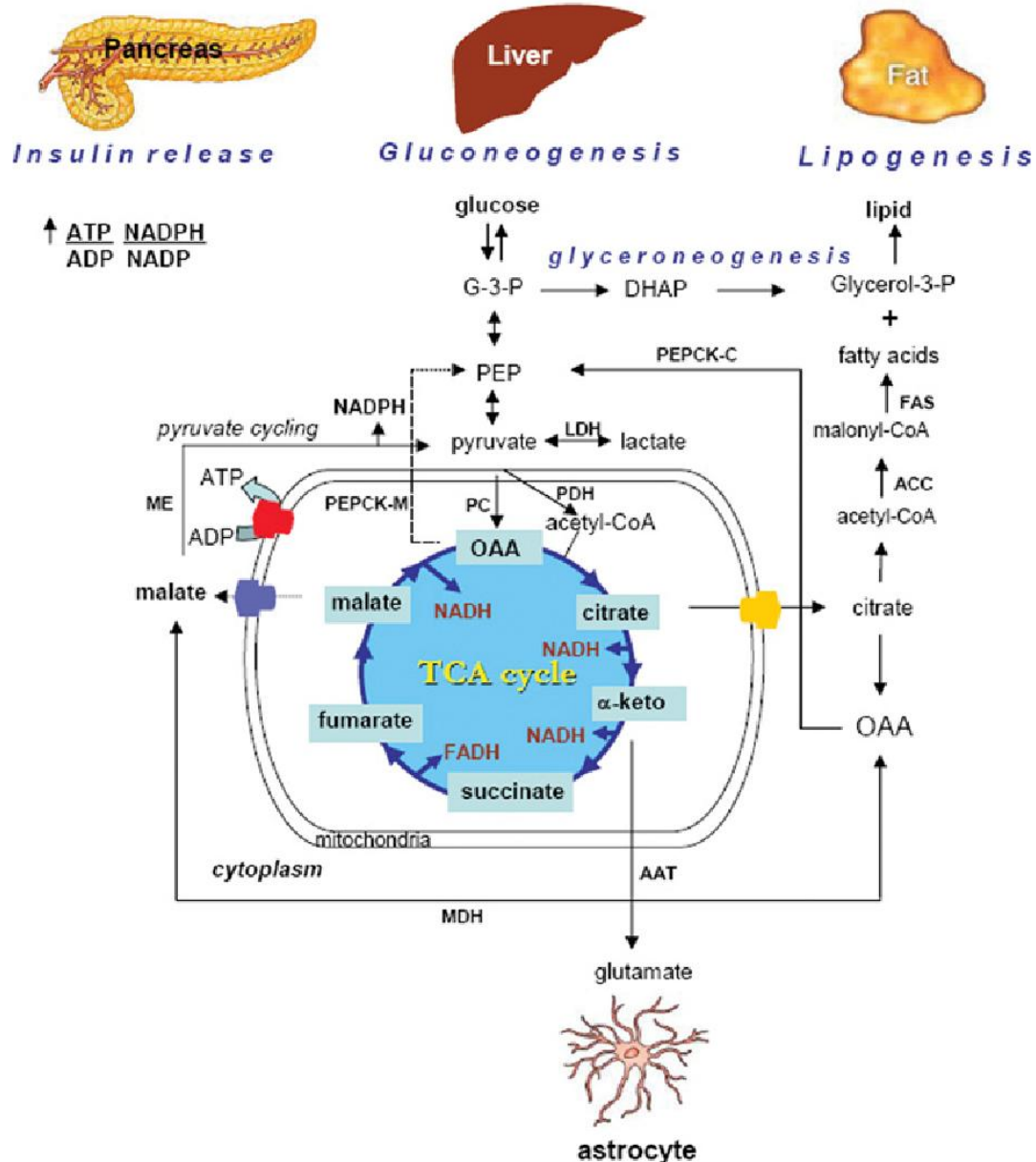


Fig.9. La glucosa se oxida a piruvato a través de la ruta glucolítica. PC repone oxaloacetato en el ciclo de TCA cuando sus intermedios se usan para varias rutas biosintéticas, dependiendo de los tejidos. En el hígado, el oxaloacetato (OAA) se utiliza como precursor de la gluconeogénesis, por lo que el oxaloacetato, además puede salir de las mitocondrias como malato antes de convertirse de nuevo en oxalacetato mediante MDH citosólica. En algunas situaciones, el oxaloacetato se convierte en PEP por PEPCK-mitocondrial (PEPCK-M)^[37,38]. El oxalacetato citoplásmico se convierte en glucosa mediante las actividades combinadas de PEPCK-citoplásmico (PEPCK-C), fructosa 1,6-bisfosfatasa, glucosa 6-fosfatasa y siete de las diez enzimas glucolíticas. En los adipocitos, PC proporciona oxaloacetato para facilitar la exportación de acetyl-CoA en forma de citrato que deja las mitocondrias para la síntesis de ácidos grasos de novo. El oxaloacetato liberado en el citoplasma por la enzima de escisión del citrato se convierte en PEP por PEPCK-C como en el hígado^[38]. La PEP luego se convierte en glicerol por una vía conocida como "gliceroneogénesis"^[39], mientras que la acetyl-CoA se convierte en malonil-CoA por ACC. El FAS cataliza la condensación de fracciones de dos carbonos a partir de malonil-CoA para producir acil-CoA de cadena larga que posteriormente se esterifican con glicerol para formar triacilgliceroles. En las células β pancreáticas, PC participa en un "ciclo de piruvato" que implica el intercambio de intermediarios del ciclo de TCA y piruvato citosólico, catalizado por MDH y enzima málica (ME)^[40,41]. Este ciclo produce una gran cantidad de NADPH que es uno de los factores de acoplamiento metabólico. En los astrocitos, el α-cetoglutarato se convierte mediante una aspartato aminotransferasa (AAT) en glutamato, una de las sustancias neurotransmisoras de las neuronas^[42]. Imagen y pie de página tomado de^[17]

utilizan como combustible único. Si observamos la Fig.9, PC es la encargada de catalizar el primer paso de la gluconeogénesis, que produce oxalacetato para su posterior conversión en fosfoenolpiruvato (PEP) mediante la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). La PEPCK tiene dos isoformas, una en la mitocondria y otra en el citoplasma en distintas proporciones según la especie que se trate. El oxalacetato puede convertirse en PEP por la PEPCK-mitocondrial (PEPCK-M)^[37] y después transportarse al citoplasma a través de un sistema transportador de aniones^[38], y una vez en el citoplasma convertirse en glucosa a través de las otras dos enzimas gluconeogénicas (fructosa-1,6-bisfosfatasa y glucosa-6-fosfatasa).

Sin embargo, en situaciones de inanición, donde la principal fuente de piruvato en el hígado es la alanina, en las cuales el NADH citosólico es bajo y el NADH mitocondrial alto, el oxalacetato puede convertirse primero a malato por la MDH mitocondrial antes de dejar la mitocondria mediante el transportador de malato. El MDH citosólico convierte malato en oxalacetato de nuevo con la reducción de NAD⁺ a NADH. El oxalacetato se convierte en PEP por la PEPCK-citosólica y el NADH es usado para reducir 1-3-bisfosfoglicerato en gliceraldehído-3-fosfato, reacción necesaria para la gluconeogénesis.

la actividad hepática de PC en roedores se ha visto afectada por el estado nutricional^[43,44]. La inanición así como la gluconeogénesis incrementan la actividad de PC y por tanto la gluconeogénesis a través de un incremento en la captación del sustrato y un aumento del flujo a través de PC en el hígado de roedores^[45,46], de esta manera se muestra el papel clave de PC en el control de la gluconeogénesis.

PC EN ADIPOCITOS

Como las enzimas gluconeogénicas clave, glucosa-6-fosfatasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa no están presentes en el tejido adiposo, se ha sugerido la implicación de PC en la síntesis de novo de los ácidos grasos^[47] de hecho, PC está altamente expresada en adipocitos. PC participa en esta vía, proporcionando oxalacetato para su conversión a citrato que se exporta de la mitocondria y se escinde en el citosol formando oxalacetato y acetil-CoA^[47]. Esta última molécula se utilizará para la síntesis de ácidos grasos de cadena larga. La actividad y el mRNA de PC se elevan conjuntamente con otras enzimas lipogénicas claves, como por ejemplo ATP-citrato-liase, enzima málica, ACC (acetil-CoA carboxilasa) y FAS (ácido graso sintasa)^[48].

PC en adipocitos también está involucrada en la gliceroneogénesis, vía que sintetiza glicerol, necesario para la reesterificación de ácidos grasos^[39]. Esta vía es importante para reducir en el plasma los niveles elevados de ácidos grasos no esterificados debido a la lipólisis o una dieta rica en grasas. PC proporciona oxalacetato necesario para la formación de PEP a través de PEPCK-mitocondrial y luego a glicerol a través de la vía de la gliceroneogénesis. El uso de fármacos que reducen los niveles de ácidos grasos no

esterificados mediante reesterificación incrementan la expresión de PC^[49,50] y PEPCK en el tejido adiposo lo que indica la cooperación existente entre estas enzimas en la regulación de la gliceroneogénesis.

PC EN ASTROCITOS

La glucosa se metaboliza a través de la glucólisis en astrocitos y neuronas, pero en estas últimas el piruvato se convierte en acetil-CoA a través de PDH para entrar en el ciclo de TCA y producir energía, por lo que las neuronas de los animales en estado postprandial dependen exclusivamente de glucosa exógena.

Sin embargo en astrocitos, el piruvato también puede ser carboxilado por PC y formar oxalacetato necesario para rellenar el ciclo TCA^[42]. Los astrocitos utilizan continuamente α -cetoglutarato como precursor de glutamato y parte de este se convierte en ácido γ -aminobutírico, siendo ambos neurotransmisores importantes^[51], por lo que PC será necesaria para reponer este α -cetoglutarato.

El glutamato formado en los astrocitos no es fácilmente difusible a neuronas por lo que tendrá que convertirse en glutamina por la glutamina sintetasa para poder ser absorbido por las neuronas y una vez allí volver a transformarse en glutamato mediante la glutaminasa. Una vez usado por las neuronas, el glutamato es recuperado por los astrocitos (este ciclo se conoce como ciclo glutamina/glutamato)^[42]. La presencia de PC solo en astrocitos explica porque las neuronas no pueden sintetizar directamente glutamato a partir de los intermediarios del ciclo TCA^[52]. El análisis de RMN en cerebros de animales hiperamonémicos, revelaron un aumento de flujo metabólico a través de PC con la estimulación de la síntesis de novo de glutamina in-vivo y ex-vivo^[53,54]. Estudios recientes también mostraron que el flujo a través de PC varía entre un 20-50% del total del piruvato dependiendo del agotamiento de piruvato^[55]

PC EN LAS CELULAS PANCREATICAS

En la homeostasis de glucosa, los islotes pancreáticos desempeñan un papel crucial al secretar insulina como respuesta a las fluctuaciones de los niveles de glucosa plasmáticos. Para esta secreción de insulina es necesaria la glucólisis y el metabolismo mitocondrial^[58] pues se requiere ATP intracelular para la exocitosis de insulina porque eleva la relación de ATP/ADP, necesario para el cierre de canales de K_{ATP} . Se ha observado la producción de una cantidad elevada de NADH debido a la alta actividad del ciclo TCA, causada por la oxidación rápida de piruvato derivado de la glucosa. Este suministro de equivalentes de reducción, activa la fosforilación oxidativa formando así ATP para mantener alta la relación ATP/ADP y hacer posible la salida de insulina.

Para la exocitosis de insulina no solo se necesita ATP, sino que también se necesitan otros nucleótidos como el NADPH que son importantes factores de acoplamiento

necesarios para la exocitosis de insulina^[59]. Por lo tanto el papel de PC en esta regulación, no solo es anaplerótico suministrando grandes cantidades de oxalacetato, sino que también está implicada en la formación NADPH. La generación de un nivel elevado de NADPH se consigue a través de una lanzadera denominada “ciclo del piruvato”, entre la mitocondria y el citoplasma. El oxalacetato formado por PC se convierte en malato o citrato y sale de la mitocondria a través de la lanzadera piruvato/malato^[40] o citrato/piruvato^[60], respectivamente. La enzima málica (EC 1.1.1.40), cataliza la producción de NADPH en ambas lanzaderas. Como estas dos lanzaderas funcionan como ciclos, la cantidad de NADPH producido es mucho mayor que la obtenida por la vía de las pentosas fosfato.

Inicialmente, se estimó que entraban cantidades similares de piruvato a través de PC y de PDH en el ciclo de TCA y que estos dos flujos eran igual de importantes para la secreción de insulina inducida por glucosa^[61]. Sin embargo, experimentos más recientes usando RMN mostraron que el piruvato que entra en la mitocondria, sale en dos grupos diferentes: un grupo derivado de la glucólisis que se oxida a acetil-CoA mediante PDH, y otro grupo que se obtiene mediante el intercambio de intermediarios del ciclo de TCA, que implica la actividad catalítica del PC, y es precisamente este último grupo el que se relaciona con la secreción de insulina^[62].

6. Papel de una nueva vía de síntesis de acil-CoA en islotes humanos

Hasta ahora los estudios sobre regulación de la secreción de insulina dependiente de glucosa se han basado en células de islotes de roedores. Los estudios utilizando islotes humanos han determinado que las vías de activación y amplificación de la secreción de insulina son muy similares a las de islotes de roedores^[63], pero un reciente estudio ha demostrado que la actividad y la expresión de PC junto con la proporción del flujo de piruvato a través de PC fueron menores en humanos^[64]. Los islotes humanos se caracterizaron por una elevada enzima succinil Co-A transferasa (SCOT) y de acetoacetil-CoA sintasa (AAS) que forman acetoacetato mitocondrial (uno de los principales cuerpos cetónicos) y acil-CoAs citosólicos respectivamente (Fig.10).

Un estudio realizado impidiendo la expresión de SCOT o AAS en células pancreáticas humanas^[65,66] sugirió que existe una vía descubierta recientemente que implica la síntesis de acetoacetato, y la producción posterior de acil-CoA citosólico^[64] (Fig.10) que puede actuar sobre la exocitosis de insulina^[67]. Esta vía puede ser más activa en humanos que en roedores dada la menor carboxilación de piruvato debido a la menor actividad y expresión de PC en humanos^[64]

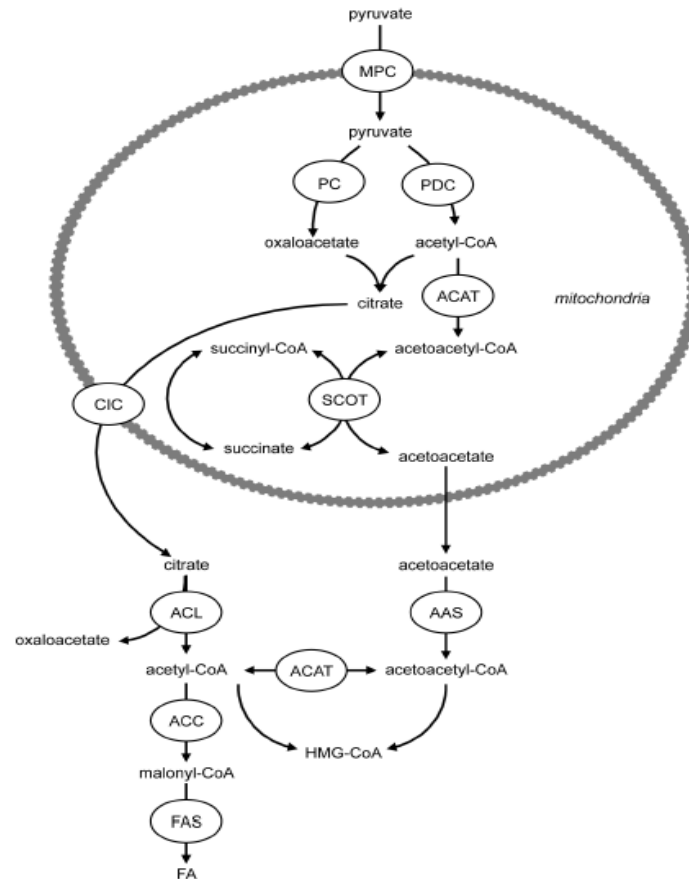


Fig.10. Papel de una nueva vía de síntesis de acil-CoA en islotos humanos. Los islotos humanos se caracterizan por una elevada succinil-CoA: 3-cetoácido-CoA transferasa (SCOT) y acetoacetyl-CoA sintetasa (AAS), que forman acetoacetato mitocondrial y permiten la formación de acil-CoA citosólica, respectivamente. Esta vía puede ser más activa en humanos en comparación con las células β de roedores debido a una menor carboxilación de piruvato como resultado de una menor expresión y actividad de PC (y por lo tanto una descarboxilación de piruvato mayor a través de PDC) en comparación con islotos de roedores. ACAT, acetyl-CoA acetiltransferasa; ACC, acetyl-CoA carboxilasa; ACL, ATP-citrato liasa; CIC, transportador de isocitrato de citrato; FAS, ácido graso sintasa; MPC, portador de piruvato mitocondrial; PC, piruvato carboxilasa; PDC, complejo piruvato deshidrogenasa; SCOT, succinil-CoA: 3-cetoácido-CoA transferasa.^[68]

CONCLUSIONES

PC es la principal enzima anaplerótica del ciclo de TCA, y está regulada alostéricamente por acetyl-CoA

En el hígado y en el riñón, PC es la primera enzima que interviene en la gluconeogénesis proporcionando el oxalacetato necesario para la síntesis de glucosa

En adipocitos PC está implicada en la síntesis de novo de ácidos grasos y en la gliceroneogénesis

En astrocitos, PC es importante para la síntesis de novo de glutamato (importante neurotransmisor excitatorio)

En islotes pancreáticos de roedores, PC es necesaria para la secreción de insulina inducida por glucosa

En el páncreas de células humanas PC se encuentra disminuida con respecto al páncreas de roedores porque en el páncreas humano hay otra vía que utiliza otras dos enzimas (SCOT y AAS) para inducir la liberación de insulina

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Corkey B. E., Deeney J. T., Yaney G. C., Tornheim K., Prentki M. (2000) J. Nutr. 130, 299S–304S
2. Utter MF, Keech DB (1960) Formation of oxaloacetate from pyruvate and carbon dioxide. J Biol Chem 235:PC17–PC18
3. Wexler ID, Du Y, Lisgaris MV, Mandal SK, Freytag SO, Yang BS, Liu TC, Kwon M, Patel MS, Kerr DS (1994) Primary amino acid sequence and structure of human pyruvate carboxylase. Biochim Biophys Acta 1227(1–2):46–52
4. Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW (2002) The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. J Biol Chem 277(34):30409–30412.
5. Chung J, Chen C, Paw BH (2012) Heme metabolism and erythropoiesis. Curr Opin Hematol 19(3):156–162
6. Owen O.E., Satish C. Kalhan and Richard W. Hanson (2002) The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function J. Biol. Chem., 277:30409-30412.
7. Jitrapakdee S, Walker ME, Wallace JC (1996) Identification of novel alternatively spliced pyruvate carboxylase mRNAs with divergent 5'-untranslated regions which are expressed in a tissue-specific manner. Biochem Biophys Res Commun 223(3):695–700.
8. Bottger I, Wieland O, Brdiczka D, Pette D (1969) Intracellular localization of pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver. Eur J Biochem 8(1):113–119
9. Wallace JC (2010) My favorite pyruvate carboxylase. IUBMB Life 62(7):535–538.

10. Xiang S, Tong L (2008) Crystal structures of human and *Staphylococcus aureus* pyruvate carboxylase and molecular insights into the carboxyltransfer reaction. *Nat Struct Mol Biol* 15(3):295–302
11. Jitrapakdee S, St Maurice M, Rayment I, Cleland WW, Wallace JC, Attwood PV (2008) Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* 413(3):369–387
12. Adina-Zada A, Zeczycki TN, Attwood PV (2012) Regulation of the structure and activity of pyruvate carboxylase by acetyl CoA. *Arch Biochem Biophys* 519(2):118–130.
13. Marin-Valencia I, Roe CR, Pascual JM (2010) Pyruvate carboxylase deficiency: mechanisms, mimics and anaplerosis. *Mol Genet Metab* 101(1):9–17
14. Waldrop GL, Holden HM, St Maurice M (2013) The enzymes of biotin dependent CO₂ metabolism: what structures reveal about their reaction mechanisms. *Protein Sci* 21(11):1597–1619
15. Tong L (2013) Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell Mol Life Sci* 70(5):863–89
16. Voet D & Voet JG, John Wiley & Sons Inc (2004) "Biochemistry"
17. Attwood PV, Wallace JC (2002) Chemical and catalytic mechanisms of carboxyl transfer reactions in biotin-dependent enzymes. *Acc Chem Res* 35(2):113–120
18. Wei J, Tong L (2015) Crystal structure of the 500-kDa yeast acetyl-CoA carboxylase holoenzyme dimer. *Nature* 526(7575):723–727.
19. Tran TH, Hsiao YS, Jo J, Chou CY, Dietrich LE, Walz T, Tong L (2015) Structure and function of a single-chain, multi-domain long-chain acyl-CoA carboxylase. *Nature* 518(7537):120–124.
20. Jurado AR, Huang CS, Zhang X, Zhou ZH, Tong L (2015) Structure and substrate selectivity of the 750-kDa alpha6beta6 holoenzyme of geranyl-CoA carboxylase. *Nat Commun* 6:8986.
21. Huang CS, Ge P, Zhou ZH, Tong L (2012) An unanticipated architecture of the 750-kDa alpha-6beta6 holoenzyme of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase. *Nature* 481(7380):219–223.
22. Fan C, Chou CY, Tong L, Xiang S (2012) Crystal structure of urea carboxylase provides insights into the carboxyltransfer reaction. *J Biol Chem* 287(12):9389–9398.

23. Huang CS, Sadre-Bazzaz K, Shen Y, Deng B, Zhou ZH, Tong L (2010) Crystal structure of the alpha(6)beta(6) holoenzyme of propionyl-coenzyme A carboxylase. *Nature* 466(7309):1001– 1005.
24. Xiang S, Tong L (2008) Crystal structures of human and *Staphylococcus aureus* pyruvate carboxylase and molecular insights into the carboxyltransfer reaction. *Nat Struct Mol Biol* 15(3):295–302
25. St Maurice M, Reinhardt L, Surinya KH, Attwood PV, Wallace JC, Cleland WW, Rayment I (2007) Domain architecture of pyruvate carboxylase, a biotin-dependent multifunctional enzyme. *Science (New York, NY)* 317(5841):1076–1079
26. Valle M., Harris J., Marles-Wright J. (eds.) (2017) “Pyruvate Carboxylase, Structure and Function”. *Macromolecular Protein Complexes. Subcellular Biochemistry*, vol 83. Springer, Cham
27. Adina-Zada A., Zeczycki T.N., St. Maurice M., Jitrapakdee S., Cleland W.W., and Attwood P.V. (2012) *Biochem. Soc. Trans.* 40, 567–572
28. Wang D, De Vivo D, Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH et al. (eds) (1993) *Pyruvate Carboxylase Deficiency. GeneReviews(R)*. Seattle (WA)
29. Robinson BH (2006) Lactic acidemia and mitochondrial disease. *Mol Genet Metab* 89(1–2):3–13.
30. Saudubray JM, Marsac C, Cathelineau CL, Besson Leaud M, Leroux JP (1976) Neonatal congenital lactic acidosis with pyruvate carboxylase deficiency in two siblings. *Acta Paediatr Scand* 65(6):717–724
31. Garcia-Cazorla A, Rabier D, Touati G, Chadeaux-Vekemans B, Marsac C, de Lonlay P, Saudubray JM (2006) Pyruvate carboxylase deficiency: metabolic characteristics and new neurological aspects. *Ann Neurol* 59(1):121–127.
32. Utter MF, Keech DB (1960) Formation of oxaloacetate from pyruvate and carbon dioxide. *J Biol Chem* 235:PC17–PC18
33. Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB (2014) Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci* 71(14):2577–2604.
34. Hebert AS, Dittenhafer-Reed KE, Yu W, Bailey DJ, Selen ES, Boersma MD, Carson JJ, Tonelli M, Balloon AJ, Higbee AJ, Westphall MS, Pagliarini DJ, Prolla TA, Assadi-Porter F, Roy S, Denu JM, Coon JJ (2013) Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial proteome. *Mol Cell* 49(1):186–199.

35. Deng WJ, Nie S, Dai J, Wu JR, Zeng R (2010) Proteome, phosphoproteome, and hydroxyproteome of liver mitochondria in diabetic rats at early pathogenic stages. *Mol Cell Proteomics* 9(1):100–116.
36. Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, Yao J, Zhou L, Zeng Y, Li H, Li Y, Shi J, An W, Hancock SM, He F, Qin L, Chin J, Yang P, Chen X, Lei Q, Xiong Y, Guan KL (2010) Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 327(5968):1000–1004.
37. Hanson, R. W. and Patel, Y. M. (1994) Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP): the gene and the enzyme. *Adv. Enzymol.* 69, 203–281
38. Robinson, B. H. (1971) Transport of phosphoenolpyruvate by the tricarboxylate transporting system in mammalian mitochondria. *FEBS Lett.* 14, 309–312
39. Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M. and Hanson, R. W. (2003) Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* 278, 30413–30416
40. MacDonald, M. J. (1995) Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 270, 20051–20058
41. Farfari, S., Schulz, V., Corkey, B. and Prentki, B. (2000) Glucose regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic β -cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 49, 718–726
42. Hertz, L., Peng, L. and Dienel, G. A. (2007) Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 27, 219–249
43. Bizeau, M. E., Short, C., Thresher, J. S., Commerford, S. R., Willis, W. T. and Pagliassotti, M. J. (2001) Increased pyruvate flux capacities account for diet-induced increases in gluconeogenesis in vitro. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R427–R433
44. Hagopian, K., Ramsey, J. J. and Weindruch, R. (2004) Krebs cycle enzymes from livers of old mice are differentially regulated by caloric restriction. *Exp. Gerontol.* 39, 1145–1154
45. Salto, R., Sola, M., Oliver, F. J. and Vargas, A. M. (1996) Effects of starvation, diabetes and carbon tetrachloride intoxication on rat kidney cortex and liver pyruvate carboxylase levels. *Arch. Physiol. Biochem.* 104, 845–850

46. Large, V. and Beylot, M. (1999) Modifications of citric acid cycle activity and gluconeogenesis in streptozotocin-induced diabetes and effects of metformin. *Diabetes* 48, 1251–1257
47. Ballard, F. J. and Hanson, R. W. (1967) The citrate cleavage pathway and lipogenesis in rat adipose tissue: replenishment of oxaloacetate. *J. Lipid Res.* 8, 73–79
48. Wise, L. S., Sul, H. S. and Rubin, C. S. (1984) Coordinate regulation of the biosynthesis of ATP-citrate lyase and malic enzyme during adipocyte differentiation. Studies on 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* 259, 4827–4832
49. Wellen, K. E., Uysal, K. T., Wiesbrock, S., Yang, Q., Chen, H. and Hotamisligil, G. S. (2004) Interaction of tumor necrosis factor α - and thiazolidinedione-regulated pathways in obesity. *Endocrinology* 145, 2214–2220
50. Wilson-Fritch, L., Nicoloso, S., Chouinard, M., Lazar, M. A., Chui, P. C., Leszyk, J., Straubhaar, J., Czech, M. P. and Corvera, S. (2004) Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J. Clin. Invest.* 114, 1281–1289
51. Gamberino WC, Berkich DA, Lynch CJ, Xu B, LaNoue KF (1997) Role of pyruvate carboxylase in facilitation of synthesis of glutamate and glutamine in cultured astrocytes. *J Neurochem* 69(6):2312–2325
52. Miller, K. E., Richards, B. A. and Kriebel, R. M. (2002) Glutamine-, glutamine synthetase-, glutamate dehydrogenase- and pyruvate carboxylase-immunoreactivities in the rat dorsal root ganglion and peripheral nerve. *Brain Res.* 945, 202–211
53. Lapidot, A. and Gopher, A. (1994) Cerebral metabolic compartmentation. Estimation of glucose flux via pyruvate carboxylase/pyruvate dehydrogenase by ^{13}C NMR isotopomer analysis of D-(U- ^{13}C)glucose metabolites. *J. Biol. Chem.* 269, 27198–27208
54. Kanamatsu, T. and Tsukada, Y. (1999) Effects of ammonia on the anaplerotic pathway and amino acid metabolism in the brain: an ex vivo ^{13}C NMR spectroscopic study of rats after administering (2- ^{13}C) glucose with or without ammonium acetate. *Brain Res.* 841, 11–19
55. Teixeira, A. P., Santos, S. S., Carinhas, N., Oliveira, R. and Alves, P. M. (2007) Combining metabolic flux analysis tools and ^{31}C NMR to estimate intracellular fluxes of cultured astrocytes. *Neurochem. Int.* 52, 478–486

56. Jitrapakdee, S. and Wallace, J. C. (1999) Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 340, 1–16
57. Cao Z, Zhou Y, Zhu S, Feng J, Chen X, Liu S, Peng N, Yang X, Xu G, Zhu Y (2016) Pyruvate Carboxylase Activates the RIG-I-like Receptor-Mediated Antiviral Immune Response by Targeting the MAVS signalosome. *Sci Report* 6:22002.
58. Wiederkehr, A. and Wollheim, C. B. (2006) Implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology* 147, 2643–2649
59. MacDonald, M. J., Fahein, L. A., Brown, L. J., Hasan, N. M., Buss, J. D. and Kendrick, M. A. (2005) Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E1–E15
60. Farfari, S., Schulz, V., Corkey, B. and Prentki, B. (2000) Glucose regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic β -cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 49, 718–726
61. MacDonald, M. J. (1993) Estimates of glycolysis, pyruvate (de) carboxylation, pentose phosphate pathway, and methyl succinate metabolism in incapacitated pancreatic islets. *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 205–214
62. Lu, D., Mulder, H., Zhao, P., Burgess, S. C., Jensen, M. V., Kamzolova, S., Newgard, C. B. and Sherry, A. D. (2002) ^{13}C NMR isotopomer analysis reveals a connection between pyruvate cycling and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2708–2713
63. Henquin JC, Dufrane D, Nenquin M. (2006) Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes*; 55:3470-7; PMID:17130494;
64. MacDonald MJ, Longacre MJ, Stoker SW, Kendrick M, Thonpho A, Brown LJ, et al. (2011) Differences between human and rodent pancreatic islets: low pyruvate carboxylase, atp citrate lyase, and pyruvate carboxylation and high glucose-stimulated acetoacetate in human pancreatic islets. *J Biol Chem*; 286:18383-96
65. Hasan NM, Longacre MJ, Stoker SW, Boonsaen T, Jitrapakdee S, Kendrick MA, et al. (2008) Impaired anaplerosis and insulin secretion in insulinoma cells caused by small interfering RNA-mediated suppression of pyruvate carboxylase. *J Biol Chem*; 283:28048-59
66. MacDonald MJ, Smith AD, III, Hasan NM, Sabat G, Fahien LA. (2007) Feasibility of pathways for transfer of acyl groups from mitochondria to the cytosol to

form short chain acyl-CoAs in the pancreatic beta cell. J Biol Chem; 282:30596-606

67. Corkey BE, Deeney JT, Yaney GC, Tornheim K, Prentki M. The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction. J Nutr 2000; 130:299- 304

68. Sugden M.C., Holness M.J. (November/December 2011) Islets 3:6, 302-319