



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

DISCUSIÓN

1. UN NUEVO MODELO DE ESTRUCTURA 3-D PARA CPT1

A pesar de los esfuerzos realizados para caracterizar el enzima CPT1, todavía no se conoce su estructura debido, posiblemente, a la dificultad de obtener un cristal apropiado, ya que CPT1 es una proteína integral de membrana. Por ello, en ausencia del cristal de CPT1 son de gran utilidad las herramientas bioinformáticas.

El desarrollo de un modelo estructural completo permitiría predecir la localización del inhibidor fisiológico, malonil-CoA, y su habilidad de interactuar con los sustratos carnitina y palmitoil-CoA. Anteriormente, nuestro grupo propuso un modelo estructural del dominio C-terminal de CPT1 (modelaje de 607 aminoácidos de 773 para CPT1A de rata) basado en el cristal de CrAT de ratón (Morillas, 2004). En el presente estudio se propone un nuevo modelo estructural 3-D *in silico* más afinado. Se han utilizado métodos bioinformáticos que utilizan procedimientos de modelaje por homología basados en alineamientos múltiples de estructuras cristalográficas de las enzimas CPT2 de rata y COT de ratón, las cuales fueron cristalizadas durante la realización de este trabajo. CPT1, CPT2 y COT unen aciles-CoA de distinta longitud. El nuevo modelo 3-D de ambas isoformas de CPT1A y CPT1B de rata, es más refinado que el anterior que utilizaba el enzima CrAT como molde. El modelo incluye la mayor parte de la secuencia de la proteína, 615 aminoácidos de 773 para CPT1A y 612 aminoácidos de 772 para CPT1B. Las posiciones del sustrato carnitina, CoA y el grupo palmitoil del sustrato palmitoil-CoA fueron asignados por superposición y análisis de Docking.

Lo más importante fue observar que CPT1, COT y CPT2 presentan modelos estructurales prácticamente idénticos en su región central, la cual contiene putativamente el lugar catalítico. Independientemente de la localización subcelular del enzima o de la longitud del sustrato acil-CoA que utilizan, parece obvio que las carnitina aciltransferasas conservan un gran parecido en su centro catalítico. Las estructuras modeladas de CPT1A y CPT1B de rata son esencialmente similares a COT. Sin embargo, cabe destacar algunas diferencias, las más significativas son el modelaje para ambas isoformas de CPT1 de dos lazos extra entre la hélice $\alpha 17$ y hoja $\beta 13$ y entre las hojas $\beta 17$ y $\beta 18$ de la estructura de COT que ha servido como molde. Ellos es debido a la presencia de residuos extra en las secuencias de aminoácidos de estas proteínas, lo cuales están ausentes en COT. Como consecuencia de ello, se debe considerar el modelaje de la estructura de estos dos lazos menos exacta que el resto del modelo.

Comparado con otras carnitina aciltransferasas, CPT1 presenta un dominio N-terminal de 160 residuos. Este dominio contiene un segmento citosólico de 47 aminoácidos y dos regiones transmembrana. Al igual que el dominio C-terminal, el dominio N-terminal se proyecta hacia el citosol. El dominio amino terminal está ausente en CPT2, COT o CrAT. Por ello, no se ha podido modelar utilizando los critales de CPT2 y COT que carecen de esta región. Existen en la literatura numerosas publicaciones incidiendo en la importancia del contacto entre los dos dominios N- y C-terminal de ambas isoformas de CPT1 en la actividad y la sensibilidad hacia malonil-CoA. La importancia de dicha interacción ha sido observada por estudios de quimeras (Cohen, 1998; Jackson, 2000a), por delección (Brown, 1994a; Shi, 1998; Shi, 1999; Jackson, 2000b; Dai, 2003; Shi, 2000), por mutación de residuos (Swanson, 1998; Jackson, 2001; Zhu, 2003), por adición de secuencias (Borthwick, 2006) y también por cambios físico-químicos (Faye, 2005). Nuestro grupo ha reportado por primera vez un modelo 3-D parcial del dominio N-terminal de CPT1A de rata. Este modelo carece de los 9 primeros aminoácidos. Dicho modelo se obtuvo basándose en la búsqueda de estructuras 3-D homólogas a la secuencia de este dominio utilizando comparaciones en PSI-BLAST dirigido contra la base de datos SCOP de clasificación de proteínas (López-Viñas, 2007). El mejor candidato fue la estructura 3-D del factor de transcripción IIIA de *Xenopus laevis* (código PDB, 1TF3). El Docking entre la zona N-terminal y C-terminal ha ampliado y mejorado la estructura 3-D y ha permitido una mejor resolución del Docking del malonil-CoA. En la **Figura 1** se muestra la dicha interacción entre ambos dominios N- y C-terminal de la proteína y también la unión del inhibidor malonil-CoA al enzima.

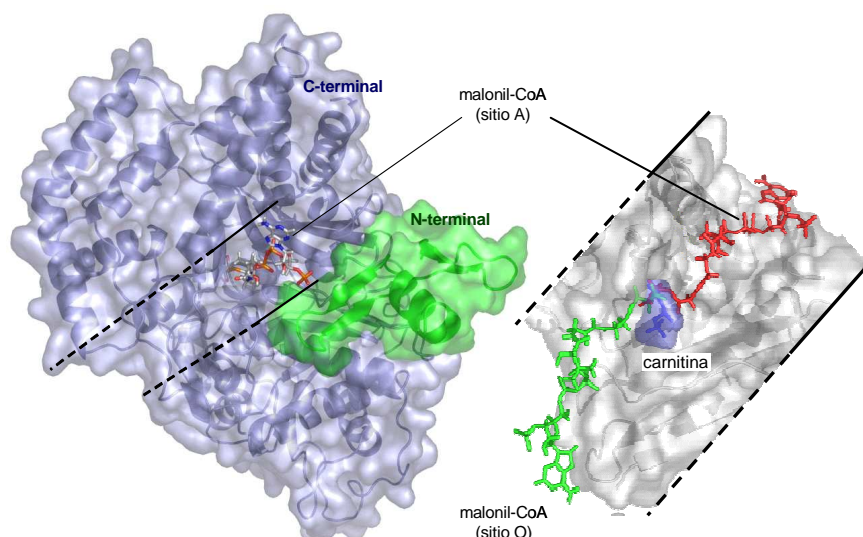


Figura 1: Modelo estructural de interacción entre los dominios N- y C-terminal de CPT1A y localización de los sitios de unión de malonil-CoA en el enzima. Utilizando procedimientos de Doking *in silico* para predecir la interacción proteína-proteína y proteína-ligando, un putativo complejo entre los dominios N- (verde) y C-terminal (azul) de CPT1A humana fue utilizado para predecir un sitio de unión de malonil-CoA en la cavidad del sustrato acil-CoA de la molécula. Se representa una sección longitudinal del canal catalítico con una línea (negro, continua y discontinua) para mostrar en detalle las putativas posiciones e interacciones de las moléculas del inhibidor y del sustrato carnitina. Las representaciones de la proteína fueron tomadas de López-Viñas (López-Viñas, 2007) con algunas modificaciones y fueron realizadas utilizando el programa PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos CA).

2. VALIDACIÓN DEL MODELO 3-D DE CPT1A

Se ha confirmado la validez del nuevo modelo de CPT1A de rata mediante la localización de varios aminoácidos descritos en la literatura y que son importantes para la actividad enzimática y mantenimiento de una estructura funcional como: 1) los implicados en la catálisis: His⁴⁷³ y Asp⁴⁷⁷, 2) en la unión del sustrato carnitina y/o en el mantenimiento de una conformación correcta del enzima: Arg⁶⁵⁵, Thr⁶⁰², Tyr⁵⁸⁹, Thr⁶⁸⁶ y Ser⁶⁸⁷, 3) en la interacción o estabilización del grupo pantoténico del CoA del palmitoil-CoA: Asp⁵⁶⁷, Glu⁵⁹⁰, Lys⁴⁵⁵ y Lys⁵⁶⁰ y finalmente, en la conformación del bolsillo hidrofóbico para el posicionamiento de la cadena carbonada del acil-CoA.

2.1 El inhibidor malonil-CoA se une al enzima CPT1A en dos sitios opuestos

Durante mucho tiempo se han realizado numerosos estudios para poder determinar los dominios de CPT1 a los que se une malonil-CoA, sin embargo su localización, hasta

la realización de este trabajo, era totalmente desconocida. Aquí, se presenta por primera vez mediante metodología de Docking la putativa localización del malonil-CoA en el modelo 3-D del enzima CPT1A humana. Los análisis de Docking predicen la localización del inhibidor en dos sitios distintos en el canal catalítico. Uno, llamado sitio A, que está próximo a la zona de interacción entre los dominios N- y C-terminal de la proteína (**Figura 1**). Este sitio está situado en el lado de entrada del sustrato acil-CoA e implica residuos de ambos dominios de la proteína en la unión del inhibidor. En cuanto al segundo sitio de localización del malonil-CoA llamado sitio O, está situado en el extremo opuesto del canal catalítico (López-Viñas, 2007).

Varios autores habían descrito anteriormente la existencia de dos sitios de unión del inhibidor malonil-CoA en CPT1, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad (Cook, 1994; Zammit, 1984a, 1984b; Bird, 1984; Bird, 1985; Shi, 1999; Shi, 2000), pero hasta ahora ningún modelo estructural ha puesto en evidencia este resultado. Del modelo propuesto para la localización del malonil-CoA en el sitio A se puede deducir que no es posible la colocación simultánea del acil-CoA y del inhibidor, ya que se superponen en el espacio (López-Viñas, 2007). Por tanto, el efecto inhibitor del malonil-CoA en la actividad CPT1 se debería a que su unión en este dominio impediría la entrada del acil-CoA al canal catalítico. Estos datos se ven apoyados por un estudio en que se observó que el sustrato palmitoil-CoA desplaza la unión del [¹⁴C]malonil-CoA unido a su sitio de baja afinidad en mitocondrias de hígado de rata, lo cual sugiere que el sitio regulador de unión del malonil-CoA con una baja afinidad correspondería al sitio de unión de aciles-CoA (Grantham, 1986). Además, se ha demostrado que los endobióticos naturales como CoA-SH, acetil-CoA y propionil-CoA inhiben la actividad CPT1 ligándose al sitio del acil-CoA (Kashfi, 1999). De todo ello se deduce que el sitio A de unión del malonil-CoA correspondería a aquellas moléculas que necesitan el coenzima A para ligarse. Dicho CoA favorecería el alojamiento de sus mitades ácidas en sus posiciones finales.

El segundo sitio de unión del malonil-CoA, sitio O, podría corresponder a un sitio de unión exclusivo para el inhibidor propuesto por Grantham y sus colaboradores (Grantham, 1986). En este lugar, la interacción del malonil-CoA con el enzima dependería más del grupo dicarbonilo (estructuras de CO-CH₂-CO o CO-CO) que de las interacciones del CoA en sí mismo con los aminoácidos próximos. En este sentido, Cook y sus colaboradores (Kashfi, 1999) mostraron que las moléculas con una estructura dicarbonílica (entre ellas, 4-hidroxifenilglioxilato y Ro 25-0187) inhiben de forma variable la actividad CPT1, ligándose a este sitio específico de unión del malonil-CoA, que es completamente diferente del sitio de unión del acil-CoA. Nuestros estudios

de Docking *in silico* realizados con Ro 25-0187 en nuestro modelo de CPT1A, están de acuerdo con los estudios de Cook y muestran que este compuesto tiene una preferencia significativa, en términos de estabilización de energía, por el sitio O respecto al sitio A. Otros compuestos considerados inhibidores débiles y que contienen estructuras dicarbonílica y también CoA, como succinil-CoA y metilmalonil-CoA (Kashfi, 1994) interactúan con este segundo sitio de unión del inhibidor malonil-CoA. Se cree que la parte del CoA de estas moléculas podría aumentar la potencia de su inhibición. Sin embargo, los inhibidores de alta potencia como Ro 25-0187 no necesitan estar en forma de éster de CoA para ejercer su inhibición, sugiriendo que la estructura dicarbonílica es la responsable de sus efectos inhibidores.

Los resultados cinéticos también apoyan el modelo *in silico* y los dos posibles sitios de unión del malonil-CoA situados a lo largo del túnel catalítico, desde el bolsillo de la carnitina donde está la His⁴⁷³ catalítica, hacia la superficie distal opuesta de CPT1. El modelo de Docking del malonil-CoA en el sitio A muestra la existencia de interacciones polares entre los residuos conservados Tyr²⁴¹, His⁴⁷³, Asp⁴⁷⁷, Ala⁴⁷⁸, Tyr⁵⁸⁹, Thr⁶⁰², Ser⁶⁸⁵ y Ser⁶⁸⁷ y el sitio de unión de la carnitina. El residuo catalítico His⁴⁷³ (Morillas, 2001) entraría en contacto con el grupo carboxilo de malonil-CoA, sugiriendo una posible interacción electrostática entre ellos. Otras interacciones polares entre los átomos de oxígeno del grupo carboxílico del malonil-CoA y CPT1A incluyen los grupos hidroxilos de Tyr²⁴¹, Tyr⁵⁸⁹ y Thr⁶⁰². La mayoría de los residuos en el bolsillo de la carnitina son compartidos por ambos sitios A y O.

En este estudio, el análisis funcional de los dos sitios de unión del malonil-CoA a CPT1A fue realizado por la localización en el modelo estructural de varios residuos descritos en la bibliografía como implicados en la sensibilidad a malonil-CoA y también por mutagénesis dirigida de residuos que definen el canal de unión del malonil-CoA en el modelo, y que están putativamente relacionados con su unión. Así, la unión del malonil-CoA en el sitio A y la implicación del dominio N-terminal en esta unión, fue confirmada por análisis mutacional de residuos Glu²⁶ (en N-terminal) y Lys⁵⁶¹ (en C-terminal) de CPT1A de rata realizados por nuestro grupo. Estas mutaciones alteran el reconocimiento mutuo de las interacciones de superficies entre N- y C-terminal (López-Viñas, 2007).

En cuanto a la unión del malonil-CoA en el sitio O, se comprobó mediante la mutación de los residuos Arg²⁴³ y Trp⁶⁸² que están completamente conservados en ambas isoformas de CPT1. El modelo de Docking muestra que la cadena lateral del residuo Arg²⁴³ se encuentra a menos de 4 Å de la molécula del malonil-CoA y está

expuesta al solvente lejos del centro catalítico ocupado por la carnitina. Este residuo establecería interacciones polares con la parte CoA del malonil-CoA, supuestamente por el grupo hidroxilo del fragmento pantoténico del inhibidor. La mutación de Arg²⁴³ a Thr presente en CPT2, enzima insensible al malonil-CoA, no afectó la actividad CPT1 pero disminuyó ligeramente la sensibilidad del enzima frente a malonil-CoA, apoyando así la posición de este sitio O. La alteración del volumen del residuo Trp⁶⁸² en esta posición por uno más pequeño, Ala en CPT2, afectó a la actividad del enzima lo que indica que probablemente este residuo este implicado en la estabilidad de la proteína y/o al complejo enzima-sustrato. Las mutaciones que provocan enfermedades en CPT1A pueden ser divididas groseramente en dos categorías según si afectan directamente (determinante funcional) o indirectamente el sitio activo del enzima (determinante estructural) (Gobin, 2003). La Trp⁶⁸² pertenece claramente a la segunda clase ya que se encuentra a más de 8 Å del sitio activo del enzima.

Otro residuo, Ala⁴⁷⁸, ha sido relacionado con la sensibilidad a malonil-CoA en CPT1A de rata (Morillas, 2003). En nuestro modelo estructural este residuo está localizado en el sitio catalítico del enzima, en el bolsillo de la carnitina y en contacto con ambas posiciones del malonil-CoA. El doble mutante CPT1A R243T/A478G era menos sensible a malonil-CoA que los simples mutantes. Esto podría deberse a la suma de las interacciones específicas de cada residuo con el inhibidor, ya que estos residuos están lejos el uno del otro en el túnel catalítico. La diferencia en la composición de los aminoácidos alrededor de los sitios A y O indica que malonil-CoA podría establecer una red diferente de interacciones polares y no polares con una diferente estabilidad de unión dependiendo del sitio al que se une. Sin embargo, aunque los detalles mecánicos de su papel en el centro activo del enzima permanece indefinido, un solo residuo hidrofóbico Met⁵⁹³ conservado en todas las carnitina aciltransferasas susceptibles a la inhibición por malonil-CoA, es esencial para la sensibilidad al malonil-CoA (Morillas, 2003). En el modelo de CPT1, este residuo se sitúa en el bolsillo de la carnitina a menos de 4 Å de la molécula del malonil-CoA en el sitio A. Parece que cualquier cambio en esta posición, ya sea por residuos pequeños como Ser, Ala y Glu (Morillas, 2003) o voluminosos como Lys y Arg, o por doble mutación involucrando este residuo (CPT1A R243T/M593S y CPT1A A478G/M593S), altera la unión del inhibidor y confiere al enzima una insensibilidad total hacia el inhibidor fisiológico malonil-CoA e incluso hacia el propio CoA. Los resultados obtenidos con estos mutantes confirman el papel de estos residuos y apoyan las putativas localizaciones de ambas moléculas de malonil-CoA.

La mutación de Cys⁶⁰⁸ provoca una disminución en la sensibilidad de CPT1A hacia malonil-CoA y un incremento en la afinidad del sustrato carnitina. Este efecto no se puede explicar por la posición que ocupa este residuo en el actual modelo de CPT1. La Cys⁶⁰⁸ está localizada cerca del sitio A a una distancia del grupo CoA del malonil-CoA de 13,82 Å y de la carnitina de 14,71 Å. Sin embargo, está localizada en un lazo que une la hoja β 16 y la hélice α 20 y por tratarse de una zona poco estructurada, posiblemente su posición real respecto al malonil-CoA sea más cercana de la predicha por el modelo estructural de CPT1A.

2.2 Malonil-CoA y carnitina compiten por su unión en el centro activo del enzima

Malonil-CoA es un inhibidor competitivo de CPT1 con respecto al sustrato palmitoil-CoA (Grantham, 1986) y presenta otro tipo de interacción con el segundo sustrato, la carnitina. Para determinar que tipo de interacción existe entre malonil-CoA y carnitina, hemos analizado los datos de varios autores que estudiaron las IC_{50} para malonil-CoA y K_m de carnitina bajo diferentes condiciones y con ello, hemos encontrado una fórmula que los relaciona. Es relevante destacar que a pesar de la amplia variedad de las fuentes de datos, la relación entre $\log IC_{50}$ de la inhibición por malonil-CoA y $\log K_m$ de la carnitina es lineal y la pendiente es esencialmente la misma en todas las situaciones analizadas (variedad de valores entre -1,37 y -1,65, con un valor medio de -1,49). Los datos cinéticos indican que malonil-CoA interfiere con la unión de la carnitina y que sus sitios respectivos de unión están muy próximos. Además, los experimentos cinéticos y de inhibición realizados en este estudio confirman esta hipótesis. Así, en extractos de levadura expresando CPT1A salvaje de rata, un aumento de concentración de carnitina produce un aumento de los valores de IC_{50} para malonil-CoA. Así mismo, cuando se realizaron experimentos cinéticos variando las concentraciones de carnitina a varias concentraciones fijas de malonil-CoA, se obtuvo una cinética de Michaelis-Menten hiperbólica en la cual el valor aparente de K_m para la carnitina aumentaba a cada concentración progresiva de malonil-CoA. Sin embargo, esta relación (valor de IC_{50} alto, valor de K_m para carnitina bajo y viceversa) no se aplica a los enzimas CPT1A y CPT1B de cerdo. CPT1A de cerdo es una quimera natural que presenta un valor de IC_{50} bajo para malonil-CoA (más sensible) cuando se compara con CPT1A de rata, pero todavía mantiene un valor bajo de K_m para el sustrato carnitina, una característica de las enzimas CPT1A (Nicot, 2001; Relat, 2004). Por el contrario, CPT1B de cerdo cuando se compara con CPT1B humana se comporta como un enzima CPT1A, con un valor de IC_{50} alto para malonil-CoA (menos sensible) y un valor de K_m para carnitina bajo (Relat, 2004; Relat, 2008).

2.3 ¿Qué estequiometría guardan CPT1 y malonil-CoA?

Nuestros resultados indican que las dos moléculas de malonil-CoA compiten por el mismo espacio dentro del sitio catalítico. Esto sugiere una estequiometría funcional 1:1 entre malonil-CoA y CPT1A. Por otra parte, una estequiometría 2:1 implicaría en nuestro estudio cinético la formación de un supuesto complejo EI_2 y eso daría un patrón de líneas rectas que no se cruzarían en el mismo punto en la representación de los dobles recíprocos (representación de Lineweaver-Burk) y cuya representación secundaria (pendientes versus [I]) produciría una línea parabólica. Dado que estos gráficos no han sido obtenidos en nuestro estudio, se sugiere que la interacción sigue una estequiometría 1:1 malonil-CoA/CPT1A.

Hasta ahora, ningún mecanismo de estequiometría cuantitativo ha sido descrito en la literatura. Sin embargo, varios estudios bioquímicos han mostrado que malonil-CoA se une a dos sitios, uno de alta y otro de baja afinidad. Las representaciones de Scatchard de unión del [^{14}C]malonil-CoA en la isoforma hepática de CPT1 claramente muestran que hay dos sitios de unión del malonil-CoA que son cinéticamente distintos (Bird, 1984; Grantham, 1986; Zammit, 1985). Sin embargo, Kolodziej y Zammit (Kolodziej, 1990) reevaluaron la interacción del malonil-CoA con el sistema CPT1 mitocondrial de hígado de rata, utilizando membranas mitocondriales purificadas. De las representaciones de Scatchard, estos autores concluyeron que la unión del malonil-CoA fue en gran parte explicada por la presencia de un solo componente de alta afinidad para CPT1, en contraste con el sitio dual previamente reportado en mitocondrias intactas. Los autores de este trabajo sugirieron que la unión de baja afinidad observada con mitocondrias intactas de hígado de rata puede ser independiente del sistema CPT1 y que podría estar relacionado con otras proteínas presentes en el espacio intermembrana, o con la membrana interna, así como con otras estructuras que contaminan las muestras de extractos crudos de mitocondrias (peroxisomas y microsomas). Todo ello sugiere una estequiometría malonil-CoA-CPT1A de 1:1. Además, un estudio realizado por Cook y sus colaboradores (Cook, 1994) de inhibición de CPT1A con los inhibidores, malonil-CoA y CoA, demostró que cada uno de estos inhibidores se une a un sitio diferente, de lo cual se podía deducir que la estequiometría de CPT1/malonil-CoA/CoA podía ser de 1:1:1. Esta observación apoyaría nuestro modelo 3-D ya que el CoA libre podría unirse libremente al sitio A sin impedir la unión simultánea del malonil-CoA en el sitio O. Además, nuestro modelo 3-D permite la unión de una molécula de malonil-CoA en el sitio O simultáneamente con la unión del palmitoil-CoA en el sitio A. Esta observación también estaría apoyada por los datos aportados por Kolodziej (Kolodziej, 1990) que mostró que la presencia de concentraciones saturables de palmitoil-CoA en el ensayo no

tenían ningún efecto en la capacidad máxima de unión del [¹⁴C]malonil-CoA en mitocondrias de hígado de rata. En este caso, la estequiometría de CPT1A/malonil-CoA/palmitoil-CoA sería de 1:1:1. En un estudio diferente, Zammit y sus colaboradores (Zammit, 1985; Kolodziej, 1990) también sugirieron que la temperatura podría modificar la fluidez de la membrana y como consecuencia, la estructura terciaria de CPT1 podría estar modificada de tal modo que pudiera aceptar, en ciertas circunstancias, la unión de la segunda molécula del malonil-CoA en el sitio de unión de baja afinidad, sitio A.

De los datos cinéticos presentados concluimos que sólo uno de los dos sitios de inhibición es competitivo con respecto al sustrato carnitina, y que los dos sitios de unión tienen diferente afinidad para malonil-CoA tal como se ha deducido del valor de γ obtenido. Hay dos posibles explicaciones de los datos cinéticos: 1) los dos sitios de unión para malonil-CoA son mutuamente excluyentes y el inhibidor se uniría al enzima con una afinidad diferente para cada uno de ellos; 2) la unión del malonil-CoA a un sitio excluye la unión del sustrato, pero la unión de malonil-CoA al segundo sitio sería posible sólo si el sustrato carnitina está ya unido (Segel, 1993). Con los datos que hemos analizado en este estudio, no estamos todavía en posición de decidir que modelo será el más exacto.

3. VALIDACIÓN DEL MODELO 3-D DE CPT1B

3.1 His⁴⁷³ Y Asp⁴⁷⁷ en CPT1B juegan un papel crucial en la catálisis

Las carnitina aciltransferasas parecen compartir un mecanismo común de transesterificación. En general se ha aceptado que un residuo de histidina muy conservado es esencial para la catálisis en todos los miembros de la familia de carnitina/colina aciltransferasas. Cuando la dirección de la reacción implica la formación de la acilcarnitina, esta histidina crítica actúa como una base general para extraer el protón del grupo 3-hidroxilo de la L-carnitina. En CPT1B de rata el residuo implicado en este proceso es la His⁴⁷³. El mutante H473A fue expresado en *S. cerevisiae* y el hecho de que esta mutación implique una total abolición de la actividad catalítica apoya su papel en el centro catalítico.

También se ha postulado que un residuo de aspartato está involucrado en la catálisis, sugiriendo que el mecanismo de catálisis ocurre a través de una triada catalítica similar al de las serin-proteasas (Brown, 1994b). En la estructura cristalográfica de CrAT humana (Wu, 2003) un glutámico conservado, Glu³⁴⁷ (Asp⁴⁷⁷ en CPT1B de rata),

interactúa con la histidina catalítica. La mutación de Asp⁴⁷⁷ a Ala en CPT1B de rata (mutante D477A) abolió la actividad enzimática igual que ocurre con la mutación del residuo en esta posición en las enzimas CPT2, CPT1A y CrAT (Brown, 1994b; Morillas, 2004; Cordente, 2004). Por lo tanto, Asp⁴⁷⁷ junto con His⁴⁷³ pueden estar involucrados directamente en la catálisis. Probablemente, Asp⁴⁷⁷ potencia la actividad catalítica de His⁴⁷³ y también estabiliza la carga positiva que se genera en el anillo de la histidina después de la desprotonización del grupo hidroxilo de la carnitina (Wu, 2003). La desprotonización de la carnitina facilita el ataque nucleofílico del oxianión resultante sobre el grupo carbonilo del tioéster del acil-CoA, resultando la formación de un intermediario tetraédrico. En el sitio activo, el segundo residuo serina Ser⁶⁸⁷ del conservado tripéptido STS, parece que ayuda a estabilizar el intermediario oxianión cargado negativamente. Así, nuestros resultados experimentales con los mutantes de His⁴⁷³ y Asp⁴⁷⁷ junto con los descritos por nuestro grupo en cuanto al posible papel del tripéptido STS (Morillas, 2004), apoyan la hipótesis de que CPT1B así como otras carnitina aciltransferasas (Brown, 1994b; Jogl, 2003; Wu, 2003) parecen utilizar más bien una díada catalítica de His-Glu/Asp que una triada para su mecanismo de catálisis. Mientras que el estado de transición estaría estabilizado por un residuo de Ser.

3.2 Especificidad por el acil-CoA y unión de la carnitina en CPT1B

El conocimiento de cuales son los aminoácidos requeridos para el correcto alojamiento de los sustratos es esencial para conocer el mecanismo de catálisis de estas enzimas y también para el diseño de posibles fármacos. La especificidad por el sustrato acil-CoA viene dada por la longitud de la cavidad donde se aloja el acil-CoA y por las interacciones con los aminoácidos del entorno. Teniendo en cuenta la información estructural del cristal de COT de ratón y CrAT de rata (Jogl, 2004; Jogl, 2003) hemos intentado rediseñar la especificidad del sustrato palmitoil-CoA en CPT1B de rata para usar aciles-CoA de cadena media o corta.

El residuo descrito en el cristal de CrAT de ratón como posible candidato para el alojamiento del sustrato acil-CoA (Met⁵⁶⁴) corresponde al residuo Gly⁷¹⁰ en CPT1. El análisis de estructura de ambas isoformas de CPT1 humana muestra que este residuo forma parte de un trío de glicinas, las cuales están localizadas cerca del sitio activo del enzima y a la salida de la hoja β 14 que esta muy conservada en las distintas carnitina aciltransferasas (**Figura 28, apartado Resultados**). Nuestro razonamiento fue que al mutagenizar los tres residuos consecutivos de glicina por los presentes en COT o en CrAT, conseguiríamos cambiar la especificidad del sustrato palmitoil-CoA de CPT1B de rata por el de aciles-CoA de cadena media o corta. Por ello, generamos los dos triples

mutantes CPT1B-CrAT (cambio de ⁷⁰⁹GGG por ⁵⁶³VMF) y CPT1B-COT (cambio de ⁷⁰⁹GGG por ⁵⁵²QGV). El cambio de estas glicinas conduce en ambos mutantes a la introducción de grupos voluminosos en el canal hidrofóbico del enzima y como consecuencia, su estrechamiento, lo que impide la entrada del palmitoil-CoA. En teoría dicho estrechamiento podría favorecer la entrada de aciles-CoA de cadena media o corta. Los resultados de actividad enzimática muestran que CPT1B mutada pierde la capacidad de metabolizar aciles-CoA de cadena larga. El enzima mutado tampoco es capaz de transformar los aciles-CoA de cadena media o corta en sus derivados acilcarnitina. Así, la pérdida total de actividad enzimática en los mutantes de glicina de CPT1B puede ser explicada por sus posiciones estratégicas en el alojamiento de cualquier acil-CoA sea cual sea la longitud de su cadena. Estos resultados demuestran que en las diferencias estructurales entre CrAT/COT y CPT1B subyacen las bases para la especificidad cinética de estas enzimas. De los estudios de modelaje estructural por Docking estas tres glicinas están formando parte de estructuras secundarias en forma de lazo que no están presentes en CrAT y que pueden formar interacciones adicionales con el dominio catalítico. Una mejor exploración funcional de estos elementos estructurales secundarios de CPT1 requiere una estructura cristalográfica específica para cada una de las isoformas de CPT1A y CPT1B.

Así, los tres residuos pequeños de glicina en CPT1B de rata son esenciales para la conformación estructural del bolsillo hidrofóbico y el resultado de la actividad enzimática obtenido está de acuerdo con las mutaciones humanas de Gly⁷⁰⁹ y Gly⁷¹⁰ en CPT1A (Prip-Buus, 2001; Gobin, 2003). En el estudio de Gobin y sus colaboradores, se demostró que las mutaciones causantes de deficiencias humanas de CPT1A se podían dividir en dos categorías dependiendo si los residuos afectaban directamente (determinante funcional) o indirectamente el sitio activo del enzima (determinante estructural) y que las mutaciones de Gly⁷⁰⁹ y Gly⁷¹⁰ pertenecían a la primera categoría. Además, estas glicinas parecían no afectar la señal de dirección hacia las mitocondrias, ni la estabilidad del enzima mutado y contribuían también a la base estructural para la selectividad de aciles-CoA de cadena larga (Jogl, 2003). Además, los estudios cinéticos de este autor mostraban que dichos mutantes son totalmente inactivos (Gobin, 2003).

Por otro lado, es importante conocer cuales son los aminoácidos que estabilizan el posicionamiento de la carnitina en el enzima CPT1B. Teniendo en cuenta la información estructural del cristal de colina acetiltransferasa (ChAT) de rata (Cai, 2004; Govindasamy, 2004) y los estudios de mutagénesis dirigida realizados en los enzimas COT y ChAT de la misma familia de CPT1 (Cronin 1997a; Cronin, 1998), intentamos

rediseñar la especificidad de CPT1B de rata para usar colina como sustrato aceptor del grupo palmitoil en vez de su sustrato natural, la carnitina.

En nuestros estudios dirigidos a cambiar la especificidad del sustrato carnitina por colina en CPT1B de rata, hemos demostrado que la Arg⁶⁵⁵ tiene un papel relevante al unir la carnitina ya que forma un puente salino con el grupo carboxílico de este sustrato. El mutante R655N pierde completamente la actividad enzimática por rotura de esta interacción. Este resultado está en concordancia con lo obtenido por Cronin (Cronin, 1997a) con el enzima COT de buey. Además del simple mutante CPT1B R655N, preparamos el triple mutante CPT1B TET602VDN y el cuádruple mutante CPT1B R655N/TET602VDN que incorporan las sustituciones que Cronin (Cronin, 1998) realizó con éxito en las coordenadas de ChAT de rata, permitiendo a ChAT acomodar el sustrato carnitina en vez de la colina. Se esperaba que el cuádruple mutante de CPT1B eliminara la mayor parte de las interacciones entre CPT1B y el grupo carboxilato de la carnitina. Los resultados observados de pérdida de actividad del enzima CPT1B mutada cuando se utiliza el sustrato natural del enzima, la carnitina, corroboran los observados por Cronin (Cronin, 1997a; Cronin, 1998). Sin embargo, no se obtuvo una mayor actividad enzimática cuando el sustrato era la colina, probablemente debido a que el volumen del sitio catalítico de CPT1B mutada seguía siendo muy amplio para una correcta acomodación de la molécula de la colina. Por lo tanto no se pudo cambiar la especificidad del sustrato carnitina por colina en CPT1B de rata.

El hecho de que no hayamos podido cambiar la especificidad de ninguno de los sustratos naturales carnitina o palmitoil-CoA en CPT1B de rata, puede ser debido a que esta proteína está muy especializada respecto a sus sustratos naturales y que ello no sea posible o bien se necesite el cambio de otros residuos para rediseñar la especificidad de ambos sustratos.

3.3 Aminoácidos implicados en la sensibilidad a malonil-CoA en CPT1B

Conocer los sitios de interacción del malonil-CoA con CPT1 es importante en el diseño de nuevos fármacos para prevenir la obesidad, el desarrollo de diabetes mellitus y enfermedades coronarias (Prentki, 1996; Anderson, 1998; Bitar, 2001; Giannesi, 2001). Al iniciar nuestros estudios, algunas aportaciones a la literatura habían sugerido que la interacción del malonil-CoA con CPT1 ocurría en dominios que contenían residuos de histidina, ya que un descenso en el pH entre 8 y 6 producía un aumento en la afinidad por el inhibidor. El estudio realizado por nuestro grupo en relación a las dos putativas histidinas en CPT1A de rata (His¹³¹ y His³⁴⁰ en COT y His²⁷⁷ y His⁴⁸³ en

CPT1A) responsables de la inhibición por malonil-CoA fue apoyado por un lado, por el análisis de secuencias proteicas, lo cual reveló la presencia de estos residuos en las carnitina aciltransferasas inhibibles por malonil-CoA y ausentes en las no inhibibles, y por otro lado, por el modelo estructural del dominio C-terminal de CPT1A de rata propuesto en aquel momento, y que estaba basado en el cristal del monómero de la enoil-CoA hidratasa (PDB 2dub), enzima homohexamérico, localizado en la matriz mitocondrial, que cataliza la segunda reacción de la β -oxidación de ácidos grasos mitocondriales (Morillas, 2000; Morillas, 2002). Efectivamente, en ese modelo las dos histidinas estaban cerca del canal de unión del inhibidor. En las coordenadas de CPT1B de rata, estos residuos corresponden a las histidinas His²⁷⁹ y His⁴⁸³. En el nuevo modelo de Docking del malonil-CoA en CPT1B de rata basado en las informaciones cristalográficas de CPT2 y COT, solo el residuo His²⁷⁹ localizado en la hélice α 9 queda lejos del canal de unión del malonil-CoA. En cuanto a la His⁴⁸³ se localiza en la hélice α 17, cerca del sitio A de unión del malonil-CoA. Sin embargo, al igual que en CPT1A de rata, los resultados cinéticos de inhibición del enzima CPT1B mutado en estos residuos indican que estas histidinas no tienen ningún efecto en la sensibilidad a malonil-CoA en las condiciones ensayadas.

Otro aminoácido presente en las carnitina aciltransferasas inhibibles por malonil-CoA y ausente en las no inhibibles es la Met⁵⁹³ en CPT1B de rata. Los resultados obtenidos con el mutante CPT1B M593S demuestran que este residuo tiene un papel crucial en la inhibición por malonil-CoA y que no afecta a la afinidad del enzima hacia sus sustratos carnitina y palmitoil-CoA. El efecto de esta mutación es importante ya que el valor de IC₅₀ para malonil-CoA aumenta más de 23 veces respecto al enzima sin mutar, lo que confirma la implicación de este residuo en la acción del inhibidor. Este valor de IC₅₀ es parecido al obtenido previamente por nuestro grupo para CPT1A de rata (Morillas, 2003). El mutante de CPT1B en el residuo de Met⁵⁹³, dominante negativo de CPT1 respecto al efecto del malonil-CoA, permitirá la realización de nuevos estudios en músculo con el fin de determinar si la desregulación de la β -oxidación de ácidos grasos en la mitocondria puede revertir la resistencia a la insulina mediada por niveles altos de ácidos grasos.

Además, el mutante natural humano P479L (Brown, 2001) que afectaba la sensibilidad del enzima hacia malonil-CoA pero no a la actividad enzimática se localiza en frente de la Met⁵⁹³ en el modelo 3-D de CPT1B de rata lo que corrobora la correcta posición del malonil-CoA cerca del centro catalítico tal como se ha visto por los estudios de Docking. Además, esto viene confirmado por los estudios de Grantham

(Grantham, 1986) que demostraba que al bloquear el centro activo del enzima CPT1 no se impedía la unión del inhibidor.

En conjunto, los resultados obtenidos aportan nuevos datos sobre las bases estructurales sobre los que se asientan las interacciones entre los sustratos carnitina y palmitoil-CoA, el inhibidor fisiológico malonil-CoA y la proteína.

4. EFECTO DEL C75 SOBRE AMBAS ISOFORMAS DE CPT1

El exceso de peso corporal es un problema de salud importante en los países desarrollados y está asociado a un riesgo significativo de diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares y una mortalidad creciente. La magnitud de este problema de salud y las limitaciones de la terapia de reducción de peso acentúa la necesidad de diferentes aproximaciones para controlar el peso. Cerulenina, un compuesto natural que inhibe la actividad FAS, reduce fuertemente y reversiblemente el peso corporal (Loftus, 2000) y ha supuesto una nueva esperanza a aquellos que necesitan una terapia eficaz para la obesidad. Numerosos trabajos han sido realizados para entender los mecanismos de reducción de peso provocados por los inhibidores de FAS. En este sentido, C75, un inhibidor sintético estable de FAS basado en la estructura de cerulenina ha sido descrito como una diana terapéutica para la obesidad y la diabetes tipo 2 (Thupari, 2002). Los autores de este estudio, explican el efecto del C75 tanto a nivel central reduciendo la ingesta como a nivel periférico, provocando una profunda y rápida pérdida de peso y de masa adiposa de los ratones tratados con C75. Según los autores esto se debería a una estimulación de la actividad CPT1 y un incremento en la oxidación de ácidos grasos. Sin embargo, la inhibición de FAS produce una acumulación de malonil-CoA, inhibidor fisiológico de CPT1, lo que debería prevenir la oxidación de ácidos grasos. El efecto del C75 provocaría efectos opuestos: inhibición de CPT1 por malonil-CoA y activación directa de CPT1 (Thupari, 2002). La activación y la inhibición simultáneas de CPT1 por C75 parecen paradójicas y no han sido aún bien aclaradas.

Teniendo en cuenta que C75 podría ser un agonista de CPT1 decidimos estudiar esta molécula utilizando modelos de estudio *in vitro* e *in vivo*.

4.1 La acción del C75 sobre la actividad CPT1 es a través de su derivado CoA, C75-CoA

Durante la realización de estos estudios, varios autores observaron un aumento en la actividad CPT1 cuando se incuban los extractos de levadura con C75 (Yang, 2005; Nicot, 2004). En nuestro caso y en nuestras condiciones de ensayo, no detectamos activación o inhibición significativas de CPT1 por C75, incluso a altas concentraciones (100 μ M). Esto podría deberse a las diferencias en la metodología utilizada por nuestro grupo y los grupos mencionados anteriormente. De hecho, aunque ambos grupos utilizaron la misma cepa de levadura (*P. pastoris*) para expresar CPT1B humana, observaron una activación distinta del enzima: 65% de activación a 80 μ M de C75 y 33% de activación a 200 μ M de C75, respectivamente. Esta diferencia se debe, probablemente, a las diferentes condiciones de ensayo utilizadas.

Dado que en nuestros experimentos no observamos cambios significativos en la actividad CPT1A ni CPT1B al incubar estas proteínas con C75, nos planteamos la posibilidad de que el verdadero efector pudiera ser el derivado CoA del C75. McGarry y sus colaboradores (Declercq, 1987) reportaron que etomoxir tenía que ser transformado a su derivado CoA, etomoxir-CoA, para actuar sobre la actividad CPT1. Además, otros compuestos como el ácido tetradecilglicídico (TDGA) y ácido carboxílico feniloxirano (POCA) también deben ser convertidos a sus derivados CoA antes de actuar como inhibidores de CPT1 (Selby, 1989; Weis, 1994). Parece que el grupo CoA dirige y fija la molécula del inhibidor en las cavidades de CPT1, de un modo similar a como lo hace el sustrato palmitoil-CoA.

Dentro de la célula, los aciles-CoA se forman como parte del metabolismo de ácidos grasos endógenos, así como de algunos ácidos carboxílicos xenobióticos. La síntesis de los derivados CoA es el paso limitante para la conjugación e inactivación de la mayor parte de los ácidos xenobióticos. Los conjugados del CoA aumentan la reactividad química de estos compuestos y pueden funcionar como sustratos alternativos en las rutas metabólicas intermedias de ácidos grasos de cadena corta, media y larga (Knights, 1998). Es bien conocido que la formación de estos xenobioticos-CoA podría potencialmente perturbar la cantidad de CoA en la célula, competir por la unión a las carnitina aciltransferasas y alterar la β -oxidación (Vessey, 1991). En mamíferos, distintas acil-CoA sintetasas pueden activar los ácidos grasos de cadena larga, media y los ácidos xenobióticos. La especificidad del sustrato y la localización intracelular de las acil-CoA sintetasas, pueden explicar el ratio de diferencias en la síntesis de los derivados xenobiótico-CoA y sus posibles toxicidades. Aunque C75, etomoxir y

cerulenina sean sustratos potenciales de la acil-CoA sintetasa debido a la cadena alifática C₈ en C75 y cerulenina y a los grupos carboxílicos esterificables presentes en C75 y etomoxir, ningún estudio se había realizado hasta el presente. El análisis por MALDI-TOF realizado en este estudio, mostró que C75-CoA, etomoxir-CoA y cerulenina-CoA fueron sintetizados respectivamente, cuando se incubaron C75, etomoxir y cerulenina *in vitro* en presencia de CoA-SH, del enzima acil-CoA sintetasa de cadena larga y de ATP. Del mismo modo, se confirmó por HPLC-MS/MS que el derivado CoA del C75 puede producirse en mitocondrias frescas aisladas de hígado o músculo de rata incubadas con C75 y CoA-SH. 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 sintetasas, 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). En nuestro caso, es probable que en la síntesis del C75-CoA esté implicado un proceso específico a través del grupo de metileno electrofílico del C75.

4.2 Estudios *ex vivo* confirman la formación del C75-CoA

Se llevó a cabo un estudio en hepatocitos primarios de rata con el objetivo de confirmar que C75-CoA se forma en células preincubadas con C75. Los análisis de MALDI-TOF y de HPLC-MS/MS indican que se ha formado el derivado CoA del C75 en estas células. Los resultados muestran que C75-CoA puede producirse *ex vivo*. C75 se transforma cuantitativamente a C75-CoA de forma dosis dependiente en hepatocitos, ya que a medida que se aumentaba la concentración del C75, aumentaba también la cantidad del C75-CoA presente en estas células. El porcentaje de recuperación de aciles-CoA de las células es muy bajo y que aunque se incubaron con concentraciones elevadas de C75 (50 y 100 µM) no se recuperó todo C75-CoA formado, posiblemente, debido a la metodología de recuperación de aciles-CoA.

4.3 C75-CoA inhibe la actividad CPT1 *in vitro* e *in vivo*

Cuando se transforma C75 en su derivado CoA, este se convierte en un inhibidor potente de CPT1. Bajo todas las condiciones *in vitro* que fueron probadas en el presente estudio, CPT1 fue claramente inhibida por C75-CoA en una manera dependiente de concentración. Los valores de IC₅₀ observados para C75-CoA varían de micromolar a nanomolar y eran inferiores a los obtenidos para etomoxir-CoA, mostrando que C75-CoA es un inhibidor de CPT1 más potente que etomoxir-CoA. CPT1B es más sensible

que CPT1A a su inhibidor fisiológico malonil-CoA y este efecto también fue observado para C75-CoA.

Los dos inhibidores de CPT1, malonil-CoA y etomoxir-CoA, se unen al enzima de diferentes modos. La unión del malonil-CoA es reversible (McGarry, 1997) y rápido, consistente con su papel fisiológico de regulador de la actividad CPT1 y de la β -oxidación. Etomoxir-CoA es una molécula sintética diseñada para inhibir fuertemente y permanentemente CPT1 (Weis, 1994). C75-CoA muestra ciertas características de unión a CPT1 que son diferentes con respecto a estos dos inhibidores. Este inhibidor inactiva el enzima dependiendo del tiempo de preincubación lo cual es consecuente con una cinética de unión lenta. Los inhibidores de unión lenta incluyen muchos fármacos importantes como el metotrexato (tratamiento de ciertos tipos de cáncer) (Stone, 1986), allopurinol (tratamientos de cáncer y cálculos renales) (Hille, 1981) y aciclovir (infecciones virales como el herpes) (Reardon, 1989). C75-CoA se une más fuertemente que malonil-CoA, ya que no se perdió su efecto inhibidor cuando se lavaron las muestras mitocondriales. Además, al contrario del etomoxir-CoA, C75-CoA se une de forma no covalente ya que fue eliminado tras la diálisis. Sin embargo, la presencia de grupos carboxílicos y de la cadena hidrocarbonada, tanto en C75 como en etomoxir, sugiere un modo común de interacción para estos dos inhibidores con el centro activo de CPT1.

El siguiente paso era determinar cual es el requisito que contribuye a la potencia inhibidora del C75-CoA hacia CPT1. La estructura química del C75 se parece a la del malonil-CoA. En este sentido, sugerimos que la cabeza del C75-CoA podría imitar la interacción del malonil-CoA con CPT1, lo que explicaría por qué C75-CoA es un inhibidor tan potente de CPT1. Para comprobar esta hipótesis, llevamos a cabo experimentos independientes de inhibición con C75-CoA, etomoxir-CoA y el mutante CPT1A M593S descrito anteriormente por nuestro grupo como insensible a la inhibición por malonil-CoA (Morillas, 2003). Este mutante también se inhibe por C75-CoA más que por etomoxir-CoA, siendo la actividad residual a altas concentraciones de inhibidor del orden del 50% y del 60%, respectivamente. El valor de IC_{50} para C75-CoA y etomoxir-CoA en el mutante de metionina fueron respectivamente, más de 100 veces y 40 veces superiores al del enzima salvaje, lo que indica que este mutante se inhibe más fácilmente con C75-CoA que con el etomoxir-CoA. Dado que la potencia inhibidora está linealmente relacionada con la afinidad de unión, K_i es un parámetro válido para determinar la potencia real de un fármaco. Los valores de K_i e IC_{50} para C75-CoA muestran que CPT1A une C75-CoA con más afinidad que etomoxir-CoA tanto en el enzima salvaje como el mutado en Met⁵⁹³. El complejo enzima-inhibidor del

mutante se disocia más rápidamente respecto al enzima salvaje (el valor de K_i es 8 veces el del enzima salvaje y la k_{inact} de 0,7 veces) probablemente debido a la localización estratégica de este residuo en el canal catalítico del enzima y del tipo de unión de C75-CoA a la proteína.

Dado que C75 y C75-CoA pueden coexistir en la célula, era importante conocer el efecto neto de la presencia de ambas moléculas sobre la actividad CPT1. Realizamos experimentos de inhibición de la actividad CPT1A sobreexpresada en levadura en presencia de C75 y su derivado CoA. Nuestros resultados indican que C75 no es ni activador ni inhibidor de CPT1A. Además, hemos demostrado que C75-CoA es un inhibidor fuerte, similar a etomoxir-CoA (IC_{50} es de 0,24 μ M y 4,1 μ M para C75-CoA y etomoxir-CoA, respectivamente). C75 a una concentración 20 veces la del C75-CoA no contrarrestó la inhibición de la actividad CPT1A causada por C75-CoA. Esto, está de acuerdo con el efecto neto observado de la inhibición de CPT1.

Los valores de IC_{50} para C75-CoA sobre CPT1A de fracciones mitocondriales de hígado de rata, eran 16 veces más altos que los observados para CPT1B de mitocondrias obtenidas a partir de músculo de rata. Sin embargo, estas diferencias no fueron observadas en extractos de levadura sobreexpresando ambas isoformas de CPT1. En los miotubos L6E9, el valor de IC_{50} era similar al observado en hígado de rata y las células de insulinoma INS(832/13), consistente con el hecho que L6E9 expresan la isoforma CPT1A, y no CPT1B (Perdomo, 2004; Sebastián, 2007). Aunque el grupo de Thupari (Thupari, 2002) sugirió que C75 era un activador de CPT1A, encontramos en todos los casos estudiados, que C75-CoA inhibe ambas isoformas de CPT1 *in vitro* (Bentebibel, 2006). Los resultados de inhibición de la actividad CPT1 en mitocondrias frescas aisladas de células en cultivo y incubadas con C75-CoA, corroboran los resultados obtenidos por nuestro grupo (Bentebibel, 2006) en células de cultivo (células β del páncreas INS(832/13), miotubos L6E9 y células de riñón HEK293) incubadas previamente con C75 y en las cuales se observó no solo una inhibición de la actividad CPT1 sino también una disminución de la oxidación de palmitato. En este caso, la activación del C75 a C75-CoA podría producirse dentro de las células vía las aciles-CoA sintetasas endógenas.

Es interesante comparar estos resultados que discrepan con los obtenidos por otros investigadores que han observado una activación de CPT1. En el estudio de Yang y colaboradores (Yang, 2005), células de hepatocarcinoma humano (Hep G2) fueron incubadas directamente con C75 y carnitina marcada radioactivamente, y se observó un incremento en la actividad CPT1 tras medir la síntesis de palmitoilcarnitina. En otros

estudios (Thupari, 2002; Landree, 2004) los autores observan una estimulación de la actividad CPT1 y una activación de la oxidación de palmitato inducidas por C75 en células de cáncer de mama humano (MCF-7), en adipocitos de ratón (3T3L-1) y en hepatocitos primarios y neuronas corticales de rata. Las discrepancias entre estos resultados y los obtenidos en este estudio podrían explicarse por diferencias en la línea celular usada, diferente metodología para medir la actividad CPT1, diferentes condiciones experimentales o a efectos no conocidos aún del C75 en otras vías de señalización celulares. En los estudios de Yang y Thupari, la actividad CPT1 se midió en células permeabilizadas con digitonina, lo que podría alterar las interacciones entre la mitocondria y el citoesqueleto (Guzmán, 2000) que pueden afectar la actividad CPT1 o interferir en el ensayo, mientras que en este estudio que presentamos, se ha ensayado la actividad CPT1 en fracciones enriquecidas en mitocondrias aisladas y purificadas de tejidos y de células en cultivo.

4.4 El mecanismo de inhibición del C75-CoA sobre CPT1A es distinto para cada sustrato

El derivado CoA de C75 es un inhibidor competitivo potente que se une fuertemente pero reversiblemente a CPT1A. La capacidad de C75-CoA para inhibir CPT1 *in vitro* nos condujo a examinar el mecanismo de esta inhibición.

En el presente trabajo mostramos las cinéticas de inhibición de CPT1A variando las concentraciones del sustrato palmitoil-CoA en presencia de varias concentraciones de C75-CoA por un lado, y por otro lado, variando las concentraciones del sustrato carnitina en presencia de varias concentraciones de C75-CoA. Nuestros resultados cinéticos indican que C75-CoA se comporta de forma diferente respecto a ambos sustratos de CPT1A. C75-CoA es un inhibidor competitivo de la actividad CPT1A respecto al sustrato palmitoil-CoA y es un inhibidor mixto respecto al segundo sustrato, carnitina. El valor aparente de K_m para palmitoil-CoA es inferior al del sustrato carnitina (4,5 μM y 46,46 μM , respectivamente). Sin embargo el valor de K_i para C75-CoA con respecto al palmitoil-CoA como sustrato, es de 0,23 μM (Bentebibel, 2006), y es más alto que el valor de K_i para C75-CoA con respecto al sustrato carnitina, 0,04 μM . Los valores respectivos del ratio K_m/K_i para el sustrato palmitoil-CoA y carnitina son de 19,5 y 161,5 de los cuales deducimos que C75-CoA es un inhibidor de CPT1A mucho más potente cuando el sustrato es carnitina que cuando se trata del palmitoil-CoA.

Estos datos también sugieren que C75-CoA se une cerca al sustrato carnitina. El mecanismo inhibitor del C75-CoA respecto a carnitina se parece al observado para malonil-CoA (Lopez-Viñas, 2007). Varios autores han descrito la existencia de una competición entre malonil-CoA y carnitina (McGarry, 1983; Bird, 1985). Los tejidos en los cuales la sensibilidad de CPT1 a malonil-CoA es la más alta, son aquellos que requieren concentración más alta de carnitina para conducir la reacción, y las condiciones necesarias para el efecto de la carnitina y la de la sensibilidad a malonil-CoA parecen estar inversamente relacionadas. En este sentido, nuestro grupo observó que una eficiencia catalítica más alta para el sustrato carnitina en el mutante CPT1A M593S fue seguida de una disminución en la sensibilidad inhibitor del malonil-CoA. Esto indica que el mutante puede alojar más eficazmente la carnitina en el sitio catalítico desplazando así malonil-CoA y previniendo la inhibición de CPT1. El grupo carboxilo del malonil-CoA y C75-CoA imitan parcialmente la interacción entre el enzima y el grupo carboxilo de la carnitina, impidiendo así la posición correcta de este sustrato e inhibiendo la actividad catalítica del enzima. Varios autores (Cook, 1994; Kashfi, 1994) sugieren que la presencia de dos grupos carbonilos en la molécula de malonil-CoA podrían ser los responsables de la interacción y el efecto inhibitor sobre CPT1A. Como C75-CoA también tiene estos dos grupos carbonilos, podría comportarse como el inhibitor malonil-CoA.

4.5 C75-CoA se forma *in vivo* e inhibe la actividad CPT1 a corto plazo

Los experimentos realizados por nuestro grupo en células de cultivo que demuestran que C75 inhibe la actividad CPT1 y la oxidación de palmitato (Bentebibel, 2006), han sido corroborados por experimentos llevados a cabo *in vivo* en ratón. Una sola inyección i.p. de C75 en ratón produjo inhibición de la actividad CPT1 en hígado, músculo (soleus) y páncreas a periodos de tiempo cortos (de 30 min a 1h). En todos los tejidos analizados se recuperó la actividad CPT1 a los niveles del control después del tratamiento de 5 h. El grado de inhibición y el tiempo necesario para llegar a los máximos efectos observados en CPT1 varían según el tejido, lo que puede reflejar diferencias en la farmacocinética de cada tejido o bien, en la tasa de transformación endógena del C75 a C75-CoA. Además, hemos demostrado por análisis de HPLC-MS/MS que C75-CoA se forma *in vivo* en hígado de estos ratones tratados con una inyección i.p. de C75 durante 30 min. También, nuestros experimentos *in vitro* realizados en mitocondrias de levadura sobreexpresando CPT1A demuestran que C75-CoA inhibe la actividad CPT1 aun en presencia de C75. Por otro lado, la inhibición de CPT1 por C75-CoA se mantiene estable hasta que el complejo CPT1/C75-CoA probablemente sea reemplazado por una nueva molécula de CPT1. Es posible que el

proteosoma reconozca el complejo CPT1/C75-CoA y promueva su desaparición. En este caso, la escala de tiempos sería dependiente del tejido.

La inhibición de la actividad CPT1 por C75-CoA *in vivo* en nuestros experimentos es independiente de la supuesta inhibición por malonil-CoA que puede ser formado después de la acción del C75 en FAS. La actividad CPT1 fue determinada en mitocondrias aisladas de tejidos y lavadas dos veces. Por lo tanto cuando se lavan las mitocondrias, el malonil-CoA no queda unido a CPT1 visto que este metabolito se libera del enzima. Por el contrario, como C75-CoA es un inhibidor de unión fuerte, permanece unido al enzima después del lavado lo que significa que su inhibición es persistente. Al contrario de lo visto en la inhibición por C75-CoA, la inhibición por el etomoxir era máxima en 5 h. Este puede ser explicado por el hecho de que etomoxir se une covalentemente a CPT1.

Los resultados *in vivo* del C75 en la actividad CPT1 en los tres tejidos reportados anteriormente son similares a aquellos reportados por otros grupos que trabajan con cerulenina, la molécula base para la síntesis del C75. En efecto, C75 podría comportarse como cerulenina en ratones produciendo un efecto bifásico en CPT1, es decir, una inhibición inicial seguida de una recuperación. Esto estaría de acuerdo con el mayor gasto energético observado en tejidos periféricos de ratones tratados con C75 durante varias horas. La inhibición de CPT1 a corto plazo vista en nuestros experimentos después de una i.p. de C75 en ratones es consistente con los resultados obtenidos por Clegg y sus colaboradores (Clegg, 2002) quién observó una reducción del gasto de energía periférico 12 h después de una dosis i.p. de C75 en ratas. Además, se ha demostrado que una administración intracerebroventricular (i.c.v) del C75 aumenta el nivel de la oxidación de ácidos grasos en el músculo, a través del sistema nervioso simpático (Cha, 2005). Así, la recuperación de la actividad CPT1 observada en el músculo podría explicarse si consideramos la posibilidad de que el efecto central del C75 vence su acción periférica.

4.6 La unión del C75-CoA a CPT1 confirmada por Docking molecular

Nuestros modelos 3-D que ilustran la interacción del C75-CoA con el centro activo de CPT1 indican una posición común para el sustrato palmitoil-CoA y los inhibidores etomoxir-CoA y malonil-CoA. Las principales diferencias entre estas moléculas aparte de la longitud de la cadena hidrocarbonada introducida en la cavidad hidrofóbica, son el tamaño y las características químicas de la "cabeza" del C75 que están ausentes en el sustrato acil-CoA. Estos datos 3-D y los experimentos cinéticos del C75-CoA respecto a

ambos sustratos de CPT1 sugieren un mecanismo competitivo entre el sustrato palmitoil-CoA y C75-CoA. En los modelos de CPT1A salvaje el grupo carboxílico de la cabeza de la molécula del C75-CoA se posiciona en el espacio equivalente al del grupo dicarbonilo del malonil-CoA lo cual interfiere con la correcta posición de la carnitina. Además, esta cabeza del C75-CoA está localizada en la proximidad del residuo catalítico His⁴⁷³, lo que puede perjudicar la actividad catalítica de CPT1A (López-Vinas, 2007). Sin embargo, estos modelos no apoyan en absoluto la acción del C75 como un activador de CPT1. Aunque Yang y sus colaboradores (Yang, 2005) dedujeron por experimentos competitivos de unión que C75 se une a un lugar distinto del malonil-CoA, el sitio exacto en el cual C75 interactuaría con CPT1 quedaría por determinar.

La carencia de un cristal de CPT1 dificulta la realización de nuevos estudios de Docking que pudieran explicar la unión del C75 y la activación de CPT1.

4.7 Efecto de cerulenina y su derivado CoA en la actividad CPT1

Se ha observado una pérdida significativa de peso tras una administración sistemática de altas dosis de cerulenina (Jin, 2004; Loftus, 2000; Makimura, 2001) pero las reducciones en el consumo de alimentos no alcanzaron valores estadísticos significativos (Jin, 2004; Makimura, 2001), sugiriendo que la pérdida de peso observada era debida a efectos potenciales en el gasto de energía. La inhibición de FAS en el cerebro puede disminuir tanto el consumo de alimentos como el peso corporal. Sin embargo, para que cerulenina sea al menos tan potente como C75 en la inhibición de FAS (Gabrielson, 2001; Pizer, 2000), la dosis de cerulenina requerida para reducir el consumo de alimentos fue considerablemente mayor. La reducción de la oxidación de ácidos grasos observada en células de cáncer de mama humano (MCF-7) tratadas con cerulenina, fue posiblemente causada por la inhibición de la actividad CPT1 por los niveles de malonil-CoA presentes, debido a la inhibición de FAS (Thupari, 2001). Así, la inhibición de la actividad CPT1 es debida a un efecto indirecto de cerulenina, ya que este inhibidor de FAS no parece unirse al enzima CPT1 (Thupari, 2002). La diferencia entre los dos inhibidores de FAS cerulenina y C75 sobre la actividad CPT1 se puede explicar parcialmente por la diferencia en la presencia de grupos dicarbonilos y en su naturaleza anfipática requerida para la interacción directa con CPT1. Así pues, cerulenina contiene un solo grupo dicarbonilo en la forma cíclica y no en la forma anfipática. Esto explicaría la falta de interacción con CPT1 (Jin, 2004).

En este estudio (Jin, 2004), se ha demostrado que el tratamiento de ratones con cerulenina tiene un efecto dual sobre la actividad CPT1 en hígado y músculo después de

una inyección i.p. En una primera fase se produce una inhibición de la actividad CPT1 seguida por una estimulación, probablemente mediada por una activación del sistema nervioso simpático (SNS). Por esta razón quisimos comprobar el efecto directo de cerulenina en CPT1A de rata expresada en levadura. No se detectó ningún efecto inhibitorio en la actividad CPT1A a las concentraciones de cerulenina utilizadas en nuestras condiciones de ensayo.

Alternativamente, ya que hemos demostrado que se puede formar el derivado CoA de cerulenina, cerulenina-CoA, éste podría interactuar con CPT1 y mostrar su efecto inhibitorio. Hemos detectado tan solo un 15% de inhibición por cerulenina-CoA a las máximas concentraciones ensayadas. El efecto inhibitorio de cerulenina sobre CPT1 observado por Jin y sus colaboradores (Jin, 2004) podría explicarse por una acción conjunta de cerulenina-CoA y malonil-CoA producido por la inhibición de FAS.

5. FUTURO: INVESTIGACIÓN ADICIONAL

La familia de las carnitina aciltransferasas ha recibido mucha atención ya que varios estudios les atribuyen un alto potencial para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y otras enfermedades humanas (Anderson, 1998; Wagman, 2001). Así, en corazón, la isquemia de miocardio ha sido asociada con la acumulación de aciles-CoA de cadena larga (Corr, 1995; Hamdan, 2001). Los resultados presentados en esta tesis pueden servir como modelo para estudiar los efectos de mutaciones específicas en aminoácidos que participan en la unión de diferentes inhibidores en las carnitina aciltransferasas y además, nos ayudan a entender las relaciones entre estructura-función de esta familia de enzimas.

Un estudio reciente resalta la importancia de la conformación y la organización de CPT1A de rata en la membrana mitocondrial externa (Faye, 2007). El estudio sugiere que el enzima CPT1A de rata existe en forma de un complejo trimérico y este es capaz de unirse además a una o más proteínas. El dominio N-terminal sería importante en la formación de este complejo oligomérico. El estudio con proteínas quimeras parcialmente delecionadas permitió demostrar que el segmento transmembrana TM2 es suficiente para la formación del trímero de CPT1A y que el tamaño del dominio C-terminal de CPT1A limita el número de oligómeros. Teniendo en cuenta estas informaciones y los estudios realizados en esta tesis, proponemos un posible modelo de transporte del sustrato palmitoil-CoA por el sistema CPT1A (**Figura 2**).

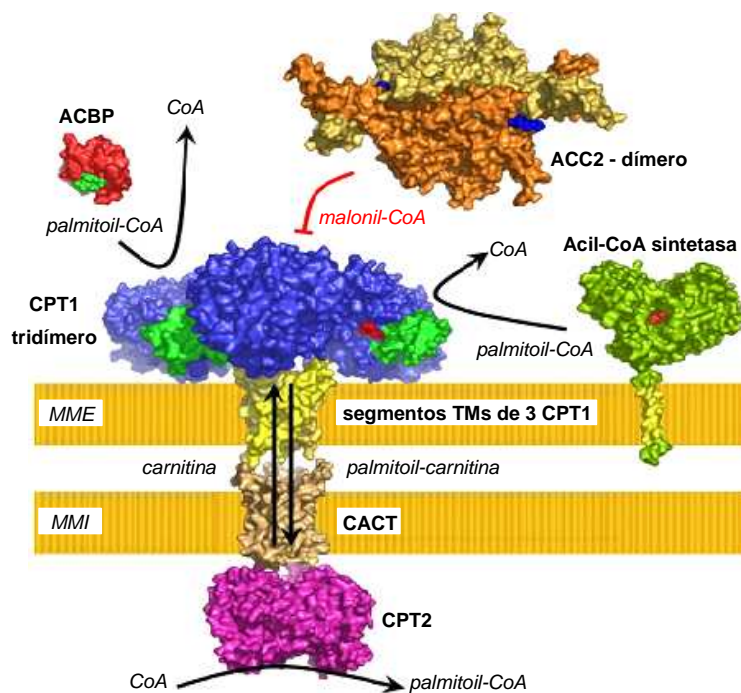


Figura 2: Modelo propuesto de CPT1A ilustrando las posibles interacciones generales entre las proteínas y ligandos que forman parte del sistema de transporte del palmitoil-CoA en la mitocondria. Se representa en la membrana mitocondrial externa el complejo de 3 CPT1A (azul) con sus dominios N-terminal (verde), el canal catalítico donde reside el sustrato carnitina (rojo) y el conjunto de los segmentos transmembranas TM1 y TM2 de cada enzima (amarillo). Cercana en la misma membrana se encuentra el enzima acil-CoA sintetasa, la que sintetiza el sustrato palmitoil-CoA utilizado por CPT1A para dirigir la reacción de transesterificación y formar el palmitoilcarnitina que será transportado junto con la carnitina por el transportador carnitina/acilcarnitina (CACT) (beige) situado en la membrana mitocondrial interna y que está en contacto con CPT2 (rosa), situada en la cara citosólica de la membrana mitocondrial interna. Se representan también la proteína que une aciles-CoA (ACBP) (rojo) y que libera el sustrato palmitoil-CoA para ser utilizado por CPT1A y el enzima acetil-CoA carboxilasa 2 (ACC2) (naranja), la que sintetiza malonil-CoA destinado a inhibir la actividad CPT1.

Nuevos estudios, una vez esté disponible la estructura cristalográfica de CPT1 permitirían no solo validar nuestro nuevo modelo 3-D de ambas isoformas de CPT1 sino también la validez de la hipótesis de transporte de ácidos grasos propuesta en el esquema anterior. Por otro lado, los resultados presentados en este estudio proporcionan pruebas irrefutables que C75 es un inhibidor potente y directo de ambas isoformas de CPT1 en su forma de éster de CoA. C75-CoA inhibe la actividad CPT1 *in vitro* e *in vivo*. La estructura cristalográfica de CPT1 nos permitiría conocer las interacciones precisas del C75-CoA con CPT1 y ello facilitaría el diseño de nuevos fármacos con mayor efectividad y especificidad para CPT1.

CONCLUSIONES

CPT1A:

1. La obtención de un nuevo modelo 3-D más refinado para CPT1 ha permitido determinar que el malonil-CoA se une al enzima CPT1A en dos sitios opuestos, sitio A y sitio O. Según el modelo de Docking del malonil-CoA en el enzima, la parte CoA del inhibidor y la del sustrato palmitoil-CoA competirían por la entrada en el sitio A. En cuanto al sitio O, sería exclusivo para el inhibidor malonil-CoA ya que el sustrato palmitoil-CoA no se alojaría en este sitio.
2. Dichos sitios de unión A y O han sido confirmados por mutagénesis dirigida de Arg²⁴³ y Met⁵⁹³ y de Ala⁴⁷⁸ respectivamente, y también por el doble mutante Arg²⁴³-Ala⁴⁷⁸.
3. El modelo de Docking de malonil-CoA en ambos sitios A y O indica que la parte malonilo ocuparía el espacio de unión del sustrato carnitina. Los estudios cinéticos muestran que malonil-CoA presenta un mecanismo de inhibición mixta respecto al sustrato carnitina para CPT1A.

CPT1B:

4. Presentamos por primera vez un modelo 3-D del enzima CPT1B de rata que es similar a la isoforma hepática de CPT1 y en el cual se conservan los sitios de unión de los sustratos carnitina y palmitoil-CoA y también los sitios A y O de unión del malonil-CoA.
5. Nuestros datos cinéticos muestran que His⁴⁷³ y Asp⁴⁷⁷ son críticos para la catálisis en CPT1B de rata. La localización de estos residuos en el modelo estructural de CPT1B cerca del sitio de unión del sustrato carnitina confirma su importancia en la actividad catalítica del enzima.
6. La mutación de cuatro aminoácidos en CPT1B de rata, Thr⁶⁰²/Glu⁶⁰³/Thr⁶⁰⁴/Arg⁶⁵⁵, no fue suficiente para cambiar la afinidad del sustrato L-carnitina por la de colina. Ello sugiere que otros requerimientos estructurales son necesarios para un cambio en la afinidad para la colina.
7. La mutación de las tres glicinas Gly⁷⁰⁹-Gly⁷¹⁰-Gly⁷¹¹ por sus homólogos en CrAT o COT no mejora la especificidad del enzima hacia aciles-CoA de cadena media o corta y produce la pérdida de actividad para aciles-CoA de cadena larga, lo que

sugiere que dichos aminoácidos son esenciales para la correcta ubicación del sustrato acil-CoA.

8. La mutación del residuo Met⁵⁹³ en CPT1B de rata por serina, confirma su papel crítico en la inhibición del enzima por malonil-CoA.

C75:

9. C75 no tiene ningún efecto activador o inhibidor sobre las isoformas de CPT1A y CPT1B de rata sobreexpresadas en levadura.
10. C75-CoA se forma *in vivo* y es un inhibidor fuerte, de unión lenta y reversible de CPT1. Dicha inhibición no es revertida por la presencia de C75.
11. C75-CoA es un inhibidor competitivo de CPT1A respecto al sustrato palmitoil-CoA y un inhibidor mixto respecto a la carnitina.
12. Los modelos de Docking *in silico* muestran que la cadena lateral del C75-CoA encaja en un bolsillo hidrofóbico donde se ubica la cadena alifática del sustrato palmitoil-CoA.
13. Una inyección i.p. del C75 a ratones produce una inhibición de la actividad CPT1 *in vivo* a tiempos cortos en hígado, músculo y páncreas, que se recupera con el tiempo.
14. Cerulenina y su derivado CoA, cerulenina-CoA, no tienen ningún efecto en la actividad CPT1A sobreexpresada en levadura.