



**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

RESULTADOS

CPT1A

ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-FUNCIÓN

1. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS AMINOACÍDICA ENTRE DIFERENTES CARNITINA ACILTRANSFERASAS

Con el objetivo de determinar los aminoácidos de CPT1A implicados en la sensibilidad al malonil-CoA, se realizó un estudio comparativo entre las secuencias de la familia de carnitina aciltransferasas de distintos organismos obtenidas del banco de datos GenBank. Utilizando el algoritmo SequenceSpace y el de alineamiento de secuencias, se identificaron cinco putativos aminoácidos conservados (las coordenadas en CPT1A de rata: Thr³¹⁴, Asn⁴⁶⁴, Ala⁴⁷⁸, Met⁵⁹³ y Cys⁶⁰⁸) comunes en las carnitina aciltransferasas inhibibles por malonil-CoA (CPT1 y COT) y ausentes en las no-inhibibles por malonil-CoA (CPT2 y CrAT), que podrían participar en la sensibilidad del enzima a este inhibidor (Morillas, 2003). Dentro de estos aminoácidos, presentamos el estudio realizado con la Cys⁶⁰⁸ de CPT1A de rata.

El alineamiento de secuencias proteicas de la **Figura 1**, muestra la conservación de 17 aminoácidos, dentro de ellos el residuo Cys⁶⁰⁸.

		*																			
Malonil-CoA	Regulados	CPT1A rata	600	G	R	T	E	T	V	R	S	C	T	M	E	S	C	N	F	V	616
		CPT1A humana	600	G	R	T	E	T	V	R	S	C	T	T	E	S	C	D	F	V	616
		CPT1A ratón	600	G	R	T	E	T	V	R	S	C	T	T	E	S	C	M	F	V	616
		CPT1A cerdo	599	G	R	T	E	T	V	R	S	C	T	T	E	S	C	M	F	V	615
		CPT1B rata	600	G	R	T	E	T	V	R	S	C	T	S	E	S	T	A	F	V	616
		CPT1B humana	600	G	R	T	E	T	V	R	S	C	T	S	E	S	T	A	F	V	616
		CPT1B ratón	600	G	R	T	E	T	V	R	S	C	T	N	E	S	A	A	F	V	616
		COT rata	450	G	R	T	E	T	V	R	S	C	T	V	E	A	V	R	W	C	466
		COT humana	450	G	R	T	E	T	M	R	S	C	T	V	E	A	V	R	W	C	466
		COT bovina	450	G	R	T	E	T	V	R	P	C	T	V	E	A	V	R	W	C	466
No-regulados		CPT2 rata	496	G	R	T	E	T	Y	R	P	A	S	I	F	T	K	R	C	S	512
		CPT2 humana	496	G	R	T	E	T	Y	R	P	A	S	V	Y	T	K	R	C	S	511
		CPT2 ratón	496	G	R	T	E	T	Y	C	P	A	S	I	F	T	K	R	C	S	512
		CrAT rata	464	G	R	T	D	T	I	R	S	A	S	T	D	S	L	A	F	V	480
		CrAT humana	464	G	R	T	D	T	Y	T	S	A	S	R	D	S	L	T	F	V	480
		CrAT ratón	464	G	R	T	D	T	Y	R	S	A	S	I	D	S	L	A	F	V	480

Figura 1: Alineamiento múltiple de secuencias proteicas de dieciséis carnitina aciltransferasas de mamíferos. Las secuencias han sido obtenidas del banco de datos GenBank. El alineamiento se ha realizado con el programa ClustalW y EMBOSS-Align (ver **Métodos, sección 8.2**). CPT1A: carnitina palmitoiltransferasa hepática; CPT1B: carnitina palmitoiltransferasa muscular; COT: carnitina octanoiltransferasa; CrAT: carnitina acetiltransferasa. El asterisco (*) indica la posición de la Cys⁶⁰⁸ conservada en los enzimas inhibibles por malonil-CoA. Los números de acceso al banco de datos son los siguientes: CPT1A de rata (LO7736); CPT1A humana (L39211), CPT1A de ratón (AF017175), CPT1A de cerdo (AF288789), CPT1B de rata (D43623), CPT1B humana (D87812), CPT1B de ratón (NM009948), COT de rata (U26033), COT humana (AF168793), COT bovina (U65745), CPT2 de rata (J05470), CPT2 humana (U09648), CPT2 de ratón (NM009949), CrAT de rata (AJ620886), CrAT humana (X78706) y CrAT de ratón (NM007760). Se han coloreado los aminoácidos según el grado de conservación.

Para determinar el papel de la Cys⁶⁰⁸ en la inhibición por malonil-CoA, reemplazamos este aminoácido por su homólogo la alanina, presente en la misma posición en CPT2 y CrAT.

1.1 Generación del mutante CPT1A C608A y expresión en *S. cerevisiae*

El cADN de CPT1A salvaje (CPT1A wt) había sido previamente clonado por nuestro grupo y subclonado (nt 54-2701) en el plásmido pBluescript, dando lugar al plásmido pBSL-CPT1A wt (Rubi, 2002). Para los experimentos de expresión, el fragmento de CPT1A (nt 103-2701) que incluía la secuencia codificante, fue subclonado en el plásmido de expresión para levaduras pYES 2.0. (Morillas, 2002).

El mutante CPT1A C608A se obtuvo utilizando el procedimiento de mutagénesis dirigida basado en la técnica de PCR asimétrico “Quick change” (ver **Métodos, sección 1**). El plásmido pYES CPT1A wt fue utilizado como molde para la mutagénesis dirigida de Cys⁶⁰⁸ a Ala utilizando los oligonucleótidos CPT1A C608A.for y CPT1A C608A.rev (ver **Apéndice 2**). Se confirmó la incorporación de la mutación deseada y la ausencia de mutaciones adicionales mediante secuenciación del plásmido obtenido pYES CPT1A C608A.

El plásmido de expresión pYES 2.0 expresa CPT1A bajo el control de secuencias de activación y promotoras de *S. cerevisiae* y del gen GAL1, lo que produce una elevada y regulada transcripción. Se transformaron los plásmidos de expresión pYES CPT1A wt y pYES CPT1A C608A en la levadura *S. cerevisiae*, un organismo carente de actividad CPT endógena, lo que facilita la interpretación de las cinéticas de las enzimas expresadas, mientras que en células de mamífero siempre esta presente la actividad endógena (Brown, 1994b). Tras la obtención de fracciones mitocondriales de levadura, se hizo un ensayo comparativo de actividad enzimática entre CPT1A C608A y CPT1A wt. La mutación de la cisteína a alanina no produjo una diferencia significativa en la actividad enzimática respecto al enzima salvaje (**Figura 2A**).

Para el análisis por Western Blot de la expresión de CPT1A wt y CPT1A C608A, se han utilizado anticuerpos policlonales dirigidos contra los aminoácidos 317-430 de CPT1A de rata, que fueron cedidos por la Dra. Prip-Buus. El análisis por Western Blot indica que las proteínas se expresan con el tamaño esperado y con niveles similares de expresión (**Figura 2B**).

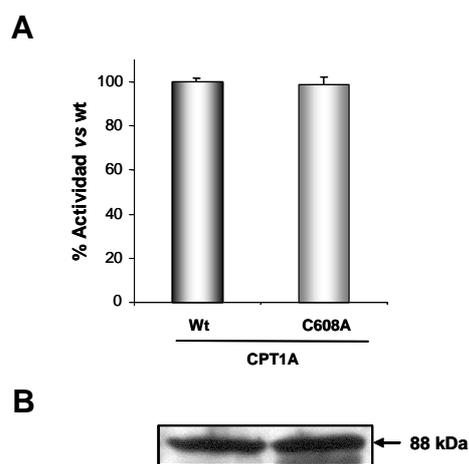


Figura 2: Actividad de las formas transformadas de CPT1A y su inmunodetección. A) Actividad relativa de CPT1A wt y CPT1A C608A expresadas en levadura. Las actividades se han representado tomando como referencia la actividad del enzima salvaje correspondiente. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron con 6 μ g de extractos proteicos de levaduras. Los datos (medias \pm D.E.) se han tomado de la **Tabla 1**. B) Se muestra un análisis de Western Blot de uno de los extractos mitocondriales de *S. cerevisiae* obtenidos. 50 μ g de extractos proteicos mitocondriales se aplicaron a cada carril de gel de proteínas SDS-PAGE y la flecha indica la posición migratoria y la masa molecular de CPT1A.

1.2 Análisis cinético del mutante CPT1A C608A

Los experimentos cinéticos realizados con el mutante CPT1A C608A muestran una cinética estándar de saturación hiperbólica tipo Michaelis-Menten tanto cuando se varía la concentración de carnitina frente a una concentración constante del segundo sustrato palmitoil-CoA (135 μ M), como cuando el sustrato que variaba era el palmitoil-CoA y se mantenía constante la concentración de carnitina a 400 μ M (**Figura 3**).

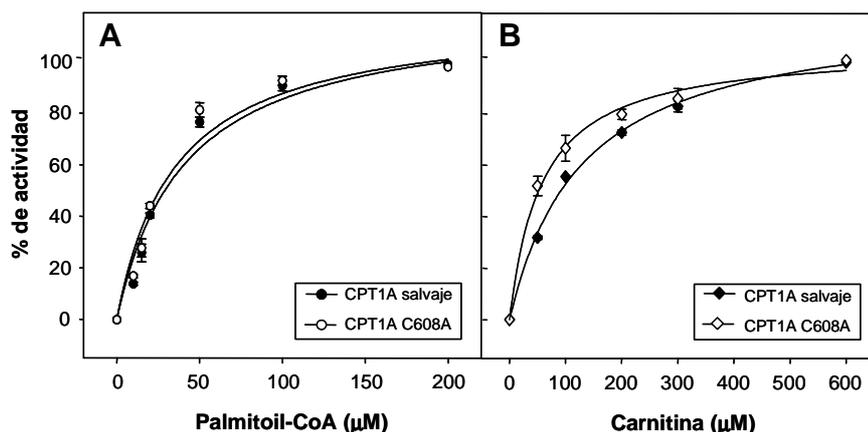


Figura 3: Análisis cinético de CPT1A expresada salvaje y mutante C608A. Fracciones mitocondriales aisladas de levaduras que contenían 6 μg de proteína y que expresaban CPT1A salvaje (\bullet , \blacklozenge) o el mutante C608A (\circ , \diamond) fueron ensayadas para la actividad CPT1A, bien en presencia de concentración fija de carnitina y concentraciones crecientes de palmitoil-CoA (A), o bien en presencia de concentración fija de palmitoil-CoA y concentraciones crecientes de carnitina (B). Los resultados se presentan como la media (medias \pm D.E.) de tres experimentos independientes.

La **Tabla 1** muestra los valores cinéticos aparentes de K_m y V_{max} para los dos sustratos ensayados. El mutante CPT1A C608A presentaba una $K_{m,app}$ para el sustrato carnitina de 51,6 μM frente a una $K_{m,app}$ de 117 μM del enzima salvaje, es decir, que la $K_{m,app}$ del enzima mutado para la carnitina es 2,3 veces menor que la del enzima salvaje, indicando que la proteína mutada en esta posición por alanina es más afin para este sustrato. La $K_{m,app}$ para el palmitoil-CoA variaba poco comparada con la del enzima salvaje (24,3 μM frente a 20,1 μM , respectivamente). En el caso del valor de $V_{max,app}$, se observa un cambio ligero (1,3 veces menor que el enzima salvaje) para el sustrato palmitoil-CoA y no se observa cambio significativo para el sustrato carnitina. La $V_{max,app}$ del mutante para la carnitina es 23,7 nmol/min.mg de proteína y la de la salvaje es de 26,8 nmol/min.mg de proteína. Para el sustrato palmitoil-CoA, la $V_{max,app}$ de la proteína mutada es de 67,5 nmol/min.mg y la de la proteína salvaje es de 50,2 nmol/min.mg (**Figura 3 y Tabla 1**).

Cepa	Actividad (nmol/min.mg)	palmitoil-CoA		carnitina	
		Km_{app}	$Vmax_{app}$	Km_{app}	$Vmax_{app}$
		(μ M)	(nmol/min.mg)	(μ M)	(nmol/min.mg)
CPT1A wt	47,4 \pm 3	20,1 \pm 3	50,2 \pm 3	117 \pm 2,5	26,8 \pm 7
CPT1A C608A	47,1 \pm 5	24,3 \pm 2	67,5 \pm 9	51,6 \pm 4	23,7 \pm 5

Tabla 1: Actividad CPT1A y parámetros cinéticos de las enzimas salvaje y mutada, expresadas en levadura. Extractos mitocondriales de levadura expresando CPT1A wt o mutante C608A (6 μ g de proteína) se ensayaron para la actividad enzimática y se calcularon las constantes cinéticas. Los resultados se expresan como las medias \pm D.E. de al menos tres experimentos independientes con diferentes preparaciones proteicas.

1.3 Inhibición por malonil-CoA de CPT1A C608A

Se analizó la sensibilidad a malonil-CoA del mutante CPT1A C608A y los resultados de inhibición se compararon con los del enzima sin mutar (**Figura 4**). La inhibición por malonil-CoA a concentraciones entre 1 y 200 μ M muestra pequeños cambios para el valor de IC_{50} respecto al de la proteína salvaje. El valor de IC_{50} para el mutante es de 27,5 μ M y es de 12,3 μ M para el enzima salvaje. Este resultado nos indica que la mutación de Cys⁶⁰⁸ a alanina disminuye la sensibilidad del enzima para su inhibidor fisiológico en 2,2 veces.

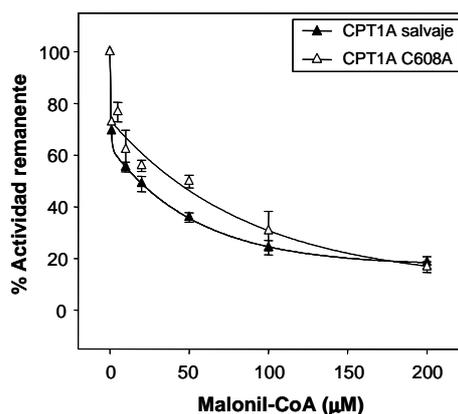


Figura 4: Efecto del malonil-CoA en la actividad del enzima CPT1A salvaje y del mutante C608A. 6 μ g de extractos proteicos mitocondriales de diferentes expresiones en levadura de *S. cerevisiae* expresando CPT1A salvaje (\blacktriangle) o mutante C608A (\triangle) se ensayaron para la actividad CPT1A en presencia de concentraciones crecientes de malonil-CoA (de 1 a 200 μ M). Los datos son la media relativa de los valores control en ausencia de malonil-CoA (100%). Se muestran las medias de tres a cuatro experimentos independientes.

1.4 Importancia del residuo Met⁵⁹³ en la sensibilidad a malonil-CoA de CPT1A de rata

Del estudio realizado anteriormente por nuestro grupo en la comparación de secuencias proteicas de la familia de carnitina aciltransferasas y del alineamiento de estas secuencias, se reportó la implicación del residuo Met⁵⁹³, uno de los cinco residuos conservados, como el más crítico para la sensibilidad a malonil-CoA de CPT1A de rata. El mutante CPT1A M593S produce un aumento en la eficiencia catalítica del enzima para el sustrato carnitina y además, es crítico para la sensibilidad al malonil-CoA. Este resultado se confirmó también por la mutación de esta Met⁵⁹³ a otros dos aminoácidos: alanina y ácido glutámico. Ambos mutantes mostraban una disminución en la sensibilidad a malonil-CoA similar a la provocada por el mutante M593S (Morillas, 2003).

Decidimos mutagenizar este aminoácido por otros más voluminosos y cargados como la arginina y la lisina. Se generaron los mutantes CPT1A M593R y CPT1A M593K por el procedimiento de mutagénesis dirigida utilizando el plásmido pYES CPT1A wt como molde y los oligonucleótidos correspondientes a cada mutación, CPT1A M593R.for, CPT1A M593R.rev y CPT1A M593K.for, CPT1A M593K.rev (**ver Apéndice 2**). Expresamos los plásmidos resultantes en células de levadura y analizamos la actividad enzimática y el efecto del malonil-CoA en las fracciones mitocondriales de cada mutante. Los mutantes se expresaron con el tamaño esperado y con niveles similares al del enzima salvaje. Sin embargo, no se pudo detectar actividad en el mutante M593R por lo que no fue posible determinar el efecto inhibitor del malonil-CoA en este mutante. En cuanto al segundo mutante, CPT1A M593K, se perdió un 80% de actividad enzimática con respecto al enzima salvaje (**Figura 5A**). El análisis de las cinéticas de inhibición muestra que este mutante se inhibe con dificultad en el rango de concentraciones de inhibidor ensayadas (1-100 μ M), siendo la actividad residual a 100 μ M de 70% (**Figura 5B**). El valor de IC₅₀ para este mutante fue > 200 μ M.

Estos resultados confirman en parte la implicación del residuo Met⁵⁹³ en la sensibilidad al malonil-CoA del enzima CPT1A de rata.

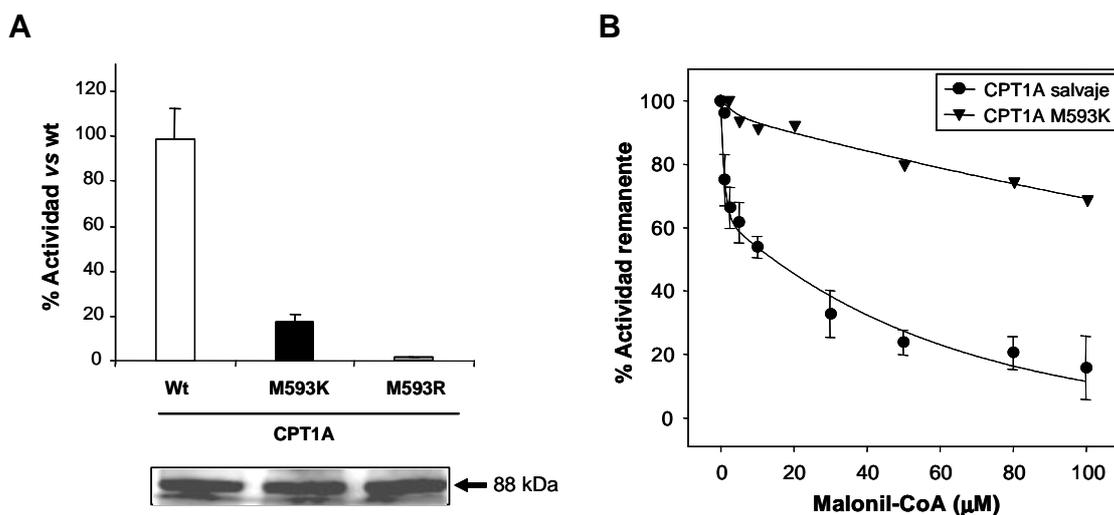


Figura 5: Actividad enzimática de CPT1A salvaje, mutantes M593K y M593R y su inhibición por malonil-CoA. A) Actividades relativa de CPT1A wt, CPT1A M593R y CPT1A M593K sobreexpresadas en levadura y su inmunodetección. Las actividades se han representado tomando como referencia la actividad del enzima salvaje correspondiente. Los ensayos de actividad se realizaron con 6 μg de extractos proteicos expresando CPT1A. Se muestra un análisis de Western Blot de uno de los extractos mitocondriales obtenidos. 30 μg de proteína se aplicó a cada carril y la flecha indica la posición migratoria y la masa molecular de CPT1A. B) Perfil de inhibición del mutante M593K en presencia de concentraciones crecientes de malonil-CoA (1-100 μM). Los datos son la media relativa a los valores control en ausencia de malonil-CoA (100%).

2. MODELO 3-D DE LA PROTEÍNA CPT1A

Los modelos estructurales del dominio carboxi-terminal de CPT1A de rata y humana fueron construidos utilizando procedimientos de modelaje por homología. Este procedimiento está basado en el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de CPT1 y de las estructuras cristalográficas de dos miembros de la familia de carnitina aciltransferasas, COT de ratón unida a acilcarnitina (entrada PDB; 1XL8) (Jogl, 2005) y CPT2 de rata (entrada PDB; 2H4T) (Hsiao, 2006). Estos modelos en 3-Dimensiones (3-D) de CPT1A humana y de rata incluyen los residuos desde 159 hasta 773 y fueron generados utilizando el servidor SWISS-MODEL. Posteriormente sus estructuras fueron comprobadas con el programa WHAT-CHECK. En la **Figura 6** se muestra el alineamiento múltiple de secuencias de diferentes enzimas CPT1A y CPT1B junto con la secuencia de aminoácidos del molde, COT de ratón (1XL8B). Además, se indica la estructura secundaria de CPT1A de rata (CPT1A_RAT_ss). La numeración de las hélices α y las hojas β en el propuesto modelo fue realizada siguiendo la numeración del molde.

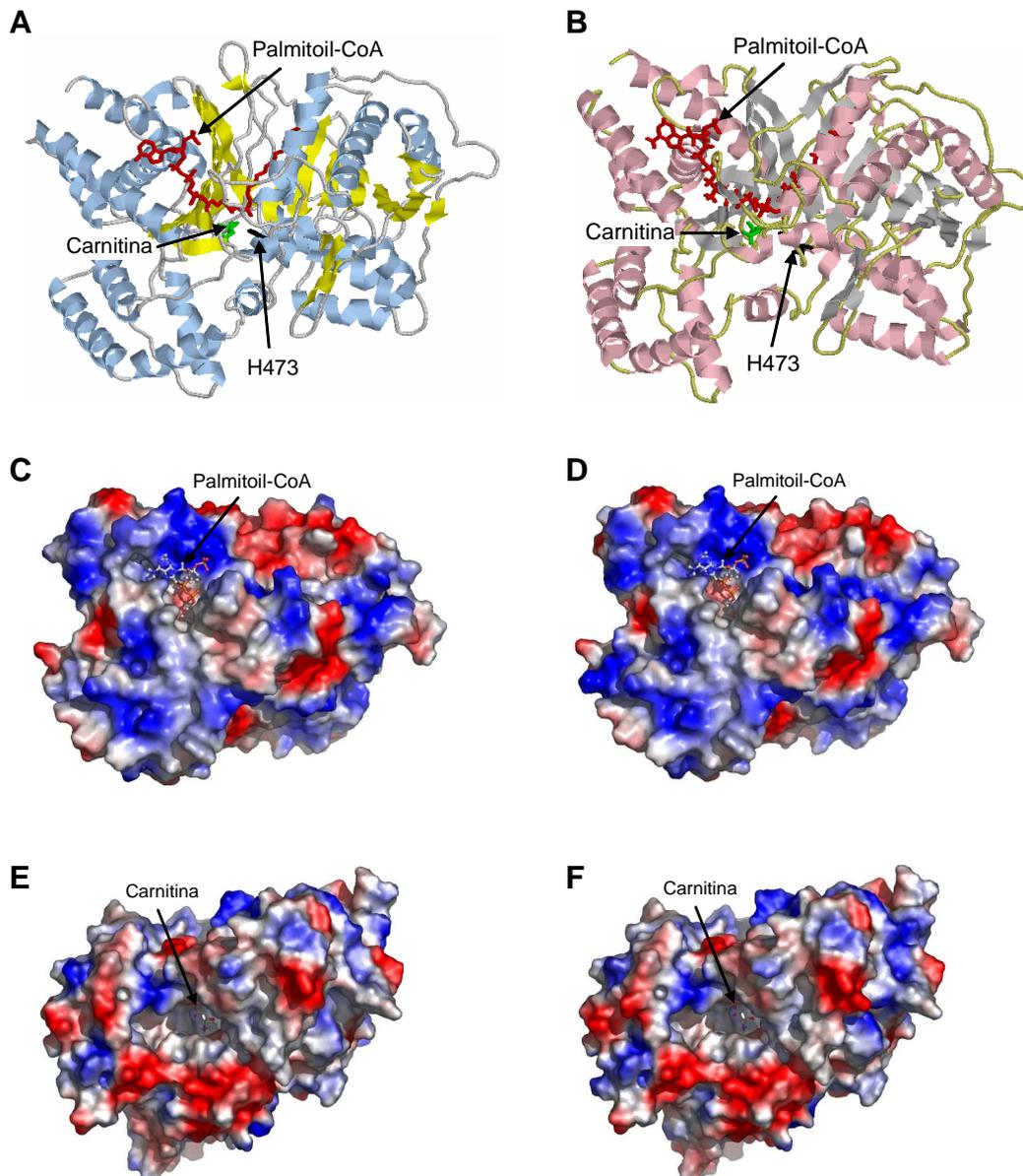


Figura 7: Representación del modelo estructural de CPT1A de rata y humana. A) y B) Representación en forma de cintas de los residuos formando el esqueleto de CPT1A de rata (hojas β en amarillo y hélices α en azul claro) y humana (hojas β en gris y hélices α en rosa), respectivamente. Se representan los sustratos carnitina (verde) y palmitoil-CoA (rojo) y también el residuo catalítico, la His⁴⁷³ (negro). C) y D) Representaciones de la superficie electrostática del modelo propuesto para CPT1A de rata y humana con el sustrato palmitoil-CoA. La superficie está coloreada de acuerdo con los potenciales electrostáticos (negativo en rojo y positivo en azul). E) y F) Representaciones de la superficie electrostática de los modelos propuestos para CPT1A de rata y humana mostrando el sustrato carnitina en el centro catalítico.

En la **Figura 8A** se muestran los residuos que según nuestro modelo estarían implicados en la catálisis o en la unión de la carnitina al bolsillo catalítico. La molécula de carnitina se une en una conformación tal en la que su grupo carboxilo está dirigido en dirección opuesta a la del grupo hidroxílico. El sitio de unión de la carnitina está

formado por las hojas β 1, β 15-17 y los residuos de las hélices α 6, α 14 y α 22. Coincidiendo con lo reportado en la literatura, el residuo His⁴⁷³ establece un puente de hidrógeno con el grupo 3-hidroxilo de la carnitina, mientras que el Asp⁴⁷⁷, que presumiblemente estabiliza la carga positiva de la carnitina, está más próximo a la carnitina que la His⁴⁷³. La carga positiva de Arg⁶⁵⁵ en la hélice α 22 que correspondería a la Arg⁵⁰⁵ en COT descrita por Cronin y sus colaboradores (Cronin, 1997a) probablemente interacciona con la carga negativa del grupo carboxilo de la carnitina. Uno de los átomos de oxígeno del grupo carboxilo de la carnitina formaría un puente de hidrógeno con los hidroxilos de los residuos Tyr⁵⁸⁹ y Ala⁵⁹¹ (β 15), mientras que el otro átomo de oxígeno, formaría un puente de hidrógeno con el hidroxilo de Thr⁶⁰² (β 16), tal como se ha descrito en el enzima CrAT de ratón (Jogl, 2003). Además, los aminoácidos del tripéptido Ser⁶⁸⁵-Thr⁶⁸⁶-Ser⁶⁸⁷ se encuentran cerca de la carnitina y pueden participar en la unión de este sustrato al centro catalítico y también en la estabilización del estado transitorio de la reacción descrito por Cronin y sus colaboradores (Cronin, 1997b).

En la **Figura 8B** se muestran los residuos que están a una distancia menor de 5 Å del fragmento CoA del sustrato palmitoil-CoA. Estos incluyen los aminoácidos Glu⁵⁹⁰, Asp⁵⁶⁷, Leu²⁹⁷, Ser⁵⁶⁵, Lys⁵⁵⁶ y Lys⁵⁶⁰ que han sido descritos por sus interacciones con varios átomos del fragmento CoA del acil-CoA en el enzima CrAT (Jogl, 2003; Wu, 2003). Los residuos Asp⁵⁶⁷ y Glu⁵⁹⁰ estabilizarían el grupo pantoténico del CoA y las Lys⁵⁵⁶ y Lys⁵⁶⁰ interactuarían con el grupo 3'-fosfato del ciclo purina del CoA, igual como ha sido propuesto para CrAT (Morillas, 2004; Jogl, 2003). La mutación de la Lys⁵⁶⁰ a Ala induce una disminución de la actividad enzimática y de la afinidad para el sustrato palmitoil-CoA (Morillas, 2004). Además, se sugirió que los residuos conservados de Glu⁵⁹⁰ y Glu⁶⁰³ están implicados en la interacción con el acil-CoA ya que sus mutaciones causan una disminución significativa del valor aparente de K_m para el palmitoil-CoA y una disminución o una pérdida total de la actividad enzimática de CPT1A (Napal, 2003; Treber, 2003). En cuanto a los residuos Arg⁶⁰¹, Glu⁶⁰³ y Arg⁶⁰⁶ forman parte de una secuencia muy conservada RTETVR que estaría implicada en la unión del acil-CoA, formando una estructura comparable a un bolsillo donde se fijaría dicho sustrato.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo, se propuso un modelo 3-D para el posicionamiento del palmitoil-CoA en un canal hidrofóbico de CPT1A (Morillas, 2004). En el presente estudio, se utilizaron técnicas de Docking *in silico* más refinadas, permitiendo así la rotación libre de la cadena palmitoil del palmitoil-CoA. El nuevo modelo de posicionamiento del palmitoil-CoA indica que la extensión del grupo acil del palmitoil-CoA está incluido en un canal hidrofóbico definido por la hélice α 12 y la hoja β 14 (**Figura 8C**).

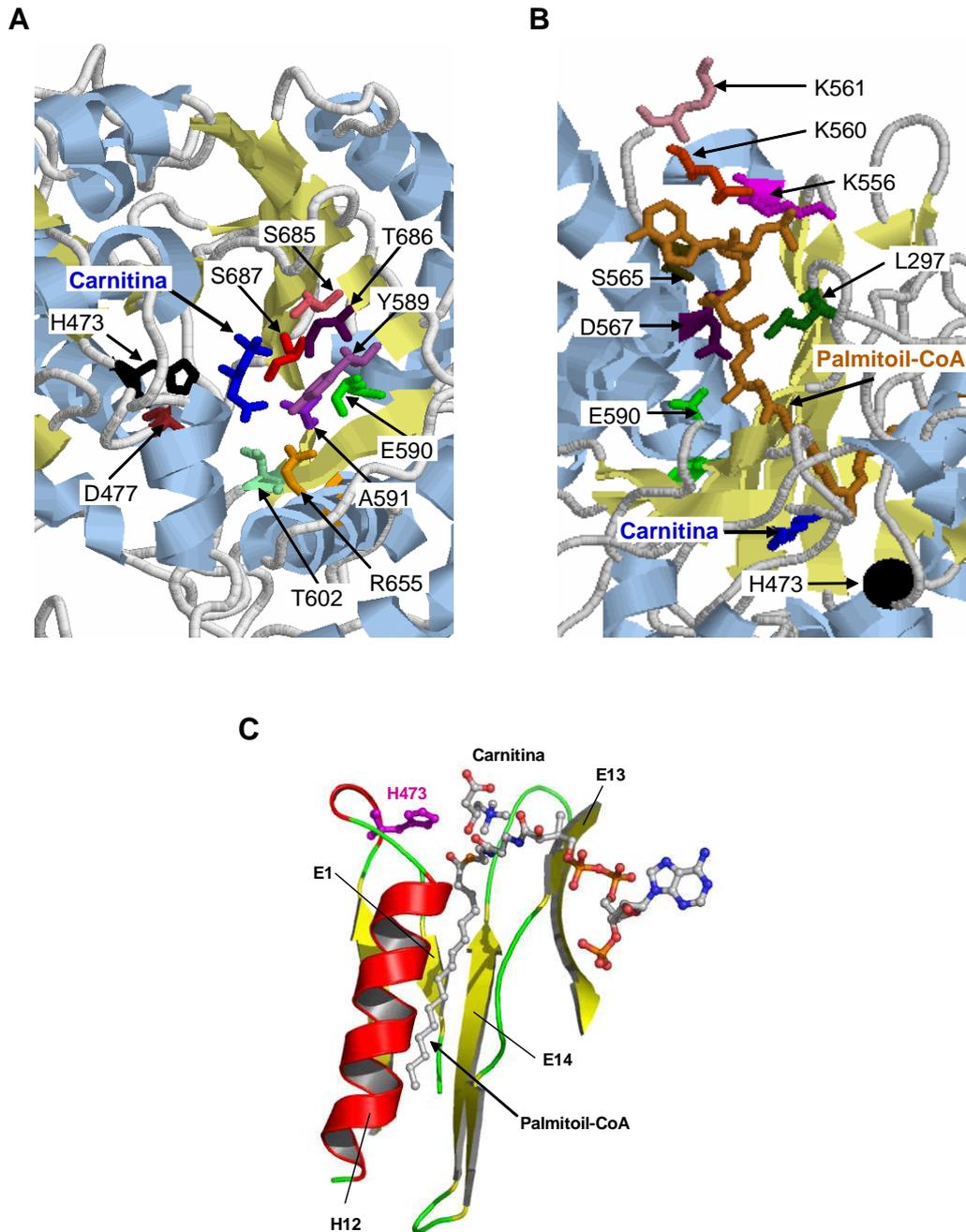


Figura 8: Localización de los residuos próximos a los centros de unión de la carnitina y del CoA en el modelo estructural de CPT1A de rata. Representación en forma de cintas de los residuos formando las hojas β (amarillo), las hélices α (azul) y en forma de bolas y varillas, las moléculas de palmitoil-CoA (marrón) y de carnitina (azul oscuro), sugiriendo sus localizaciones putativas en el centro activo. **A)** Residuos implicados en la catálisis o en la unión de la carnitina en su bolsillo. **B)** Posición de algunas lisinas lejanas del centro activo involucradas en la actividad, y localización de otros residuos implicados en la interacción con el CoA del acil-CoA. La His⁴⁷³ catalítica (negro) está indicada en ambas representaciones, como punto de referencia. **C)** Docking *in silico* de una molécula de palmitoil-CoA en el canal hidrofóbico de la proteína formado por la hélice α 12 y la hoja β 14. El residuo catalítico y la carnitina están también indicados.

3. LOCALIZACIÓN DEL MALONIL-CoA EN EL MODELO ESTRUCTURAL DE CPT1A

3.1 Docking de malonil-CoA en CPT1A humana

Para obtener un modelo molecular de la interacción entre el inhibidor fisiológico malonil-CoA y la proteína CPT1A humana, se realizaron estudios de Docking utilizando los programas “Autogrid”, “Autodock” y “Hex” (ver **Métodos, sección 8.5**). Para ello fue necesario utilizar las coordenadas tridimensionales de la molécula de malonil-CoA (obtenidas del PDB, entrada 1hnj, la estructura 3-D de la proteína β -cetoacil-acil carrier sintasa III), y el modelo estructural del centro catalítico de CPT1A. Se generaron y analizaron las mejores soluciones en términos de menor energía y la menor distancia macromolecular del complejo *in silico* de las putativas posiciones del inhibidor.

La representación simultánea de las moléculas del sustrato palmitoil-CoA y del inhibidor malonil-CoA en la superficie del modelo de CPT1A humana, propone un modelo de competición entre ambas moléculas por el mismo sitio, pero con diferentes lugares de unión. Este primer sitio de unión del inhibidor correspondería al sitio de entrada del acil-CoA y fue llamado “sitio A” (para el sitio de alojamiento del CoA en el canal catalítico). También se pudo predecir y localizar un segundo sitio putativo de unión del inhibidor en el lado opuesto al sitio A en el canal catalítico. Este segundo sitio fue llamado “sitio O” (para el sitio opuesto al del CoA). La **Figura 9** muestra en detalle las interacciones entre carnitina y las partes malonilo de las moléculas de malonil-CoA, lo que nos indica que los aminoácidos alrededor de esta zona, posiblemente, estarían implicados en la afinidad y/o sensibilidad de la proteína hacia ambas moléculas.

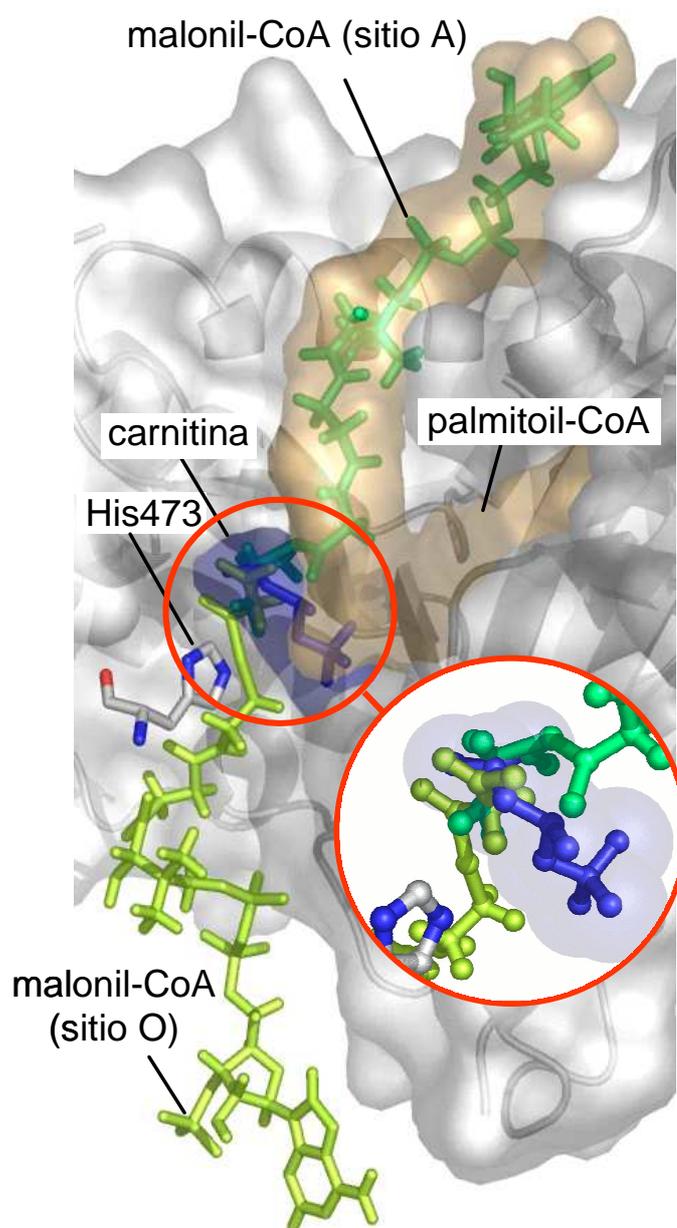


Figura 9. Representación de los dos sitios de unión de malonil-CoA en el modelo estructural de CPT1A humana. Sección longitudinal de la estructura CPT1A ilustrando el centro catalítico de CPT1A y los dos sitios putativos de unión del inhibidor malonil-CoA representado en forma de bolas y varillas: “sitio A” en color verde y “sitio O” en color amarillo. Se representa en el modelo la localización de los sustratos palmitoil-CoA (en color marrón claro) y carnitina (en color azul claro) y se indica también la posición del residuo catalítico His⁴⁷³. La molécula de carnitina en el centro activo del enzima ilustra las interferencias con ambas orientaciones del malonil-CoA. El inserto muestra en detalle las interacciones predichas entre carnitina y las partes malonilo de las moléculas de malonil-CoA.

La **Tabla 2** resume la lista de los residuos posiblemente implicados en la unión del malonil-CoA al enzima CPT1A humana. Estos aminoácidos están a una distancia menor de 4 Å de la molécula de malonil-CoA del sitio A o bien del sitio O. También se muestran los aminoácidos presentes en el bolsillo de la carnitina y que posiblemente influyen en su alojamiento en el canal catalítico.

Residuos de contacto con malonil-CoA del “sitio A”		Residuos de contacto con malonil-CoA del “sitio O”		
Bolsillo de la carnitina	“sitio A” Canal del CoA	Bolsillo de la carnitina	“sitio O” Canal del CoA	
Tyr ²⁴¹	Lys ⁵⁵⁶	Tyr ²⁴¹	Ile ²⁴⁰	Leu ⁵³⁹
His ⁴⁷³	Lys ⁵⁶⁰	His ⁴⁷³	Arg ²⁴³	Leu ⁵⁴⁰
Asp ⁴⁷⁷	Ser ⁵⁶⁵	Asp ⁴⁷⁷	Gly ²⁴⁴	Trp ⁶⁸²
Ala ⁴⁷⁸	Asp ⁵⁶⁷	Ala ⁴⁷⁸	Arg ²⁴⁵	Ser ⁶⁸⁵
Tyr ⁵⁸⁹	Glu ⁵⁹⁰	Tyr ⁵⁸⁹	Gly ²⁴⁶	Phe ⁷¹²
Ala ⁵⁹¹	His ⁶⁴⁰	Ala ⁵⁹¹	Leu ²⁴⁸	Gly ⁷¹³
Ser ⁵⁹²	Met ⁶⁴³	Thr ⁶⁰²	Asn ²⁵¹	Pro ⁷¹⁴
Met ⁵⁹³	Gln ⁶⁸⁸	Arg ⁶⁵⁵	Ser ²⁵²	Val ⁷¹⁵
Thr ⁶⁰²	Pro ⁶⁹⁰	Ser ⁶⁸⁷		Lys ⁷³⁹
Thr ⁶⁸⁶	Gln ⁶⁹¹			
Ser ⁶⁸⁷	Gln ⁶⁹²			
Thr ⁶⁸⁹				

Tabla 2: Definición de los sitios de unión del malonil-CoA. Los residuos localizados en el modelo estructural de CPT1A humana han sido clasificados según sus posibles interacciones y contactos con la molécula de carnitina y malonil-CoA del sitio A, o bien con malonil-CoA del sitio O. Se marca en negrita los residuos localizados en el sitio catalítico del enzima y que contactan con ambas posiciones del inhibidor en el modelo 3-D propuesto en la **Figura 9**.

3.2 Docking de malonil-CoA en CPT1A de rata

Utilizando los mismos procedimientos de análisis de Docking para la localización del inhibidor malonil-CoA en el modelo estructural de CPT1A humana, hemos comprobado si el posicionamiento del inhibidor está conservado en el nuevo modelo estructural de CPT1A de rata. En este caso, igual que ocurre en CPT1A humana, malonil-CoA se une a dos sitios opuestos en el enzima.

En el nuevo modelo estructural de CPT1A de rata, realizamos un Docking *in silico* de una molécula de malonil-CoA en el sitio A. En la **Figura 10A** y **10B** se representa la posición de los aminoácidos que coincidieron en rata con los descritos en la **Tabla 2**

para CPT1A humana. Además, se localizaron los residuos implicados en la unión de malonil-CoA al enzima descritos en la bibliografía o por nuestro grupo de investigación. Estos residuos validan el posicionamiento del malonil-CoA en el sitio A del nuevo modelo de CPT1A de rata.

Se analizaron también por Docking los residuos que definen el canal de unión del malonil-CoA en el sitio O de CPT1A de rata. La **Figura 10C** y **10D** muestra los residuos de CPT1A de rata que coincidieron con los descritos anteriormente en la **Tabla 2** para CPT1A humana. Estos 26 aminoácidos están a una distancia menor de 4 Å de la molécula de malonil-CoA. Como se observa en la **Figura 10D**, la estructura de este sitio presenta una forma de embudo en la región próxima al bolsillo de la carnitina.

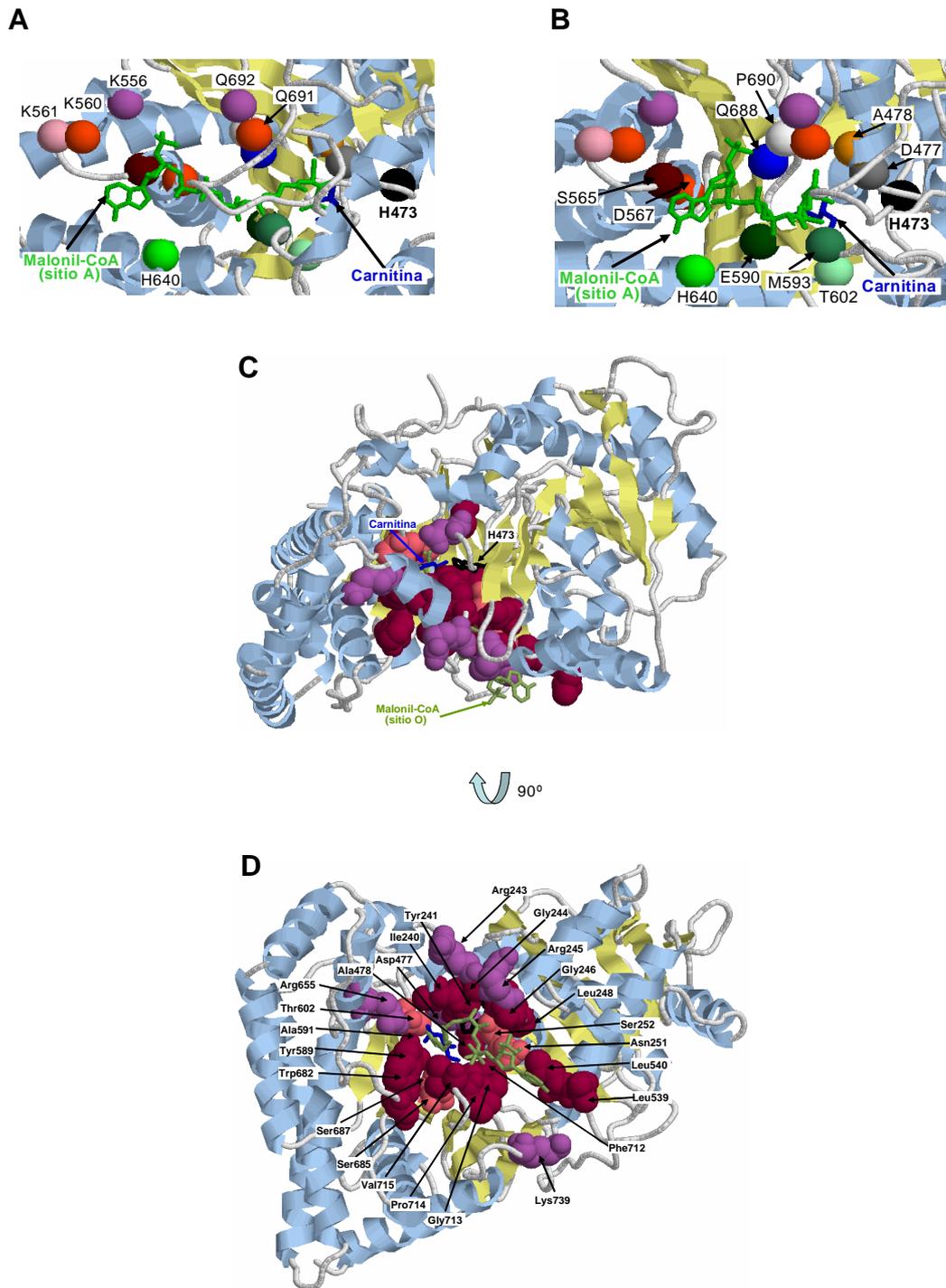


Figura 10. Representación de los sitios A y O de unión del malonil-CoA en el modelo estructural de CPT1A de rata. A), B) y C) Secciones longitudinales de la estructura CPT1A de rata ilustrando el centro catalítico de CPT1A. El inhibidor malonil-CoA (verde) y el sustrato carnitina (azul) están representados en forma de bolas y varillas y se indica también la posición del residuo catalítico His⁴⁷³ (negro) como punto de referencia. A) y B) Se representan los aminoácidos implicados en el sitio A de unión del malonil-CoA. C) y D) Se representan los residuos implicados en el sitio O de unión del inhibidor. D) Sección inferior de la estructura presentada en C, girada 90°, indicando los residuos en forma de bolas formando el canal de entrada del malonil-CoA en el sitio O (residuos polares (rosa); cargados (lila) y el resto, apolares como Pro y Gly (magenta).

4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS SITIOS “A” Y “O”. MUTAGÉNESIS DE Arg²⁴³, Trp⁶⁸² Y Met⁵⁹³ Y SU RELACIÓN CON LA SENSIBILIDAD AL MALONIL-CoA

4.1 Caracterización cinética de los mutantes CPT1A R243T y CPT1A W682A

Con el objetivo de comprobar y apoyar nuestro modelo estructural, se mutaron dos aminoácidos arginina 243 (Arg²⁴³) y triptófano 682 (Trp⁶⁸²) de la lista de residuos de CPT1A de rata que hemos visto anteriormente por sus homólogos tirosina y alanina presentes en CPT2. Se eligieron dichos residuos porque están conservados en ambas isoformas de CPT1A y CPT1B de rata, ratón y humano sensibles a malonil-CoA y que no están presentes en la isoforma insensible a malonil-CoA, CPT2. La Arg²⁴³ es un aminoácido cargado positivamente y en el modelo estructural este residuo está muy cerca del grupo -OH en el ácido pantoténico del grupo malonilo del malonil-CoA (**Figura 11**). El cambio de la arginina por un aminoácido polar no cargado como la treonina puede modificar las características electrostáticas de la zona alrededor de este residuo, impidiendo la localización correcta del inhibidor malonil-CoA. En cuanto al triptófano es un aminoácido de gran tamaño que puede favorecer un mejor posicionamiento del malonil-CoA comparado al proporcionado por la alanina.

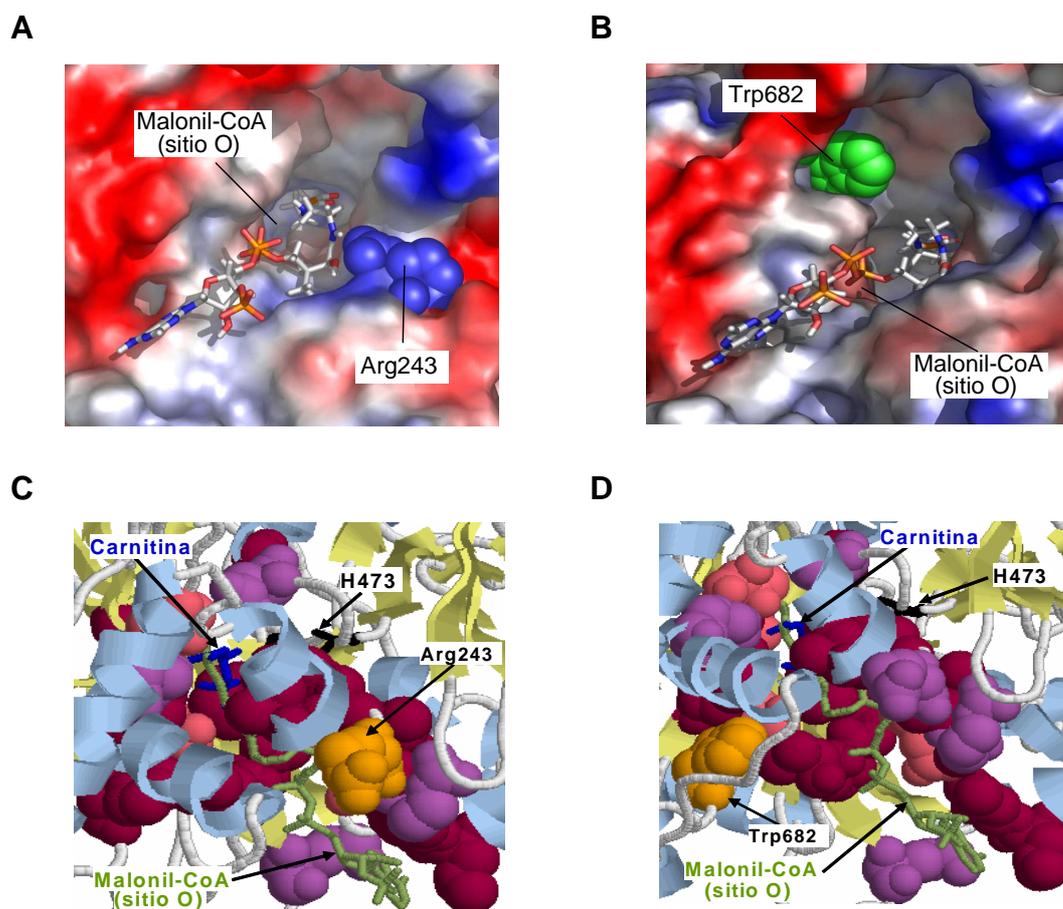


Figura 11. Representación del posicionamiento de los residuos de Arg²⁴³ y Trp⁶⁸² en el sitio O de unión del malonil-CoA en CPT1A de rata. A) y B) Representación de la superficie electrostática del sitio O. Se indica la posición de los residuos Arg²⁴³ y Trp⁶⁸² en forma de bolas y se muestra también el inhibidor malonil-CoA en forma de bolas y varillas. C) y D) Representación del sitio O de unión de malonil-CoA en forma de cintas. Se indican los residuos de Arg²⁴³ y Trp⁶⁸² en forma de bolas (naranja) y la molécula de malonil-CoA (verde), el residuo catalítico His⁴⁷³ (negro) y el sustrato carnitina (azul) en forma de bolas y varillas.

4.1.1 Generación de los mutantes y expresión en *S. cerevisiae*

Los mutantes CPT1A R243T y CPT1A W682A se obtuvieron utilizando el procedimiento de mutagénesis dirigida. El plásmido pYES CPT1A wt fue utilizado como molde con los oligonucleótidos correspondientes a cada mutación, CPT1A R243T.for, CPT1A R243T.rev y CPT1A W682A.for, CPT1A W682A.rev (**Apéndice 2**). Los plásmidos obtenidos fueron pYES CPT1A R243T y pYES CPT1A W682A. Se confirmó la incorporación de la mutación deseada y la ausencia de mutaciones adicionales mediante la secuenciación de los plásmidos obtenidos.

Las levaduras transformadas con los plásmidos de expresión salvaje o mutados se crecieron en medio líquido y tras la obtención de las fracciones mitocondriales, se llevo a cabo un ensayo comparativo de actividad enzimática entre CPT1A wt, CPT1A R243T y CPT1A W682A. Tal y como se esperaba, no se detectó actividad en la cepa de levadura control, transformada con el vector vacío. La mutación de arginina a tirosina no produjo ningún cambio significativo en la actividad enzimática respecto al enzima salvaje (**Figura 12A**). Sin embargo, la mutación del triptófano a alanina produjo una pérdida casi total de la actividad enzimática. Esta pérdida de actividad no significa necesariamente que este residuo esté implicado en la catálisis ya que se encuentra alejado del centro activo del enzima CPT1 y probablemente, la causa de la perdida de actividad puede ser debida a que este residuo estaría implicado en el mantenimiento estructural de la proteína. El análisis por Western Blot de la expresión de CPT1A wt, CPT1A R243T y CPT1A W682A indica que las proteínas se expresan con el tamaño esperado y con niveles similares (**Figura 12B**).

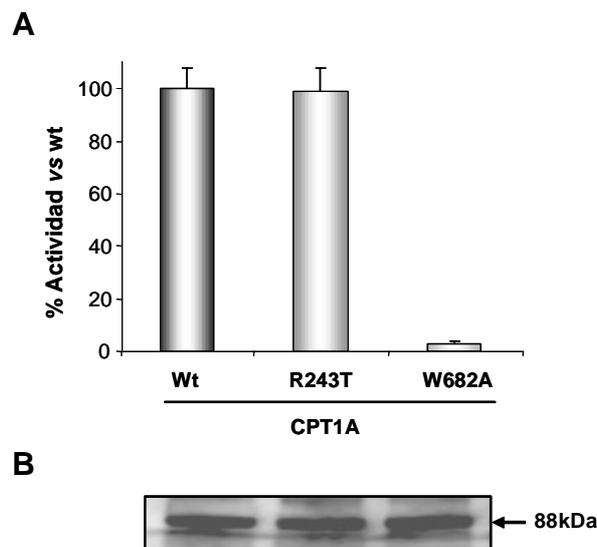


Figura 12: Actividad y Western Blot de las proteínas expresadas CPT1A salvaje y mutantes. **A)** Actividad relativa de CPT1A wt, CPT1A R243T y CPT1A W682A expresadas en levadura. Las actividades se han representado tomando como referencia la actividad del enzima salvaje correspondiente. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron con 6 μ g de extractos mitocondriales de levaduras que expresaban CPT1A. Los datos (medias \pm D.E.) se han tomado de la **Tabla 3**. **B)** Análisis representativo de Western Blot de uno de los extractos mitocondriales obtenidos. Se aplicaron 50 μ g de proteína a cada carril del gel. La flecha indica la posición migratoria y la masa molecular de CPT1A.

4.1.2 Análisis cinético de CPT1A salvaje y mutantes

Se analizó el comportamiento cinético del mutante CPT1A R243T. Este mutante mostraba una cinética estándar de saturación hiperbólica tipo Michaelis-Menten, similar al observado para el enzima salvaje, cuando se variaba la concentración de carnitina frente a una concentración constante del segundo sustrato palmitoil-CoA (135 μM). Lo mismo ocurría cuando el sustrato que variaba su concentración era el palmitoil-CoA, manteniéndose constante la concentración de carnitina a 400 μM (**Figura 13**).

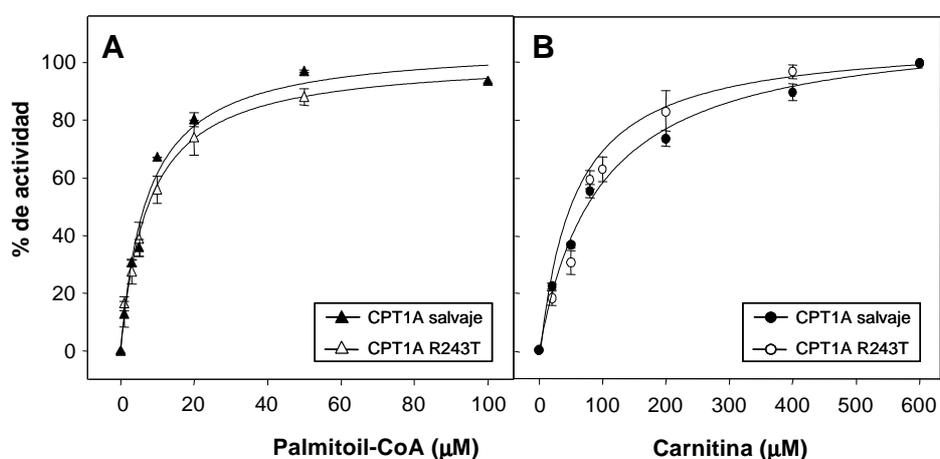


Figura 13: Análisis cinético de CPT1A salvaje y mutante R243T. Extractos mitocondriales de levaduras (6 μg de proteína) que expresaban CPT1A salvaje (▲, ●) o el mutante CPT1A R243T (△, ○) fueron ensayados para la actividad CPT1A, bien en presencia de concentración fija de carnitina (400 μM) y concentraciones crecientes de palmitoil-CoA (A), o bien en presencia de concentración fija de palmitoil-CoA (135 μM) y concentraciones crecientes de carnitina (B). Los resultados se presentan como la media (medias \pm D.E.) de tres experimentos independientes.

Se calcularon los valores cinéticos aparentes de K_m y V_{max} para los dos sustratos ensayados. Como se puede observar en la **Tabla 3**, estos valores cinéticos aparentes para los dos sustratos no presentaban cambios significativos en el mutante respecto al enzima salvaje. Estos resultados nos indican que la mutación de Arg²⁴³ a Thr no afecta la afinidad del enzima mutado para sus sustratos ni la velocidad de la reacción.

Cepa	Actividad (nmol/min.mg)	palmitoil-CoA		carnitina	
		Km_{app}	$Vmax_{app}$	Km_{app}	$Vmax_{app}$
		(μ M)	(nmol/min.mg)	(μ M)	(nmol/min.mg)
CPT1A wt	60,4 \pm 7,8	3,6 \pm 0,4	34,1 \pm 9,4	59,7 \pm 2,5	64,9 \pm 7,1
CPT1A R243T	59,8 \pm 8,4	7,0 \pm 2,2	36,3 \pm 6,9	56,3 \pm 2,9	70,6 \pm 10,3
CPT1A W682A	1,7 \pm 0,7	nd	nd	nd	nd

Tabla 3: Actividad CPT1A y parámetros cinéticos de las enzimas salvaje y mutadas. Extractos mitocondriales de levadura (6 μ g de proteína) expresando CPT1A wt y mutantes CPT1A R243T y CPT1A W682A se ensayaron para la actividad enzimática y se calcularon las constantes cinéticas. Los resultados se expresan como las medias \pm D.E. de al menos tres experimentos independientes con diferentes preparaciones proteicas. nd: parámetro no determinado.

Respecto al mutante resultante de la mutación de Trp⁶⁸² a Ala fue imposible realizar un análisis cinético ya que no presentaba suficiente actividad.

4.2 Sensibilidad a malonil-CoA de los mutantes CPT1A R243T y CPT1A R243T-A478G

Se analizó la sensibilidad a malonil-CoA del mutante CPT1A R243T y los resultados de inhibición se compararon con los del enzima sin mutar (**Figura 14A**). La inhibición producida por malonil-CoA a concentraciones crecientes de 1 a 100 μ M no fue lo efectivo que esperábamos. El valor de IC₅₀ para el mutante es de 38,4 μ M frente a 7,3 μ M para la forma salvaje. Este resultado nos indica que la mutación de Arg²⁴³ a alanina disminuye la sensibilidad del enzima para su inhibidor fisiológico en 5,3 veces.

Anteriormente nuestro grupo había mostrado que el residuo Ala⁴⁷⁸ estaba implicado en la pérdida de la sensibilidad de la proteína CPT1A (Morillas, 2002). Cuando se mutaba a Gly, aumentaba el valor de IC₅₀ de 3,2 veces respecto a la forma salvaje. En nuestro nuevo modelo estructural, este residuo estaría contactando con ambos sitios A y O de unión del malonil-CoA (**Tabla 2**). Con el fin de conseguir un mutante de CPT1A más insensible al malonil-CoA, hemos generado el doble mutante CPT1A R243T-A478G ya que el primer residuo Arg²⁴³ se localiza en la base de la entrada del malonil-CoA del sitio O y el segundo Ala⁴⁷⁸ en el bolsillo de la carnitina.

El plásmido que contiene el doble mutante CPT1A R243T-A478G se obtuvo utilizando el procedimiento de mutagénesis dirigida utilizando como molde el plásmido pYES CPT1A R243T y los oligonucleótidos CPT1A A478G.for y CPT1A A478G.rev

(**Apéndice 2**). Una vez obtenido el plásmido pYES CPT1A R243T-A478G, se confirmó la incorporación de la mutación deseada y la ausencia de mutaciones adicionales mediante la secuenciación del plásmido obtenido. Se transformaron los plásmidos de las enzimas salvaje y mutado separadamente en células de levadura *S. cerevisiae* y se crecieron en medio líquido, tal y como se ha descrito anteriormente.

Se analizó la actividad CPT1A de extractos mitocondriales que contienen el enzima CPT1A doblemente mutada. Se observó una pérdida de 58% en la actividad específica del mutante CPT1A R243T-A478G (**Figura 14B**) que no había sido observado en los mutantes simples. También se llevaron a cabo ensayos de inhibición del doble mutante por malonil-CoA a concentraciones entre 1 y 100 μM del inhibidor. El valor de IC_{50} para el mutante fue $>150 \mu\text{M}$ frente a $7,3 \mu\text{M}$ para la forma salvaje, un aumento estimado de 20 veces que era superior al de los mutantes individuales.

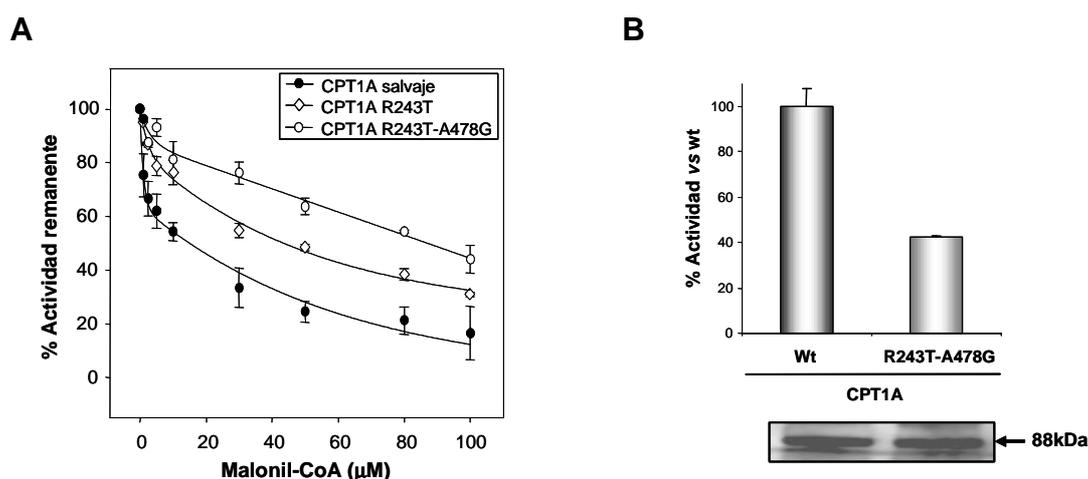


Figura 14: Efecto del malonil-CoA en la actividad del enzima CPT1A salvaje y mutantes CPT1A R243T y CPT1A R243T-A478G. **A)** 6 μg de extractos mitocondriales de *S. cerevisiae* expresando CPT1A salvaje (\bullet), mutante CPT1A R243T (\diamond) y doble mutante CPT1A R243T-A478G (\circ), se ensayaron para actividad CPT1A en presencia de concentraciones crecientes de malonil-CoA (de 1 a 100 μM). Los datos son la media relativa a los valores control en ausencia de malonil-CoA (100%). Se muestran las medias de tres a cuatro experimentos independientes a partir de extractos proteicos de diferentes expresiones en levadura. **B)** Actividad relativa de 6 μg de extractos proteicos de levaduras sobreexpresando CPT1A wt y CPT1A R243T-A478G. Las actividades se han representado tomando como referencia la actividad del enzima salvaje correspondiente. Se muestra un análisis de Western Blot de uno de los extractos mitocondriales obtenidos. 50 μg de proteína se aplicó a cada carril y la flecha indica la posición migratoria y la masa molecular de CPT1A.

4.3 Sensibilidad a malonil-CoA y a CoA-SH de los mutantes de M593S

El mutante M593S en CPT1A de rata casi abolió la sensibilidad del enzima frente a malonil-CoA pero quedaba un 20% de actividad residual a las altas concentraciones de malonil-CoA ensayadas (Morillas, 2003). Con el objetivo de llegar a una total insensibilidad del enzima CPT1A al malonil-CoA, hemos construido dos dobles mutantes de M593S: R243T-M593S y A478G-M593S que podrían dar lugar a un efecto inhibitor sumatorio al observado por las mutaciones individuales.

Los mutantes CPT1A R243T-M593S y CPT1A A478G-M593S se obtuvieron utilizando el procedimiento de mutagénesis dirigida. Los plásmidos pYES CPT1A R243T y pYES CPT1A A478G fueron utilizados como moldes para la mutagénesis dirigida de Met⁵⁹³ a Ser utilizando los oligonucleótidos CPT1A M593S.for y CPT1A M593S.rev (ver **Apéndice 2**). Se confirmó la incorporación de la mutación deseada y la ausencia de mutaciones adicionales mediante secuenciación de los plásmidos resultantes pYES CPT1A R243T-M593S y pYES CPT1A A478G-M593S. Tras la transformación de los plásmidos en células de levadura se analizó la actividad enzimática de cada mutante. No se observó ningún cambio significativo en la actividad específica de cada mutante respecto al enzima salvaje ($60,4 \pm 7,8$, $57,8 \pm 4,1$ y $58,2 \pm 2,6$ nmol.min⁻¹.mg⁻¹ para CPT1A wt, CPT1A R243T-M593S y CPT1A A478G-M593S respectivamente). Los dobles mutantes presentaron una sensibilidad a malonil-CoA muy alterada. De hecho, estos mutantes se inhibieron con dificultad en el rango de concentraciones de inhibidor ensayadas (1-100 μ M), siendo la actividad CPT1 residual de 70-75% a 100 μ M de inhibidor (**Figura 15**). Este resultado no era el esperado ya que no se consiguió una insensibilidad del enzima del 100% hacia el inhibidor malonil-CoA. Sin embargo, los valores de IC₅₀ para cada doble mutante en Met⁵⁹³ se mantuvieron superiores a 200 μ M.

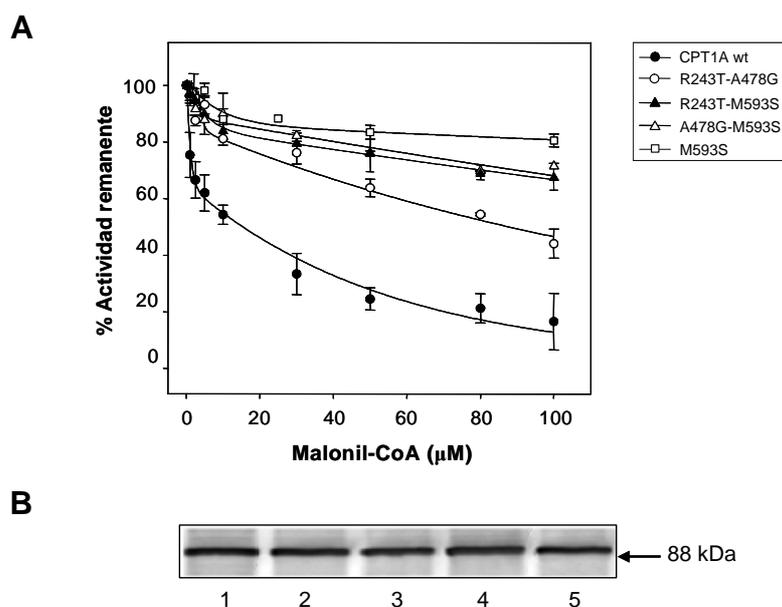


Figura 15: Efecto del malonil-CoA en la actividad del enzima CPT1A salvaje y mutantes. **A)** 6 μg de extractos mitocondriales de *S. cerevisiae* expresando CPT1A salvaje y mutantes se ensayaron para la actividad CPT1A en presencia de concentraciones crecientes de malonil-CoA (1-100 μM). Los datos son la media relativa a los valores control en ausencia de inhibidor (100%). **B)** Se muestra un análisis representativo de Western Blot de uno de los extractos mitocondriales obtenidos. 30 μg de proteína CPT1A salvaje (1), R243T-A478G (2), R243T-M593S (3), A478G-M593S (4) y M593S (5) se aplicó a cada carril y la flecha indica la posición migratoria y la masa molecular de CPT1A.

Los resultados de las **Figuras 5 y 15** nos indican que la actividad residual observada en los mutantes dobles o simple de M593S probablemente es debida a la presencia del CoA-SH o cualquier molécula unida al CoA en el entorno del enzima. Para comprobar esta hipótesis, realizamos ensayos de inhibición de CPT1A salvaje y mutante M593S en presencia de concentraciones crecientes de CoA-SH.

En la **Figura 16** se observa que el enzima salvaje se inhibe en presencia del CoA-SH con una IC_{50} de 89,55 μM y a altas concentraciones (100 μM) la actividad residual es de un 40%. El mutante CPT1A M593S se inhibe un 20% a altas concentraciones de CoA-SH, igual que lo observado en el caso de la inhibición por malonil-CoA. Este resultado sugiere que, dado que el propio CoA inhibe o inactiva en parte la actividad CPT1A, no se podrá en ningún caso conseguir una insensibilidad completa del enzima hacia su inhibidor malonil-CoA. Por tanto, se puede considerar que CPT1A mutada en el residuo M593 es completamente insensible al inhibidor, y que cualquier mutante que incluya la mutación de esta Met⁵⁹³ tendrá un perfil de inhibición similar al de la simple mutación de M593S.

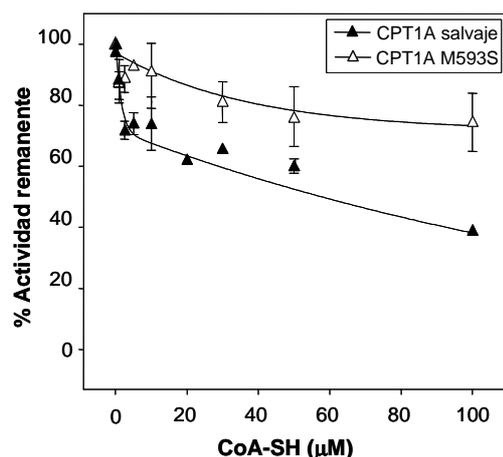


Figura 16: Efecto del CoA-SH en la actividad del enzima CPT1A salvaje y mutante M593S. Perfil de inhibición del mutante M593S en presencia de concentraciones crecientes de CoA-SH (1-100 μM). Los ensayos de actividad enzimática se realizaron con 6 μg de extractos proteicos de levadura que expresaban CPT1A salvaje o mutante M593S. Los datos son la media relativa a los valores control en ausencia de CoA-SH (100%).

5. EL SUSTRATO CARNITINA Y EL INHIBIDOR MALONIL-CoA COMPITEN POR EL MISMO SITIO EN EL CENTRO ACTIVO DEL ENZIMA

La posición de las moléculas de carnitina y malonil-CoA en el modelo predicho de CPT1A (**Figura 9**) indica que estas moléculas podrían competir para la unión en los dos sitios de unión del malonil-CoA, sitio A y sitio O. Para examinar esta hipótesis, hemos comparado los resultados descritos en la bibliografía, especialmente las medidas de cinéticas de inhibición y de afinidad para el sustrato carnitina. Así, recogimos los valores de IC_{50} para la inhibición de CPT1 por malonil-CoA y los valores de $K_{m_{\text{app}}}$ del sustrato carnitina.

Estos datos fueron clasificados en tres apartados (tejidos, expresión en levadura *Pichia pastoris* y expresión en levadura *S. cerevisiae*) y representados en la **Figura 17** como valores logarítmicos de IC_{50} (eje de ordenadas) frente a los de $K_{m_{\text{app}}}$ para la carnitina (eje de abscisas).

- I. Tejidos: hígado de rata, hígado fetal humano, corazón de rata, hígado de conejillo de indias, músculo esquelético humano, de rata, de perro y corazón de perro (McGarry, 1983) (**Figura 17A**).

II. Expresión en la levadura *P. pastoris*; CPT1A salvaje de rata y de cerdo y también CPT1B humana (Shi, 1999; Shi, 2000; Esser, 1996; Nicot, 2001; Zhu, 1997) (**Figura 17B**, triángulos blancos).

III. Expresión en *S. cerevisiae* (Morillas, 2001; Morillas, 2003; López-Viñas, 2007) que hemos clasificado en dos subgrupos:

a) Proteínas salvajes y mutantes cuya sensibilidad a malonil-CoA no cambiaba: CPT1A wt, CPT1B wt, CPT1A T314S, CPT1A N464D, CPT1A C608A y CPT1A R243T (**Figura 17B**, cuadros negros).

b) Todos los mutantes que perdieron la sensibilidad a malonil-CoA: CPT1A H277A, CPT1A A478G, CPT1A M593S y CPT1A T314S-N464D-A478G-M593S-C608A (**Figura 17B**, cuadrados blancos).

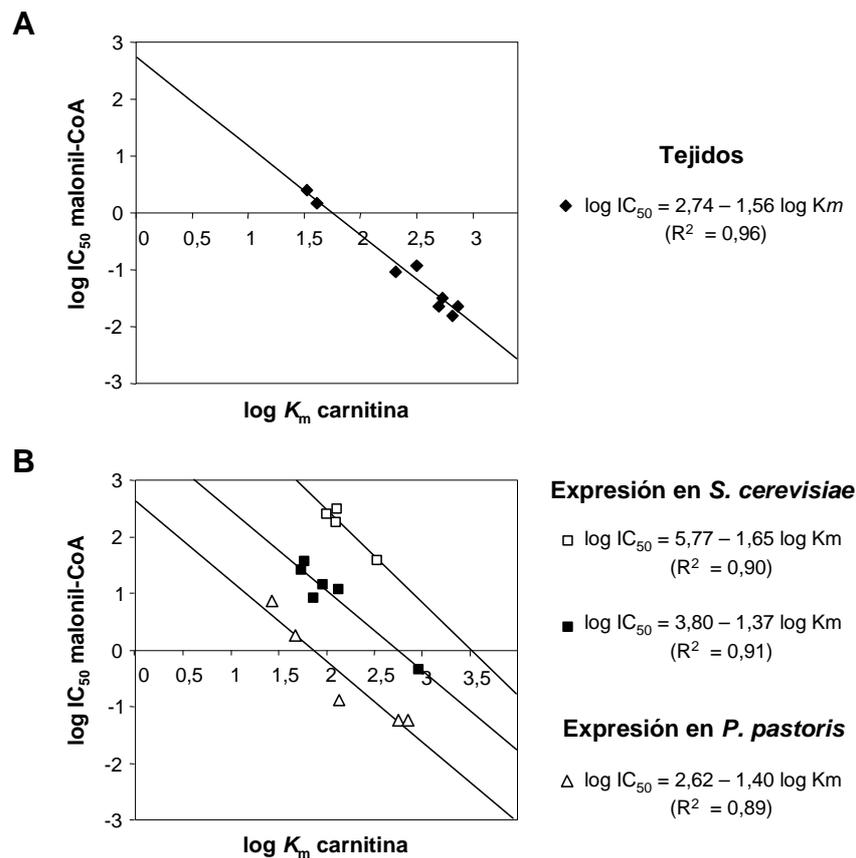


Figura 17: Representación doblemente logarítmica de la relación de los parámetros cinéticos de IC₅₀ para malonil-CoA y Km para carnitina. A) Los datos se obtienen de la actividad CPT1 en tejidos descritos en la literatura. **B)** Los datos se tomaron de la expresión de cADN de CPT1 salvaje o mutantes expresados en *P. pastoris* o en *S. cerevisiae*, también tomados de la literatura.

En todas las representaciones se obtuvo una línea recta indicando que hay una correlación inversa entre ambos parámetros cinéticos. Las correspondientes ecuaciones de cada Plot están representadas en la **Figura 17**. En todos los casos se observa que las ecuaciones lineales tienen un valor de pendiente entre -1,37 y -1,65 independientemente de:

- La expresión de cADNs ha sido en dos especies diferentes de levadura.
- La expresión de cADNs de ambas isoformas de CPT1, CPT1A y CPT1B.
- Se tomaron varios tejidos de animales y varios organismos.
- La diversidad de laboratorios que han realizado los ensayos.

El valor de la media de estas pendientes se calcula como sigue:

$$\frac{\Delta \log IC_{50} \text{ malonil-CoA}}{\Delta \log Km \text{ carnitina}} = -1,49 \pm 0,13$$

El valor de la pendiente nos indica que probablemente las dos moléculas de malonil-CoA y carnitina se unen una cerca de la otra en el enzima CPT1 y sugiere que una produce la repulsión de la otra en el centro catalítico.

Con el objetivo de examinar como el sustrato carnitina interfiere en la inhibición de CPT1 por malonil-CoA, se ensayó la actividad enzimática y de inhibición por malonil-CoA del enzima salvaje CPT1A sobreexpresada en *S. cerevisiae*, en presencia de concentraciones crecientes del sustrato carnitina, 100, 400, 800 y 1600 μM (**Figura 18**). Las curvas de inhibición tienen un perfil similar entre si, pero la inhibición disminuye cuando se incrementa la concentración de carnitina. Los valores de IC_{50} de la inhibición por malonil-CoA aumentaron progresivamente al aumentar las concentraciones de carnitina, indicando que este sustrato impediría la ubicación correcta del inhibidor en el centro catalítico. Estos valores de inhibición correlacionan con los valores de actividad específica del enzima en cada concentración de carnitina (**Tabla 4**).

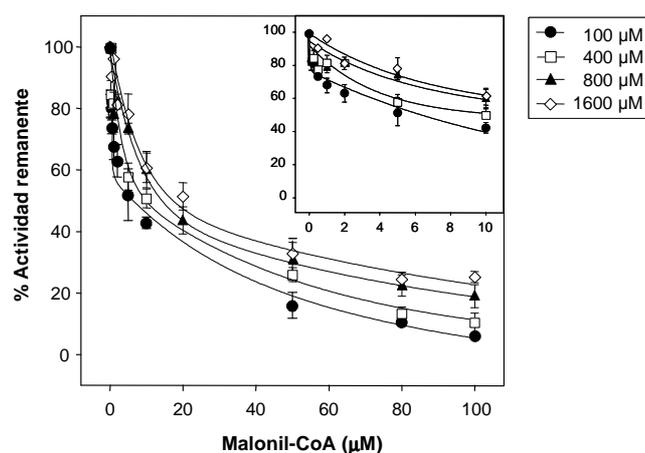


Figura 18: Efecto del malonil-CoA en la actividad del enzima CPT1A salvaje en presencia de concentraciones crecientes de carnitina. 6 µg de extractos proteicos mitocondriales de diferentes expresiones en levadura fueron ensayados para la actividad CPT1A en presencia de concentraciones crecientes de malonil-CoA (de 1 a 100 µM) y de carnitina (100, 400, 800 y 1600 µM). El inserto muestra los detalles de inhibición a bajas concentraciones del inhibidor. Los datos son la media relativa a los valores control en ausencia de malonil-CoA (100%). Se muestran las medias de tres a cuatro experimentos independientes.

	Carnitina (µM)	Actividad específica (nmol/min.mg)	IC ₅₀ malonil-CoA (µM)
CPT1A wt	100	39,1 ± 4,1	4,1 ± 0,7
	400	65,8 ± 6,4	7,3 ± 0,5
	800	70,7 ± 3,1	13,5 ± 1,6
	1600	74,3 ± 1,8	18,7 ± 0,5

Tabla 4: Actividad CPT1A salvaje e inhibición por malonil-CoA a concentraciones crecientes de carnitina. 6 µg de extractos proteicos mitocondriales de levadura expresando CPT1A wt fueron ensayados para la actividad y la inhibición por malonil-CoA en presencia de 50 µM de palmitoil-CoA y concentraciones crecientes de carnitina. Se calcularon la actividad específica y la IC₅₀ del enzima. Los resultados se expresan como las medias ± D.E. de al menos tres experimentos independientes con diferentes preparaciones proteicas.

5.1 Análisis cinético de la competición entre el sustrato carnitina y el inhibidor malonil-CoA

Para definir el tipo de inhibición que ejerce malonil-CoA respecto al sustrato carnitina en el enzima CPT1A, realizamos experimentos cinéticos en los cuales variábamos las concentraciones de carnitina (de 20 a 600 μM) en presencia de concentraciones crecientes de malonil-CoA (10, 50 y 100 μM) y a una concentración fija de 50 μM del sustrato palmitoil-CoA. El enzima muestra cinéticas de saturación estándar para el sustrato carnitina a cada concentración del malonil-CoA (**Figura 19A**).

La representación de Lineweaver-Burk para la actividad CPT1A salvaje en cada concentración de malonil-CoA fue lineal. Este Plot nos ha permitido calcular los valores aparentes de K_m y V_{max} del sustrato carnitina (**Figura 19B**). Observamos cambios en la actividad intrínseca del enzima y en la eficiencia catalítica definida como el ratio V_{max}/K_m . El aumento de las concentraciones de malonil-CoA produjo una disminución en la eficiencia catalítica lo que indica que el enzima CPT1A disminuye su preferencia por el sustrato carnitina cuando aumenta la concentración de malonil-CoA (**Tabla 5**). Esta reducción es debida a su vez a la disminución del valor de V_{max} y al incremento del valor de K_m de la carnitina, siendo este último el factor que más varía.

La representación de Lineweaver-Burk, definida como $1/v$ (eje de ordenadas) en función de $1/[\text{carnitina}]$ (eje de abcisas) para la actividad CPT1A en las diferentes concentraciones de malonil-CoA, da una serie de líneas rectas que se cruzan en un punto del segundo cuadrante a la izquierda del eje $1/v$ pero por encima del eje $1/[\text{carnitina}]$ (**Figura 19B**). La representación de los Plots secundarios, pendientes resultantes de la representación de Lineweaver-Burk frente a la concentración del inhibidor $[I]$, da una línea recta que cruza hacia la izquierda del eje de ordenadas (pendientes del Plot primario) y del eje de abcisas (**Figura 19C**). La representación de Dixon, definida como $1/v$ (eje de ordenadas) en función de $[I]$ (eje de abcisas), da también una línea recta que cruza hacia la izquierda del eje de ordenadas ($1/v$) y del eje de abcisas ($[I]$) (**Figura 19D**).

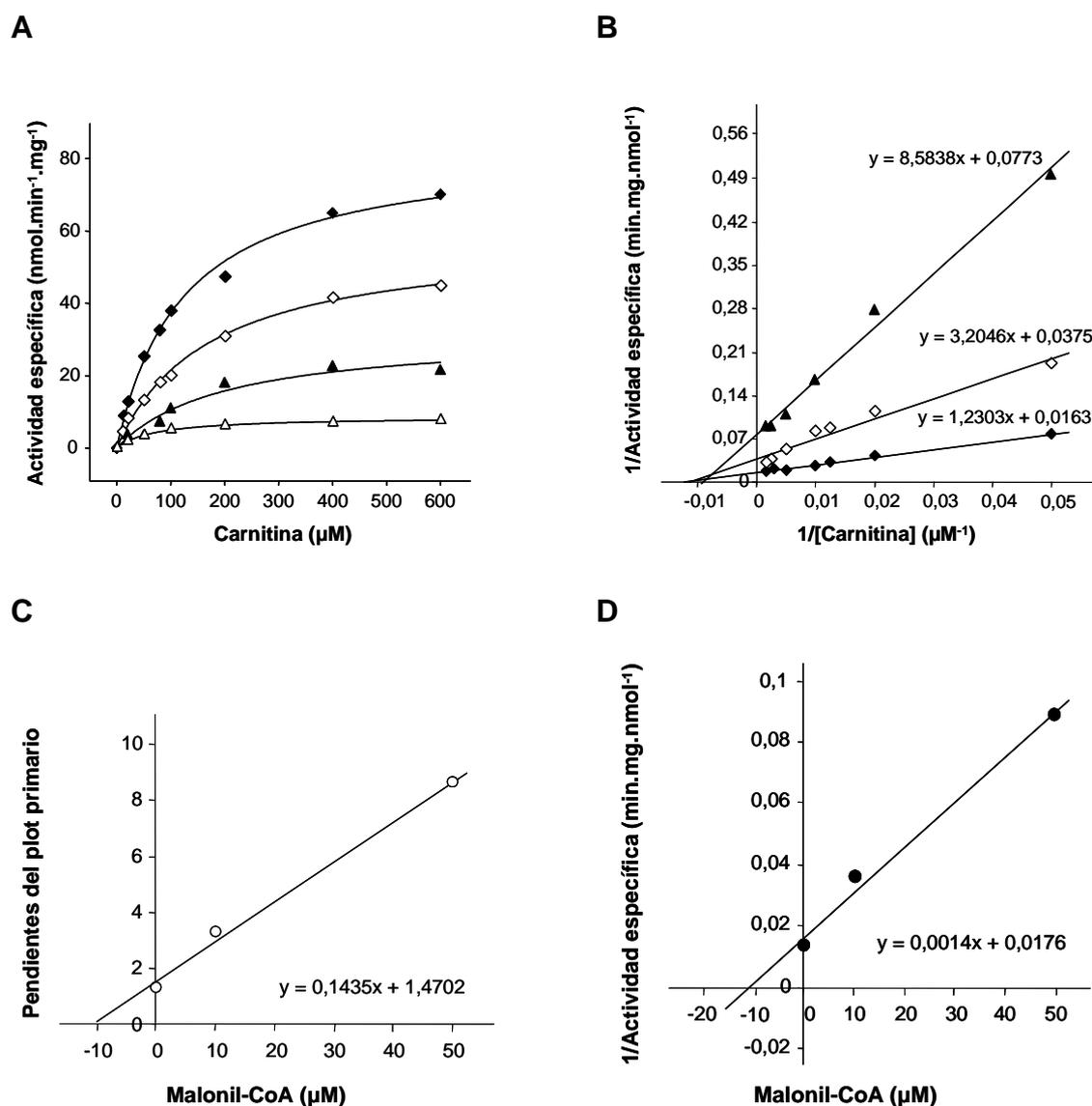


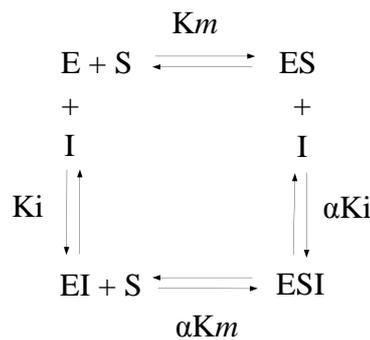
Figura 19: Análisis cinéticos de CPT1A salvaje expresada para el sustrato carnitina en presencia de diferentes concentraciones de malonil-CoA. Fracciones mitocondriales aisladas de levadura (10 μg de proteína) fueron ensayadas para la actividad CPT1A salvaje de rata. **A)** Representación de Michaelis-Menten de la actividad CPT1A versus concentraciones crecientes de carnitina (de 20 a 800 μM) en presencia de diferentes niveles de malonil-CoA 0 μM (◆), 10 μM (◇), 50 μM (▲) y 100 μM (Δ). **B)** Representación de Lineweaver-Burk de las cinéticas presentadas en A. **C)** Plot secundario de los datos cinéticos presentados en B. **D)** Representación de Dixon a una concentración fija de 400 μM de carnitina y 50 μM de palmitoil-CoA. Se muestran las medias de dos experimentos independientes a partir de extractos proteicos de diferentes expresiones de CPT1A salvaje en levadura.

	Malonil-CoA (μM)	Actividad específica (nmol/min.mg)	Carnitina		Eficiencia catalítica $V_{\text{max,app}}/K_{\text{m,app}}$
			$K_{\text{m,app}}$ (μM)	$V_{\text{max,app}}$ (nmol/min.mg)	
CPT1A wt	0	$65,8 \pm 6,4$	$75,6 \pm 0,6$	$65,4 \pm 4,4$	0,86
	10	$42,2 \pm 14,3$	$80,9 \pm 4,4$	$40,1 \pm 13,5$	0,49
	50	$22,9 \pm 11,5$	$102,9 \pm 8,0$	$22,9 \pm 10,0$	0,22
	100	$7,26 \pm 0,21$	nd	nd	nd

Tabla 5: Parámetros cinéticos de CPT1A expresada en *S. cerevisiae*. Fracciones enriquecidas en mitocondrias (10 μg de proteína) obtenidas tras la sobreexpresión de CPT1A salvaje en levadura fueron ensayadas en presencias de diferentes concentraciones de malonil-CoA y carnitina. Los resultados se expresan como las medias \pm D.E. de dos experimentos independientes con diferentes preparaciones proteicas. nd: parámetro no determinado.

Estos resultados cinéticos son compatibles con una inhibición mixta y como su nombre indica, puede ser considerada como una mezcla de inhibición competitiva e inhibición no competitiva pura. Los datos cinéticos son compatibles con el modelo cinético con un solo centro de unión para el inhibidor (I). En este tipo de inhibición, se presentan dos procesos por los cuales el inhibidor puede unirse al enzima libre (E) y al complejo enzima/sustrato (ES) con diferentes afinidades.

Esquema 1



En este contexto aparecen dos constantes de inhibición: K_i y $\alpha K_i = K_I$. Ambas constantes pueden ser calculadas según las siguientes fórmulas:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad \text{y} \quad \alpha K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

K_i : representa la constante de disociación del complejo enzima/malonil-CoA y es un indicador de la afinidad del enzima por malonil-CoA.

K_I : representa la constante de disociación del complejo enzima/sustrato/inhibidor (ESI).

Las ecuaciones de Lineweaver-Burk para una inhibición mixta pueden ser definidas como sigue:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V \max_{app}} + \frac{Km_{app}}{V \max_{app}} \times \frac{1}{[S]}$$

Donde:

$$V \max_{app} = \frac{V \max}{\left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)} \quad y \quad Km_{app} = Km \times \frac{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)}$$

Una inhibición mixta puede ser lineal o hiperbólica y viene definida por las representaciones secundarias de: a) Dixon; $1/V\max_{app}$ frente a $[I]$ (**Figura 19D**) y b) de las pendientes $Km_{app}/V\max_{app}$ frente a $[I]$ (**Figura 19C**). Dado que estas representaciones nos dieron líneas rectas y no hipérbolas, esto indica que la inhibición que ejerce malonil-CoA sobre el enzima CPT1A es una inhibición mixta lineal con respecto al sustrato carnitina. También, observamos que al aumentar la $[I]$, $v = 0$ (a 100 μM de malonil-CoA, practicamente se consigue $v = 0$), esto implica necesariamente que la inhibición es lineal. Por tanto el esquema cinético corresponde a una inhibición mixta lineal, ya que el complejo ESI no es cataliticamente eficaz. En caso de que se tratara de una inhibición mixta hiperbólica, el complejo ESI es eficaz pero menos que ES.

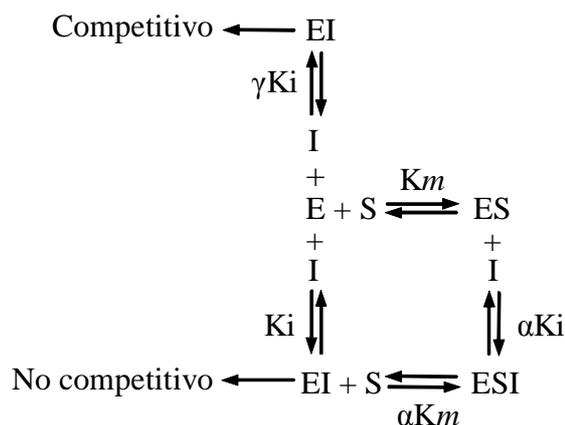
El valor de αK_i (K_I) fue obtenido de la intersección de la recta en el eje de abcisas ($[I]$), cuando representamos el gráfico de $1/V\max_{app}$ en función de $[I]$, lo que corresponde a la representación de Dixon en la **Figura 19D**. Este valor de $K_I = \alpha K_i$ es de $13,2 \pm 1,4 \mu\text{M}$. En cuanto al valor de K_i , fue obtenido cuando representamos las pendientes del Plot primario (representación de Lineweaver-Burk) en función de $[I]$. El punto de corte de la recta con el eje de abcisas, corresponde al valor de K_i que es de $10,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$ (**Figura 19C**). Los valores obtenidos para $K_I = \alpha K_i$ indican que el valor de α es mayor a 1 (en nuestro caso, $\alpha = 1,24$).

Sin embargo nuestros resultados cinéticos son también compatibles con otro modelo cinético que implica la unión de I en dos centros diferentes del enzima. Los datos presentados en este trabajo y descritos por otros autores en la bibliografía, indican que hay dos sitios de unión de malonil-CoA en el enzima CPT1. Podemos relacionar

nuestros datos cinéticos con los modelos estructurales basados en dos sitios de unión de malonil-CoA.

El primer modelo se observa en el esquema 2 y consistiría en una mezcla de una inhibición competitiva pura y una inhibición no competitiva:

Esquema 2



El I se une a dos centros que son mutuamente exclusivos y se une con diferente afinidad en cada uno de ellos. La ecuación de velocidad sería la siguiente:

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

Donde:

$$V_{\max_{app}} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)} \quad \text{y} \quad K_{m_{app}} = K_m \times \frac{\left(1 + \frac{I}{K_i} + \frac{I}{\gamma K_i}\right)}{\left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)}$$

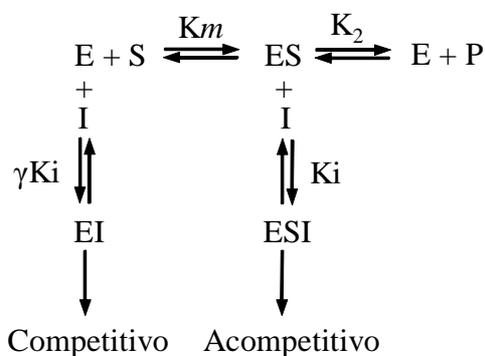
En este caso, la $V_{\max_{app}}$ es idéntica a la de la expresión para la inhibición mixta lineal con un solo centro de unión del I, que acabamos de ver. La representación de Dixon, $1/V_{\max_{app}}$ frente a $[I]$ da una línea recta (**Figura 19D**) que cruza en un punto del eje de abscisas ($[I]$). Esta intersección corresponde al valor de αK_i (K_I) que es igual a $13,2 \pm 1,4 \mu\text{M}$. En cuanto a la pendiente, sería igual a $K_{m_{app}}/V_{\max_{app}}$.

$$\frac{K_{m_{app}}}{V_{max_{app}}} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{[I] \times K_m \times [1 + \gamma]}{V_{max} \times \gamma K_i}$$

La representación de las pendientes $K_{m_{app}}/V_{max_{app}}$ frente a $[I]$ da también una línea recta (**Figura 19C**) pero en este caso, la intersección de la recta en el eje de abscisas ($[I]$) no es igual a la K_i aparente sino a la $\gamma K_i/(1+\gamma)$ aparente que es igual a $10,6 \mu\text{M}$. Si $\alpha = 1$, tendremos un valor aparente de $K_i = 13,2$ y por lo tanto, $\gamma = 4,16$.

El segundo modelo se muestra en el esquema 3 y consistiría en una mezcla de una inhibición competitiva y una inhibición acompetitiva pura:

Esquema 3



En este caso, el I se une a dos centros de tal manera que su unión a uno de los centros excluye la unión de S, pero la unión de I al segundo centro, sólo es posible si se ha unido S. La ecuación de velocidad sería la siguiente:

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

Donde:

$$V_{max_{app}} = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \quad \text{y} \quad K_{m_{app}} = K_m \times \frac{\left(1 + \frac{I}{\gamma K_i}\right)}{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$$

Así, la $V_{max_{app}}$ es también idéntica a la de la expresión para la inhibición mixta lineal con un solo centro de unión del I. Una representación de $1/V_{max_{app}}$ frente a $[I]$ da una línea recta (**Figura 19D**) que cruza en un punto del eje de abcisas ($[I]$). Esta intersección corresponde al valor de K_i que es igual a $13,2 \pm 1,4 \mu\text{M}$. En cuanto a la pendiente sería igual a $Km_{app}/V_{max_{app}}$.

$$\frac{Km_{app}}{V_{max_{app}}} = \frac{Km \times \left(1 + \frac{I}{\gamma K_i}\right)}{V_{max}}$$

La representación de las pendientes $Km_{app}/V_{max_{app}}$ frente a $[I]$ da también una línea recta (**Figura 19C**) pero en este caso, la intersección de la recta en el eje de abcisas ($[I]$) no es igual a la K_i aparente ni a la $\gamma K_i/(1+\gamma)$ aparente sino a la γK_i aparente que es igual a $10,6 \mu\text{M}$ y en este caso $\gamma = 0,80$. Es decir que malonil-CoA se une con más afinidad en el centro en el que se excluye la unión del S.

Hasta ahora y con nuestros datos cinéticos presentados no podemos decir cual de los dos esquemas (2 o 3) se adapta mejor a CPT1A, ya que ambos modelos apoyan los datos cinéticos obtenidos para los valores de Km_{app} y $V_{max_{app}}$ en las concentraciones de malonil-CoA y carnitina ensayadas.

CPT1B

ESTUDIOS DE ESTRUCTURA-FUNCIÓN

En este apartado de la tesis comentaremos otros estudios realizados en la isoforma muscular de CPT1 de rata y que son diferentes a los realizados y comentados anteriormente en CPT1A.

Hemos reportado por primera vez un modelo estructural 3-D de CPT1B de rata que está basado en los cristales de COT de ratón y CPT2 de rata (Jogl, 2005; Hsiao, 2006). Este modelo es muy parecido al de la isoforma hepática, CPT1A. También, trataremos de cambiar la especificidad de sustratos carnitina y palmitoil-CoA y determinar los aminoácidos implicados en la sensibilidad a malonil-CoA en CPT1B de rata.

6. MODELO 3-D DE LA PROTEÍNA CPT1B

Los modelos estructurales del dominio carboxi-terminal de CPT1B de rata y humana fueron construidos utilizando procedimientos de modelaje por homología. Este procedimiento está basado en alineamiento múltiple de las secuencias de CPT1 y de las estructuras cristalográficas de dos miembros de la familia de carnitina aciltransferasas, COT de ratón unida a acilcarnitina (Jogl, 2005) y CPT2 de rata (Hsiao, 2006). Estos modelos 3-D de CPT1B humana y de rata incluyen los residuos desde 161 hasta 772 y fueron generados utilizando el servidor SWISS-MODEL. Seguidamente sus estructuras fueron comprobadas con el programa WHAT-CHECK. En la **Figura 20** se muestra el alineamiento múltiple de secuencias de diferentes enzimas CPT1A y CPT1B junto con la secuencia de aminoácidos del molde COT de ratón (1XL8_B). Además, se indica la estructura secundaria de CPT1B de rata (CPT1B_RAT_ss). La numeración de las hélices α y las hojas β en el propuesto modelo fue realizada sin cambiar las del molde.

Resultados

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	E1	H8
1XL8_B_ssHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
1XL8_B	11 DRT...FOYC	LSLSELPVPA	LESERKQVYE	SVRPFANBDE	FKCTBIVLCK	FOGACGRH	QDLERARGK	RNWLEEWLN	VATLQVREBS
CPT1A_HUMAN	159 GRKFMLYSFC	TSLEKLPVPA	WKLTVNRYLO	SVRPLKREED	FKRMALALD	FAVGLKSRLO	WTLKLSWVA	INWVSDWBE	VYLRGRSPL
CPT1A_MOUSE	159 GRKFMLYSFC	TSLEKLPVPA	WKLTVNRYLE	SVRPLKREED	FKRMALALD	FAVGLKSRLO	WTLKLSWVA	INWVSDWBE	VYLRGRSPL
CPT1A_RAT	159 GRKFMLYSFC	TSLEKLPVPA	WKLTVNRYLE	SVRPLKREED	FKRMALALD	FAVGLKSRLO	WTLKLSWVA	INWVSDWBE	VYLRGRSPL
CPT1B_HUMAN	161 SRFPMLYSFC	TSLEKLPVPS	WPAIHHRYLD	SVRPLDDEA	YRMDLAKKE	FOKKTAPRLC	KVYLKLSWVA	INWVSDWBE	VYLRGRSPL
CPT1B_MOUSE	161 SRFPMLYSFC	TSLEKLPVPS	WPAIHHRYLD	SVRPLDDEA	YRMDLAKKE	FOKKTAPRLC	KVYLKLSWVA	INWVSDWBE	VYLRGRSPL
CPT1B_RAT	161 SRFPMLYSFC	TSLEKLPVPS	WPAIHHRYLD	SVRPLDDEA	YRMDLAKKE	FOKKTAPRLC	KVYLKLSWVA	INWVSDWBE	VYLRGRSPL
CPT1B_RAT_ssHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH

	H9	E2	E3	H10	E4	E5	E6	E7	E8	E9	H11
1XL8_B_ssHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
1XL8_B	118 ECT...LDRG	SMNWHMNTV	WOLFRRBKLE	EVHKSNTPE	D.MNQRMLF	STCKVPCITR	ETLNRYKTB	SGHCPHTA	VLCGRGVVF	DVLRGCELT	ETLRKQTY
CPT1A_HUMAN	263 LEFHQAARA	SNVHALLIM	RRLDREEEK	RRLDREEEK	CSQAMRLE	WTRIPGCEET	DLIQM.R.D	SG.....HW	VYHGRGFV	WLYDGRLLR	PRRLCQCC
CPT1A_MOUSE	263 LEFHQAARA	SNVHALLIM	RRLDREEEK	RRLDREEEK	CSQAMRLE	WTRIPGCEET	DLIQM.R.D	SR.....HW	VYHGRGFV	WLYDGRLLR	PRRLCQCC
CPT1A_RAT	263 LEFHQAARA	SNVHALLIM	RRLDREEEK	RRLDREEEK	CSQAMRLE	WTRIPGCEET	DLIQM.R.D	SR.....HW	VYHGRGFV	WLYDGRLLR	PRRLCQCC
CPT1B_HUMAN	265 KNDVQARL	SNVHAMIMV	RRLDREEEK	PWMLC.MVE	CSQAMRME	WTRIPGCEET	DLIQH.L.SD	SR.....HW	VYHGRGFV	WLYDGRLLR	PRRLCQCC
CPT1B_MOUSE	265 KNDVQARL	SNVHAMIMV	RRLDREEEK	PWMLC.MVE	CSQAMRME	WTRIPGCEET	DLIQH.L.SD	SR.....HW	VYHGRGFV	WLYDGRLLR	PRRLCQCC
CPT1B_RAT	265 KNDVQARL	SNVHAMIMV	RRLDREEEK	PWMLC.MVE	CSQAMRME	WTRIPGCEET	DLIQH.L.SD	SR.....HW	VYHGRGFV	WLYDGRLLR	PRRLCQCC
CPT1B_RAT_ssHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH

	H12	H13	H14	E10	H15	H16	E11	E12
1XL8_B_ssHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
1XL8_B	224 LHKCKSN.EP	VGPSLAALTS	EBRTWAKAR	EVLSDLPEN	LTPFKQTSN	LFVYSIEDES	P...HATPE	YSQ.VFEMLE
CPT1A_HUMAN	366 ILDDLPQEP	SEKLAALTA	SEKLAALTA	ADKVMARCR	CFCSA.RKSN	CSLDVWVKA	APFVLDDEE	QCRREDDPA
CPT1A_MOUSE	366 ILDDLPQEP	SEKLAALTA	SEKLAALTA	ADKVMARCR	CFCSA.RKSN	CSLDVWVKA	APFVLDDEE	QCRREDDPA
CPT1A_RAT	366 ILDDLPQEP	SEKLAALTA	SEKLAALTA	ADKVMARCR	CFCSA.RKSN	CSLDVWVKA	APFVLDDEE	QCRREDDPA
CPT1B_HUMAN	367 ILDDLPQEP	SEKLAALTA	SEKLAALTA	ADKVMARCR	CFCSA.RKSN	KADLALERA	APFVLDDEE	QCRREDDPA
CPT1B_MOUSE	367 ILDDLPQEP	SEKLAALTA	SEKLAALTA	ADKVMARCR	CFCSA.RKSN	KADLALERA	APFVLDDEE	QCRREDDPA
CPT1B_RAT	367 ILDDLPQEP	SEKLAALTA	SEKLAALTA	ADKVMARCR	CFCSA.RKSN	KADLALERA	APFVLDDEE	QCRREDDPA
CPT1B_RAT_ssHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH

	H17	E13	H18	E14	H19
1XL8_B_ssHHHHHHHHHHHHHHHHH
1XL8_B	329 PVDMMVNTI	AHVDERVLE	TE...RW	KRSKVRITP	...E.EE
CPT1A_HUMAN	475 WADAPLGH	WBYVMSIDSL	QLGYDTHC	KG.DINPAP	VPRFLWDIP
CPT1A_MOUSE	475 WADAPLGH	WBYVMSIDSL	QLGYDTHC	KG.DINPAP	VPRFLWDIP
CPT1A_RAT	475 WADAPLGH	WBYVMSIDSL	QLGYDTHC	KG.DINPAP	VPRFLWDIP
CPT1B_HUMAN	475 WADAPLGH	WBYVMSIDSL	QLGYDTHC	KG.DINPAP	VPRFLWDIP
CPT1B_MOUSE	475 WADAPLGH	WBYVMSIDSL	QLGYDTHC	KG.DINPAP	VPRFLWDIP
CPT1B_RAT	475 WADAPLGH	WBYVMSIDSL	QLGYDTHC	KG.DINPAP	VPRFLWDIP
CPT1B_RAT_ssHHHHHHHHHHHHHHHHH

	E15	E16	H20	H21	H22	H23	H24	E17
1XL8_B_ssEEEEEEEEEHHHHHHHHHHHHHHHEEE
1XL8_B	434 RFGCCVETPM	TRFVYHGRTE	TVRSCTVDAV	RWCSTVDPS	ASLDRQOKM	LEAFARHNKM	MDCSH.CKG	DRHLGCLL
CPT1A_HUMAN	584 KFCITVEASM	TRFVREGRTE	TVRSCTVDSQ	DFVAMADPA	QSLDRKLIK	KLFAEKKHQ	MYRLAMTGS	IDRHLGCLY
CPT1A_MOUSE	584 KFCITVEASM	TRFVREGRTE	TVRSCTVDSQ	DFVAMADPA	QSLDRKLIK	KLFAEKKHQ	MYRLAMTGS	IDRHLGCLY
CPT1A_RAT	584 KFCITVEASM	TRFVREGRTE	TVRSCTVDSQ	DFVAMADPA	QSLDRKLIK	KLFAEKKHQ	MYRLAMTGS	IDRHLGCLY
CPT1B_HUMAN	584 KFCITVEASM	TRFVREGRTE	TVRSCTVDSQ	DFVAMADPA	QSLDRKLIK	KLFAEKKHQ	MYRLAMTGS	IDRHLGCLY
CPT1B_MOUSE	584 KFCITVEASM	TRFVREGRTE	TVRSCTVDSQ	DFVAMADPA	QSLDRKLIK	KLFAEKKHQ	MYRLAMTGS	IDRHLGCLY
CPT1B_RAT	584 KFCITVEASM	TRFVREGRTE	TVRSCTVDSQ	DFVAMADPA	QSLDRKLIK	KLFAEKKHQ	MYRLAMTGS	IDRHLGCLY
CPT1B_RAT_ssEEEEEEEHHHHHHHHHHHHHHHEEE

	E18	E19	H25
1XL8_B_ssEEE
1XL8_B	543 TSLVGLRV	...CQVVM	VHNGYGRVH
CPT1A_HUMAN	686 TSCVPCQVE	LPFLNNPEY	VSSGGGEGV
CPT1A_MOUSE	686 TSCVPCQVE	LPFLNNPEY	VSSGGGEGV
CPT1A_RAT	686 TSCVPCQVE	LPFLNNPEY	VSSGGGEGV
CPT1B_HUMAN	686 TSCVPCQVE	LPFLNNPEY	VSSGGGEGV
CPT1B_MOUSE	686 TSCVPCQVE	LPFLNNPEY	VSSGGGEGV
CPT1B_RAT	686 TSCVPCQVE	LPFLNNPEY	VSSGGGEGV
CPT1B_RAT_ssEEE

Figura 20: Alineamiento múltiple de secuencias de diferentes carnitina aciltransferasas. Las secuencias de aminoácidos de CPT1A humana (CPT1_HUMAN), ratón (CPT1A_MOUSE) y de rata (CPT1_RAT) y CPT1B humana (CPT1B_HUMAN), ratón (CPT1B_MOUSE) y de rata (CPT1B_RAT) y la estructura 1XL8_B (enzima COT de ratón) del “Protein Data Bank”, se alinearon de la forma descrita en el apartado **Métodos, sección 8.2**. Los elementos de la estructura secundaria (ss) de 1XL8_B han sido numerados como se indica en Jogl (Jogl, 2005). Se muestran asimismo los elementos de estructura secundaria pertenecientes al modelo estructural obtenido para el enzima CPT1B de rata (H, hélice α ; E, hoja β).

En la **Figura 21** se muestran los modelos 3-D obtenidos de CPT1B de rata y humana que están basados en la estructura del enzima COT de ratón libre de sustratos (1XL8_B). Como en el caso de los modelos 3-D de CPT1A de rata y humana que hemos comentado anteriormente (**Resultados, sección 2**), pudimos localizar en los modelos 3-D de CPT1B de rata y humana la putativa posición de los sustratos palmitoil-CoA y carnitina en el canal catalítico de cada modelo. Estos modelos pueden ser representados de diferentes formas, bien por cintas o por superficie de solvatación accesible.

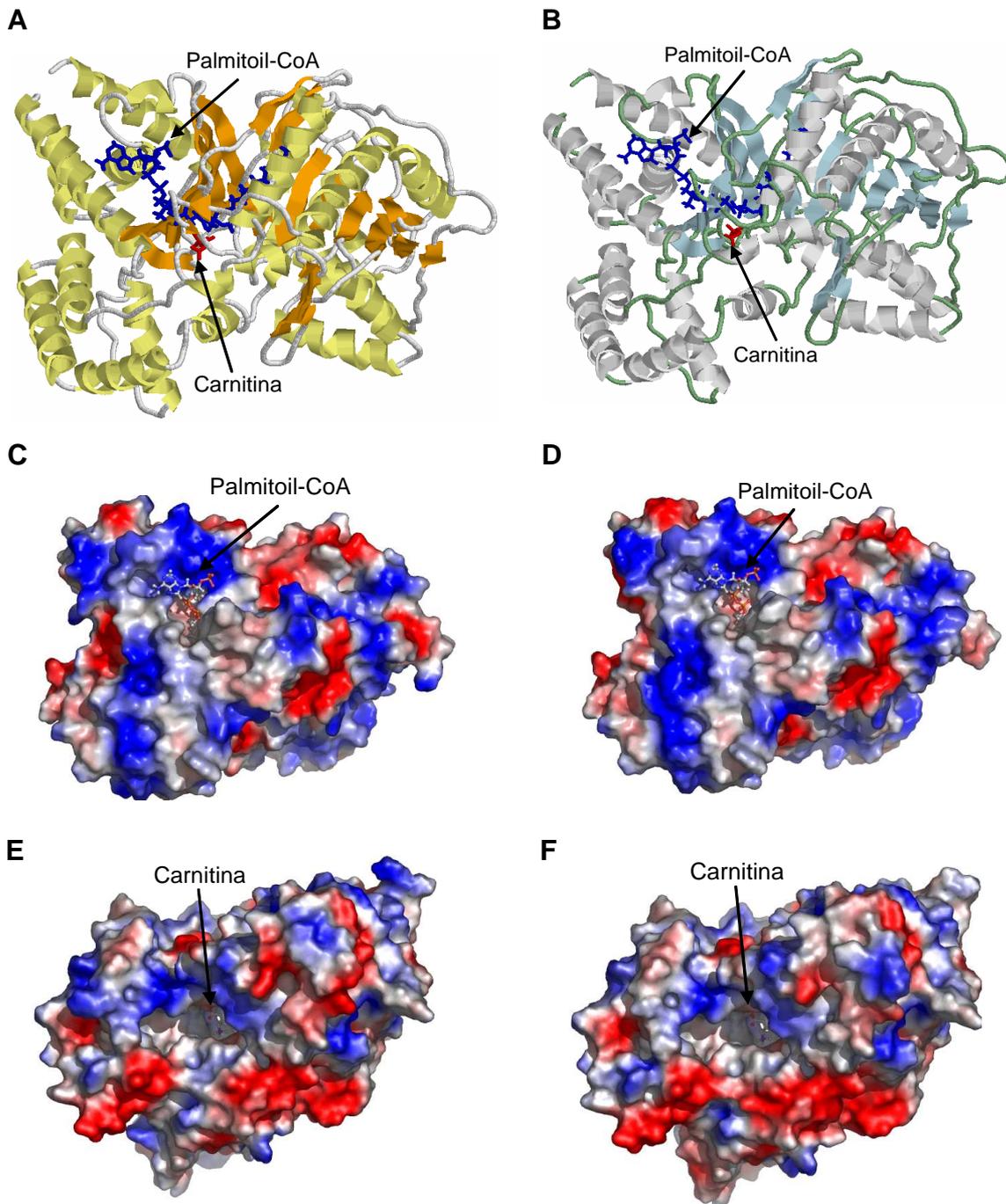


Figura 21: Representación del modelo estructural de CPT1B de rata y humana. A) y B) Representación en forma de cintas de los residuos formando el esqueleto de CPT1B de rata (hojas β en naranja y hélices α en amarillo) y humana (hojas β en azul claro y hélices α en gris). Se representan también en forma de bolas y varillas los sustratos carnitina (rojo) y palmitoil-CoA (azul). C) y D) Representaciones de la superficie electrostática del modelo propuesto para CPT1B de rata y humana respectivamente mostrándose la entrada del sustrato palmitoil-CoA. La superficie está coloreada de acuerdo con los potenciales electrostáticos calculados (negativo en rojo y positivo en azul). E) y F) Representaciones de la superficie electrostática de los modelos propuestos para CPT1B de rata y humana respectivamente mostrando el sustrato carnitina en el centro catalítico.

7. RESIDUOS IMPLICADOS EN EL CENTRO ACTIVO

Se ha aceptado ampliamente que una histidina es el residuo catalítico principal en la familia de las carnitina aciltransferasas. Esta histidina crítica ha sido mutada por otro aminoácido en varias proteínas de la familia como CPT2, CPT1A, COT y CrAT de rata (Brown, 1994a; Morillas, 2001; Morillas, 2000; Cordente, 2004) y en todos los casos, la mutación abolió completamente la actividad del enzima. La posición que ocupa dicha histidina está estrictamente conservada entre todos los miembros de la familia y el residuo homólogo a esta histidina en CPT1B de rata es la His⁴⁷³, tal como se observa en el alineamiento representativo de secuencias de carnitina aciltransferasas de mamíferos (**Figura 22**).

7.1 La His⁴⁷³ y el Asp⁴⁷⁷ intervienen en la catálisis

Estudios previos por el grupo del Dr. McGarry demostraron que uno de los dos residuos Asp³⁷⁶ y Asp⁴⁶⁴ es importante para la catálisis en CPT2 de rata (Brown, 1994a). Además, en la estructura cristalográfica del enzima CrAT humana se mostró la presencia de un Glu³⁴⁷ en la posición ocupada por el Asp³⁷⁶ en CPT2. Dicho aminoácido interaccionaría con la histidina catalítica (His³⁴³ en CrAT humana) favoreciendo la catálisis (Wu, 2003). La importancia de este residuo ácido en la catálisis ha sido confirmada también por nuestro grupo. La mutación del aminoácido Asp⁴⁷⁷ en CPT1A de rata y la del Glu³⁴⁷ en CrAT de rata correspondientes a la posición del Asp³⁷⁶ en CPT2, produjeron una pérdida de actividad en ambas enzimas (Morillas, 2004; Cordente, 2004). En CPT1B de rata, el aminoácido ortólogo del Glu³⁴⁷ de CrAT es el Asp⁴⁷⁷ (**Figura 22**).

CPT1A	RATA	469	INAEHSWADAP	IVGHLWEYVMATDVFQ	495
CPT1A	RATON	460	INAEHSWADAP	IVGHLWEYVMATDVFQ	486
CPT1A	HUMANA	469	LNAEHSWADAQIV	AHLWEYVMSIDSLQ	495
CPT1B	RATA	469	LNTEHSWADAP	IIGHLWEFVLATDTFH	495
CPT1B	HUMANA	469	LNAEHAWADAP	IIGHLWEFVLGTDSPH	495
CPT2	RATA	368	VHFEHSWCDGVA	VLRFNFNEVFRDSTQ	393
CPT2	RATON	368	VHFEHAWCDGVA	VLRFNFNEVFRDSTQ	393
CPT2	HUMANA	368	VHFEHSWCDGVA	VLRFNFNEVFRDSTQ	393
OCTC	RATA	323	CSCDHAPYDAML	LMVNI AHYVDEKLL	349
OCTC	HUMANA	323	CNCDHAPFDAM	IMVNISYVVEKIFQ	349
OCTC	BOVINO	323	SNCDHAPFDAM	HVLVKVCYVVDEN	349
CACP	HUMANA	339	LVYEHAAAE	EGFPITLLDVIET	365
CACP	RATON	340	MVYEHAAAE	EGFPITVALVDE	366
CACP	RATA	339	MVYEHAAAE	EGFPITVALVDE	365

Para definir el papel de la His⁴⁷³ y el Asp⁴⁷⁷ en la actividad catalítica del enzima CPT1B de rata, cada aminoácido fue mutado individualmente a alanina. La alanina es un aminoácido con cadena lateral no polar y poco voluminosa (un grupo metilo) lo cual la diferencia claramente de una histidina y un aspártico, aminoácidos de cadenas laterales voluminosas con carga. Se utilizó el plásmido pYES CPT1B wt como molde para la obtención de los mutantes CPT1B H473A y CPT1B D477A utilizando los oligonucleótidos correspondientes a cada mutación, CPT1B H473A.for, CPT1B H473A.rev y CPT1B D477A.for y CPT1B D477A.rev (**Apéndice 2**). Se confirmó la incorporación de la mutación deseada y la ausencia de mutaciones adicionales mediante secuenciación de los plásmidos obtenidos. Ambos plásmidos se transformaron en células de levadura *S. cerevisiae*.

Tras la obtención de los extractos mitocondriales de cada mutante, se procedió al análisis de las actividades enzimáticas y al análisis por Western Blot de la expresión de CPT1B salvaje y mutada, usando anticuerpos específicos anti-CPT1B cedidos por el Dr. Zammit (Van der Leij, 2002). Dichos anticuerpos reconocen el fragmento de residuos 259-760 del extremo carboxilo terminal de CPT1B de rata.

La actividad enzimática fue abolida en el mutante H473A, confirmando el papel clave de la His⁴⁷³ en la catálisis. También la mutación de Asp⁴⁷⁷ a alanina causó una pérdida total de la actividad catalítica, sugiriendo que este aminoácido desempeña un papel esencial en la actividad enzimática (**Figura 24A**). Ambos mutantes de CPT1B se expresan con el tamaño esperado y con niveles de expresión similares a los del enzima salvaje (**Figura 24B**), indicando que la abolición de la actividad no va ligada a los niveles de expresión de proteína. Dada la total falta de actividad, fue imposible realizar ensayos cinéticos con estos mutantes.

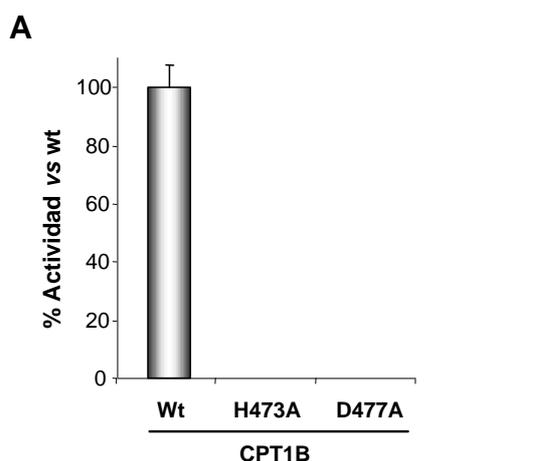


Figura 24. Actividad relativa de CPT1B salvaje y simple mutantes CPT1B H473A y CPT1B D477A y su inmunodetección. **A)** Las actividades se han representado tomando como referencia la actividad del enzima salvaje correspondiente. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron con 5 μ g de extractos mitocondriales de levadura. Los datos son la medias \pm D.E. de al menos tres experimentos independientes. **B)** Se muestra un Western Blot representativo de uno de los extractos mitocondriales obtenidos. 30 μ g de proteína fueron fraccionados mediante SDS-PAGE y sometidos a inmunodetección usando anticuerpos específicos. La flecha indica la posición migratoria y la masa molecular de CPT1B.

8. RESIDUOS IMPLICADOS EN LA UNIÓN DE LA CARNITINA

Se han descrito distintos aminoácidos implicados en la unión del sustrato carnitina en la carnitina octanoiltransferasa (COT) y en la colina acetiltransferasa (ChAT) (Cronin, 1997a; Cronin, 1998). Si tenemos en cuenta las coordenadas de CPT1B de rata, dichos residuos corresponderían a: Arg⁶⁵⁵, Thr⁶⁰², Glu⁶⁰³ y Thr⁶⁰⁴. Estos residuos están completamente conservados en la familia de las carnitina aciltransferasas y cambiados por Asn, Val, Asp y Asn respectivamente en ChAT, como se muestra en el alineamiento de secuencias proteicas de la **Figura 25A**.

Con el objetivo de confirmar nuestro modelo estructural de CPT1B de rata, hemos localizado estos residuos y calculado las distancias entre ellos y la molécula de la carnitina (**Figura 25B**). Todos estos residuos se encuentran a una distancia menor de 6 Å de la carnitina, lo que explicaría su importancia a la hora de alojar este sustrato. También quisimos cambiar la especificidad del sustrato carnitina a colina en CPT1B de rata. Para ello se obtuvieron mutantes CPT1B R655N Y CPT1B TET602-604VDN.

A

CPT1B	RATA	591	ASMT	RMF	REG	RTET	VR	SCT	SE	STA	614	645	RLAM	TGAG	IDRH	LF	CLY	IVS	664
CPT1B	RATON	591	ASMT	RMF	REG	RTET	VR	SCT	NE	SAA	614	645	RLAM	TGAG	IDRH	LF	CLY	IVS	664
CPT1B	HUMANO	591	ASMT	RMF	REG	RTET	VR	SCT	SE	STA	614	645	RLAM	TGAG	IDRH	LF	CLY	LVS	664
CPT1A	RATA	591	ASMT	RLF	REG	RTET	VR	SCT	ME	SCN	614	645	RLAM	TGAG	IDRH	LF	CLY	VVS	664
CPT1A	RATON	582	ASMT	RLF	REG	RTET	VR	SCT	TE	SCN	605	636	RLAM	TGAG	IDRH	LF	CLY	VVS	625
CPT1A	HUMANO	591	ASMT	RLF	REG	RTET	VR	SCT	TE	SCD	614	645	RLAM	TGSG	IDRH	LF	CLY	VVS	664
CPT2	RATA	488	SCST	AAF	KHGR	TETI	RP	SIF	TKR	511	544	KEA	AMG	QGF	DRHL	FAL	RYLA	563	
CPT2	RATON	488	SCST	AAF	KHGR	TETI	CP	SIF	TKR	511	544	KEA	AMG	QGF	DRHL	FAL	RYLA	563	
CPT2	HUMANO	488	SCST	AAF	KHGR	TETI	RP	SIV	TKR	511	544	KEA	AMG	QGF	DRHL	FAL	RHLA	563	
COT	RATA	441	TAM	TRY	FYHGR	TETV	RS	CTV	EAVR	464	495	RDC	SHG	KCF	DRHL	LGL	LILA	514	
COT	HUMANO	441	TAM	TRH	FYHGR	TETM	RS	CTV	EAVR	464	495	KDC	SAG	KCF	DRHL	LGL	LILA	514	
CrAT	RATON	455	SAS	LRM	FHLGR	TDTI	RS	ASID	SLA	478	509	DRA	IRG	EAF	DRHL	LGL	KLQA	528	
CrAT	HUMANO	452	SAS	LRM	FHLGR	TDTI	RS	ASMD	SLT	475	506	DRA	IRG	EAF	GRHL	LGL	KLQA	525	
ChAT	RATA	452	SAS	IRR	FQEG	RVDN	IR	SATP	EALA	470	503	VMA	ITG	MAID	NHLL	LAL	RELA	522	
ChAT	RATON	453	SAS	IRR	FQEG	RVDN	IR	SATP	EALA	471	504	VMA	ITG	MAID	NHLL	LAL	RELA	523	
ChAT	HUMANO	556	SAS	IRR	FQEG	RVDN	IR	SATP	EALA	579	612	VMA	ITG	MAID	NHLL	LAL	RELA	631	
ChAT	CERDO	453	SAS	IRR	FHE	GRVD	NI	RSATP	EALH	471	504	VMA	ITG	MAID	NHLL	LGL	RELA	523	

B

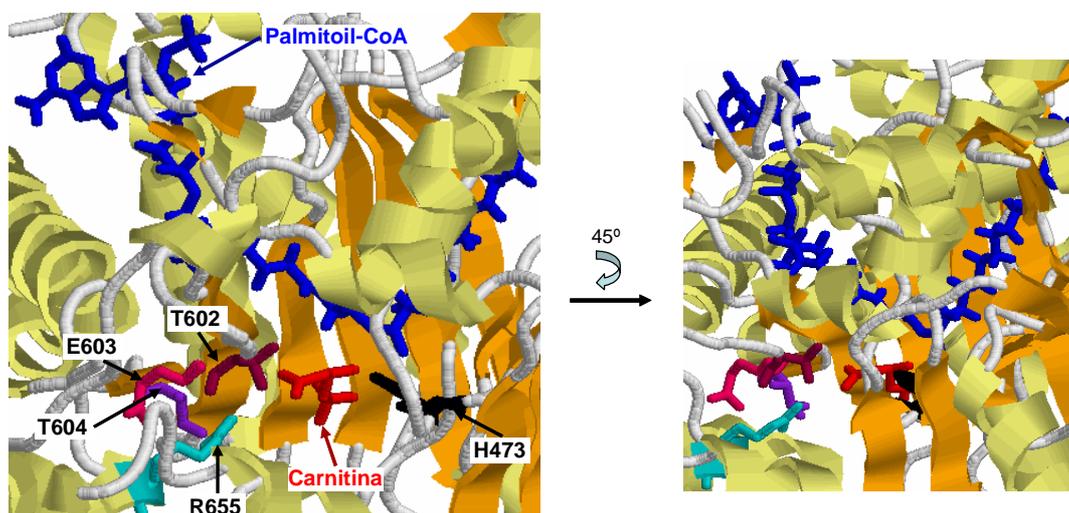


Figura 25. Residuos implicados en la unión de la carnitina a CPT1B de rata. A) Alineamiento múltiple de secuencias proteicas de carnitina aciltransferasas de mamíferos. Las secuencias han sido obtenidas del banco de datos GenBank. El alineamiento se ha realizado con el programa ClustalW (**Métodos, sección 8.2**). Las secuencias incluidas fueron las de los enzimas CPT1B de rata, ratón y humano; CPT1A de rata, ratón y humano; CPT2 de rata, ratón y humano; COT de rata y humano; CrAT de ratón y humano y ChAT de rata, ratón, humano y cerdo. Los residuos están coloreados según sus conservaciones. Las posiciones de los residuos implicados en la unión de la carnitina se indican con flechas. **B)** Representación por cintas del modelo propuesto para el entorno catalítico de CPT1B de rata. Se representan las hojas β (naranja), las hélices α (amarillo) y los sustratos carnitina (rojo) y palmitoil-CoA (azul) en forma de bolas y varillas. Se muestran también los residuos catalíticos: His⁴⁷³ (negro) y Asp⁴⁷⁷ (verde) y los aminoácidos involucrados en la unión de la carnitina en el bolsillo catalítico.

8.1 Cambio de especificidad de carnitina a colina del enzima CPT1B

El mutante simple CPT1B R655N, el triple mutante CPT1B TET602-604VDN y el cuádruple mutante CPT1B R655N-TET602-604VDN se obtuvieron utilizando el procedimiento de mutagénesis dirigida. Por ello, se utilizó el plásmido pYES CPT1B wt como molde para la mutagénesis dirigida de Arg⁶⁵⁵ a Asn y de Thr-Glu-Thr 602-604 a Val-Asp-Asn y también los oligonucleótidos correspondientes a cada mutación, CPT1B R655N.for, CPT1B R655N.rev y CPT1B TET602-604VDN.for, CPT1B TET602-604VDN.rev (**Apéndice 2**). En el caso del cuádruple mutante CPT1B R655N-TET602-604VDN, se utilizó el plásmido pYES CPT1B TET602-604VDN como molde. Se confirmó la incorporación de la mutación deseada y la ausencia de mutaciones adicionales en cada caso mediante secuenciación de los plásmidos obtenidos.

El sistema de expresión elegido fue el de la levadura *S. cerevisiae*. Tras la transformación en células de levadura y la obtención de los extractos mitocondriales de cada mutante, se procedió al análisis de las actividades enzimáticas y al análisis por Western Blot de CPT1B salvaje y mutantes.

La generación del cuádruple mutante elimina la mayor parte de las interacciones entre el enzima y el grupo carboxilato de la carnitina. Los resultados cinéticos con el simple, triple y cuádruple mutante mostraron una completa abolición de la actividad enzimática cuando los sustratos utilizados fueron palmitoil-CoA y carnitina, confirmando el papel clave de estos residuos en la unión del sustrato carnitina. Tal como muestra el resultado por Western Blot, todos los mutantes de CPT1B se expresan con el tamaño esperado y con niveles de expresión similares a los del enzima salvaje (**Figura 26A**).

También se analizó la actividad enzimática de CPT1B salvaje y mutantes utilizando una mayor concentración de proteína (30 µg) y como sustratos el palmitoil-CoA a 50 µM y la colina a 1 mM y a 10 mM. A pesar de que la molécula de la colina es más pequeña que la de carnitina, observamos que apenas se detecta actividad del enzima salvaje y no se observa ninguna actividad en los mutantes de CPT1B (**Figura 26B**). Este resultado indica que no hemos podido transformar CPT1B en una colina palmitoiltransferasa.

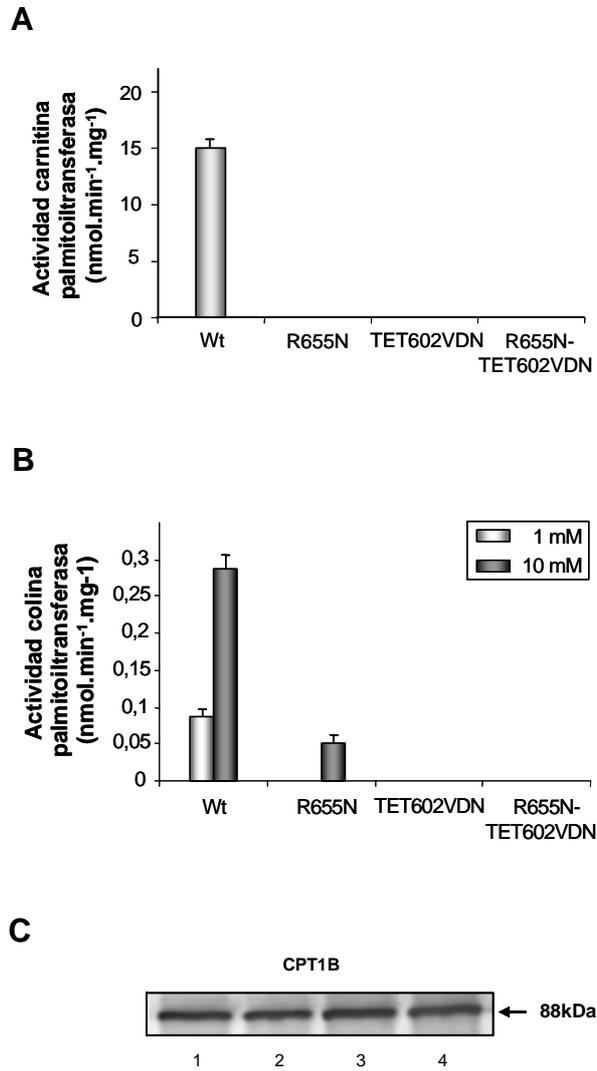


Figura 26. Actividad relativa de CPT1B salvaje y mutantes. **A)** Los ensayos de actividad se realizaron con 5 μ g de extractos mitocondriales de levadura en presencia de 50 μ M palmitoil-CoA y 1 mM carnitina durante 4 min a 30°C. **B)** Actividad enzimática en presencia de 50 μ M palmitoil-CoA y dos concentraciones de colina (1 y 10 mM) como sustrato. Se utilizó 6 veces de concentración de proteína comparada con **A**. **C)** Se muestra un Western Blot representativo de uno de los extractos mitocondriales obtenidos de la expresión de CPT1B salvaje (1), CPT1B R655N (2), CPT1B TET602VDN (3) y CPT1B R655N-TET602VDN (4). 30 μ g de proteína se aplicó a cada carril y la flecha indica la posición migratoria y la masa molecular de CPT1B.

9. CAMBIO DE ESPECIFICIDAD DE CPT1B HACIA ACILES-CoA DE CADENA CORTA

Las carnitina aciltransferasas catalizan el cambio de grupos acil del CoA a la carnitina. Los miembros de la familia pueden ser clasificados en la base a su selección hacia el sustrato acil-CoA. El estudio de los aminoácidos implicados en la unión del sustrato acil-CoA y el posicionamiento del grupo acil en el centro activo del enzima era de gran interés después de la descripción de la estructura cristalográfica del enzima CrAT de ratón. El enzima CrAT es muy activa hacia aciles-CoA de cadena corta (C₂ hasta C₆) pero no hacia aciles-CoA de cadena media (C₈ hasta C₁₂) o larga (C₁₄ hasta C₁₈). El análisis y el estudio de dicha estructura cristalográfica reveló que la parte acetil de la molécula acetilcarnitina está dirigida hacia un canal hidrofóbico del enzima (Jogl, 2003). Este canal está ocupado parcialmente por la cadena lateral del residuo Met⁵⁶⁴, un aminoácido conservado solamente en CrAT y que esta sustituido por una glicina en las otras carnitina aciltransferasas (CPT1, CPT2 y COT). Nuestro grupo confirmó que el residuo Met⁵⁶⁴ mutado a una glicina era crítico para la especificidad del enzima CrAT de rata hacia el sustrato acetil-CoA. El mutante CrAT M564G permitió alojar aciles-CoA de cadena media, convirtiendo el enzima CrAT de rata en COT. El aminoácido Met⁵⁶⁴ bloquea la entrada de aciles-CoA de cadena media o larga al sitio catalítico del enzima CrAT. Además, cuando se mutaba la glicina en COT de rata por la metionina (mutante COT G553M), el enzima COT mutado se convertía en CrAT permitiendo solo alojar aciles-CoA de cadena corta (Cordente, 2004; Cordente, 2006).

9.1 Papel del tripéptido ⁷⁰⁹GGG⁷¹¹ en la especificidad del sustrato acil-CoA

El análisis del alineamiento múltiple de secuencias proteicas de miembros de la familia de las carnitina aciltransferasas muestra que la Met⁵⁶⁴ presente en CrAT de rata le corresponde la glicina 710 en CPT1A y CPT1B de rata. Esta glicina forma parte de un grupo de tres residuos de glicinas ⁷⁰⁹GGG⁷¹¹ completamente conservados en las CPT1 (A y B) y cambiados por VMS o VMF en CrAT y por QGV en COT (**Figura 27**).

CPT1A	RATA	683	RLSTSQT	PQQQVEL	DFEKNPD	VVSCGGG	FGPWA	716
CPT1A	RATON	674	RLSTSQT	PQQQVEL	DFEKYPD	VVSCGGG	FGPWA	707
CPT1A	HUMANA	683	RLSTSQT	PQQQVEL	FDLENNPE	VVSSGGG	FGPWA	716
CPT1B	RATA	683	SLSTSQ	IPQFQIC	MFDPKQY	PNHLGAG	GGFGPWA	716
CPT1B	HUMANA	683	RLSTSQ	IPQSQIR	MFDPQHP	NHLGAG	GGFGPWA	716
CPT2	RATA	586	ILSTSTLN	SPAVSLG	GFAPVV	606	
CPT2	RATON	586	ILSTSTLS	SPAVSLG	GFAPVV	606	
CPT2	HUMANA	586	VLSTSTLS	SPAVNLS	GFAPVV	606	
OCTC	RATA	540	VLSTSLVG	YLRICG	VVVPMV	559	
OCTC	HUMANA	540	VLSTSLVG	YLRVCG	VVVPMV	559	
OCTC	BOVINO	540	VLSTSLVG	YLRVCG	VVVPMV	559	
CACP	HUMANA	550	HLSTSQVP	AKTDCV	MFFGPVV	570	
CACP	RATON	551	NLSTSQVP	AKTDCV	MFFGPVV	571	
CACP	RATA	550	NLSTSQVP	AKTDCV	MFFGPVV	570	

Figura 27: Alineamiento múltiple de secuencias proteicas de carnitina aciltransferasas de mamífero. Las secuencias de aminoácidos de los enzimas carnitina aciltransferasas han sido obtenidas del banco de datos GenBank. El alineamiento se realizó con el programa ClustalW (Métodos, sección 8.2). Se muestran las secuencias de los enzimas que actúan con aciles-CoA de cadena media y de cadena larga como sustratos: CPT1A de rata, ratón y humano; CPT1B de rata y humano; CPT2 de rata, ratón y humano; y COT (OCTC) de rata, humano y bovino. También se muestran los enzimas que utilizan sustratos cortos: CrAT (CACP) de humano, ratón y rata. Los residuos han sido coloreados según sus conservaciones. La posición del tripéptido putativamente implicado en la unión del sustrato acil-CoA está indicada mediante flechas y cuadros.

Con el fin de conocer que importancia tienen estas tres glicinas en el posicionamiento del sustrato palmitoil-CoA en el enzima CPT1, realizamos un estudio de Docking entre el sustrato palmitoil-CoA y ambas isoformas de CPT1 humana tal como se describe en el apartado Métodos, sección 8.4 y 8.5.

El resultado del análisis de Docking indica que la cadena alifática del ácido graso de la molécula del palmitoil-CoA se introduce en un bolsillo hidrofóbico definido por la hélice $\alpha 12$ y la hoja $\beta 14$ en ambas isoformas de CPT1 humana, igual que ocurre en el caso del Docking de este sustrato en CPT1A de rata. La **Figura 28** muestra cómo el grupo palmitoil se acomoda en el bolsillo hidrofóbico. El grupo palmitoil no forma una línea recta con el grupo CoA sino que se dobla en frente del putativo residuo catalítico His⁴⁷³, hacia una región hidrofóbica. Esto es posible porque en la zona de la curvatura, después de la hoja $\beta 14$ residen los tres residuos consecutivos de glicina ⁷⁰⁹GGG⁷¹¹ descritos anteriormente y que son suficientemente pequeños para permitir que la cadena de hidrocarburos entre en el bolsillo. En esta figura se indican también los residuos localizados dentro de un rango de 4Å alrededor del grupo palmitoil. Los residuos hidrofóbicos en la hélice $\alpha 12$ se localizan en el mismo lado de la hélice formando el canal hidrofóbico y apuntan hacia los tres residuos de glicina, localizados de forma idéntica en ambas isoformas de CPT1 humana.

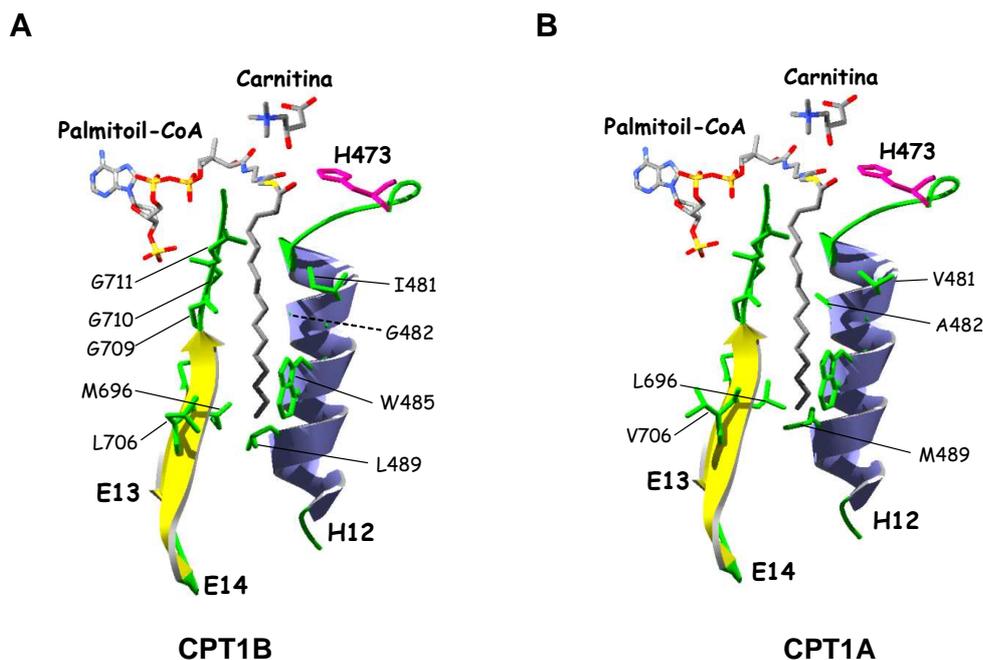


Figura 28: Docking *in silico* del sustrato palmitoil-CoA en el modelo 3-D del centro activo del enzima CPT1 humana. A) Modelo propuesto para el alojamiento del grupo palmitoil de la molécula de sustrato palmitoil-CoA en el centro activo del enzima CPT1B humana. B) Modelo de Docking del sustrato palmitoil-CoA en CPT1A humana. En ambos casos se indican las posiciones del sustrato carnitina y el residuo catalítico His⁴⁷³ (en color lila) y también las estructuras secundarias de la hélice α 12 y las hojas β 13 y β 14. La cadena hidrocarbonada de la molécula del sustrato se localiza en el bolsillo hidrofóbico presente en el centro activo del enzima. Se indican los tres residuos de glicina justo después de la hoja β 14 y los demás residuos formando este canal hidrofóbico.

Teniendo en cuenta toda esta información, nos propusimos convertir el enzima CPT1B de rata en una pseudo-CrAT o pseudo-COT, mutando los tres residuos consecutivos de glicina también conservados en CPT1B de rata por sus homólogos en CrAT y COT de rata.

9.2 Cambio de especificidad de longitud de sustrato acil-CoA del enzima CPT1B

Se obtuvieron los dos triples mutantes CPT1B GGG709-711VMF y CPT1B GGG709-711QGV utilizando el plásmido pYES CPT1B wt como molde para la mutagénesis dirigida de Gly-Gly-Gly 709-711 Val-Met-Phe y la de Gly-Gly-Gly 709-711 Gln-Gly-Val y los oligonucleótidos correspondientes a cada mutación, CPT1B GGG709-711VMF.for, CPT1B GGG709-711VMF.rev y CPT1B GGG709-711QGV.for, CPT1B GGG709-711QGV.rev. Se han obtenido separadamente los plásmidos que sobreexpresan las proteínas mutantes CPT1B GGG709-711VMF

(CPT1B-CrAT) y GGG709-711QGV (CPT1B-COT). Se confirmó la incorporación de las mutaciones deseadas y la ausencia de mutaciones adicionales mediante secuenciación de los plásmidos obtenidos.

Dado que nuestro interés es conocer los aminoácidos implicados en la especificidad del enzima CPT1B para la longitud de la cadena del sustrato acil-CoA, decidimos convertir CPT1B de rata en una pseudo COT o pseudo CrAT. Por ello, utilizamos un nuevo sistema de expresión de levadura *S. cerevisiae* que carece del gen *CAT2* endógeno (FY23 Δ *cat2* (MATa *trp1 ura3* Δ *cat2::LEU2*)). La ausencia de actividad carnitina acetil y aciltransferasa en la cepa de FY23 Δ *cat2* facilita la interpretación de los estudios cinéticos de las proteínas sobreexpresadas.

Se transformaron las células de levadura con los plásmidos pYES CPT1B GGG709-711VMF y pYES CPT1B GGG709-711QGV y también los plásmidos control expresando CrAT, CPT1A y CPT1B salvajes de rata. Se obtuvieron los extractos mitocondriales de cada mutante y de cada enzima salvaje separadamente, y se procedió al análisis de las actividades enzimáticas y al análisis por Western Blot de las proteínas expresadas.

Utilizamos el método radiométrico para estudiar la actividad enzimática con sustratos de aciles-CoA de cadena larga y media desde C₁₈ hasta C₈. Para el análisis de la actividad enzimática de sustratos de aciles-CoA de cadena corta y media desde C₂ hasta C₁₀ utilizamos el método fluorimétrico (**ver Métodos, sección 5**).

La **Figura 29** muestra el resultado de la actividad de las diferentes enzimas ensayadas. Tal y como era de esperar, el ensayo radiométrico de las diferentes enzimas con sustratos de aciles-CoA de cadena media y larga muestra que solamente CPT1A y CPT1B tienen actividad desde C₈ hasta C₁₈, con una actividad máxima en C₁₄. Mientras que los dos mutantes triples de glicina no muestran ninguna actividad con sustratos que van desde C₁₀ hasta C₁₈ (**Figura 29A**). Por otro lado con el ensayo fluorimétrico en el que se analizó la actividad de los distintos enzimas salvajes y mutantes sobre aciles-CoA de cadena corta, se observó que ninguno de los triples mutantes de CPT1B era activo (**Figura 29B**). La falta de actividad de estos mutantes de CPT1B no es debida a una bajada en la expresión de las proteínas ya que el análisis por Western Blot en la **Figura 29C** muestra los niveles y el tamaño de expresión similares al enzima salvaje.

Estos resultados nos indican que CPT1B es un enzima muy especializado respecto a la especificidad del sustrato acil-CoA y que el cambio de las glicinas por sus análogos en CrAT y COT no es suficiente para rediseñar su especificidad.

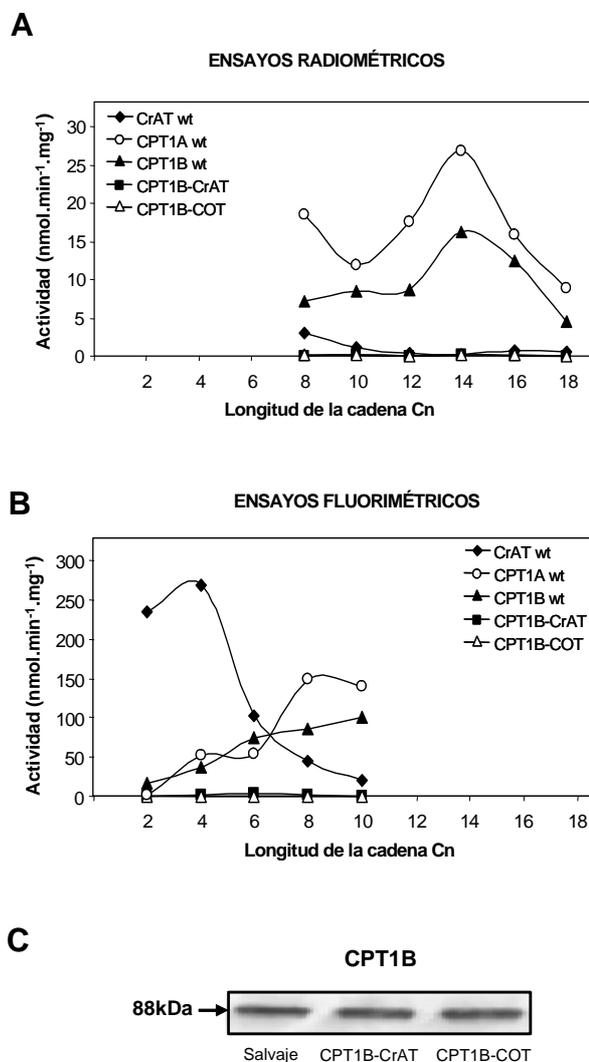


Figura 29: Actividad carnitina aciltransferasa de CrAT salvaje, CPT1A salvaje, CPT1B salvaje y sus mutantes. **A)** Actividad relativa de los enzimas ensayados por el método radiométrico. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron con 10 μ g de extractos proteicos de levadura incubados con 50 μ M acil-CoA y 1 mM carnitina durante 10 min a 30°C. **B)** Actividad relativa de los enzimas ensayados por el método fluorimétrico. Se ensayaron 10 μ g de extractos proteicos de levaduras incubados con 50 μ M acil-CoA y 1,5 mM carnitina durante 10 min a 30°C. **C)** Se muestra un Western Blot representativo de uno de los extractos mitocondriales obtenidos de la expresión de CPT1B salvaje y mutantes CPT1B-CrAT y CPT1B-COT. 30 μ g de proteína se aplicó a cada carril y la flecha indica la posición migratoria y la masa molecular de CPT1B.

10. RESIDUOS DE CPT1B RELACIONADOS CON LA SENSIBILIDAD A MALONIL-CoA

10.1 Histidinas implicadas en la sensibilidad a malonil-CoA: His²⁷⁹ y His⁴⁸³

Nos interesaba conocer los aminoácidos determinantes de la interacción del enzima con malonil-CoA. Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de comparación de secuencias entre las isoformas de las carnitina aciltransferasas sensibles a malonil-CoA e isoformas insensibles, mostraron que dos residuos de histidina estaban conservados sólo en las formas sensibles a malonil-CoA (Morillas, 2002). El estudio realizado sobre el enzima COT de rata mostró que las dos histidinas (His¹³¹ y His³⁴⁰) afectaban a la inhibición por malonil-CoA. Un doble mutante de estos residuos era totalmente insensible al malonil-CoA lo que confirmaba la importancia implícita de estas histidinas en COT (Morillas, 2000). Sin embargo, los residuos homólogos a estas histidinas en el enzima CPT1A de rata (His²⁷⁷ y His⁴⁸³) mutados a alanina no presentaron cambios en la sensibilidad del enzima a malonil-CoA ya que este inhibidor inhibía por igual al enzima salvaje que a los enzimas simples o doblemente mutados (Morillas, 2002).

En el presente estudio, nos interesaba conocer el papel de estos residuos de histidinas en el caso de CPT1B de rata y ver si este enzima se comporta de forma parecida a la forma hepática de CPT1 o al enzima COT. Mutagenizamos las dos histidinas His²⁷⁹ y His⁴⁸³ en CPT1B de rata y comprobamos la acción del malonil-CoA en el enzima mutado.

Se generaron las proteínas simples mutantes de His²⁷⁹ y His⁴⁸³ y el doble mutante His²⁷⁹-His⁴⁸³ y se expresaron en levadura. El plásmido pYES CPT1B wt fue utilizado como molde para la mutagénesis dirigida de las His²⁷⁹ y His⁴⁸³ a alanina utilizando los oligonucleótidos correspondientes a cada mutación, CPT1B H279A.for, CPT1B H279A.rev y CPT1B H483A.for, CPT1B H483A.rev. Igual que en el caso de la mutación de la histidina catalítica, se eligió la alanina por ser un residuo con cadena lateral no polar y poco voluminosa (un grupo metilo), la cual lo diferenciaba claramente de una histidina, aminoácido con una cadena lateral voluminosa y cargada positivamente. En el caso del doble mutante His²⁷⁹-His⁴⁸³, se utilizó el plásmido pYES CPT1B H279A como molde para la mutagénesis de la segunda histidina. Se obtuvieron separadamente los plásmidos sobreexpresando las proteínas mutantes CPT1B H279A, CPT1B H483A y CPT1B H279A-H483A. Se confirmó en cada caso la incorporación de la mutación deseada y la ausencia de mutaciones adicionales mediante secuenciación de los plásmidos obtenidos.

De nuevo elegimos como sistema de expresión el de la levadura *S. cerevisiae*. Tras la transformación de las células de levadura con los plásmidos, se obtuvieron fracciones enriquecidas en mitocondrias que sobreexpresan CPT1B salvaje y mutantes. En los ensayos de actividad de estas fracciones se observó una actividad específica similar entre las fracciones mitocondriales de levadura sobreexpresando CPT1B salvaje y mutantes. La actividad intrínseca de estas proteínas fueron de $16,09 \pm 1,02$, $17,45 \pm 0,68$, $16,41 \pm 1,01$ y $16,82 \pm 1,3$ $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína para CPT1B salvaje, CPT1B H279A, CPT1B H483A y CPT1B H279A-H483A, respectivamente. De hecho, los niveles de expresión eran similares en todos los casos y las proteínas tenían la misma masa molecular como se deduce del análisis por Western Blot (**Figura 30A**).

Se realizó a continuación, experimentos de inhibición de CPT1B salvaje y mutada utilizando concentraciones crecientes de malonil-CoA entre 0,02 y 10 μM . El perfil de inhibición de los simple mutantes y el del doble mutante fue idéntico al enzima sin mutar y no se observó diferencias significativas en los valores de IC_{50} calculados para los enzimas mutados comparado al enzima salvaje ($0,037 \pm 0,003$ μM) (**Figura 30B**). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos previamente por nuestro grupo en el caso de la isoforma hepática de CPT1 de rata (Morillas, 2002).

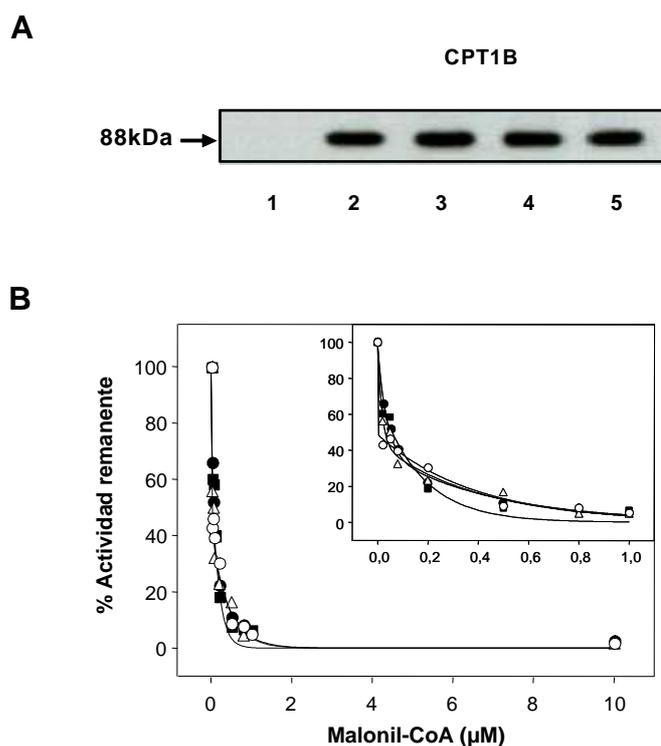


Figura 30. Análisis de Western Blot y efecto del malonil-CoA en los variantes recombinantes de CPT1B expresadas en *S. cerevisiae*. A) Se muestra un análisis representativo de Western Blot de uno de los extractos mitocondriales obtenidos de la transformación en células de levadura con el vector vacío (1), los plásmidos expresando CPT1B wt (2), CPT1B H279A (3), CPT1B H483A (4) y CPT1B H279A-H483A (5). 30 μg de proteína se separaron por gel SDS/PAGE y la flecha indica la posición migratoria y la masa molecular de CPT1B. B) Efecto de concentraciones crecientes de malonil-CoA (de 0,02 a 10 μM) en la actividad CPT1B wt (●), CPT1B H279A (■), CPT1B H483A (Δ) y el doble mutante CPT1B H279A-H483A (○). Los datos son la media relativa a los valores control en ausencia de malonil-CoA (100%). El inserto representa en detalle las curvas de inhibición de la actividad CPT1B a las concentraciones más bajas de malonil-CoA.

Dado que disponíamos de un nuevo modelo estructural 3-D de CPT1B de rata basado en las informaciones de los nuevos cristales de COT y CPT2, quisimos localizar estas dos histidinas en este modelo. La **Figura 31** muestra que ambos residuos se encuentran alejados del centro activo de CPT1B y del putativo centro de unión del inhibidor malonil-CoA. La información aportada por el modelo 3-D nos sugiere que posiblemente, estas dos histidinas no participan directamente en la actividad o unión del inhibidor, al menos de forma directa.

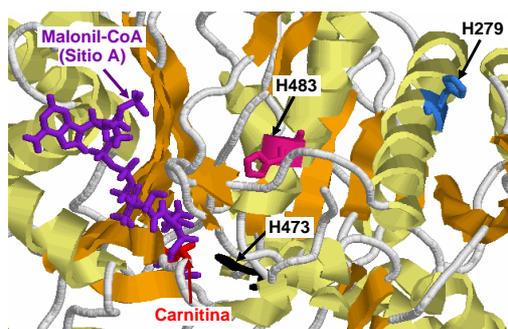


Figura 31. Localización de las histidinas putativamente implicadas en la sensibilidad del enzima CPT1B hacia malonil-CoA. Representación por cintas del modelo propuesto para el entorno catalítico de CPT1B de rata. Se representan las hojas β en color naranja y las hélices α en amarillo y también se representa el sustrato carnitina (rojo) y el inhibidor malonil-CoA (magenta) en forma de varillas. Se han localizado el residuo catalítico His⁴⁷³ (negro) y también los residuos His²⁷⁹ y His⁴⁸³.

10.2 La Met⁵⁹³ en CPT1B está implicada en la sensibilidad a malonil-CoA

Dada la importancia de la Met⁵⁹³ en la sensibilidad de la isoforma hepática de CPT1 (Morillas, 2003), esto nos condujo a iniciar una serie de experimentos para comprobar el papel de este residuo aminoacídico en la isoforma muscular de CPT1. Como se observa en la **Figura 32**, el alineamiento de secuencias de varias carnitina aciltransferasas muestra que este residuo está conservado en los enzimas sensibles a malonil-CoA (CPT1A, CPT1B y COT) y está reemplazado por una serina en los enzimas insensibles a malonil-CoA (CPT2 y CrAT). Por ello, llevamos a cabo la mutación de la metionina de CPT1B de rata, Met⁵⁹³, por una serina, su homólogo en CPT2, tal y como se había realizado anteriormente en la isoforma hepática de CPT1.

Malonil-CoA		Residuo	Alineamiento de secuencias proteicas																											
			585	F	C	L	T	Y	E	A	S	M	T	R	L	F	R	E	G	R	601									
Regulado	CPT1A rata	585	F	C	L	T	Y	E	A	S	M	T	R	L	F	R	E	G	R	601										
	CPT1A humana	585	F	C	L	T	Y	E	A	S	M	T	R	L	F	R	E	G	R	601										
	CPT1A ratón	576	F	C	L	T	Y	E	A	S	M	T	R	L	F	R	E	G	R	592										
	CPT1A cerdo	584	F	S	L	T	Y	E	A	S	M	T	R	L	F	R	E	G	R	600										
	CPT1B rata	585	F	C	L	T	Y	E	A	S	M	T	R	M	F	R	E	G	R	601										
	CPT1B humana	585	F	C	L	T	Y	E	A	S	M	T	R	M	F	R	E	G	R	601										
	CPT1B ratón	585	F	C	L	T	Y	E	A	S	M	T	R	M	F	R	E	G	R	601										
	COT rata	435	P	G	C	C	Y	E	T	A	M	T	R	Y	F	Y	H	G	R	451										
	COT humana	435	P	G	C	C	Y	E	T	A	M	T	R	H	F	Y	H	G	R	451										
	COT bovina	435	P	G	C	C	Y	E	T	A	M	T	R	L	F	Y	H	G	R	451										
No-regulado	CPT2 rata	482	T	V	A	T	Y	E	S	C	S	T	A	A	F	K	H	G	R	498										
	CPT2 humana	482	T	V	A	T	Y	E	S	C	S	T	A	A	F	K	H	G	R	498										
	CPT2 ratón	482	T	V	A	T	Y	E	S	C	S	T	A	A	F	K	H	G	R	498										
	CrAT rata	448	A	C	A	T	Y	E	S	A	S	L	R	M	F	H	L	G	R	464										
	CrAT humana	448	A	C	A	T	Y	E	S	A	S	L	R	M	F	H	L	G	R	464										
CrAT ratón	448	A	C	A	T	Y	E	S	A	S	L	R	M	F	H	L	G	R	464											

Figura 32: Alineamiento múltiple de secuencias proteicas de carnitina aciltransferasas de mamífero. Las secuencias se han obtenido del banco de datos GenBank. El alineamiento se ha realizado con el programa ClustalW y EMBOSS-Align. CPT1A: carnitina palmitoiltransferasa hepática; CPT1B: carnitina palmitoiltransferasa muscular; COT: carnitina octanoiltransferasa; CrAT: carnitina acetiltransferasa. El asterisco (*) indica la posición de la Met⁵⁹³ conservada en los enzimas regulados por malonil-CoA. Se han coloreado los aminoácidos según sus conservaciones.

El residuo de Met⁵⁹³ se localiza en el modelo estructural del dominio C-terminal de CPT1B, en el centro activo del enzima cerca del sustrato carnitina (a una distancia de 6,3 Å) y de la molécula del malonil-CoA en el sitio A (a una distancia de 1,03 Å) (**Figura 33**). Es interesante la localización en este modelo del mutante natural humano P479L (Brown, 2001) que presenta una sensibilidad a malonil-CoA disminuida mientras que la actividad CPT1 no se veía seriamente afectada (se mantiene un 21,6% de actividad residual). La Pro⁴⁷⁹ se localiza cerca del centro activo del enzima de cara hacia el canal de unión del sustrato acil-CoA, a una distancia de 5,14 Å del grupo CoA del sustrato palmitoil-CoA y del inhibidor malonil-CoA en el sitio A, y en frente de la Met⁵⁹³ a una distancia de 4 Å (**Figura 33**).

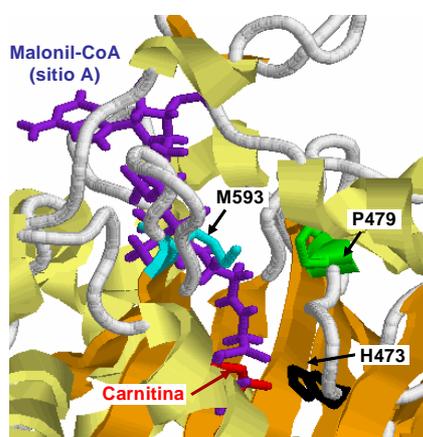


Figura 33. Representación del sitio A de unión del malonil-CoA en el modelo estructural de CPT1B de rata. Sección longitudinal de la estructura de CPT1B de rata ilustrando el centro catalítico de CPT1B y el sitio A, putativo de unión del inhibidor malonil-CoA. El inhibidor (lila) y la molécula del sustrato carnitina (rojo) están representados en forma de varillas y se indica también la posición del residuo catalítico His⁴⁷³ como punto de referencia. Se indican los residuos de Met⁵⁹³ y el mutante natural humano Pro⁴⁷⁹ cercanos uno del otro y del centro de unión del malonil-CoA en el sitio A.

10.2.1 Generación del mutante CPT1B M593S y expresión en *S. cerevisiae*

El plásmido pYES CPT1B wt fue utilizado como molde para la mutagénesis dirigida de la Met⁵⁹³ a serina por el método de PCR asimétrico utilizando los oligonucleótidos CPT1B M593S.for y CPT1B M593S.rev. Se ha obtenido así el plásmido que sobreexpresa la proteína mutada CPT1B M593S. Se confirmó la incorporación de la mutación deseada y la ausencia de mutaciones adicionales mediante secuenciación del plásmido. Tras la transformación de células de levadura *S. cerevisiae* con este plásmido

y la obtención de fracciones enriquecidas en mitocondrias, se realizó un ensayo radiométrico comparativo de actividad enzimática entre CPT1B wt y CPT1B M593S.

La mutación de la metionina a serina no produjo un cambio significativo en la actividad enzimática respecto al enzima salvaje (**Figura 34A**). El análisis por Western Blot de CPT1B wt y CPT1B M593S indica que las proteínas se expresan con el tamaño esperado y con niveles similares de expresión (**Figura 34B**).

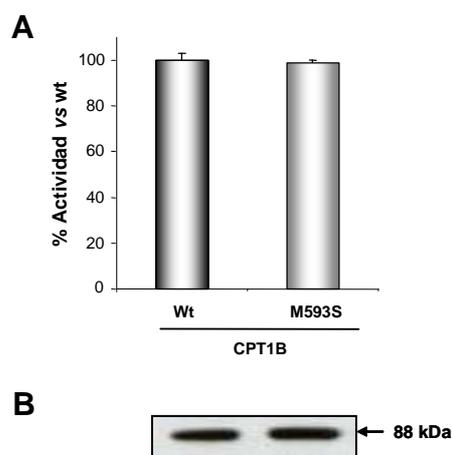


Figura 34: Actividad de las formas transformadas de CPT1B y su inmunodetección. A) Actividad relativa de CPT1B wt y CPT1B M593S sobreexpresadas en levadura. Las actividades se han representado tomando como referencia la actividad del enzima salvaje correspondiente. Los ensayos de actividad enzimática se realizaron con 6 μ g de extractos proteicos de levaduras. B) Análisis representativo de Western Blot de uno de los extractos mitocondriales obtenidos de la expresión de CPT1B salvaje y mutante CPT1B M593S. 30 μ g de proteína se aplicó a cada carril y la flecha indica la posición migratoria y la masa molecular de CPT1B.

10.2.2 Inhibición por malonil-CoA del enzima mutado en Met⁵⁹³

Se analizó la sensibilidad a malonil-CoA del mutante CPT1B M593S y los resultados de inhibición se compararon con los del enzima sin mutar. En la **Figura 35** se observa que el mutante CPT1B M593S presenta una sensibilidad a malonil-CoA muy alterada. De hecho, este mutante se inhibe con dificultad comparado con la proteína salvaje en el rango de concentraciones de inhibidor ensayado (0,02 - 1 μ M), siendo la actividad residual a 1 μ M de concentración de malonil-CoA del orden del 40%. Para valores superiores a 10 μ M, la curva de inhibición del mutante M593S se solapa con la del enzima salvaje. La IC₅₀ de la proteína mutada es de 0,710 \pm 0,210 μ M. Comparando

con la IC_{50} de $0,030 \pm 0,001 \mu\text{M}$ de la proteína salvaje, hay un incremento de 23,6 veces. Estos resultados confirman que este residuo está implicado en la inhibición por malonil-CoA en CPT1B wt de rata, igual que lo estaba en la isoforma hepática de CPT1 (Morillas, 2003).

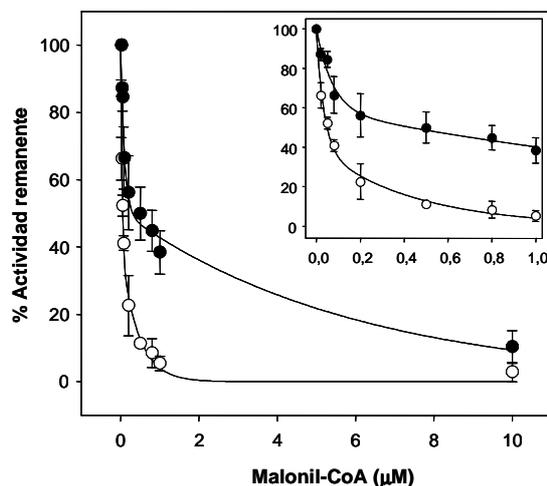


Figura 35. Efecto del malonil-CoA en la actividad del enzima CPT1B salvaje y mutante M593S. 6 μg de extractos de levadura que expresaban CPT1B salvaje (\circ) o el mutante M593S (\bullet) se ensayaron para la actividad CPT1B en presencia de cantidades crecientes de malonil-CoA (0,02 - 10 μM). Los datos son la media relativa a los valores control en ausencia de malonil-CoA (100%) de tres curvas obtenidas a partir de diferentes extractos proteicos. El inserto representa en detalle la curva de inhibición de la actividad CPT1B a concentraciones bajas de malonil-CoA.

10.2.3 Análisis cinético del mutante CPT1B M593S

Para caracterizar mejor el mutante CPT1B M593S, se llevaron a cabo una serie de experimentos cinéticos que permitieron calcular sus constantes cinéticas. El mutante CPT1B M593S muestra una cinética estándar de saturación hiperbólica tipo Michaelis-Menten igual al que presenta el enzima salvaje para ambos sustratos (**Figura 36**).

La mutación M593S provoca un ligero cambio en los valores aparentes de K_m y V_{max} de ambos sustratos. Los valores de $K_{m_{app}}$ para el sustrato carnitina variaban de 667,1 μM (CPT1B wt) a 617,4 μM (mutante M593S). Esta mutación no afecta la actividad enzimática y afecta ligeramente, aunque de forma no significativa, la afinidad del enzima para el sustrato palmitoil-CoA, $K_{m_{app}}$ de 21,6 μM y 25,2 μM para el mutante y el wt respectivamente (**Tabla 6**).

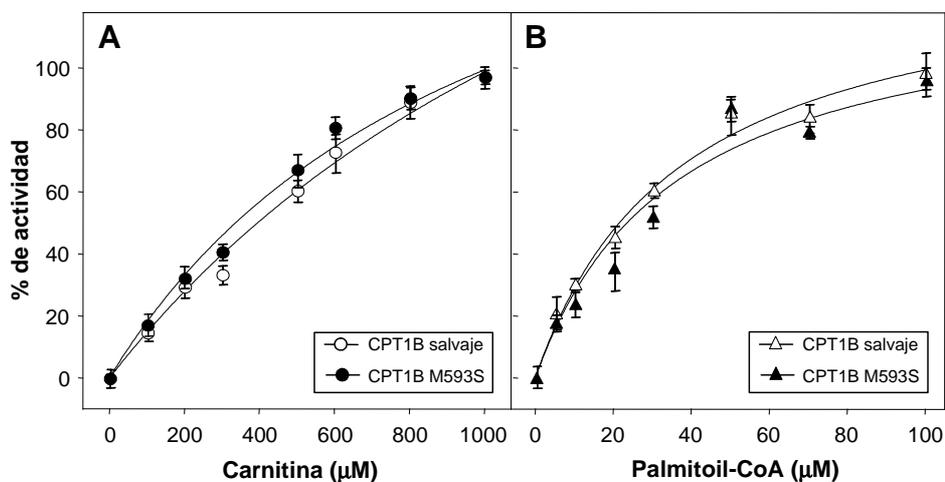


Figura 36: Análisis cinéticos de las proteínas expresadas de CPT1B wt y mutante CPT1B M593S. Mitocondrias aisladas de levaduras (6 µg de proteína) que expresaban CPT1B salvaje (○, Δ) o mutante CPT1B M593S (●, ▲) fueron ensayados radiométricamente para la actividad CPT1B, bien en presencia de concentración fija de palmitoil-CoA (135 µM) y concentraciones crecientes de carnitina (A) o bien, en presencia de concentración fija de carnitina (1 mM) y concentraciones crecientes de palmitoil-CoA (B). Los resultados se presentan como la media (medias ± D.E.) de tres experimentos independientes.

CPT1B	Actividad (nmol/min.mg)	Km_{app} (µM)		$Vmax_{app}$ (nmol/min.mg)	
		Carnitina	Palmitoil-CoA	Carnitina	Palmitoil-CoA
Salvaje	40,7 ± 5,8	667,1 ± 29,0	25,2 ± 2,0	11,1 ± 0,8	49,7 ± 3,6
M593S	39,6 ± 3,8	617,4 ± 99,5	21,6 ± 2,8	11,8 ± 4,3	38,2 ± 3,4

Tabla 6. Actividad y parámetros cinéticos de los enzimas CPT1B salvaje y mutada expresadas en levadura. 6 µg de fracciones mitocondriales de levadura expresando CPT1B salvaje o con la mutación de metionina se ensayaron radiométricamente para medir la actividad enzimática y los parámetros cinéticos. Los resultados se expresan como las medias ± D.E. de tres experimentos independientes con diferentes preparaciones proteicas.

ACCIÓN DEL C75 Y CERULENINA SOBRE CPT1A Y CPT1B

11. C75 NO AFECTA LA ACTIVIDAD DE NINGUNA DE LAS DOS ISOFORMAS DE CPT1

En la búsqueda de compuestos farmacológicos inhibidores del apetito, C75 ha adquirido un papel relevante en los últimos años. Este compuesto es un derivado de cerulenina, compuesto natural inhibidor de la actividad de la ácido graso sintasa (FAS) (Thupari, 2001). C75 (4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofurano-3-ácido carboxílico) es un inhibidor sintético y estable de FAS y se ha descrito que puede actuar a nivel del sistema nervioso central reduciendo la ingesta y a nivel periférico estimulando la actividad CPT1 y la oxidación de palmitato, conduciendo a una rápida y profunda pérdida de peso debido a la reducción de la masa grasa en ratones (Thupari, 2002; Yang, 2005). Cuando C75 inhibe FAS, se incrementan los niveles de malonil-CoA, uno de los sustratos del enzima. Esta subida en los niveles de malonil-CoA debería inhibir la actividad CPT1, pero paradójicamente se ha descrito lo contrario, es decir, activación de CPT1 en tejidos periféricos como hígado y tejido adiposo.

Debido a la importancia del hígado y del músculo en el metabolismo energético y en la oxidación de ácidos grasos, hemos querido estudiar el efecto del C75 en la actividad de ambas isoformas de CPT1. Para ello, se incubaron las fracciones mitocondriales de levadura sobreexpresando CPT1A y CPT1B de rata con concentraciones crecientes de C75 tal como se ha descrito en el apartado **Métodos, sección 5.1.1**. La **Figura 37** muestra que C75 no tiene ningún efecto activador sobre CPT1A o CPT1B expresadas en levadura en el rango de concentraciones estudiadas.

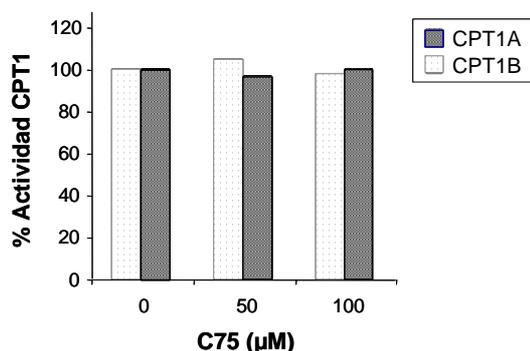


Figura 37: Análisis de las actividades CPT1A y CPT1B salvajes en presencia de concentraciones crecientes de C75. Fracciones enriquecidas en mitocondrias aisladas de levadura (6 μg de proteína) sobreexpresando CPT1A salvaje (■) o CPT1B salvaje (▨) fueron ensayadas separadamente para la actividad enzimática. Previo al ensayo, se preincubaron las proteínas durante 5 min con C75.

12. SÍNTESIS DE C75-CoA A PARTIR DE C75

12.1 C75 es sustrato del enzima acil-CoA sintetasa

Muchos fármacos son solo activos tras ser metabolizados en el organismo. Una de estas transformaciones es la que llevan a cabo las acil-CoA sintetasas que utilizan como sustratos diversos xenobióticos transformándolos a derivado de CoA. Así, el inhibidor irreversible de CPT1, etomoxir, necesita ser transformado a etomoxir-CoA (Weis, 1994) para ser activo. Por este motivo se partió de la hipótesis de que C75 podía ser metabolizado a C75-CoA y una vez convertido en su derivado CoA, podía tener un mayor efecto sobre la actividad CPT1.

Para ello se activó *in vitro* C75 a C75-CoA y como control de activación etomoxir a etomoxir-CoA, incubándolos separadamente con coenzima A, ATP y la acil-CoA sintetasa de *Pseudomonas sp* (ver **Métodos, sección 6.1**). Para confirmar si C75 había reaccionado con el coenzima A para dar lugar a C75-CoA, se realizó un análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF en el modo negativo y positivo (ver **Métodos, sección 7.1**). Este estudio confirmó la presencia de un compuesto del tamaño esperado para el producto C75-CoA (**Figura 38A**, pico de 1020,4 Da), indicando así, que C75 es sustrato del enzima acil-CoA sintetasa. El mismo análisis se llevó a cabo con etomoxir como control (**Figura 38B**, pico de 1064,0 Da). El resto de los picos observados en el espectro corresponden a la matriz usada en el análisis, al CoA-SH en exceso o a productos que provienen de su fragmentación.

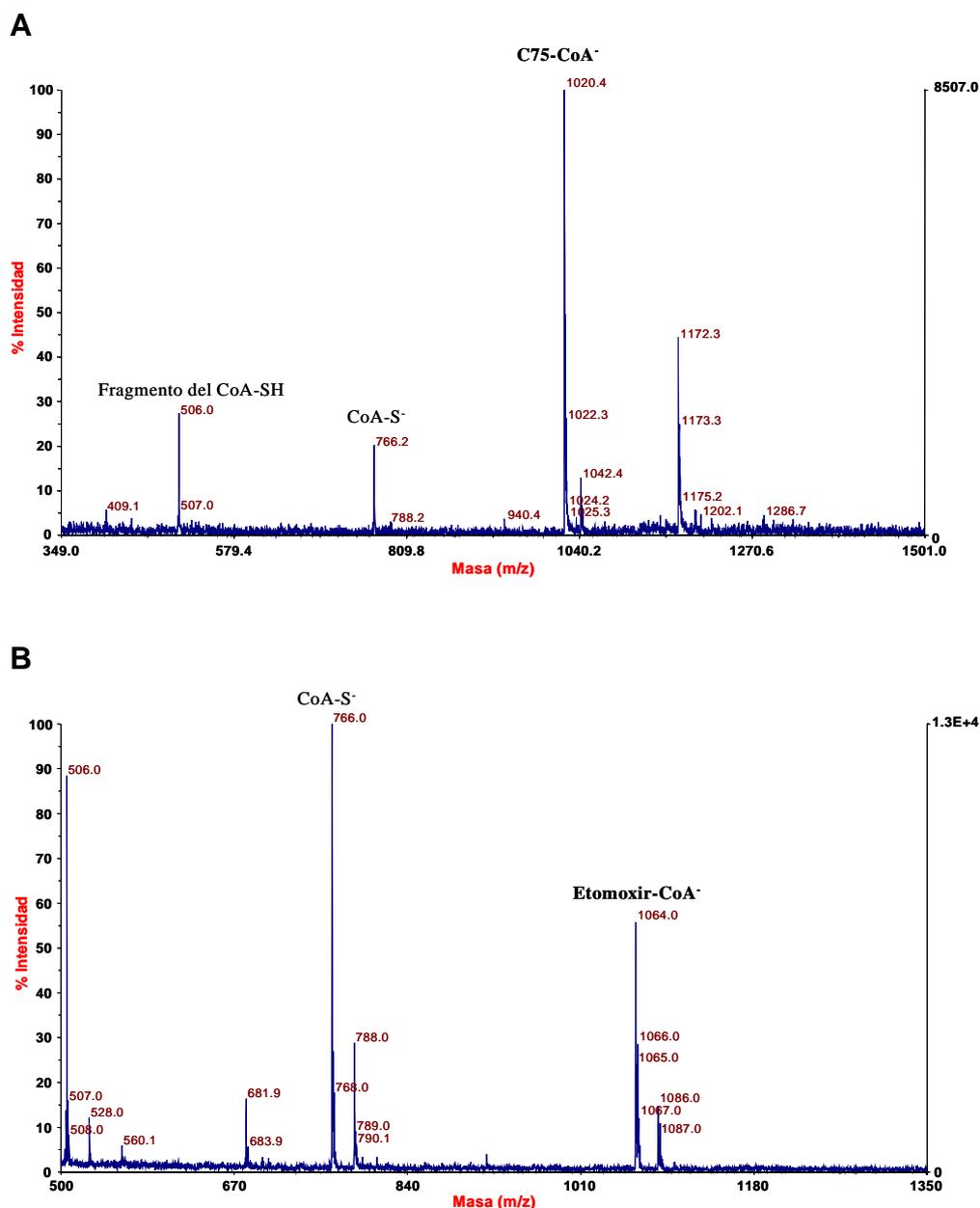


Figura 38. Espectro de MALDI-TOF del C75-CoA y etomoxir-CoA. Los espectros se obtuvieron directamente a partir de la mezcla de la reacción de activación del C75-CoA o etomoxir-CoA usando un sistema Voyager-DE-RP de Applied Biosystems con DHB (10 mg/ml en agua:metanol 1:1) tal y como se ha descrito en el apartado **Métodos, sección 7.1**. La detección se llevó a cabo en modo negativo. **A)** Se señala el producto C75-CoA que corresponde al pico de 1020,4 Da. **B)** El producto etomoxir-CoA corresponde al pico de 1064,0 Da.

El tamaño molecular del producto C75-CoA confirmó que la formación del tioéster con el CoA-SH era posible bien, abriendo el anillo de furano o bien, uniéndose al grupo metileno (CH₂) y no a través del grupo carboxílico que hubiera comportado la pérdida de una molécula de agua. La **Figura 39** muestra las dos posibles estructuras químicas del C75-CoA que corresponden a la masa molecular obtenida por MALDI-TOF. No podemos confirmar con certeza cual de estas dos formas se produce durante la síntesis del C75-CoA, aunque el entorno nucleofílico de la molécula, sugiere que la forma cerrada sea la más probable.

En cuanto al producto etomoxir-CoA, su tamaño molecular confirmó que el enlace con CoA-SH se produce por apertura del epóxido y no a través del grupo carboxílico, que hubiera comportado la pérdida de una molécula de agua y por lo tanto otra masa molecular. La **Figura 39** muestra la estructura del etomoxir-CoA que corresponde a la masa molecular obtenida por MALDI-TOF. También, se representa en esta figura la molécula de cerulenina y malonil-CoA.

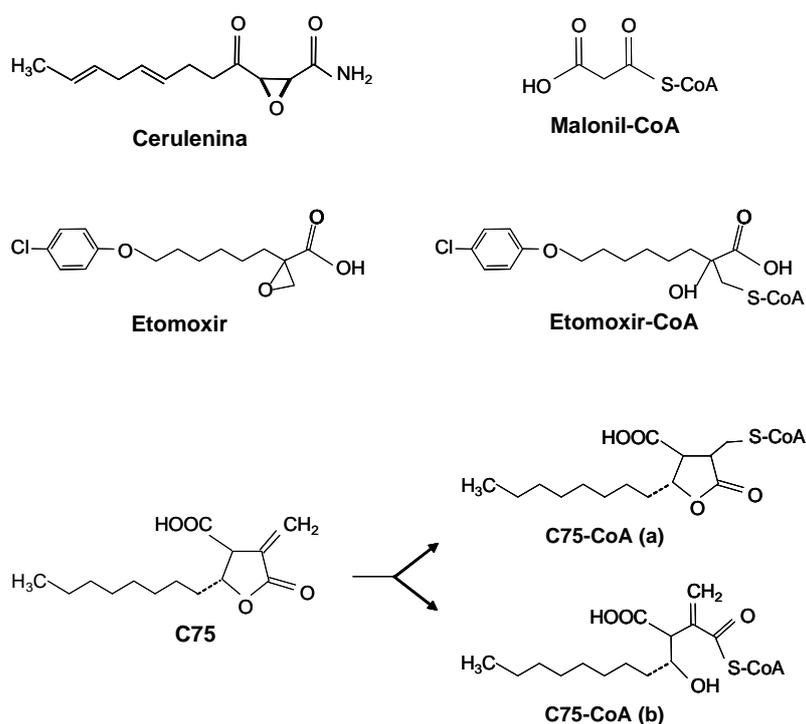


Figura 39. Estructuras químicas propuestas para diferentes compuestos. Se muestran las estructuras químicas del inhibidor fisiológico de CPT1, malonil-CoA y las de cerulenina, etomoxir y C75. También se han dibujado las posibles estructuras para los derivados CoA, C75-CoA y etomoxir-CoA de acuerdo con las masas moleculares obtenidas por MALDI-TOF para estos compuestos.

12.2 Las mitocondrias de hígado y de músculo de rata transforman cuantitativamente C75 en C75-CoA

Con el objetivo de comprobar que C75-CoA se produce *ex vivo*, incubamos C75 con fracciones mitocondriales frescas obtenidas de músculo o de hígado de rata en presencia de CoA-SH. La producción del C75-CoA se analizó posteriormente por el método de HPLC-MS/MS (ver Métodos, sección 7.2 y 7.3.3).

Previo a este estudio, se realizó en primer lugar un análisis de detección de aciles-CoA por la técnica de HPLC-MS/MS. Para confirmar y comprobar que el sistema de detección de aciles-CoA con este método funciona, hemos inyectado en el HPLC-MS/MS un patrón de aciles-CoA de tamaños conocidos y de concentración de 10 ppm cada uno; C₆-CoA, C₈-CoA, C₁₀-CoA y C₁₆-CoA. Como muestra la **Figura 40A**, se pudo detectar la salida por tiempo de retención en la columna C₁₈ de cada acil-CoA basándonos en la masa molecular de cada uno.

A continuación tomamos como muestra control o estándar la activación del C75 a C75-CoA y chequeamos la detección de este estándar, inyectándolo directamente en el HPLC-MS/MS y apoyándonos en los resultados del análisis previo por MALDI-TOF. Con estas condiciones cromatográficas óptimas, se obtuvo el espectro del estándar C75-CoA en los experimentos en modo *full scan* (barrido completo, MS) y los experimentos en tándem (MS/MS). El tiempo de retención del C75-CoA fue de 13,94 min (**Figura 40B**). El análisis con el barrido completo y en modo positivo de este estándar dio un ion $[M + H]^+$ a m/z 1022,5, correspondiente a la molécula protonada del C75-CoA. Este resultado confirma lo obtenido por el análisis de MALDI-TOF, en el cual no se produce una pérdida de una molécula de agua al formar el éster C75-CoA.

La inyección del ion $[M + H]^+$, m/z 1022,5, en el modo *ion scan* muestra la siguiente composición de iones: una fragmentación de ion a m/z 515,6 que se asigna al grupo pantoténico del C75 y un ion a m/z 428,1 que corresponde al ion adenosino 3'-difosfato (**Figura 40C**).

Finalmente, la producción del derivado CoA estable en las muestras de mitocondrias frescas aisladas de músculo o de hígado de rata incubadas con C75, se analizó por HPLC-MS/MS. Para chequear la formación del C75-CoA, se inyectó el estándar C75-CoA en el modo MRM (*multiple reaction monitoring*) monitorizando la transición 1022,5/515,6 para ofrecer una máxima sensibilidad. Como resultado de este análisis, se confirmó la formación del C75-CoA en dichas muestras. El tiempo de retención del

C75-CoA fue de 13,78 min (**Figura 40D**) y de 14,10 min (**Figura 40E**) en las muestras mitocondriales de hígado y de músculo de rata respectivamente. Ambos tiempos de retención de C75-CoA se corresponden con el estándar inyectado sólo en el HPLC-MS/MS.

Estos resultados sugieren fuertemente que el derivado CoA del C75 puede producirse en mitocondrias frescas aisladas de tejidos. La activación de C75 a C75-CoA está probablemente mediada por la acción de la actividad de las enzimas de cadena media- o cadena larga-acil-CoA sintetetas, presentes en la cara citoplásmica de la membrana mitocondrial externa y que están implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos y xenobióticos (Knights, 2000).

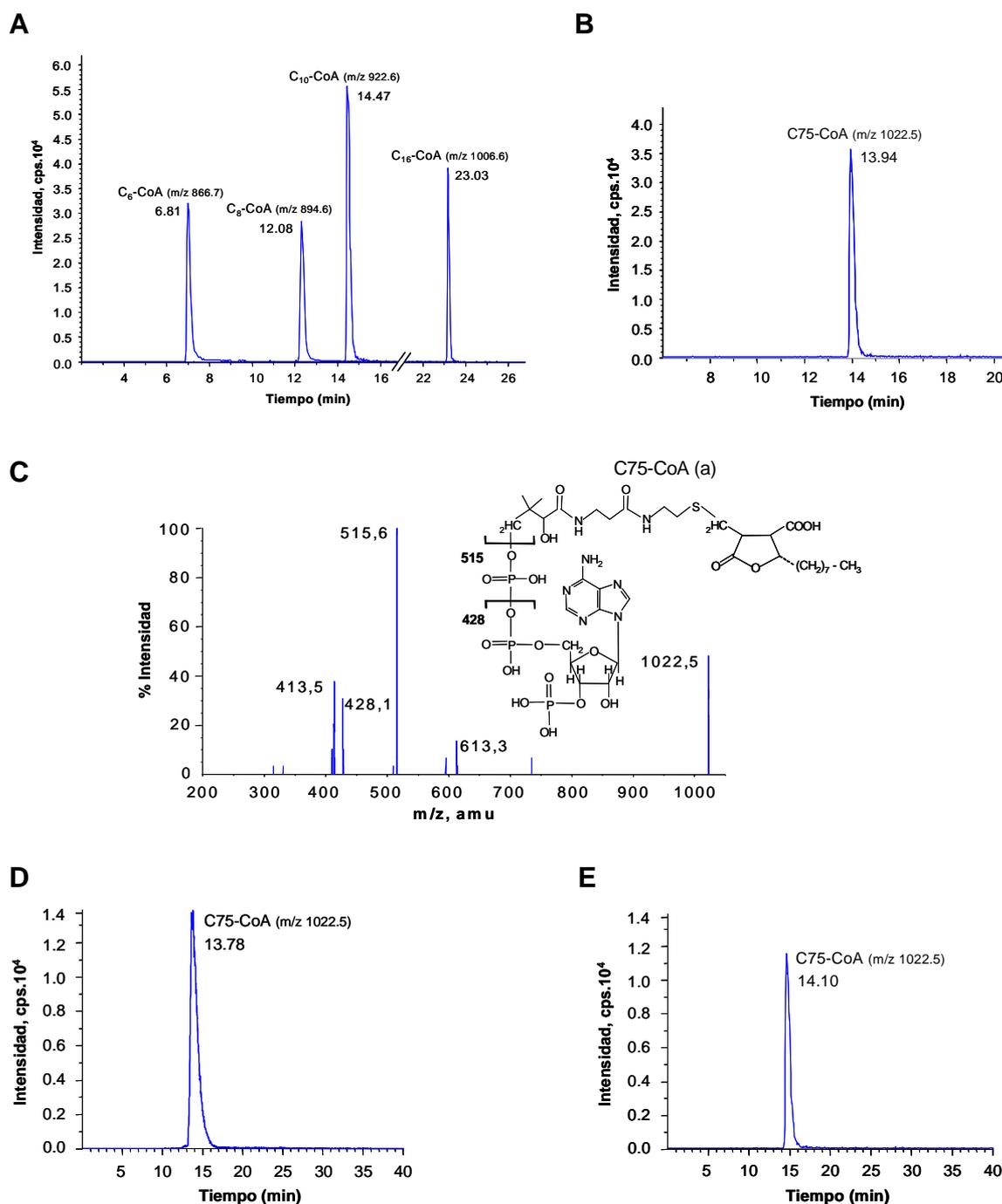


Figura 40. Análisis por HPLC-MS/MS de C75-CoA formado en mitocondrias de músculo e hígado de rata. **A)** Espectro del tiempo de retención de los aciles-CoA de tamaño y concentración conocidos utilizados como control de detección. **B)** El espectro se obtuvo a partir de la inyección directa del estándar C75-CoA. **C)** Espectro del estándar C75-CoA en el experimento en tándem (MS/MS) y en el modo de ionización positivo. El mayor ion de fragmentación a m/z 515,6 corresponde al grupo pantoténico de C75 y el ion a m/z 428,1 corresponde al ion adenosino 3'-difosfato. **D)** MRM de transición 1022,5/515,6 del C75-CoA en el sobrenadante de las muestras mitocondriales frescas de músculo de rata incubadas con 0,5 μ mol de C75. **E)** MRM de transición 1022,5/515,6 de C75-CoA en el sobrenadante de las muestras mitocondriales frescas de hígado de rata incubadas con 0,5 μ mol de C75.

13. C75-CoA INHIBE LAS DOS ISOFORMAS DE CPT1

Debido al importante papel que juega el músculo en el metabolismo energético y en la oxidación de ácidos grasos, hemos querido estudiar el efecto del C75-CoA en la actividad de ambas isoformas de CPT1, *in vitro* e *in vivo*. Este análisis se llevó a cabo en mitocondrias de levadura sobreexpresando CPT1A o CPT1B, en mitocondrias obtenidas de las líneas celulares: células β del páncreas de rata (INS(823/13)) y línea celular de músculo esquelético de rata (L6E9) y también en mitocondrias aisladas de distintos tejidos murinos.

13.1 C75-CoA muestra características de un inhibidor de unión lenta a CPT1A

Para estudiar el efecto del C75-CoA sobre la actividad CPT1 hemos preincubado a diferentes tiempos una concentración fija de C75-CoA (50 μ M), de enzima CPT1A sobreexpresada en levadura (5 μ g) y los sustratos carnitina (400 μ M) y palmitoil-CoA (50 μ M). En las condiciones del ensayo para la actividad CPT1A, el enzima y el inhibidor se preincubaron durante varios tiempos (0,5, 1, 3 y 5 min) a 30°C antes del inicio de la reacción enzimática con la adición de la mezcla de reacción.

En la **Figura 41** se observa que en ausencia de C75-CoA el enzima CPT1A se inactiva siguiendo una cinética monofásica, una simple caída exponencial con un valor aparente de la constante de inactivación $kinact = 0,067 \text{ min}^{-1}$. En presencia de C75-CoA, la cinética de inactivación es bifásica (doble caída exponencial), es decir que hay una inactivación inicial muy rápida ($kinact$ del orden de 3,5-4 min^{-1}) seguida de una etapa más lenta con una $kinact$ inferior en 2 órdenes de magnitud. Solo se observó una fuerte disminución de la actividad del enzima CPT1A, hasta el 90% después de 5 min de incubación con el inhibidor. Lo cual es consecuente con una cinética de unión lenta del inhibidor al enzima.

Los inhibidores de unión lenta (*slow-binding inhibitors*) han sido definidos como compuestos en los cuales ocurre un equilibrio entre enzima, inhibidor y el complejo inhibidor-enzima, en una escala de segundos a minutos (Morrison, 1988). Como ejemplos de inhibidores de unión lenta cabe destacar algún fármaco importante, como el metotrexato (Stone, 1986), el allopurinol (Hille, 1981) y la forma activada del aciclovir (Reardon, 1989).

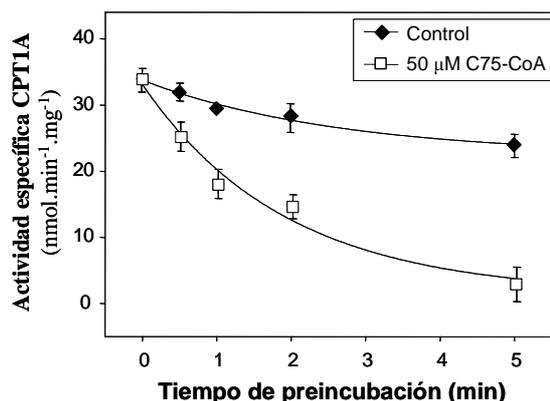


Figura 41. Caracterización de la unión del C75-CoA a CPT1A. 6 μg de extractos mitocondriales de levadura que expresan CPT1A salvaje fueron preincubados a 30°C durante diferentes tiempos y ensayados a continuación para la actividad CPT1A, bien en presencia de una concentración fija de 50 μM de C75-CoA (\square) o en ausencia de inhibidor (\blacklozenge). Se representa la actividad enzimática en cada caso como la media relativa de dos curvas obtenidas a partir de diferentes extractos proteicos.

13.2 Efecto del C75-CoA sobre la actividad CPT1A y CPT1B salvaje y el mutante CPT1A M593S

Se realizaron a continuación ensayos de actividad CPT1 en presencia de concentraciones crecientes de C75-CoA o de etomoxir-CoA, como control de inhibición. Los extractos mitocondriales de levadura sobreexpresando CPT1A o bien CPT1B (3-4 μg de proteína) fueron preincubados durante 5 min con los dos inhibidores separadamente y se ensayó la actividad CPT1 durante 4 min. La **Figura 42** muestra que ambos derivados CoA sintetizados inhiben fuertemente la actividad CPT1A y CPT1B con unas cinéticas similares. A 50 μM de C75-CoA la actividad CPT1 fue prácticamente inhibida por completo. Los valores de IC_{50} para C75-CoA fueron de 0,24 y 0,36 μM para CPT1A y CPT1B respectivamente, mientras que los valores de IC_{50} para etomoxir-CoA fueron de 4,06 y 3,10 μM para CPT1A y CPT1B respectivamente (**Tabla 7**).

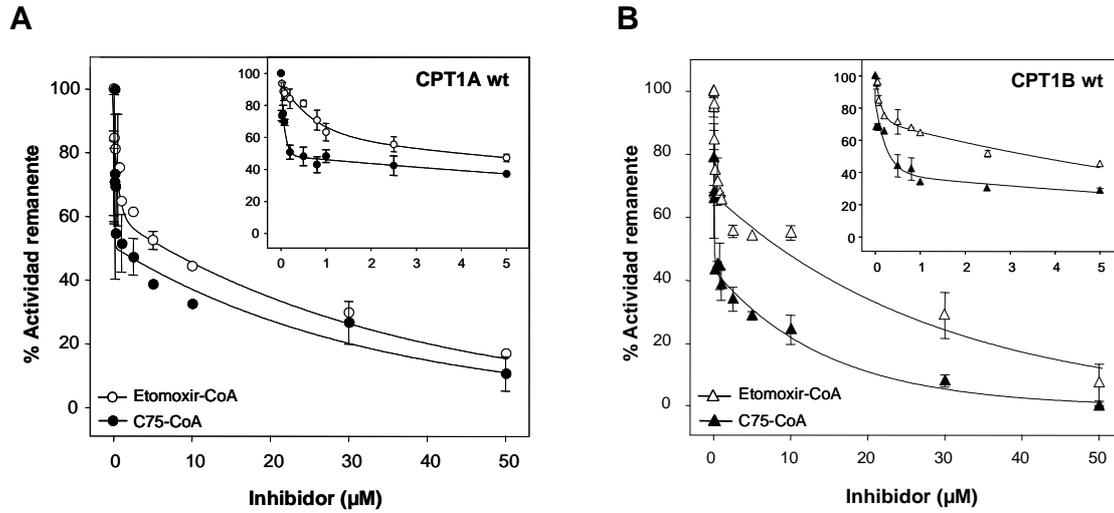


Figura 42. Efecto del C75-CoA y etomoxir-CoA en la actividad de las isoformas hepáticas y muscular de CPT1 sobreexpresadas en levadura. A) Perfil de inhibición de fracciones mitocondriales expresando CPT1A salvaje. 4 μg de extractos mitocondriales de levadura fueron preincubadas durante 5 min con concentraciones crecientes de etomoxir-CoA (\circ) o C75-CoA (\bullet). **B)** Estudio de la inhibición de la actividad de la isoforma muscular de CPT1 (3 μg de proteína) en presencia de concentraciones crecientes de ambos derivados CoA, etomoxir-CoA (Δ) y C75-CoA (\blacktriangle) preincubados con el enzima 5 min antes del ensayo de actividad. Los datos están representados en porcentaje relativos a los valores del control en ausencia de inhibidor (100%) y son la media de tres experimentos independientes. El inserto en ambos casos representa en detalle la inhibición de la actividad CPT1 a bajas concentraciones de inhibidores.

	IC ₅₀ (μM)	
	C75-CoA	Etomoxir-CoA
CPT1A sobreexpresada en <i>S. cerevisiae</i>	0,24 \pm 0,01	4,06 \pm 0,78
CPT1B sobreexpresada en <i>S. cerevisiae</i>	0,36 \pm 0,18	3,10 \pm 0,06

Tabla 7: Valores de IC₅₀ para C75-CoA y etomoxir-CoA sobre la actividad CPT1. Fracciones mitocondriales obtenidas de levadura expresando CPT1A o CPT1B de rata (3-4 μg de proteína) se ensayaron para la actividad CPT1 en presencia de concentraciones crecientes de C75-CoA o etomoxir-CoA y se determinó en cada caso el valor de IC₅₀. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. de tres experimentos independientes con diferentes preparaciones proteicas.

Estos resultados indican que el derivado CoA, C75-CoA, se comporta como un inhibidor de la actividad de ambas isoformas de CPT1 sobreexpresadas en levadura, inhibiéndolas con valores de IC_{50} mucho más bajos a los del etomoxir-CoA (**Tabla 7**).

A continuación, se realizaron ensayos de actividad del mutante de CPT1A M593S en presencia de concentraciones crecientes de C75-CoA o bien de etomoxir-CoA y malonil-CoA como controles de inhibición. Los extractos mitocondriales de levadura (6 μ g de proteína) sobreexpresando el mutante CPT1A M593S insensible a malonil-CoA (Morillas, 2003), fueron preincubados durante 5 min con los tres inhibidores por separado y se ensayó la actividad CPT1A durante 4 min. La **Figura 43A** muestra el perfil de inhibición de los tres inhibidores sobre la actividad CPT1A salvaje y la **Figura 43B** muestra el perfil de inhibición del mutante CPT1A M593S. Se puede observar que el grado de inhibición de la actividad CPT1A salvaje y mutante es el siguiente, inhibición por malonil-CoA < inhibición por etomoxir-CoA < inhibición por C75-CoA. El valor de IC_{50} para la inhibición por malonil-CoA fue de 7,3 μ M y > 300 μ M para CPT1A salvaje y mutante, respectivamente.

En cuanto a los derivados CoA sintetizados, además de evaluar el valor de IC_{50} , también se determinó el valor de la constante de inhibición ($K_{i,app}$) y el de la constante de inactivación del enzima ($k_{inact,app}$) para CPT1A salvaje y mutante CPT1A M593S, utilizando el análisis de regresión por el método no lineal basado en el método descrito por Kitz-Wilson (Kitz, 1962; Maurer, 2000). Se trata de una representación de la actividad enzimática ($|\ln(E/E_0)|/t$) frente a $[I]$ (**Métodos, sección 5.1.1**). Se muestra en la **Figura 43C** y **43D** el grado de inactivación de ambas enzimas estudiadas en presencia de 50 μ M palmitoil-CoA y 400 μ M carnitina. La **Tabla 8** resume los valores de las constantes de inhibición en cada caso.

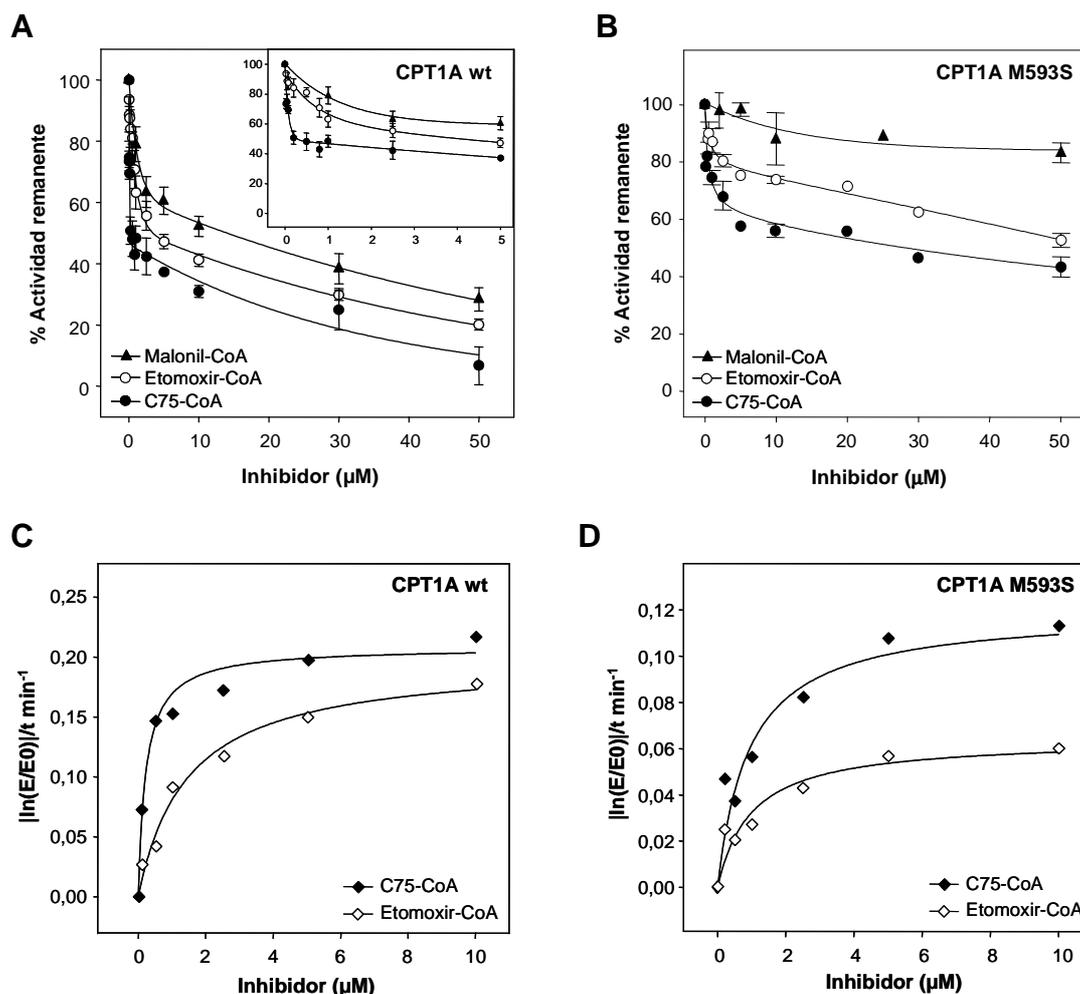


Figura 43. Efecto del malonil-CoA, etomoxir-CoA y C75-CoA en la actividad CPT1A salvaje y mutante M593S sobreexpresados en levadura. A) y B) Perfil de inhibición de fracciones mitocondriales expresando CPT1A salvaje y mutante CPT1A M593S respectivamente. 6 μg de extractos mitocondriales de levadura fueron ensayados separadamente para la actividad CPT1A, tras la preincubación de 5 min con concentraciones crecientes de malonil-CoA (\blacktriangle), etomoxir-CoA (\circ) o C75-CoA (\bullet). El inserto representa en detalle la inhibición de la actividad CPT1A salvaje a bajas concentraciones de inhibidores. Los datos están representados en porcentaje relativos a los valores del control en ausencia de inhibidor (100%) y son la media de tres experimentos independientes. C) y D) Representación del grado de pérdida de actividad del enzima CPT1A salvaje y mutante CPT1A M593S versus concentraciones crecientes del inhibidor C75-CoA (\blacklozenge) o etomoxir-CoA (\diamond). Usando el modelo no lineal basado en el método propuesto por Kitz-Wilson, se representa la línea de regresión no lineal que mejor se adapta a los datos de inhibición usando el programa SigmaPlot 8.0. Se muestran en cada caso el resultado de un ensayo representativo de tres experimentos independientes a partir de extractos proteicos de diferentes expresiones de CPT1A salvaje o mutante en levadura.

CPT1A	C75-CoA			Etomoxir-CoA		
	IC ₅₀ (μ M)	K _i _{app} (μ M)	kinact _{app} (min ⁻¹)	IC ₅₀ (μ M)	K _i _{app} (μ M)	kinact _{app} (min ⁻¹)
Salvaje	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,09	0,20 ± 0,01	4,06 ± 0,78	1,45 ± 0,33	0,19 ± 0,01
M593S	25,86 ± 0,93	1,84 ± 0,61	0,14 ± 0,01	168,19 ± 10,15	5,76 ± 2,77	0,11 ± 0,01

Tabla 8: Parámetros cinéticos de inhibición de la actividad CPT1A salvaje y mutante M593S expresados en *S. cerevisiae*. 6 μ g de extractos mitocondriales de levadura obtenidos tras la sobreexpresión de CPT1A en levadura fueron ensayados en presencia de concentraciones crecientes de etomoxir-CoA o C75-CoA. Los resultados se expresan como la media \pm D. E. de tres experimentos independientes con diferentes preparaciones proteicas.

Estos resultados indican que C75-CoA y etomoxir-CoA son menos efectivos en el enzima mutado M593S comparado con el enzima salvaje. Se observa que C75-CoA también inhibe en parte la actividad del enzima mutante CPT1A M593S insensible a la inhibición por malonil-CoA y que esta inhibición es mayor que la del etomoxir-CoA.

13.3 El efecto inhibitor del C75-CoA sobre CPT1A no se ve afectado por la presencia de C75

Se realizaron una serie de experimentos de caracterización cinética del efecto del C75 versus C75-CoA, con el objetivo de exponer claramente si C75 afecta la capacidad inhibitor del ester CoA ya que se ha descrito en la literatura una acción activadora del C75 sobre CPT1.

Por ello, se realizaron experimentos cinéticos de inhibición en los cuales se preincubaron fracciones mitocondriales de levadura sobreexpresando CPT1A salvaje durante 5 min a 30°C con concentraciones crecientes de C75-CoA (5-50 μ M) y una concentración fija de C75 (100 μ M) y por otro lado, con concentraciones crecientes de C75 (5-100 μ M). Se compararon las actividades enzimáticas en cada caso con el control (actividad en presencia de DMSO). Los resultados de la **Figura 44A** claramente muestran que C75 no es ni activador ni inhibidor de CPT1A en las concentraciones ensayadas (como ya habíamos visto anteriormente en la **Figura 36**). Además, el perfil de inhibición de la actividad CPT1A salvaje producida por concentraciones crecientes hasta 50 μ M de C75-CoA no se revierte incluso en presencia de una cantidad fija y alta de 100 μ M de C75. C75 no es capaz de vencer la inhibición producida por C75-CoA

(Figura 44B). De hecho, las pequeñas diferencias que podrían ser observadas en la acción inhibitoria de C75-CoA causada por C75 no son estadísticamente significativas.

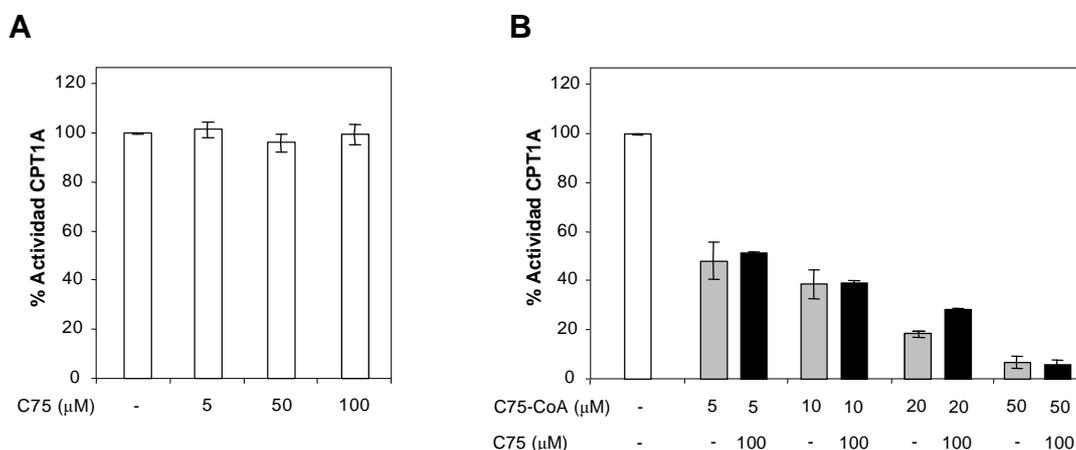


Figura 44. CPT1A salvaje sobreexpresada en levadura es inhibida por C75-CoA en presencia de C75. A) 8 μg de fracciones mitocondriales de levadura sobreexpresando CPT1A salvaje fueron preincubadas durante 5 min con concentraciones crecientes de C75 y la actividad CPT1A fue medida por ensayo radiométrico. B) Comparación de actividad CPT1A salvaje en presencia de concentraciones crecientes de C75-CoA (barras grises) con la actividad CPT1A salvaje en presencia de C75-CoA y 100 μM C75 (barras negras). Los datos están representados en porcentaje relativos a los valores del control en presencia de DMSO (100%) y ausencia de C75 o C75-CoA (barra blanca). Se presenta la media de tres experimentos independientes.

13.4 La interacción entre C75-CoA y CPT1 es reversible

Con el objetivo de comprobar que la unión del C75-CoA a CPT1 es estable, se realizó el siguiente ensayo de actividad enzimática con fracciones enriquecidas en mitocondrias de levadura sobreexpresando CPT1A salvaje. Se preincubaron estas fracciones mitocondriales (3 μg de proteína) durante 5 min a 30°C con 50 μM C75-CoA, etomoxir-CoA o malonil-CoA o bien con el tampón del ensayo CPT1 como control. Después de la preincubación, se estudió el efecto del lavado de las mitocondrias. Se ensayaron los extractos directamente (muestra sin lavar) o bien se centrifugó y se resuspendió la fracción mitocondrial en el tampón del ensayo de actividad CPT1A (muestra lavada) y ensayadas a continuación para la actividad CPT1A por el método radiométrico (ver apartado Métodos, sección 5.1.2).

Como se muestra en la **Figura 45A**, se perdió la inhibición producida por malonil-CoA cuando se lavaron los extractos mitocondriales. La recuperación de la actividad CPT1A con respecto al control lavado fue del 91%. Sin embargo, ambos inhibidores C75-CoA y etomoxir-CoA produjeron una inhibición persistente, del orden del 75% y 79% respectivamente, con respecto a las fracciones lavadas control. Este experimento demuestra que C75-CoA y etomoxir-CoA se unen fuertemente a CPT1A.

Se realizó también un experimento de diálisis con fracciones mitocondriales de levadura sobreexpresando CPT1A salvaje preincubadas con 50 μ M de C75-CoA o de etomoxir-CoA durante 5 min a 30°C y sometidas después a diálisis. Se tomaron alícuotas de estas fracciones a los 24 y 36 h de diálisis y se ensayaron para la actividad CPT1A. Se recuperó la actividad enzimática en las fracciones preincubadas con C75-CoA de 50% y 100% respectivamente, pero no en las fracciones tratadas con etomoxir-CoA (**Figura 45B**) comparado con el control. Durante la diálisis, el complejo C75-CoA/CPT1A acabó disociándose a las 36 h, mostrando así una unión fuerte pero reversible.

En el caso de las fracciones tratadas con etomoxir-CoA no se detectó ninguna recuperación en la actividad CPT1A tras 36 h de diálisis, lo que es consistente con los datos reportados en la bibliografía que muestran que etomoxir-CoA y la proteína CPT1 forman un enlace covalente.

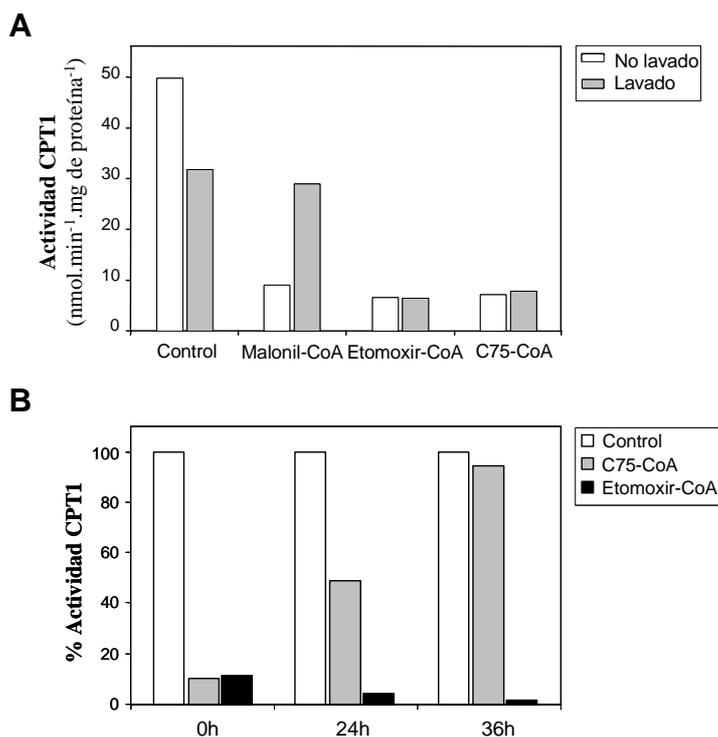


Figura 45. Análisis de la unión del C75-CoA a CPT1A sobreexpresada en levadura. A) 3 μg de proteína de levadura sobreexpresando CPT1A salvaje fueron preincubados durante 5 min con 50 μM malonil-CoA, etomoxir-CoA o C75-CoA y lavados o no con el tampón de lavado. Se representa la actividad específica de CPT1A salvaje. **B)** 160 μg de fracción enriquecida en mitocondrias de células de levadura sobreexpresando CPT1A wt fueron preincubadas durante 5 min a 30°C sin inhibidor, o bien con una concentración final de 50 μM de C75-CoA o 50 μM de etomoxir-CoA y luego dializados. Se tomaron alícuotas previas a la diálisis y a tiempo 24 y 36 h después de la diálisis y se ensayaron para la actividad CPT1A.

13.5 C75-CoA es un inhibidor competitivo respecto al sustrato palmitoil-CoA

Para identificar el tipo de inhibición que ejerce C75-CoA en la catálisis del sustrato palmitoil-CoA por el enzima CPT1A, realizamos experimentos cinéticos con extractos de levadura sobreexpresando CPT1A salvaje de rata, en los cuales variábamos las concentraciones de palmitoil-CoA (de 1 a 100 μM) en presencia de concentraciones crecientes de C75-CoA (0, 1, 2 y 5 μM) y manteniendo una concentración fija de 400 μM del sustrato carnitina. En todos los casos el ratio molar de acil-CoA y albúmina fue mantenido a 5:1 para evitar la presencia de acil-CoA libre y sus efectos de detergente o bien la formación de micelas. El enzima CPT1A muestra unas cinéticas estándar de saturación tipo Michaelis-Menten para el sustrato palmitoil-CoA a todas las concentraciones de C75-CoA ensayadas (**Figura 46A**).

La representación de Lineweaver-Burk para la actividad CPT1A salvaje en cada concentración de C75-CoA fue lineal (**Figura 46B**). Esta representación, nos permitió calcular las constantes cinéticas aparentes de K_m y V_{max} (**ver Métodos, sección 5.1.3**). No se observan cambios en la actividad catalítica intrínseca aparente del enzima CPT1A salvaje ($V_{max_{app}} = 3,98 \pm 0,83 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) sin embargo, se observan diferencias en los valores aparentes de K_m para el palmitoil-CoA que fueron aumentados desde $4,5 \pm 0,8 \text{ }\mu\text{M}$, $33,6 \pm 1,2 \text{ }\mu\text{M}$, $61,6 \pm 1,7 \text{ }\mu\text{M}$ hasta $126,0 \pm 3,7 \text{ }\mu\text{M}$ a cada concentración creciente de C75-CoA de 0, 1, 2 hasta 5 μM , respectivamente. Los resultados de las cinéticas muestran que C75-CoA es un inhibidor competitivo con respecto al sustrato palmitoil-CoA. En este tipo de inhibición, el inhibidor se combina con el enzima libre impidiendo la unión al sustrato, es decir, se excluyen mutuamente. La ecuación de velocidad de Lineweaver-Burk es:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{m_{app}}}{V_{max_{app}}} \times \frac{1}{[S]} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + \frac{1}{V_{max_{app}}}$$

Donde:

$$K_{m_{app}} = K_m \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

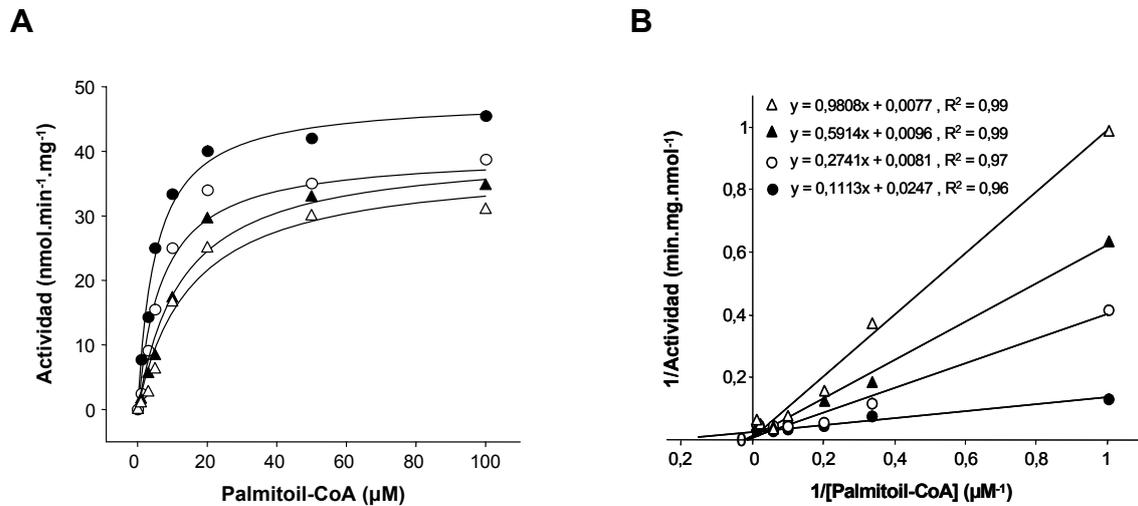


Figura 46: Análisis cinéticos para el sustrato palmitoil-CoA de CPT1A salvaje expresada en levadura en presencia de diferentes concentraciones de C75-CoA. Fracciones mitocondriales aisladas de levaduras (3-4 μg de proteína) fueron ensayadas radiométricamente para la actividad CPT1A salvaje de rata. **A)** Representación de Michaelis-Menten de la actividad CPT1A wt versus concentraciones crecientes de palmitoil-CoA (de 1 a 100 μM) en presencia de diferentes niveles de C75-CoA 0 μM (●), 1 μM (○), 2 μM (▲) y 5 μM (△) y una concentración fija de 400 μM de carnitina. **B)** Representación de Lineweaver-Burk de las cinéticas presentadas en (A). En cada concentración del inhibidor se indica la ecuación de la recta. Se muestran las medias de dos experimentos independientes a partir de extractos proteicos de diferentes expresiones de CPT1A salvaje en levadura.

Utilizando los datos cinéticos a 20 μM de concentración del sustrato palmitoil-CoA, pudimos calcular las constantes aparentes de inhibición (K_i) y de inactivación del enzima ($kinact$) utilizando el método de regresión no lineal basado en el método de Kitz-Wilson (Kitz, 1962; Maurer, 2000) y el programa SigmaPlot 8.0 (**Figura 47**). La constante aparente K_i fue igual a la calculada en los ensayos de inhibición de CPT1A salvaje que vimos previamente en el **apartado de Resultados 13.2** y fue de $0,23 \pm 0,09$ μM. En cuanto a la constante de inactivación $kinact$, fue mucho más baja ya que la concentración del sustrato acil-CoA fue también baja. Este valor aparente de $kinact$ fue de $0,09 \pm 0,004$ min⁻¹.

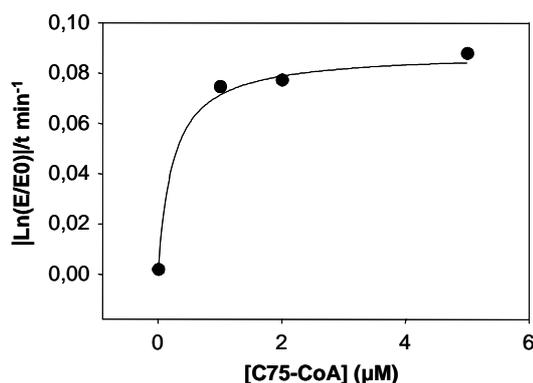


Figura 47: Representación del grado de pérdida de actividad CPT1A salvaje versus concentraciones del inhibidor C75-CoA. Usando el modelo no lineal basado en el método propuesto por Kitz-Wilson (Kitz, 1962; Maurer, 2000), se representa la línea de regresión no lineal que mejor se adapte a los datos de inhibición usando el programa SigmaPlot 8.0. Se muestran las medias de dos experimentos independientes a partir de extractos proteicos de diferentes expresiones de CPT1A salvaje en levadura.

13.6 C75-CoA es un inhibidor competitivo mixto respecto al sustrato carnitina

Del mismo modo que en el caso de la interacción del C75-CoA con el enzima CPT1A con respecto al sustrato palmitoil-CoA, hemos analizado el tipo de interacción de este inhibidor con el enzima CPT1A pero con respecto al segundo sustrato, la carnitina. Realizamos experimentos cinéticos con extractos de levadura sobreexpresando CPT1A salvaje en presencia de: concentración fija del sustrato palmitoil-CoA (50 µM), concentraciones crecientes del sustrato carnitina de 0 a 800 µM y de concentraciones fijas de 0 µM, 0,1 µM, 1 µM y 5 µM de C75-CoA. Se preincubaron las fracciones mitocondriales con el inhibidor durante 5 min antes de proceder al ensayo radiométrico. La actividad CPT1A muestra una cinética de saturación estándar hiperbólica tipo Michaelis-Menten (**Figura 48A**). La representación de Lineweaver-Burk, utilizando todos los datos a diferentes concentraciones de carnitina fue lineal a 0 µM de C75-CoA pero hiperbólica a las otras concentraciones de C75-CoA lo cual no nos permitió calcular los parámetros cinéticos de $K_{m,app}$ y $V_{max,app}$ (**Figura 48B**) ya que el análisis de Michaelis-Menten para este caso no es válido (el cociente E/K_i es $> 0,01$) (Morrison, 1969).

Decidimos realizar otro conjunto de ensayos utilizando la mitad de concentración del enzima y concentraciones más bajas de carnitina (de 0 a 100 µM) y del inhibidor

C75-CoA (0 μM , 0,0001 μM , 0,001 μM y 0,025 μM). En estas nuevas condiciones, las cinéticas obtenidas fueron hiperbólicas de tipo Michaelis-Menten y la representación de los dobles recíprocos fue lineal en cada concentración de C75-CoA (**Figura 48C y 48D**). La serie de líneas en esta representación se cortan en un punto común que se acerca mucho al eje de ordenadas y muy cerca de las cinéticas del control cuando la concentración del C75-CoA es de 0 μM . Al disminuir la concentración del enzima (E), el cociente E/K_i habrá disminuido y nos habremos acercado al análisis válido de Michaelis-Menten. No se observan cambios en la actividad catalítica intrínseca aparente del enzima CPT1A salvaje ($V_{\text{max,app}} = 16,11 \pm 1,28 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). Los valores de los parámetros cinéticos reportados en la **Tabla 9** indican que a medida que se aumenta la concentración del inhibidor, el valor de $K_{m,app}$ aumenta, lo que corresponde a un perfil de una inhibición competitiva mixta. Dado que vimos que C75-CoA se une fuertemente al enzima CPT1, esto sugiere que C75-CoA es un inhibidor competitivo mixto con respecto al sustrato carnitina.

La dependencia de las pendientes obtenidas de la **Figura 48D** en función de la concentración de C75-CoA (**Figura 48E**), puede ser lineal aunque el ajuste no es muy bueno y se obtiene un valor aparente de K_i para C75-CoA de 0,04 μM (intersección con el eje de abscisas). Por otro lado, se utilizó otra representación para calcular el valor de K_i y definir el tipo de inhibición. La representación de Henderson ($[I]/(1-(v_i/v_o))$) frente a v_o/v_i de los datos de la **Figura 48C** da líneas rectas con pendientes positivas. La representación de estas pendientes en función de concentraciones de carnitina muestra una línea recta (**Figura 48F**) que tiene la siguiente fórmula:

$$Y = (2,3 \cdot 10^{-3}) \cdot X + 8,49 \cdot 10^{-2}$$

Donde X es la concentración de la carnitina.

La pendiente en la ecuación de Henderson para un inhibidor competitivo que se une fuertemente al enzima es igual a: pendiente ($K_{i,app}$) = $K_i \times (1 + ([S]/K_m))$. De esto se deducen los valores aparentes de K_i para C75-CoA que es de 0,085 μM y de K_m para la carnitina que es de 36,91 μM . El valor de $K_{i,app}$ obtenido de esta representación es cercano al valor obtenido de la representación secundaria (**Figura 48E**) de los dobles recíprocos que se estima a 0,04 μM .

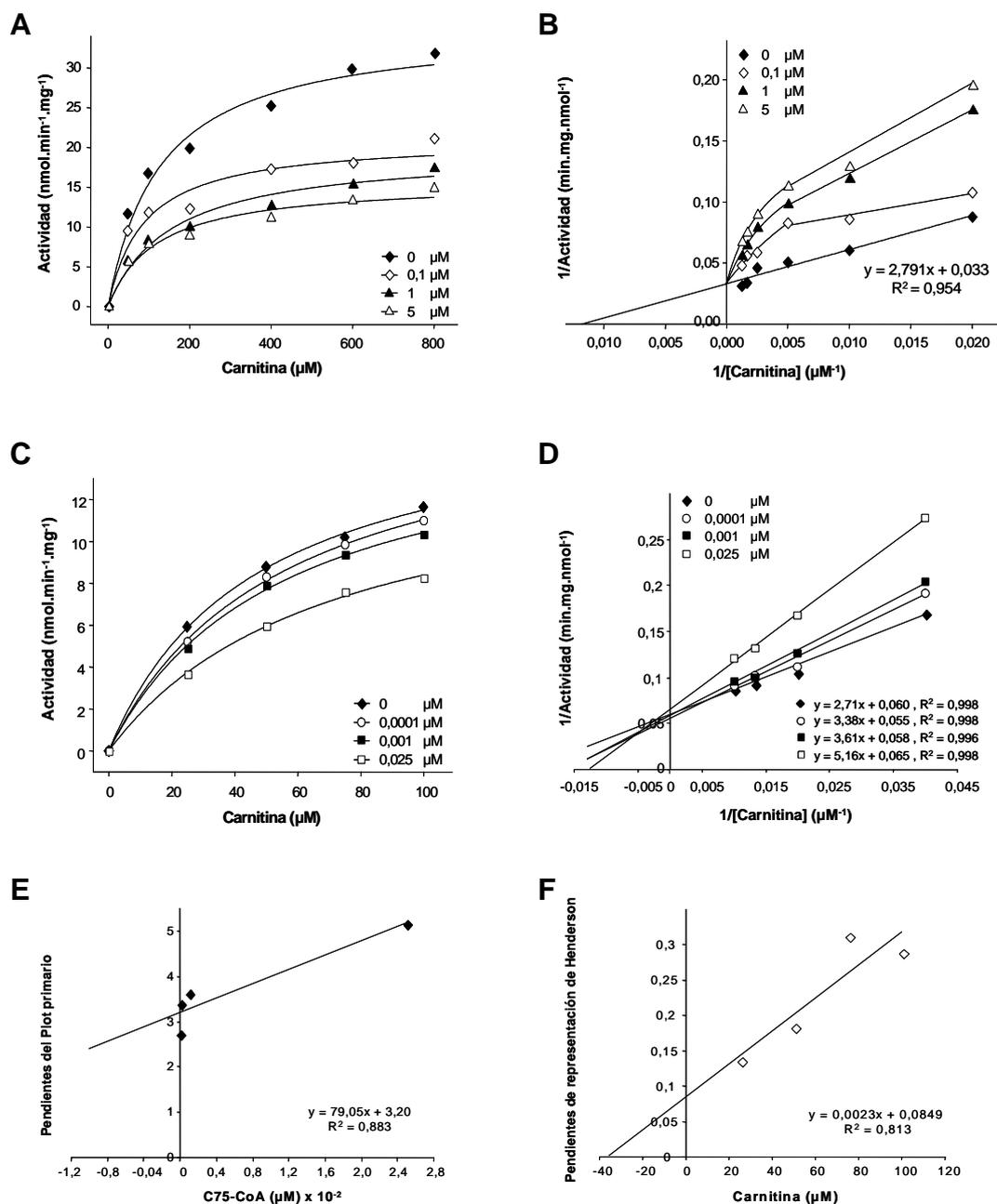


Figura 48: Análisis cinéticos de la actividad CPT1A salvaje para el sustrato carnitina a diferentes concentraciones del inhibidor C75-CoA. **A)** Fracciones enriquecidas en mitocondrias (6 μg de proteína) sobreexpresando CPT1A salvaje de rata fueron utilizadas en el análisis cinético de la actividad enzimática a 50 μM de palmitoil-CoA y concentraciones crecientes de carnitina. Las proteínas fueron preincubadas durante 5 min con el inhibidor. Representación de Michaelis-Menten de la actividad enzimática versus concentraciones crecientes de carnitina en presencia de diferentes concentraciones de C75-CoA: 0 μM (◆), 0,1 μM (◇), 1 μM (▲) y 5 μM (△). **B)** Representación de Lineweaver-Burk de las cinéticas presentadas en **A**. **C)** Cinéticas de Michaelis-Menten de la actividad enzimática de CPT1A salvaje (3 μg de proteína) versus concentraciones crecientes de carnitina (0-100 μM) en presencia de concentraciones de C75-CoA: 0 μM (◆), 0,0001 μM (○), 0,001 μM (■) y 0,025 μM (□). **D)** Representación de Lineweaver-Burk de las cinéticas presentadas en **C** con las

correspondientes ecuaciones a cada concentración de C75-CoA. E) Plot secundario de los datos cinéticos presentados en D. F) Representación de las pendientes obtenidas de la representación de Handerson versus concentraciones de carnitina (0-100 μM). Se indica la ecuación resultante de la línea. Todos los datos representados utilizando los programas Excel y SigmaPlot 8.0 son la media de dos experimentos independientes con diferentes extractos proteicos de diferentes expresiones de CPT1A salvaje en levadura.

	C75-CoA (μM)	Carnitina	
		$K_{m_{app}}$ (μM)	$V_{max_{app}}$ (nmol/min.mg)
CPT1A wt	0	$46,46 \pm 3,61$	$16,85 \pm 0,54$
	0,0001	$55,38 \pm 3,88$	$17,14 \pm 0,54$
	0,001	$62,78 \pm 5,14$	$16,15 \pm 0,68$
	0,025	$70,21 \pm 8,29$	$14,29 \pm 0,85$

Tabla 9: Parámetros cinéticos aparentes de inhibición de CPT1A por C75-CoA. Fracciones mitocondriales (3 μg de proteína) obtenidas tras la sobreexpresión de CPT1A salvaje en levadura fueron ensayadas en presencias de una concentración fija de 50 μM palmitoil-CoA y concentraciones crecientes de C75-CoA y carnitina. Los resultados se expresan como la media \pm D.E. de dos experimentos independientes con diferentes preparaciones proteicas.

14. C75-CoA INHIBE LA ACTIVIDAD CPT1 EN MITOCONDRIAS DE DOS LÍNEAS CELULARES Y TEJIDOS

14.1 Efecto del C75-CoA en la actividad CPT1 en mitocondrias de dos líneas celulares

Los efectos inhibidores del C75-CoA y del etomoxir-CoA fueron también estudiados en fracciones mitocondriales frescas purificadas a partir de líneas celulares en cultivo de páncreas INS(832/13) y de músculo L6E9. El cultivo celular y la obtención de los extractos mitocondriales se realizaron en nuestro laboratorio como se indica en Bentebibel (Bentebibel, 2006).

Una vez obtenidas las fracciones mitocondriales frescas, se procedió al análisis de las cinéticas de inhibición de la actividad CPT1 radiométricamente preincubando las proteínas 5 min a 30°C con concentraciones crecientes de ambos derivados CoA separadamente. En ambos casos, la actividad CPT1 fue fuertemente inhibida en ambas fracciones mitocondriales de las líneas celulares estudiadas (**Figura 49**). CPT1 en mitocondrias frescas obtenidas de los cultivos celulares de las células INS(823/13) y

L6E9 muestra una sensibilidad mayor hacia el inhibidor que la de los extractos de levadura (ver **Resultados, sección 13.2**). A 10 μM de los derivados de CoA, la actividad CPT1 fue prácticamente inhibida por completo. Los valores de IC_{50} para C75-CoA fueron de 0,25 μM y 0,46 μM para las células INS(823/13) y las células L6E9 respectivamente y los valores de IC_{50} para etomoxir-CoA fueron de 1,21 μM y 2,87 μM para las células INS(823/13) y las células L6E9 respectivamente (**Tabla 10**).

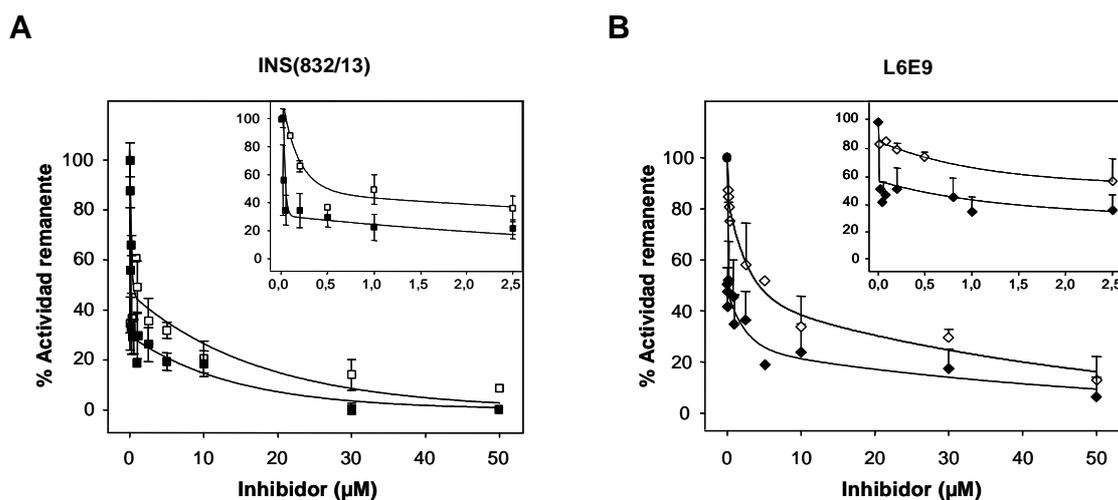


Figura 49. Efecto del C75-CoA y etomoxir-CoA en la actividad CPT1 en extractos mitocondriales de células INS(823/13) y L6E9. A) Perfil de inhibición de fracciones mitocondriales frescas (10 μg de proteína) obtenidas de células INS(823/13) preincubadas con concentraciones crecientes de etomoxir-CoA (\square) o C75-CoA (\blacksquare). B) Estudio de la inhibición de la actividad CPT1 en mitocondrias frescas (15 μg de proteína) obtenidas de células L6E9 preincubadas con concentraciones crecientes de etomoxir-CoA (\diamond) o C75-CoA (\blacklozenge). Los datos están representados en porcentaje relativos a los valores del control en ausencia de inhibidor (100%) como la media de tres experimentos independientes. El inserto en ambos casos representa en detalle las curvas de inhibición para ambos inhibidores a bajas concentraciones.

14.2 Efecto del C75-CoA en la actividad CPT1 en mitocondrias de hígado y músculo de rata

Con el objetivo de comprobar si el efecto del C75-CoA en la actividad CPT1 puede ser modificado según el origen del enzima CPT1, hemos realizado otros experimentos de cinéticas de inhibición en presencia de concentraciones crecientes de C75-CoA o de etomoxir-CoA como control, con mitocondrias frescas aisladas de hígado (CPT1A) y de músculo gastronemius (CPT1B) de rata (ver **Métodos, sección 4.2 y 4.3**). Los extractos mitocondriales frescos de hígado o de músculo de rata (15-20 μg de proteína) fueron

preincubados durante 5 min con los dos inhibidores separadamente y se ensayó la actividad CPT1 durante 4 min. El perfil de inhibición provocado por ambos inhibidores en la actividad CPT1 fue prácticamente igual. Ambos C75-CoA y etomoxir-CoA inhiben la actividad CPT1 con unas cinéticas similares (**Figura 50**).

CPT1 de mitocondrias frescas de tejidos muestra una sensibilidad mayor hacia el inhibidor comparado con la de los extractos de levadura expresando el enzima salvaje. A 10 μM de los derivados de CoA la actividad CPT1 fue prácticamente inhibida por completo. Los valores de IC_{50} para C75-CoA fueron de 0,25 μM y 0,015 μM para CPT1A y CPT1B respectivamente, y los valores de IC_{50} para etomoxir-CoA fueron de 0,70 μM y 0,04 μM para CPT1A y CPT1B respectivamente (**Tabla 10**).

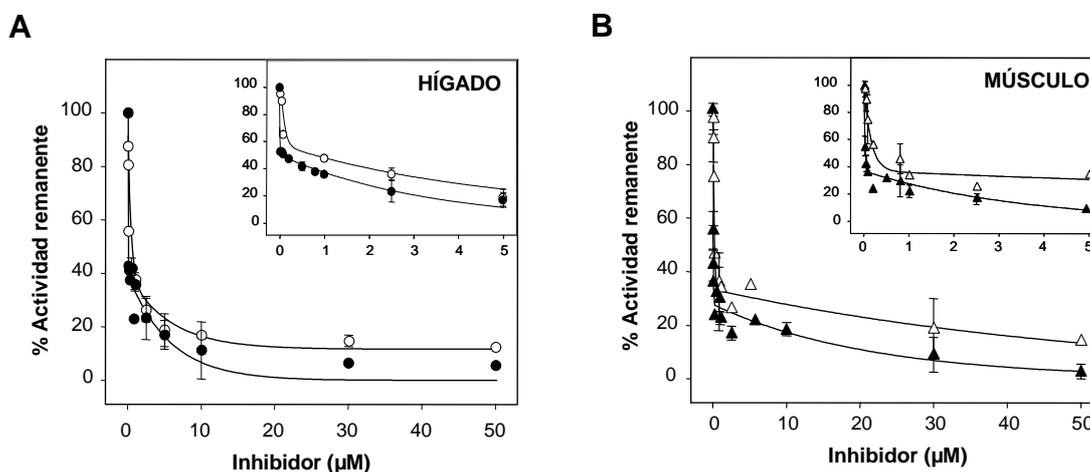


Figura 50. Efecto del C75-CoA y etomoxir-CoA en la actividad CPT1 en mitocondrias obtenidas de tejidos de rata. **A)** Perfil de inhibición de 15 μg de fracciones mitocondriales obtenidas de hígado de rata preincubadas con concentraciones crecientes de etomoxir-CoA (\circ) o C75-CoA (\bullet). **B)** Estudio de la inhibición de la actividad CPT1B en mitocondrias de músculo de rata (20 μg de proteína) en presencia de concentraciones crecientes de ambos derivados CoA, etomoxir-CoA (Δ) o C75-CoA (\blacktriangle). Se representan los datos en porcentaje relativos a los valores del control en ausencia de inhibidor (100%) como la media de tres experimentos independientes de diferentes preparaciones proteicas. El inserto en ambos casos representa en detalle las curvas de inhibición de la actividad CPT1 para ambos inhibidores a bajas concentraciones.

	IC ₅₀ (μM)	
	C75-CoA	Etomoxir-CoA
Células INS(832/13)	0,25 ± 0,16	1,21 ± 0,25
Miotubos L6E9	0,46 ± 0,21	2,87 ± 0,87
CPT1A de hígado de rata	0,25 ± 0,13	0,70 ± 0,10
CPT1B de músculo de rata	0,015 ± 0,005	0,04 ± 0,01

Tabla 10: Valores de IC₅₀ para C75-CoA y etomoxir-CoA sobre la actividad CPT1. Fracciones mitocondriales obtenidas de células en cultivo INS(823/13) (10 μg de proteína) y células L6E9 (15 μg de proteína) y fracciones mitocondriales de hígado (15 μg de proteína) y músculo (20 μg de proteína) de rata fueron ensayadas para la actividad CPT1 en presencia de concentraciones crecientes de C75-CoA o etomoxir-CoA. Se indican los valores de IC₅₀ en cada caso. Los resultados se expresan como las medias ± D.E. de al menos tres experimentos independientes con diferentes preparaciones proteicas.

Estos resultados indican que C75-CoA inhibe la actividad CPT1 en mitocondrias frescas obtenidas de las líneas celulares en cultivo y de los tejidos y que inhibe más fuertemente la isoforma muscular que la hepática. También, C75-CoA es un inhibidor más potente que etomoxir-CoA.

15. C75 ADMINISTRADO INTRAPERITONEALMENTE INHIBE CPT1 EN MÚSCULO, HÍGADO Y PÁNCREAS DE RATA

Para examinar el efecto del C75 sobre la actividad CPT1 *in vivo*, se inyectaron intraperitonealmente a ratones una dosis única de 20 mg/kg de peso de C75 o bien de etomoxir disueltos en medio RPMI 1640, o se inyectó solo el medio RPMI 1640 como control. Los ratones se sacrificaron a 0,5, 1, 3 y 5 h tras la inyección y se obtuvieron fracciones enriquecidas en mitocondrias de músculo, hígado (**ver Materiales, sección 3.1 y Métodos, sección 4.2 y 4.3**) y páncreas (Bentebibel, 2006). Seguidamente se analizó la actividad CPT1 por método radiométrico en las fracciones mitocondriales frescas.

La **Figura 51** muestra que la actividad CPT1 disminuye rápidamente a tiempos cortos en todos los tejidos estudiados, pero recuperándose sucesivamente en el caso del tratamiento con C75 con cinéticas dependientes del tipo de tejido.

En el caso del tratamiento con C75 la inhibición de CPT1 en el hígado disminuye en un 56% a 1 h y en un 73% después del tratamiento de 3 h, alcanzando los valores del control a los 5 h (**Figura 51A**). La inhibición de la actividad CPT1 en el músculo fue de un 80% a los 30 min, recuperándose totalmente después de este tiempo y de forma más rápida que en el caso del hígado (**Figura 51B**). En el páncreas, la actividad CPT1 disminuye en un 36% tras el tratamiento con C75 durante 30 min con respecto al control, recuperándose después de este tiempo (**Figura 51C**). En ningún caso el nivel de recuperación en la actividad CPT1 excede el del control. C75 produce una inhibición inmediata en la actividad CPT1 en hígado, páncreas y músculo de ratón, con propiedades máximas de inhibición en el hígado. Estos experimentos *in vivo* son consistentes con los ensayos *in vitro* en mitocondrias aisladas de levadura o de tejidos de rata.

En el caso del etomoxir la actividad CPT1 se inhibe también en todos estos tejidos (**Figura 51**). Después de 3 h de tratamiento, los niveles de inhibición de la actividad CPT1 fueron de 97%, 71% y 60% en hígado, músculo y páncreas respectivamente. Los efectos inhibidores del etomoxir *in vivo* sobre la actividad CPT1 son siempre mayores a los observados tras el tratamiento con C75. Además, al contrario de lo observado para C75, los efectos inhibidores del etomoxir se mantienen hasta las 5 h perdurando en el tiempo, lo que es consistente con el hecho que etomoxir se une covalentemente a CPT1.

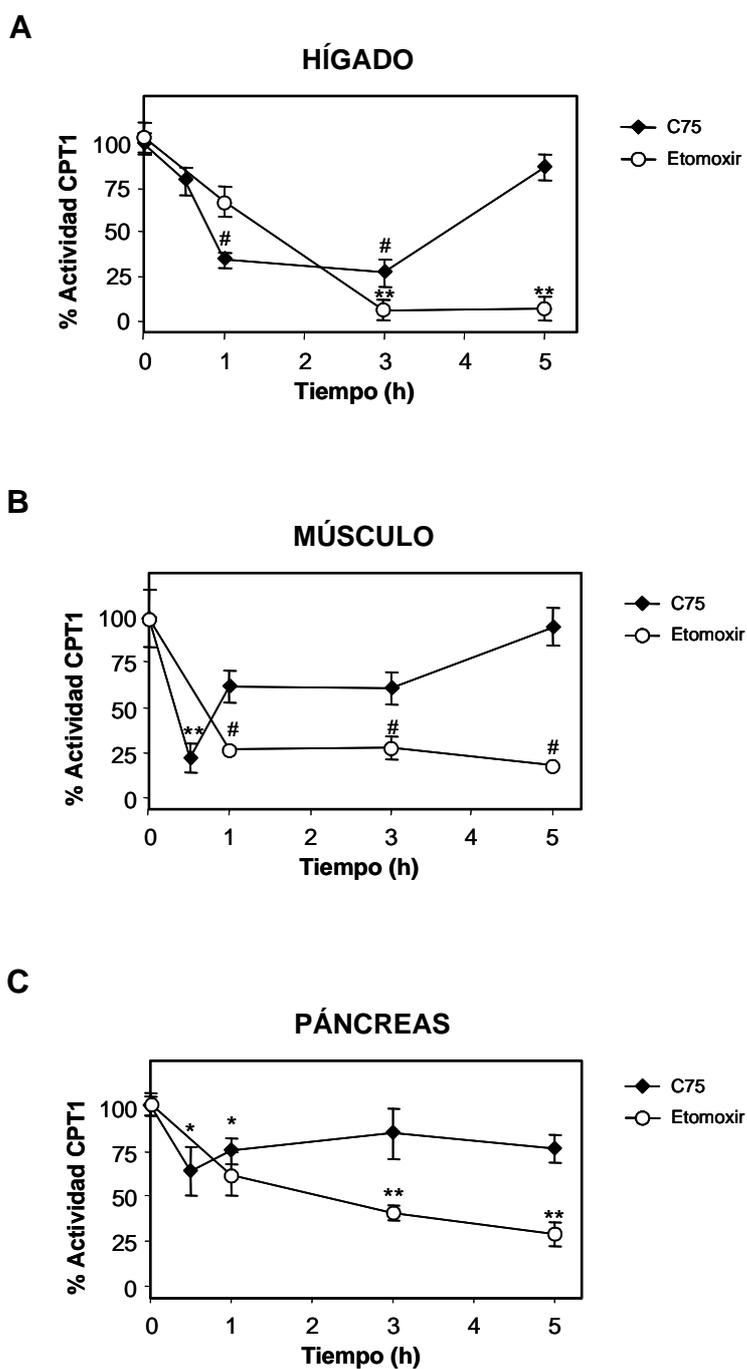


Figura 51: Efecto de la administración intraperitoneal de C75 y etomoxir en ratón. Se inyectaron separadamente e intraperitonealmente C75 y etomoxir en ratones, a la dosis de 20 mg/kg de peso corporal y se sacrificaron a 0,5, 1, 3, y 5 h después del tratamiento. Se obtuvieron fracciones enriquecidas en mitocondrias de hígado (A), músculo (B) y páncreas (C) y se ensayó la actividad CPT1 con 20 µg de proteína fresca. Los resultados son la media ± SEM de 6 ratones. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, # $P < 0,001$ respecto al control (0 h).

16. C75-CoA SE FORMA A PARTIR DE C75 EX VIVO E IN VIVO

16.1 C75 es transformado cuantitativamente a C75-CoA en hepatocitos primarios de rata

Realizamos experimentos adicionales para analizar y confirmar que C75 es capaz de ser activado a su éster de CoA en células de hepatocitos primarios de rata. Tal como se ha descrito anteriormente, el método HPLC-MS/MS es capaz de detectar los diferentes aciles-CoA (**ver Resultados, sección 12.2**). Con el fin de mejorar la resolución de detección de los aciles-CoA en las muestras añadimos una fase móvil adicional, la fase C (100% acetona).

En primer lugar, inyectamos en el HPLC-MS/MS una mezcla de C₆-CoA, C₈-CoA, C₁₆-CoA, C75-CoA (estándar o control de activación del C75 a C75-CoA) y C₁₇-CoA (heptadecanoil-CoA, un control interno) a una concentración de 10 ppm. Como muestra la **Figura 52A**, se pudo detectar la salida por tiempo de retención de cada acil-CoA en la columna C₁₈ según la masa molecular de cada uno. Se detectó la salida del pico correspondiente al C75-CoA (1022,5 Da) con un tiempo de retención de 6,34 min. En el caso del control interno, C₁₇-CoA, el análisis muestra un pico de 1020,7 Da con un tiempo de retención de 12,93 min.

En segundo lugar, analizamos las muestras obtenidas de la extracción de los aciles-CoA a partir de células de hepatocitos primarios de rata. Estas células se trataron con 50 µM o con 100 µM de C75 o bien con DMSO como control y durante la obtención de la fracción enriquecida en aciles-CoA, se añadió 16 nmol de C₁₇-CoA como control interno (**ver Métodos, sección 7.3.1**).

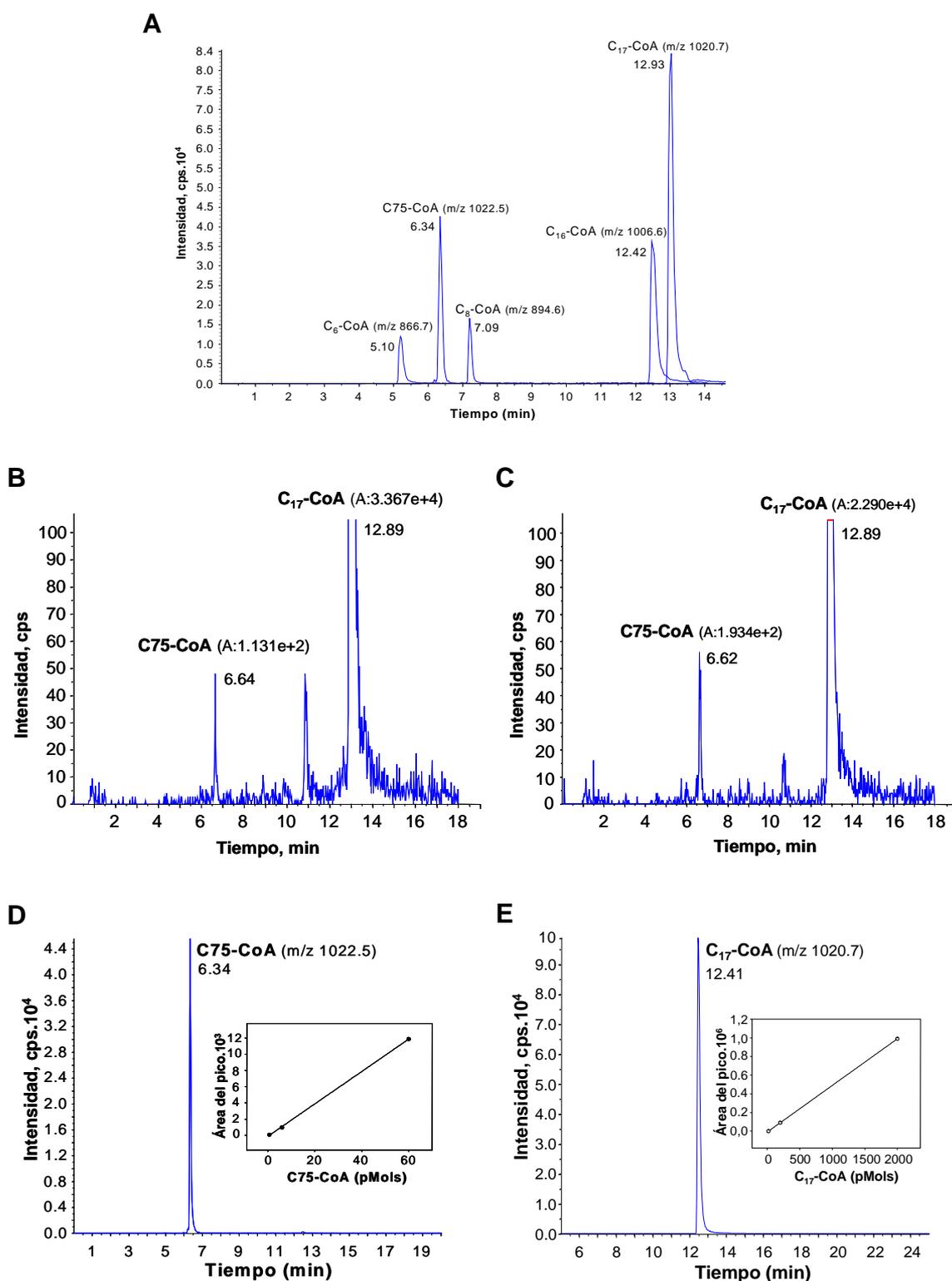
Los espectros del análisis de los extractos obtenidos a partir de células de hepatocitos primarios de rata incubadas con 50 µM o con 100 µM C75 se presentan en la **Figura 52B** y **52C** respectivamente. En estas figuras, se indican los valores de las áreas que nos sirven para la cuantificación de la formación del derivado CoA. El área del pico de C75-CoA en las células tratadas con 100 µM C75 es 1,7 veces mayor que el área del pico de C75-CoA en las células tratadas con 50 µM C75. Los picos correspondientes a la masa molecular del C75-CoA y del C₁₇-CoA salen con tiempos de retención similares a los en el patrón de aciles-CoA. En ambos casos, este estudio confirmó la presencia de un compuesto del tamaño esperado para el producto C75-CoA. Estos resultados confirman que C75-CoA se forma *in vitro* e *ex vivo*. Además, los resultados de estos espectros nos permitieron cuantificar el producto C75-CoA formado

en estas células. Previo a la cuantificación se generó una curva de calibración, una para C75-CoA (estándar de activación del C75 a C75-CoA) y otra para el estándar interno C₁₇-CoA.

En ambas curvas de calibración se obtienen líneas rectas que presentan un coeficiente de regresión del 99% (**Figura 52D** y **52E**). Utilizando la curva de calibración del estándar interno y el valor del área del pico del C₁₇-CoA en la **Figura 52B** y **52C**, hemos deducido el porcentaje de recuperación del C₁₇-CoA tras el proceso de extracción de los aciles-CoA en la muestra. Este valor es de 21,7% para las muestras incubadas con 50 μ M y de 16,3% para las muestras incubadas con 100 μ M.

Del mismo modo, utilizando la curva de calibración del estándar C75-CoA y el valor del área del pico del C75-CoA (**Figura 52B**), hemos deducido la cantidad de C75-CoA formado en los hepatocitos incubados con 50 μ M de C75 tras el proceso de extracción de los aciles-CoA y teniendo en cuenta la cantidad de proteína por placa de cultivo, da un valor de 0,7 pmol/mg de proteína. Del mismo modo, en el caso de las células incubadas con 100 μ M de C75 (**Figura 52C**), la cantidad de C75-CoA formado en estas células y tras el proceso de extracción de los aciles-CoA es de 1,3 pmol/mg de proteína.

Estos resultados confirman la formación del C75-CoA a partir de C75 *ex vivo* en hepatocitos primarios de rata.



añadió 16 nmol de C₁₇-CoA a la hora de la obtención de las fracciones de aciles-CoA. Se indican las áreas de los picos de C₇₅-CoA y C₁₇-CoA utilizadas para la cuantificación. **D)** y **E)** Curva de calibración de C₇₅-CoA y C₁₇-CoA. Dos concentraciones de C₇₅-CoA: 8 y 60 pMols y dos otras concentraciones de C₁₇-CoA: 100 y 2000 pMols fueron inyectadas en el HPLC-MS/MS y las correspondientes áreas de los picos fueron calculadas. Se muestran las curvas de calibración en cada caso. Los cromatogramas representados corresponden a los picos de C₇₅-CoA y C₁₇-CoA inyectados a una concentración de 20 ppm. Se indica también el tiempo de retención de cada uno de los ésters de CoA. Todas las detecciones se llevaron a cabo en el modo positivo.

16.2 C75 es transformado a C75-CoA en hígado de ratón

La inhibición de la actividad CPT1A en hígado de ratón tratado i.p durante 1h con una sola dosis de C75 vista en el apartado **Resultados 15**, posiblemente es debida a la formación del C75-CoA en este tejido. Para confirmar esta hipótesis, hemos purificado los aciles-CoA de este tejido y los hemos sometido a una detección por HPLC-MS/MS. La **Figura 53** muestra el pico de detección del C75-CoA con un tiempo de retención de 6,29 min. Este resultado confirma que C75 es activado a su derivado CoA *in vivo*. En este tejido tras una inyección i.p de C75 en ratón la actividad CPT1 está inhibida debido a la acción del C75-CoA sintetizado endógenamente.

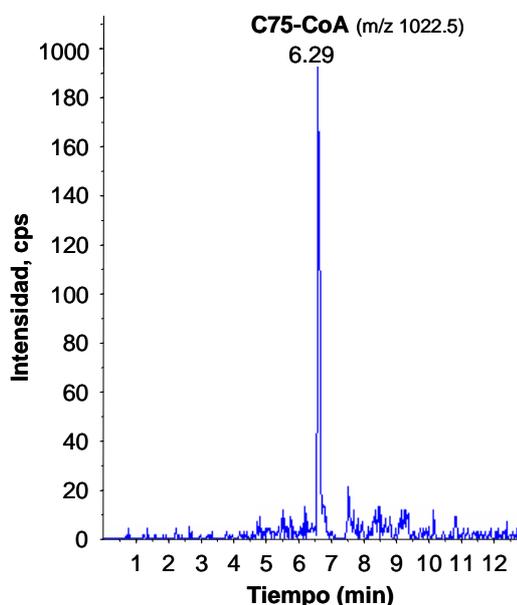


Figura 53. Detección del C75-CoA *in vivo* en hígado de ratón tratado previamente con una única dosis de C75. Se muestra un espectro de tiempo de retención del C75-CoA presente en la muestra de aciles-CoA aislados de hígado de ratón inyectado i.p. con C75 y sacrificado tras 1h de tratamiento.

17. CERULENINA Y CERULENINA-CoA NO AFECTAN LA ACTIVIDAD CPT1

Cerulenina (2,3-epoxi-4-oxo-7-10-dodecadienamido) es un inhibidor natural potente y no competitivo de la actividad FAS (Kuhajda, 1994). En un estudio reciente se reportó que este fármaco provoca una respuesta bifásica en la actividad CPT1 tras una sola inyección intraperitoneal en ratones. En la primera fase se suprimía rápidamente la actividad CPT1 y en la segunda fase se producía una estimulación de la actividad enzimática (Jin, 2004). Estos autores sugerían que cerulenina no se uniría directamente a CPT1 y que el efecto de inactivación sobre ésta última era indirecto. Dichos autores especulan que este efecto sobre CPT1 estaría causado por un aumento en los niveles de malonil-CoA como consecuencia de la inhibición de FAS por cerulenina. Para comprobar esta hipótesis, quisimos ver si la actividad CPT1 *in vitro* está regulada directamente por cerulenina.

Se analizó el efecto de cerulenina en la actividad de la isoforma hepática de CPT1. Por ello, se incubaron las fracciones enriquecidas en mitocondrias de levadura sobreexpresando CPT1A de rata con concentraciones crecientes de cerulenina (**Figura 54**) tal como se ha descrito en **Métodos, sección 5.1.1**. Este ensayo muestra que cerulenina no tiene ningún efecto activador o inhibidor significativo sobre CPT1A.

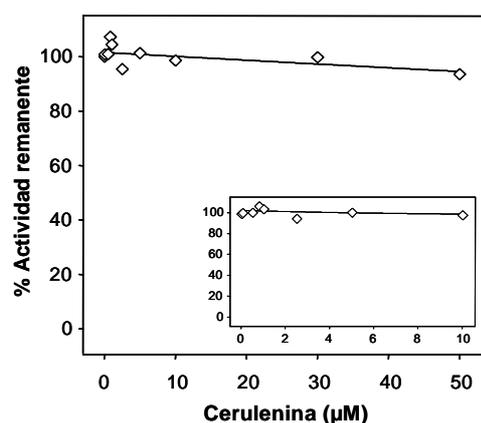


Figura 54: Análisis de la actividad CPT1A salvaje en presencia de concentraciones crecientes de cerulenina. Fracciones mitocondriales aisladas de levadura (6 µg de proteína) sobreexpresando CPT1A salvaje de rata fueron ensayadas para la actividad enzimática. Previo al ensayo, se preincubaron las proteínas durante 5 min con cerulenina. Los datos están representados en porcentaje relativos a los valores del control en ausencia de inhibidor (100%). El inserto representa en detalle la curva de inhibición a concentraciones bajas de cerulenina.

Debido a que muchos fármacos necesitan ser transformados en el organismo para ser activos, pensamos que quizás podría pasar lo mismo con la cerulenina. Una de estas transformaciones podría ser la formación del derivado CoA, llevada a cabo por la acción de las acil-CoA sintetasas. Por este motivo se comprobó si cerulenina podía ser transformada a cerulenina-CoA y si una vez convertida en su derivado CoA, podía tener un efecto sobre la actividad CPT1.

17.1 Cerulenina es sustrato del enzima acil-CoA sintetasa

Comprobamos si cerulenina podía ser transformada a cerulenina-CoA. Para ello, se activó *in vitro* cerulenina a cerulenina-CoA y como control de activación etomoxir a etomoxir-CoA, incubándolos con coenzima A, ATP y la acil-CoA sintetasa de *Pseudomonas sp* (ver **Métodos, sección 6.1**). Seguidamente se realizó un análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF en el modo negativo y positivo (ver **Métodos, sección 7.1**). Este estudio confirmó la presencia de un compuesto del tamaño esperado para el producto derivado CoA (**Figura 55A**, pico de 989,3 Da) sin la pérdida de una molécula de agua indicando así, que cerulenina es sustrato del enzima acil-CoA sintetasa. El mismo análisis se llevó a cabo con etomoxir como control (**Figura 55B**, pico de 1064,0 Da) ya que este compuesto se transforma a etomoxir-CoA tal como hemos demostrado en el **apartado Resultados 12.1**. El resto de los picos observados en el espectro corresponden a la matriz usada en el análisis, al CoA-SH en exceso o a productos provenientes de su fragmentación. En la **Figura 56** se muestra la estructura química de cerulenina y la que proponemos para cerulenina-CoA.

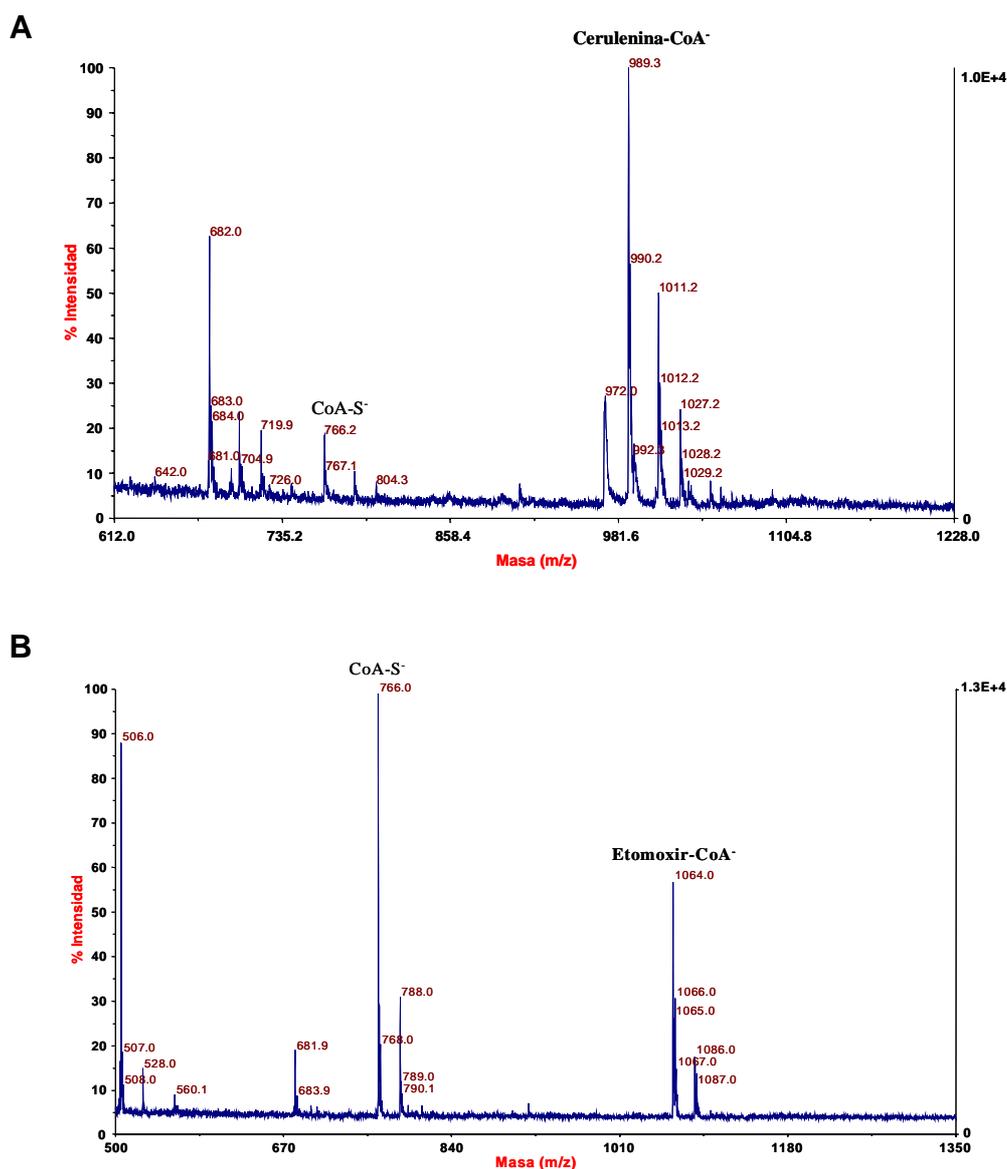


Figura 55. Espectro de MALDI-TOF de cerulenina-CoA y etomoxir-CoA. Los espectros se obtuvieron directamente a partir de la mezcla de la reacción de activación de cerulenina-CoA y etomoxir-CoA usando un sistema Voyager-DE-RP de Applied Biosystems con DHB (10 mg/ml en agua:metanol 1:1) tal como se ha descrito en **Métodos, sección 7.1**. La detección se llevó a cabo en el modo negativo. El producto cerulenina-CoA (**A**) corresponde al pico de 989,3 Da y etomoxir-CoA (**B**) corresponde al pico de 1064,0 Da.

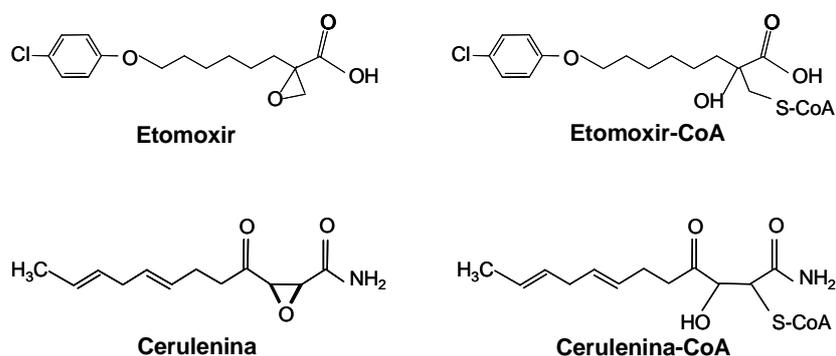


Figura 56. Estructuras químicas propuestas para el compuesto cerulenina-CoA. Se muestran las estructuras químicas del etomoxir y cerulenina y también se han dibujado las posibles estructuras para los derivados CoA, etomoxir-CoA y cerulenina-CoA de acuerdo con las masas moleculares obtenidas por el análisis de MALDI-TOF para estos compuestos aciles-CoA.

17.2 Efecto de cerulenina-CoA en la actividad CPT1A

Se realizaron a continuación ensayos de actividad CPT1A en presencia de concentraciones crecientes de cerulenina-CoA y también de etomoxir-CoA como control de inhibición. Los extractos mitocondriales de levadura sobreexpresando CPT1A (6 μg de proteína) fueron preincubados durante 5 min con concentraciones crecientes de los dos derivados CoA por separado y se ensayó la actividad CPT1A durante 4 min.

La **Figura 57** muestra que cerulenina-CoA apenas inhibe la actividad CPT1A. A 50 μM de concentración, la actividad enzimática fue inhibida por tan sólo un 15%, mientras que etomoxir-CoA inhibe rápidamente la actividad CPT1A de un 80% a esta concentración. Este resultado, indica que cerulenina y cerulenina-CoA no tienen un efecto directo sobre la actividad CPT1A de rata sobreexpresada en levadura.

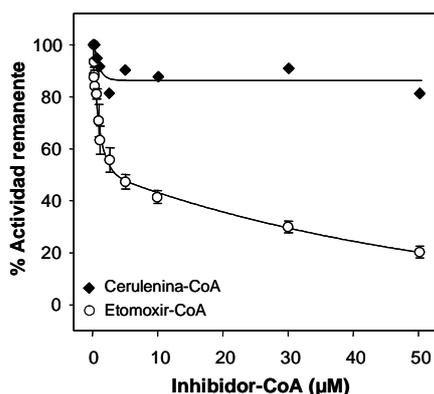


Figura 57: Análisis de la actividad CPT1A salvaje en presencia de concentraciones crecientes de cerulenina-CoA. Fracciones mitocondriales de levadura (6 µg de proteína) expresando CPT1A salvaje de rata fueron ensayadas para la actividad CPT1A. Previo al ensayo, se preincubaron las proteínas durante 5 min con cerulenina-CoA o con etomoxir-CoA como control de inhibición. Los datos están representados en porcentaje relativos a los valores del control en ausencia de inhibidor (100%) como la media de dos experimentos independientes de diferentes preparaciones proteicas.

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

Tal como hemos descrito en el apartado **Resultados 2 y 6**, los recientes datos cristalográficos publicados del enzima COT de ratón (Jogl, 2005) y de CPT2 de rata (Hsiao, 2006) nos permitieron mejorar el modelo 3-D de CPT1 basado en el cristal del enzima CrAT reportado previamente por nuestro grupo (Morillas, 2004). Utilizando métodos computacionales de Docking (**ver Métodos, sección 8.5**), proponemos una putativa localización de una molécula de C75-CoA y de etomoxir-CoA en el nuevo modelo 3-D de CPT1A. En el caso de la molécula del C75-CoA, realizamos el Docking molecular con ambas formas (a) y (b) (**Figura 39**) y en ambos casos, C75-CoA se aloja perfectamente en el canal hidrofóbico. En la **Figura 58A** se muestra la posición de una molécula de la forma (a) del C75-CoA en la cual se mantiene el anillo de furano cerrado en el centro activo de CPT1A elegida entre las siete mejores soluciones en términos de energía. La cadena alifática lateral del C75 se introduce en la cavidad hidrofóbica en el centro activo de CPT1A, definida por la hélice $\alpha 12$ y las hojas $\beta 1$, $\beta 13$ y $\beta 14$ de la proteína, justo donde el grupo acil del sustrato palmitoil-CoA se posiciona durante el proceso enzimático. El enlace tioéster del C75-CoA esta frente al residuo catalítico His⁴⁷³, lo que prevendría la actividad catalítica de CPT1A. El Docking molecular del etomoxir-CoA se realizó como control de la interacción de un inhibidor irreversible del

enzima CPT1 y su centro activo (**Figura 58B**). Este modelo sugiere que etomoxir-CoA se coloca en el enzima de una manera similar a la del sustrato fisiológico palmitoil-CoA (**Figura 58C**). Los segmentos del CoA en las moléculas del inhibidor y la del sustrato se posicionan prácticamente en la misma orientación en el canal del acil-CoA.

Es interesante observar que el grupo carboxilo de la cabeza de la molécula del C75-CoA se posiciona en el espacio correspondiente al sustrato carnitina en el modelo de CPT1A, prácticamente llenándolo. Esto sugiere que el inhibidor puede obstruir la correcta posición de la carnitina. Además, la posición para el grupo carboxilo del C75-CoA es muy similar a la propuesta para el grupo dicarbonilo del malonil-CoA en el sitio A de CPT1A (**Figura 58D**). El efecto inhibitorio sobre CPT1 puede ser explicado en parte, por la presencia de un grupo carboxilo, presente tanto en la molécula de carnitina como del malonil-CoA (**Figura 58E**). Estos grupos carboxílicos estarían posiblemente colocados en un sitio común en el centro activo del enzima.

En resumen, el Docking molecular de C75-CoA en CPT1A indica que se coloca en el mismo bolsillo del sustrato palmitoil-CoA y que además, podría molestar la localización correcta del sustrato carnitina. Estos resultados de Docking molecular confirman los resultados cinéticos de C75-CoA con respecto a ambos sustratos (**ver Resultado, sección 13.6 y 13.7**).

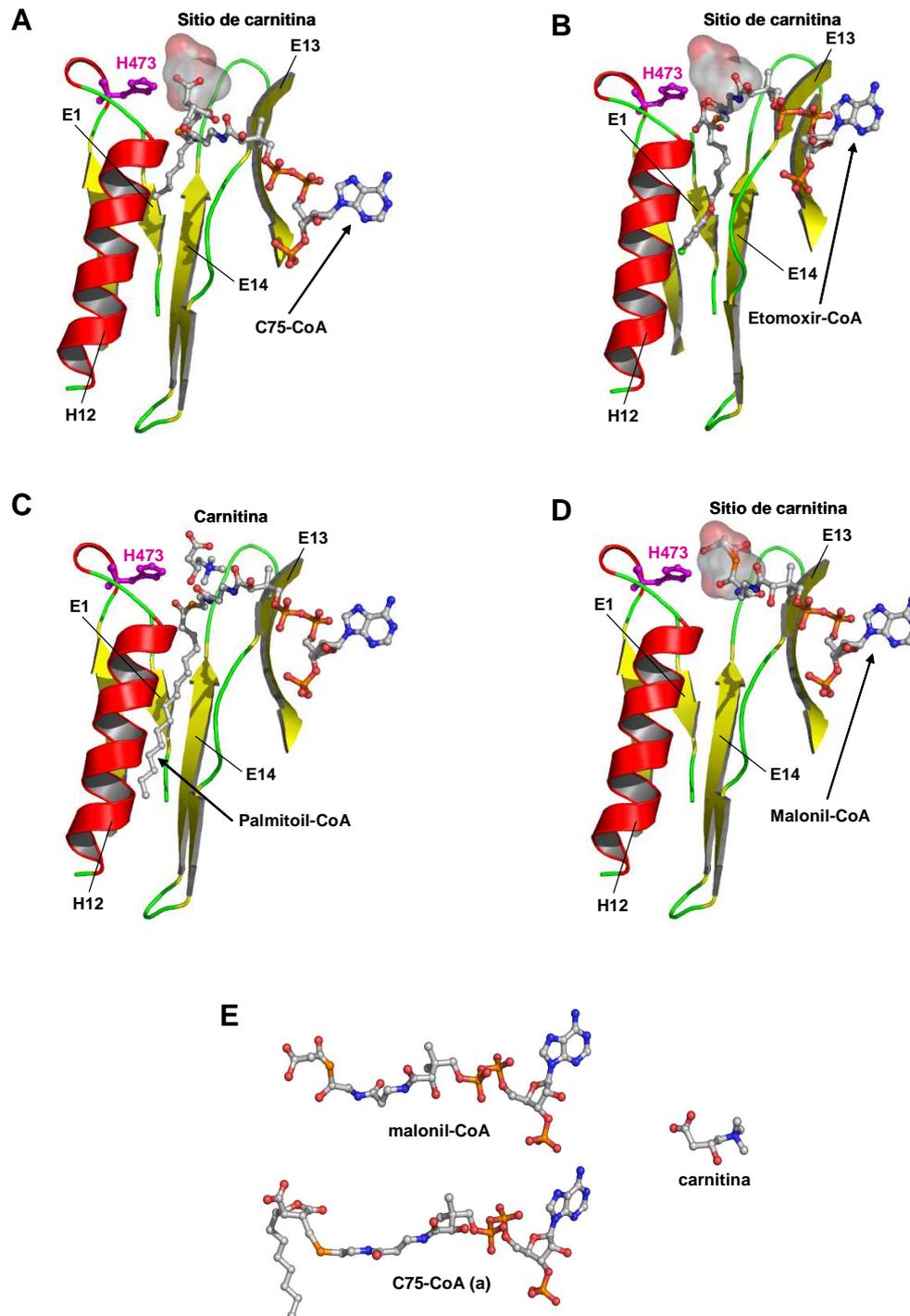


Figura 58. Docking *in silico* del C75-CoA, etomoxir-CoA, palmitoil-CoA y malonil-CoA en el modelo 3-D del centro activo de CPT1A de rata. A) y B) Modelo propuesto para el alojamiento de una molécula de C75-CoA (forma a) o de etomoxir-CoA en el centro activo de CPT1A. Se indican las posiciones del sitio de carnitina y el residuo catalítico His⁴⁷³ (en color lila) y también las estructuras secundarias de los elementos; hélice α 12 y las hojas β 1, β 13 y β 14. El grupo carboxílico del C75-CoA parcialmente llena el volumen correspondiente a la molécula de sustrato carnitina. C) y D) Docking molecular del sustrato palmitoil-CoA en el mismo centro de CPT1A y Docking del malonil-CoA en el "sitio A" de CPT1A mostrando una disposición similar a la del C75-CoA, localizando el grupo dicarbonilo en el lugar de la

carnitina. E) Estructuras moleculares de malonil-CoA, C75-CoA y carnitina, mostrando la disposición similar de sus correspondientes grupos carboxilos. Las representaciones moleculares fueron realizadas usando PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos CA).

18.1 Inhibidores que no son derivados de CoA: Ro 25-0187

Ro 25-0187 es un análogo del malonil-CoA y es un inhibidor potente de la actividad CPT1A ($IC_{50} = 0,2 \mu\text{M}$) mucho más fuerte que malonil-CoA (Kashfi, 1999). La estructura química de este compuesto se detalla en la **Figura 59A**. Ro 25-0187 y malonil-CoA tienen en común la posición de la molécula del azufre. Además, Ro 25-0187 tiene una cadena corta de hidrocarburos unida a un anillo naftaleno que puede actuar como un sustituto lipofílico para el coenzima A. Otro compuesto que carece de coenzima A y que ha sido reportado como inhibidor de CPT1 es HPG (4-hidroxifenilglioxilato) (Cook, 1994).

Con el fin de conocer la ubicación del inhibidor Ro 25-0187 en el enzima CPT1A, hemos generado un modelo de Docking *in silico* con una molécula de Ro 25-0187 y otra de malonil-CoA como referencia. El análisis de Docking mostró que Ro 25-0187 se uniría al sitio O de unión al malonil-CoA en CPT1A (**Figura 59B y 59C**). En estos Docking se conservan las posiciones de los grupos importantes a efectos de reconocimiento ligando-proteína en la zona apical tanto de Ro 25-0187 como del malonil-CoA. Este análisis apoya la idea de que en CPT1 existen dos sitios de unión de inhibidores y que uno de ellos requiere absolutamente la presencia de dos grupos carbonilos como en el caso del malonil-CoA, pero no tiene un requerimiento absoluto para la presencia del CoA (Cook, 1994).

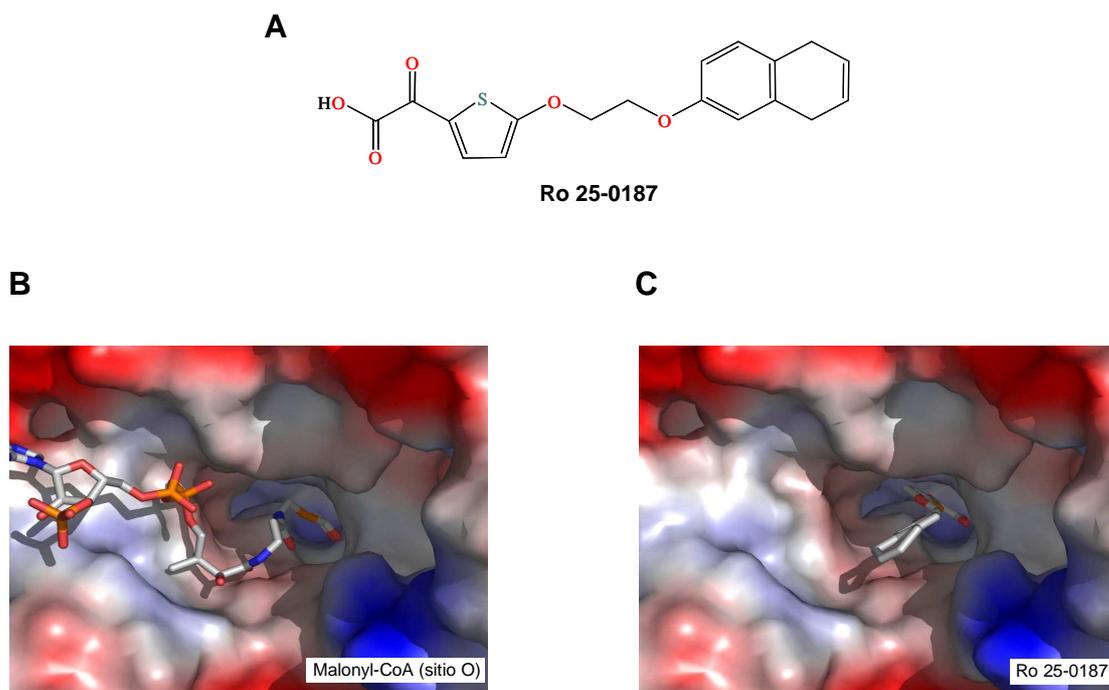


Figura 59: Docking molecular de Ro 25-0187 en CPT1A. A) Estructura química del compuesto Ro 25-0187. B) y C) Representaciones de la superficie electrostática del modelo propuesto para CPT1A de rata en el lado de la entrada del sustrato carnitina. La superficie está coloreada de acuerdo con los potenciales electrostáticos calculados (negativo en rojo y positivo en azul). Se indica en cada caso, el alojamiento de una molécula de malonil-CoA o de Ro 25-0187 en el enzima.

19. ESTUDIO DEL METABOLISMO OXIDATIVO EN CORAZÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS DEFICIENTES DEL ENZIMA ACETIL-CoA CARBOXILASA 2 (ACC2^{-/-})

En el curso de mi tesis realicé una estancia doctoral en el laboratorio del Dr. S. Wakil del departamento de Bioquímica y Biología Molecular del Colegio de Medicina de Baylor, Houston, Tejas, USA. Mi participación en el estudio del metabolismo oxidativo en corazón de animales transgénicos deficientes del enzima acetil-CoA carboxilasa 2 (ACC2^{-/-}) ha contribuido a la publicación de un artículo (Essop, 2008) que se presenta en el apartado **Publicaciones**.

El músculo cardíaco está enriquecido con la isoforma 2 del enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC2) que es un regulador clave del uso mitocondrial de los ácidos grasos vía CPT1. El mutante transgénico de este enzima, el ratón ACC2^{-/-} (MUT) mostró un aumento en niveles de oxidación de los ácidos grasos en el músculo esquelético y una reducción en el contenido de grasa y en el peso corporal (Abu-Elheiga, 2001). Se evaluó la función cardíaca *in vivo* en corazones de animales transgénicos ACC2^{-/-} y se determinaron los niveles de oxidación de sustratos en el miocardio *ex vivo* con el objetivo de probar la hipótesis de que el metabolismo oxidativo en estos corazones está aumentado. Los exámenes ecocardiográficos mostraron que no había diferencia en la función sistólica pero la masa ventricular izquierda de los ratones ACC2^{-/-} se redujo significativamente en un 25% comparado con los ratones salvajes (WT). En corazones de ratones MUT se encontró una reducción en la activación de la diana de la rapamicina en mamíferos, mTOR, y su subsecuente diana, p70S6K. La amortiguación en la señal del mTOR puede causar la reducción de los tamaños de corazón observados en estos ratones. En los corazones de los ratones MUT, los niveles de oxidación exógena del oleato y de la glucosa también aumentaron, asociados con una sostenida función contráctil cardíaca, pero con un tamaño de corazón reducido. Además, la utilización de clamp normoglucémico hiperinsulinémico reveló un aumento del 83% en el consumo de la glucosa en los corazones de estos ratones. Los niveles cardiacos de triglicéridos (TG) se redujeron significativamente en los MUT versus los WT, mientras que el contenido en glucógeno fue similar. Además, en los ratones MUT los niveles de transcritos del PPAR α y sus genes diana, piruvato deshidrogenasa kinasa-4 (PDK-4), malonil-CoA decarboxilasa (MCD) y CPT1B también disminuyeron. La disminución en los niveles de ARNm de CPT1B coincide con los análisis de niveles de expresión de la proteína que también disminuyó en corazón de los ratones MUT con respecto a los WT. En resumen, los corazones de ratones MUT muestran una capacidad para oxidar tanto glucosa como ácidos grasos igual que los ratones WT. Es posible que todo este conjunto

de alteraciones ayuden a mantener una función normal de los corazones de ratones ACC2^{-/-} a pesar de una disminución significativa de su tamaño.

En este trabajo mi participación consistió en analizar la expresión de diferentes genes por la técnica cuantitativa de PCR a tiempo real (qRT-PCR) a partir de ARN total aislado de corazón de ratones MUT y WT. Se analizaron a) genes del metabolismo de los ácidos grasos: PPAR α , un activador transcripcional de varios genes que utilizan los ácidos grasos; CPT1B, el enzima mitocondrial que facilita la translocación de los ácidos grasos; acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD), un enzima representativo de la oxidación de los ácidos grasos; el receptor activador de proliferación peroxisomal (PGC-1 α), un coactivador transcripcional que controla la biogénesis mitocondrial y las rutas metabólicas energéticas de la célula; y b) genes del metabolismo de la glucosa: ambas isoformas de transportadores de glucosa cardíacos GLUT1 y GLUT4 y piruvato deshidrogenasa quinasa 4 (PDK-4), un inhibidor indirecto de la oxidación de la glucosa.

También se procedió al análisis por Western Blot del nivel de expresión de la proteína CPT1B y de ACC en mitocondrias aisladas de corazón de ratones MUT y WT. Se utilizaron anticuerpos específicos de la isoforma muscular de CPT1 cedidos por el Dr. Zammit (Van der Leij, 2002) para la detección de CPT1B y también se utilizó la proteína avidina peroxidasa que detecta los niveles de ACC y también detecta proteínas mitocondriales biotiniladas como la propionil-CoA carboxilasa (PCC), que se expresa igualmente en corazones de ratones WT y MUT.

Los resultados de estos análisis se muestran en la **Tabla 2** y la **Figura 7** del artículo adjuntado en el apartado **Publicaciones**.