



**UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE INHIBICIÓN
DE LA ACTIVIDAD CARNITINA
PALMITOILTRANSFERASA 1**

ASSIA BENTEBIBEL

Barcelona, 2009



UNIVERSIDAD DE BARCELONA - FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORADO: BIOMEDICINA
BIENIO 2002-2004

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA 1

Memoria presentada por Assia Bentebibel, Licenciada en Biología por la Universidad de Badji Mokhtar –Annaba- Argelia, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona.

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Fausto García Hegardt y la Dra. Guillermina Asins.

Dr. Fausto G. Hegardt

Dra. Guillermina Asins

Assia Bentebibel

ASSIA BENTEBIBEL

Barcelona, 2009

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

La carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) es un enzima que pertenece a la familia de las carnitina aciltransferasas y facilita el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial. Ambas isoformas hepática y muscular de CPT1 (CPT1A y CPT1B) están inhibidas fisiológicamente y de forma diferente por malonil-CoA, primer intermediario en la síntesis de los ácidos grasos. Aunque se han llevado a cabo diversos estudios para explicar esta diferente regulación, no se conocen todavía los mecanismos de acción del malonil-CoA ni la ubicación de éste en la proteína. La regulación de la actividad CPT1 por malonil-CoA no solo es de gran interés en el metabolismo de los ácidos grasos que señalizan a la célula la disponibilidad de lípidos o carbohidratos, sino por la implicación de esta señalización en muchos otros procesos metabólicos.

La especificidad del sustrato en las carnitina aciltransferasas viene definida por la longitud de la cadena hidrocarbonada del acil-CoA. Pero poco se conoce sobre cuales son los determinantes moleculares que definen la preferencia de CPT1 sobre aciles-CoA de cadena larga respecto a los de cadena media o corta. Por otro lado, tampoco están bien definidos cuales son los aminoácidos responsables de la correcta ubicación i interacción con el sustrato carnitina y que permiten al enzima mostrar su alto grado de discriminación frente a sustratos parecidos como es la colina, y que es utilizada por otros miembros de la familia de aciltransferasas. Recientemente, la descripción de los cristales de dos miembros de esta familia, carnitina acetiltransferasa (CrAT) y carnitina octanoiltransferasa (COT) ha proporcionado nuevas perspectivas en la base molecular de la especificidad de sustrato y la actividad catalítica en la familia de las aciltransferasas (Jogl 2003; Jogl 2005). Dichos cristales han supuesto un gran avance y han permitido realizar los estudios que se presentan en esta tesis.

En la literatura, han sido descritos muchos inhibidores de CPT1 y recientemente, se ha referido C75 como una diana potencial para el tratamiento de la obesidad y la diabetes tipo 2. Conocido primero como un inhibidor sintético del enzima ácido graso sintasa (FAS), también se ha descrito como un agonista de la actividad CPT1, aumentando la utilización de energía periférica y la oxidación de ácidos grasos en ratones. Sin embargo, aún se desconoce en detalle su mecanismo de acción que será uno de los objetivos de esta tesis.

Este trabajo de tesis se inscribe en el contexto del estudio de las relaciones estructura-función de ambas isoformas hepática y muscular de CPT1 con el fin de

entender mejor los mecanismos moleculares implicados en la actividad y en la inhibición de CPT1 por malonil-CoA y por otros fármacos.

Los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

1. Estudio de la interacción malonil-CoA/CPT1 y definición por análisis funcional y estructural de dicha interacción.
2. Estudio de la especificidad de los sustratos carnitina y palmitoil-CoA de CPT1B y análisis de los aminoácidos que confieren al enzima sensibilidad al malonil-CoA.
3. Análisis del efecto del C75 y su mecanismo de acción sobre CPT1 *in vitro* e *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

*A la memoria de mi padre Ali, a mi madre Rahima
y a mi querido marido Riad*

En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento a mis dos directores de tesis por todos sus esfuerzos y dedicación para que esta tesis haya podido tener lugar. Al Prof. Fausto García Hegardt por permitirme realizar la tesis en su grupo, por su entusiasmo por la ciencia que también sabe transmitir a los demás y por abrirme el camino a la investigación. A la Dra. Guillermina Asins, por su dinamismo, buen humor, y sobre todo por su apoyo en los momentos difíciles, que de esos hay muchos, y por todo aquello que me ha enseñado.

Gracias también a la Dra. Dolors Serra, por su generosidad, por tener siempre un momento para los demás y por todo el apoyo y consejos científicos que me dio durante la realización de esta tesis. Mis agradecimientos también a otros miembros del grupo, al Dr. Paulino Gómez y al Dr. Eduardo López-Viñas por su amabilidad y por su gran contribución en el tema bioinformático. Muchas gracias a la Dra. Núria Casals por sus consejos y sugerencias en los seminarios del grupo y por haberme mostrado siempre su ayuda e interés por la tesis.

Quisiera dar las gracias a todos los compañeros del grupo durante todos estos años, porque al final se han convertido en mis amigos. A los que estuvieron en estos años de trabajo: Montse, Ruth, Judith, David, Guillem y Toni; y a los que están y que siguen alegrando el cuarto: Laura, Irene, Paula, Yolanda, Chandru y Pep, por las risas, las penas y todo lo demás. Gracias Montse por tu paciencia, generosidad, ayuda incondicional, por tus consejos y por haberme acompañado en los primeros momentos en los que me enseñaste cómo funciona el mundo de las *Saccharomyces*. A David, por ser un compañero de poyata ideal y por compartir risas y alegrías y también por tu increíble buen humor. Sin olvidar darte las gracias por enseñarme “tu castellano”. Gracias a Laura por tus consejos, por enseñarme tantas cosas y por tus ánimos en todo momento. Quisiera agradecer a todos en general por permitir y colaborar para que siempre haya habido un clima excelente en el laboratorio.

Cómo no, agradecer a todos los grupos del Departamento por su ayuda en un momento u otro, por los encuentros en el pasillo aunque sean por unos minutos. Mil gracias también a Mari Carmen, Tina y Brugués por su ayuda con los papeles, y a Silvia porque el departamento entero ha cambiado de color a tu lado.

Mil gracias a los mejores haciendo reuniones, excursiones, comilonas y sobre todo por llenar de risas los fines de semana. A Jordi, Gisela, Isabel, Judith, Vero, Juan, Rubén, Ruth y Evaristo.

Quiero dar las gracias al Prof. Salih Wakil por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio, en Houston. Muchas gracias al Dr. Lutfi Abu-elheiga por su entusiasmo científico, sugerencias y optimismo. Gracias Paricher Cordari por tu ayuda y paciencia, por enseñarme a obtener hepatocitos primarios de ratón, por estar ahí en el laboratorio en cada momento y por demostrarme que es posible hacer muy buenos amigos en poco tiempo. También agradezco la ayuda de los otros miembros del laboratorio del Dr. Wakil: Gu, Mao, Patrick y Tatim.

Y recordar a todos los que no tienen nada que ver con este mundo de la ciencia, pero sin los que me hubiera sido imposible llegar hasta aquí. Mis amigos, con los que desconectar cuando hace falta. Gracias a mi familia por el cariño, el apoyo en todo momento y comprensión que he recibido por su parte durante todos estos años. Gracias a mi madre por su paciencia, cariño y dedicación, y también a mis hermanas, Salima y Rim por estar ahí y apoyarme durante todo este tiempo.

Aunque en último lugar, con mayor énfasis quiero agradecer a mi marido Riad todo el cariño, apoyo incondicional, alegrías, colaboración y comprensión, por su paciencia (que ha tenido mucha) porque sin él no sé si hubiera llegado al final... Tú más que nadie has sufrido mis desilusiones y mis momentos bajos y porque tu vida conmigo ha ido paralela a esta tesis, creo que una parte es también tuya. Espero poder agradecerte siempre todo lo que me has aportado.

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de la beca de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia y Tecnología y la beca de colaboración en proyectos de investigación del IRBB-PCB.

Assia

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABD-F	7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide
ACBP	proteína de unión a aciles-CoA
ADN	ácido desoxirribonucleico
A. E.	actividad específica
AgRP	<i>Agouti related protein</i>
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido
AMP	adenosín monofosfato
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
AMPK	proteína kinasa activada por AMP
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BSA	albúmina de suero bovino
cADN	ADN copia
CAT2	carnitina acetiltransferasa de peroxisoma/mitocondria de levadura
Ci	curio
CoA	coenzima A
COT	carnitina octanoiltransferasa
c.p.m.	cuentas por minuto
CPT1A	carnitina palmitoiltransferasa I, isoforma hepática
CPT1B	carnitina palmitoiltransferasa I, isoforma muscular
CPT2	carnitina palmitoiltransferasa II
CrAT	carnitina acetiltransferasa
C75	4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofurano-3-ácido carboxílico
Da	dalton
D.E.	desviación estándar
DIO	obeso inducido por dieta
DHB	ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
E	enzima
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
EI	complejo enzima/inhibidor
ES	complejo enzima/sustrato
ESI	complejo enzima/sustrato/inhibidor
FABPc	proteína de unión a ácidos grasos citozólica
FABPpm	proteína de unión a ácidos grasos de membrana plasmática
FAS	ácido grasa sintasa
FAT	transportador de ácidos grasos
F.I.	intensidad de fluorescencia
for	forward
GAL1	promotor inducido por galactosa
GLUT	transportador de glucosa
GSH	glutación reducido
h	hora
HEK	células de embrión de riñón humano

HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HPLC-MS/MS	cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a la espectrometría de masas y tándem
I	inhibidor
IC ₅₀	concentración de I necesaria para inhibir el 50% de la actividad enzimática
i.c.v	intracerebroventricular
i. p.	intraperitoneal
<i>K_{cat}</i>	constante catalítica; representa el máximo número de moléculas de S transformadas en P por el centro activo de E y por unidad de tiempo
<i>K_{i,app}</i>	constante aparente de disociación del complejo EI
<i>K_{I,app}</i>	constante aparente de disociación del complejo ESI
<i>k_{inact,app}</i>	constante aparente de inactivación y de formación del complejo EI*
<i>K_{m,app}</i>	constante aparente de Michaelis Menten
M	molar (mol/l)
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight</i>
mARN	ácido ribonucleico mensajero
mg	miligramo
min	minuto
mmoles	milimoles
ml	mililitro
MOPS	ácido 3-[N-morfolino propano] sulfónico
MRM	monitorización de reacción múltiple
m/z	relación masa/carga
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
nm	nanómetros
NPY	neuropéptido Y
Nt	nucleótido
OD	densidad óptica
o/n	<i>overnight</i>
P	producto
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	banco de datos de proteínas
PEG	polietileno glicol
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonil
POMC	proopiomelanocortina
PPAR	receptor activado por proliferadores peroxisomales
PPRE	elemento de respuesta a PPAR
ppm	partes por millón
qRT-PCR	reacción de PCR cuantitativa a tiempo real
R.E	radioactividad específica
rev	inverso
r.p.m.	revoluciones por minuto
p/v	peso/volumen
S	sustrato
S.D.	desviación estándar
SDS	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

TDGA	ácido tetradecilglicídico
TOFA	ácido 5-(tetradeciloxi)-2-furoico
TR	receptor de la hormona tiroidea
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
V_{max_app}	velocidad máxima aparente del enzima
wt	salvaje
3-D	modelo tridimensional

Lista de aminoácidos y de su abreviatura:

Aminoácidos no polares (hidrofóbicos)

Aminoácidos	Código de tres letras	Solo código de la letra
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Triptófano	Trp	W
Prolina	Pro	P

Aminoácidos polares (hidrofilicos)

Aminoácidos	Código de tres letras	Solo código de la letra
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteina	Cys	C
Tirosina	Tyr	Y
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q

Aminoácidos cargados negativamente e hidrofílicos

Aminoácidos	Código de tres letras	Solo código de la letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E

Aminoácidos cargados positivamente e hidrofílicos

Aminoácidos	Código de tres letras	Solo código de la letra
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

β-OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS	1
1. Entrada y transporte de ácidos grasos en la célula	2
2. Transporte intracelular y activación de ácidos grasos de cadena larga a aciles-CoA	3
3. Modulación de las reservas de coenzima A en la célula	4
4. Las carnitina aciltransferasas una familia de enzimas	5
5. Transporte intramitocondrial de los ácidos grasos de cadena larga: el sistema carnitina palmitoiltransferasa	6
5.1 Topología y conformación de CPT1	8
5.2 Isoformas de CPT1	9
5.2.1 Isoforma hepática (L-CPT1 o CPT1A)	9
5.2.2 Isoforma muscular (M-CPT1 o CPT1B)	9
5.2.3 Isoforma cerebral (CPT1C)	10
5.3 La proteína CPT2	12
6. Carnitina aciltransferasas sensibles a malonil-CoA	12
7. Deficiencias humanas en carnitina aciltransferasas	13
RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE LAS CARNITINA ACILTRANSFERASAS	14
8. Estructura tridimensional (3-D) de las carnitina aciltransferasas cristalizadas	15
8.1 El centro activo y la histidina catalítica	15
8.2 Sitio de unión de la carnitina	18
8.3 Sitio de unión del CoA	20
8.4 Sitio de unión de los ácidos grasos	20
9. Modelo bioinformático 3-D de CPT1A	23
10. CPT1, principal sitio de regulación de la β-oxidación	26
10.1 Regulación transcripcional	26
10.2 Regulación de la actividad CPT1A por malonil-CoA	28
10.2.1 Importancia del dominio N-terminal en la inhibición de CPT1 por malonil-CoA	28
10.2.2 Residuos del dominio C-terminal implicados en la inhibición por malonil-CoA	30
10.3 Regulación de la cantidad de malonil-CoA	31
10.4 Otros factores que modulan la actividad y la sensibilidad de CPT1 al malonil-CoA	33
REGULACIÓN FARMACOLÓGICA DE CPT1	36
11. C75, un inhibidor de la ácido graso sintasa	37
12. C75 como agente antitumoral	38
13. Efecto central del C75 y de las alteraciones del metabolismo de los ácidos grasos en la ingesta y el peso corporal	39

14. Efecto periférico del C75 y de la alteración del metabolismo de los ácidos grasos	41
--	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES	44
1. Cepas bacterianas	44
2. Cepas de levadura	44
3. Animales	44
3.1 Tratamiento con C75 y etomoxir	45
4. Vectores plasmídicos	45
5. Oligonucleótidos	45
MÉTODOS	46
1. Obtención y análisis de ADN	46
2. Secuenciación de ADN	46
3. Expresión de proteínas en <i>S. cerevisiae</i>	46
3.1 La secuencia CTCCTC en el cADN de carnitina palmitoiltransferasa 1 de músculo (CPT1B) permite la expresión en levaduras	46
4. Obtención de mitocondrias	48
4.1 Obtención de proteína recombinante a partir de <i>S. cerevisiae</i>	48
4.2 Obtención de mitocondrias a partir de hígado murino	49
4.3 Obtención de mitocondrias a partir de músculo murino	50
5. Ensayos de actividad CPT1	51
5.1 Método radiométrico	51
5.1.1 Ensayo en presencia de inhibidores	54
5.1.2 Ensayos de estabilidad de la unión enzima-inhibidor	59
5.1.3 Determinación de parámetros cinéticos	60
5.2 Método fluorimétrico	60
6. Activación y cuantificación de aciles-CoA	62
6.1 Activación de etomoxir, C75 y cerulenina a sus derivados-CoA <i>in vitro</i>	62
6.2 Purificación de los derivados-CoA	65
6.3 Cuantificación por DTNB	66
7. Espectrofotometría de masas	67
7.1 Análisis por MALDI-TOF	67
7.2 Análisis por HPLC-MS/MS	68
7.3 Extracción y cuantificación de aciles-CoA de tejidos	70
7.3.1 Extracción de aciles-CoA	70
7.3.2 Cuantificación de aciles-CoA	71
7.3.3 Tratamiento de fracciones mitocondriales con C75	72
8. Métodos bioinformáticas	72
8.1 Herramientas bioinformáticas básicas y bases de datos	72
8.2 Alineamiento y comparación de secuencias	73
8.3 Análisis de residuos conservados en las subfamilias de enzimas (<i>tree-determinants</i>)	73

8.4 Construcción del modelo 3-D del dominio C-terminal de CPT1	73
8.5 Docking molecular de los sustratos carnitina y palmitoil-CoA y de los inhibidores malonil-CoA, C75-CoA, etomoxir-CoA y Ro 25-0187 en CPT1	74
9. Análisis estadísticos	75

RESULTADOS

CPT1A, ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-FUNCIÓN	76
1. Alineamiento de secuencias aminoacídica entre diferentes carnitina aciltransferasas	77
1.1 Generación del mutante CPT1A C608A y expresión en <i>S. cerevisiae</i>	78
1.2 Análisis cinético del mutante CPT1A C608A	79
1.3 Inhibición por malonil-CoA de CPT1A C608A	81
1.4 Importancia del residuo Met ⁵⁹³ en la sensibilidad a malonil-CoA de CPT1A de rata	82
2. Modelo 3-D de la proteína CPT1A	83
3. Localización del malonil-CoA en el modelo estructural de CPT1A	88
3.1 Docking de malonil-CoA en CPT1A humana	88
3.2 Docking de malonil-CoA en CPT1A de rata	90
4. Análisis funcional de los sitios “A” y “O”. Mutagénesis de Arg²⁴³, Trp⁶⁸² y Met⁵⁹³ y su relación con la sensibilidad al malonil-CoA	93
4.1 Caracterización cinética de los mutantes CPT1A R243T y CPT1A W682A	93
4.1.1 Generación de los mutantes y expresión en <i>S. cerevisiae</i>	94
4.1.2 Análisis cinético de CPT1A salvaje y mutantes	96
4.2 Sensibilidad a malonil-CoA de los mutantes CPT1A R243T y CPT1A R243T-A478G	97
4.3 Sensibilidad a malonil-CoA y a CoA-SH de los mutantes de M593S	99
5. El sustrato carnitina y el inhibidor malonil-CoA compiten por el mismo sitio en el centro activo del enzima	101
5.1 Análisis cinético de la competición entre el sustrato carnitina y el inhibidor malonil- CoA	105
CPT1B, ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-FUNCIÓN	112
6. Modelo 3-D de la proteína CPT1B	113
7. Residuos implicados en el centro activo	116
7.1 La His ⁴⁷³ y el Asp ⁴⁷⁷ intervienen en la catálisis	116
8. Residuos implicados en la unión de la carnitina	119
8.1 Cambio de especificidad de carnitina a colina del enzima CPT1B	121

9. Cambio de especificidad de CPT1B hacia aciles-CoA de cadena corta	123
9.1 Papel del tripéptido ⁷⁰⁹ GGG ⁷¹¹ en la especificidad del sustrato acil-CoA	123
9.2 Cambio de especificidad de longitud de sustrato acil-CoA del enzima CPT1B	125
10. Residuos de CPT1B relacionados con la sensibilidad a malonil-CoA	128
10.1 Histidinas implicadas en la sensibilidad a malonil-CoA: His ²⁷⁹ y His ⁴⁸³	128
10.2 La Met ⁵⁹³ en CPT1B está implicada en la sensibilidad a malonil-CoA	131
10.2.1 Generación del mutante CPT1B M593S y expresión en <i>S. cerevisiae</i>	132
10.2.2 Inhibición por malonil-CoA del enzima mutado en Met ⁵⁹³	133
10.2.3 Análisis cinético del mutante CPT1B M593S	134
ACCIÓN DEL C75 Y CERULENINA SOBRE CPT1A Y CPT1B	136
11. C75 no afecta la actividad de ninguna de las dos isoformas de CPT1	137
12. Síntesis de C75-CoA a partir de C75	138
12.1 C75 es sustrato del enzima acil-CoA sintetasa	138
12.2 Las mitocondrias de hígado y de músculo de rata transforman cuantitativamente C75 en C75-CoA	141
13. C75-CoA inhibe las dos isoformas de CPT1	144
13.1 C75-CoA muestra características de un inhibidor de unión lenta a CPT1A	144
13.2 Efecto del C75-CoA sobre la actividad CPT1A y CPT1B salvaje y el mutante CPT1A M593S	145
13.3 El efecto inhibidor del C75-CoA sobre CPT1A no se ve afectado por la presencia de C75	149
13.4 La interacción entre C75-CoA y CPT1 es reversible	150
13.5 C75-CoA es un inhibidor competitivo respecto al sustrato palmitoil-CoA	152
13.6 C75-CoA es un inhibidor competitivo mixto respecto al sustrato carnitina	155
14. C75-CoA inhibe la actividad CPT1 en mitocondrias de dos líneas celulares y tejidos	158
14.1 Efecto del C75-CoA en la actividad CPT1 en mitocondrias de dos líneas celulares	158
14.2 Efecto del C75-CoA en la actividad CPT1 en mitocondrias de hígado y músculo de rata	159
15. C75 administrado intraperitonealmente inhibe CPT1 en músculo, hígado y páncreas de rata	161
16. C75-CoA se forma a partir de C75 <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>	164

16.1 C75 es transformado cuantitativamente a C75-CoA en hepatocitos primarios de rata	164
16.2 C75 es transformado a C75-CoA en hígado de ratón	167
17. Cerulenina y cerulenina-CoA no afectan la actividad CPT1	168
17.1 Cerulenina es sustrato del enzima acil-CoA sintetasa	169
17.2 Efecto de cerulenina-CoA en la actividad CPT1A	171
18. La interacción entre CPT1 y el sustrato palmitoil-CoA y los inhibidores malonil-CoA, C75-CoA y etomoxir-CoA es confirmada por Docking molecular	172
18.1 Inhibidores que no son derivados de CoA: Ro 25-0187	175
19. Estudio del metabolismo oxidativo en corazón de animales transgénicos deficientes del enzima acetil-CoA carboxilasa 2 (ACC2^{-/-})	177

DISCUSIÓN

1. Un nuevo modelo de estructura 3-D para CPT1	179
2. Validación del modelo 3-D de CPT1A	181
2.1 El inhibidor malonil-CoA se une al enzima CPT1A en dos sitios opuestos	181
2.2 Malonil-CoA y carnitina compiten por su unión en el centro activo del enzima	185
2.3 ¿Que estequiometría guardan CPT1 y malonil-CoA?	186
3. Validación del modelo 3-D de CPT1B	187
3.1 His ⁴⁷³ y Asp ⁴⁷⁷ en CPT1B juegan un papel crucial en la catálisis	187
3.2 Especificidad por el acil-CoA y unión de la carnitina en CPT1B	188
3.3 Aminoácidos implicados en la sensibilidad a malonil-CoA en CPT1B	190
4. Efecto del C75 sobre ambas isoformas de CPT1	192
4.1 La acción del C75 sobre la actividad CPT1 es a través de su derivado CoA, C75-CoA	193
4.2 Estudios <i>ex vivo</i> confirman la formación del C75-CoA	194
4.3 C75-CoA inhibe la actividad CPT1 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	194
4.4 El mecanismo de inhibición del C75-CoA sobre CPT1A es distinto para cada sustrato	197
4.5 C75-CoA se forma <i>in vivo</i> e inhibe la actividad CPT1 a corto plazo	198
4.6 La unión del C75-CoA a CPT1 confirmada por Docking molecular	199

4.7 Efecto de cerulenina y su derivado CoA en la actividad CPT1	200
5. Futuro: investigación adicional	201
CONCLUSIONES	203
BIBLIOGRAFÍA	205
APÉNDICES	
1. Mapa de restricción de los vectores plasmídicos	223
2. Oligonucleótidos	224
3. Secuencias	225
3.1 Secuencia de CPT1A de rata	225
3.2 Secuencia de CPT1B de rata	227
4. Deficiencias humanas en CPT1A y CPT2	229
5. Alineamiento de secuencias correspondientes a carnitina/colina aciltransferasas	232
PUBLICACIONES	