



**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**

# **INTRODUCCIÓN**

## **$\beta$ -OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS**

## 1. ENTRADA Y TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRASOS EN LA CÉLULA

En los mamíferos, en situaciones fisiológicas como el ayuno, dieta rica en grasa y ejercicio físico prolongado, cuando la disponibilidad de glucosa no permite cubrir las necesidades energéticas de la célula, el mantenimiento de la glucemia es indispensable para el funcionamiento normal de los tejidos donde el metabolismo oxidativo es parcialmente (cerebro) o totalmente (eritrocitos y la médula renal) dependiente de la glucosa. Una de las estrategias de adaptación metabólica es la utilización preferencial de los ácidos grasos de cadena larga como fuente de energía con el fin de ahorrar glucosa y reservarla para los tejidos dependientes de glucosa. La oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena larga juega un papel importante en la conservación de la homeostasis energética ya que constituye una fuente principal de energía para muchos órganos sobre todo el músculo y el hígado.

Los ácidos grasos de cadena corta (4-6 átomos de carbono) y de cadena media (8-10 átomos de carbono) pueden penetrar en las células a través de las membranas por simple difusión debido a su pequeño tamaño y sus características hidrosolubles. En cambio, la entrada de los ácidos grasos de cadena larga en las células de diferentes tejidos es un mecanismo todavía poco conocido. Se han propuesto dos modelos: un transporte pasivo no saturable y un transporte facilitado, saturable y llevado a cabo por diferentes proteínas (Schaffer, 2002; Hajri, 2002). Cuando la concentración extracelular de los ácidos grasos de cadena larga es elevada del orden  $\mu\text{M}$ , éstos son capaces de difundir libremente a través de las membranas plasmáticas por difusión pasiva o "flip-flop", mecanismo similar al de entrada de los ácidos grasos de cadena corta y de cadena media. En cambio, cuando la concentración plasmática de los ácidos grasos de cadena larga es baja, del orden  $\text{nM}$ , su transporte es saturable y se efectúa por transporte facilitado.

La primera proteína implicada en la captación de los ácidos grasos fue la albúmina (Weisiger, 1981; Ockner, 1983). El complejo formado por ácidos grasos de cadena larga/albúmina permite su interacción con la membrana plasmática y facilita su disociación. A continuación, diferentes proteínas se hacen cargo de los ácidos grasos libres para asegurar su paso a través de la membrana plasmática tales como la FABPpm (*plasma membrane Fatty Acid Binding Protein*) que es una proteína de membrana expresada en hígado, tejido adiposo, corazón e intestino (Stremmel, 1985; Schwieterman, 1988; Sorrentino, 1988); la FAT (*Fatty Acid Translocase*) (Harmon, 1993) también llamada CD36 (Stremmel, 1985) y la FATP (*Fatty Acid Transport*

*Protein*) (Schaffer, 1994). FAT/CD36 y FATP se expresan notablemente en tejidos que tienen un metabolismo elevado de ácidos grasos de cadena larga (Hajri, 2002).

Cualquiera que sea el mecanismo de transporte, la entrada de los ácidos grasos de cadena larga en la célula es bidireccional. Sin embargo, cuando la transferencia se acopla a la activación de los ácidos grasos de cadena larga en aciles-CoA, la transferencia se hace unidireccional y conduce a una acumulación del acil-CoA en el citosol (Schaffer, 2002).

## **2. TRANSPORTE INTRACELULAR Y ACTIVACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA A ACILES-CoA**

Una vez captados por la célula, los ácidos grasos son tomados por las FABPc (*cytosolic Fatty Acid Binding Protein*) que juegan un papel esencial en el transporte de estos ácidos grasos hacia sus diferentes sitios de utilización intracelular, tales como mitocondrias, retículo endoplasmático y peroxisomas (Bernlohr, 1997; Glatz, 1997). Antes de ser dirigidos hacia su almacenaje, hacia su inserción en las membranas o hacia su oxidación, se activan primero a aciles-CoA. Esta reacción es catalizada por el enzima acil-CoA sintetasa (ACS) que utiliza ATP y constituye la única etapa del catabolismo de los ácidos grasos que requiere gasto de energía.

Existen diferentes tipos de acil-CoA sintetasa en función de su especificidad por la longitud de la cadena de átomos de carbono (Watkins, 1996; Kerner, 1998). Los ácidos grasos de cadena corta y ácidos grasos de cadena media son activados directamente en la matriz mitocondrial por la acción de acil-CoA sintetasa de cadena corta y de la acil-CoA sintetasa de cadena media respectivamente (Killenberg, 1971). En cambio, los ácidos grasos de cadena larga son activados en el citosol por una acil-CoA sintetasa de cadena larga abundante en la superficie de mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplasmático (Watkins, 1997). La acil-CoA sintetasa de cadena larga es una proteína de transmembrana que se encuentra asociada a la membrana mitocondrial externa (MME) con el sitio activo expuesto hacia el citoplasma (Hesler, 1990).

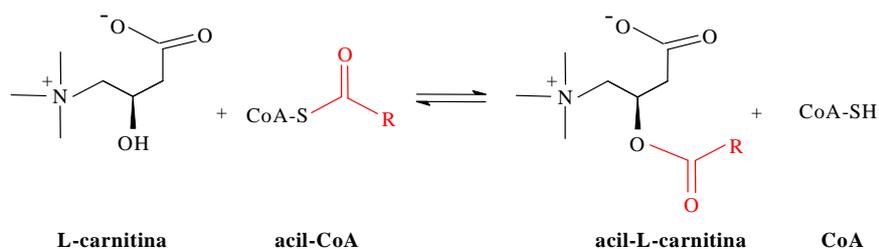
La ACBP (*acyl-CoA Binding Protein*) juega un papel importante en el transporte de los aciles-CoA de cadena larga hacia los diferentes orgánulos donde serán esterificados (retículo endoplasmático) u oxidados (mitocondrias y peroxisomas) y favorecen la formación de un "pool" intracelular de aciles-CoA (Knudsen, 2000).

### 3. MODULACIÓN DE LAS RESERVAS DE COENZIMA A EN LA CÉLULA

Las células contienen reservas limitadas de coenzima A (CoA) que son esenciales para activar metabolitos carboxílicos. La esterificación de los ácidos carboxílicos a CoA a través de un enlace tioéster es una estrategia común usada en procesos metabólicos para “activar” un metabolito relevante y que requiere el gasto de energía. Los aciles-CoA resultantes de la activación de estos ácidos proporcionan sustratos activados para muchas rutas metabólicas importantes tales como el ciclo de Krebs, la síntesis de lípidos y colesterol, la modificación post-traducciona l de proteínas y para mecanismos de detoxificación.

Esta activación tiene dos consecuencias: en primer lugar, mantiene el acil-CoA formado impermeable a las membranas celulares y en segundo lugar, secuestra el CoA de los acúmulos limitados que existen en los compartimentos subcelulares. Como resultado, los aciles-CoA se mantienen separados en los diferentes compartimentos celulares, lo cual es muy importante debido a la alta actividad biológica mostrada por alguno de ellos, incluyendo la regulación de expresión génica, el tráfico a través de las membranas y la modulación de las actividades de canales iónicos. Consecuentemente, la célula requiere dos sistemas: primero, un mecanismo para el control de las concentraciones de ésteres de CoA que es rápido y no involucra las energéticamente costosas hidrólisis y resíntesis de los ésteres a partir de ácidos grasos libres, y en segundo lugar, un sistema que después de la síntesis inicial del ester de CoA, permite a la parte acil del acil-CoA atravesar las membranas sin la necesidad de gastar de nuevo energía (Zammit, 1999a; Ramsay, 2004).

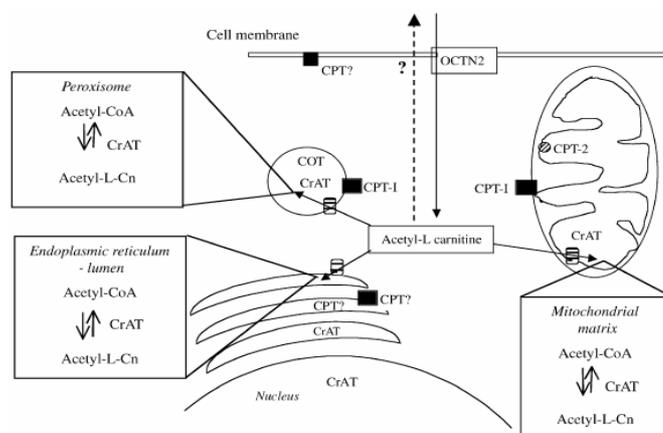
La célula consigue estos requerimientos gracias al sistema carnitina que consiste en varias proteínas que transportan la carnitina y derivados de carnitina a través de las membranas y enzimas. Se trata de las proteínas carnitina aciltransferasas (Zammit, 1999a) que catalizan la reacción de transesterificación reversible entre acil-CoA y L-carnitina para formar el correspondiente ester de carnitina y regenerar el CoA (**Figura 1**). Por tanto, el sistema de carnitina aciltransferasas conecta las diferentes reservas de aciles-CoA y amortigua las fluctuaciones en su estado acilado que podrían ser perjudiciales para la homeostasis celular (Ramsay, 2001).



**Figura 1. La reacción catalizada por las carnitina aciltransferasas.** La parte acil, está representada en color rojo.

#### 4. LAS CARNITINA ACILTRANSFERASAS UNA FAMILIA DE ENZIMAS

Las carnitina aciltransferasas se dividen en tres clases que se diferencian por la afinidad selectiva hacia la longitud de cadena de carbono del ácido graso que utilizan como sustrato. Además, se diferencian por distinta distribución subcelular, distintas cinéticas y funciones fisiológicas. La **Figura 2** ilustra las posiciones de las diferentes aciltransferasas en la célula.



**Figura 2. Localización de las carnitina aciltransferasas en las células de mamíferos.** Se muestra el enzima carnitina/acil-carnitina translocasa (CACT) en cuadros rayados. OCTN2: transportadores de cationes orgánico dependiente de sodio. CrAT: carnitina acetiltransferasa. COT: carnitina octanoiltransferasa. CPT: carnitina palmitoiltransferasa. Acetil-L-Cn: acetil-carnitina. Figura tomada de la referencia (Ramsay, 2004).

La carnitina acetiltransferasa o CrAT (EC. 2.3.1.7) (Bieber, 1988) actúa con sustratos de cadena corta como el acetil-CoA y se localiza en la matriz mitocondrial, en el retículo endoplasmático (RE), en los peroxisomas (Colucci, 1988) y se ha descrito su presencia también en el núcleo. Mientras, la carnitina octanoiltransferasa o COT (EC. 2.3.1.137) se localiza en la matriz peroxisomal y facilita el transporte de ácidos grasos de cadena media de átomos de carbono (C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>) desde los peroxisomas hasta las

mitocondrias a través de la conversión de aciles-CoA acortados tras la  $\beta$ -oxidación peroxisomal a acil-carnitina (Ferdinandusse, 1999). La  $\beta$ -oxidación peroxisomal no proporciona energía directamente pero es capaz de acortar los ácidos grasos de cadena muy larga, preparándolos para la posterior  $\beta$ -oxidación mitocondrial. COT tiene también una importante acción detoxificadora de moléculas oxidadas en el peroxisoma como eicosanoides y xenobióticos. Finalmente, las carnitina palmitoiltransferasas (CPTs) (EC. 2.3.1.21) 1 y 2 (McGarry, 1997) localizadas en la membrana mitocondrial externa y membrana mitocondrial interna respectivamente, facilitan el transporte de los ácidos grasos de cadena larga ( $C_{16}$ ) a la matriz mitocondrial donde se utilizan para la  $\beta$ -oxidación (McGarry, 1997). CPT1 es la única aciltransferasa que tiene acceso directo a las reservas citosólicas de aciles-CoA.

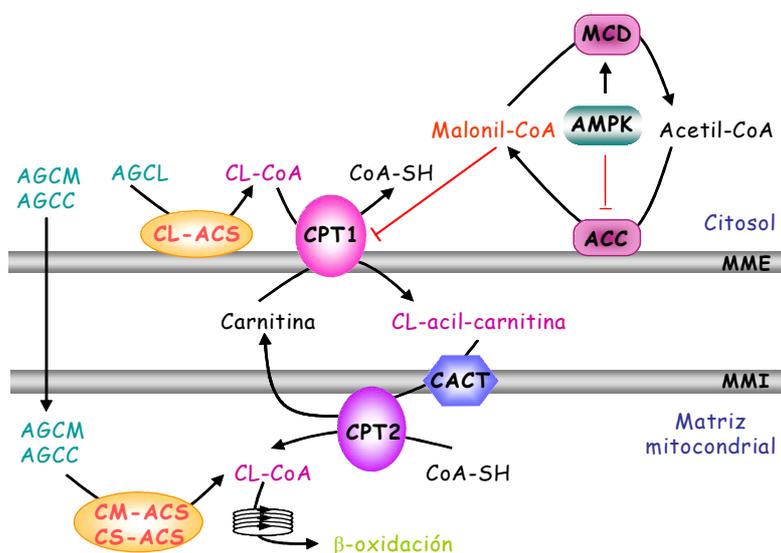
## 5. TRANSPORTE INTRAMITOCONDRIAL DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA: EL SISTEMA CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA

Los aciles-CoA de cadena larga activados y orientados hacia la vía de la oxidación deben penetrar en la matriz mitocondrial donde serán  $\beta$ -oxidados. Al ser la membrana mitocondrial interna impermeable a estos aciles-CoA, es necesario un sistema de transporte para su transferencia en la matriz (**Figura 3**). Esta translocación está asegurada por el sistema de las carnitina palmitoiltransferasas (CPT, EC 2.3.1.2) y se efectúa en tres etapas distintas (Ramsay, 2001):

- ❖ En primer lugar, CPT1 se hace cargo de los aciles-CoA formados por la acción de acil-CoA sintetasa de cadena larga en la membrana mitocondrial externa. Esta enzima, localizada en la misma membrana (Murthy, 1987) cataliza la formación de acil-carnitina a partir de acil-CoA y de L-carnitina, trasladando el grupo acil del átomo de azufre del coenzima A sobre el grupo hidroxilo de la carnitina (Fritz, 1955).
- ❖ Los productos de la reacción (acil-carnitina) son entonces translocados a la matriz mitocondrial en un intercambio catalizado por una proteína integral de membrana, carnitina/acil-carnitina translocasa, permitiendo así a los residuos de cadena larga atravesar la membrana mitocondrial interna (Pande, 1975).
- ❖ Dentro de la matriz mitocondrial, CPT2, enzima asociado a la cara interna de la membrana mitocondrial interna cataliza la formación del acil-CoA a partir de aciles carnitina importados desde el citosol y trasladan el grupo acil de las acil-carnitina sobre el coenzima A (Murthy, 1987).

Los aciles-CoA en la matriz mitocondrial provenientes a la vez del transporte de los ácidos grasos de cadena larga desde el citosol y de la activación al nivel de la matriz de los ácidos grasos de cadena corta y ácidos grasos de cadena media son degradados por las enzimas de la  $\beta$ -oxidación.

El paso limitante de la transferencia de los aciles-CoA a la matriz mitocondrial y de hecho, de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, es catalizada por CPT1. La actividad de esta enzima es controlada y fuertemente regulada por su inhibidor fisiológico malonil-CoA, el primer intermediario de la lipogénesis. Este proceso, permite que la célula señale la disponibilidad relativa de lípidos e hidratos de carbono en el hígado, corazón, músculo esquelético y en células  $\beta$  pancreática.



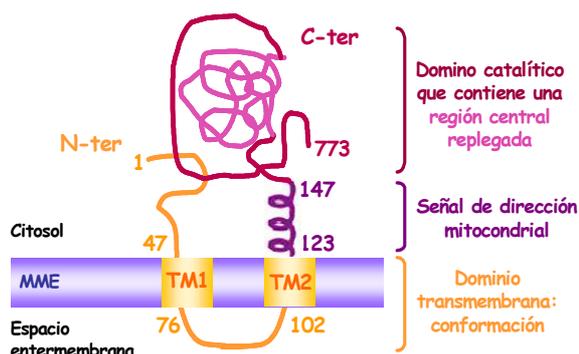
**Figura 3: Transporte de ácidos grasos dentro de la mitocondria mediante el sistema CPT.**

Los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) se activan a acil-CoA por acción de acil-CoA sintetasa de cadena larga (CL-ACS). El transporte del acil-CoA al interior de la mitocondria se lleva a cabo por acción de CPT1 localizada en la membrana mitocondrial externa (MME) y que convierte el acil-CoA en acil-carnitina, carnitina:acil-carnitina translocasa (CACT) que transporta la acil-carnitina a través de la membrana mitocondrial interna (MMI) y por acción de CPT2 que reconvierte la acil-carnitina en acil-CoA. Los niveles de malonil-CoA, inhibidor de CPT1, están regulados por las actividades de acetil-CoA carboxilasa (ACC) y malonil-CoA descarboxilasa (MCD). Estas dos proteínas están a su vez reguladas por AMPK. AGCM: ácidos grasos de cadena media, AGCC: ácidos grasos de cadena corta, CM-ACS: acil-CoA sintetasa de cadena media, CC-ACS: acil-CoA sintetasa de cadena corta.

## 5.1 Topología y conformación de CPT1

CPT1 es una proteína integral de membrana mitocondrial cuyos extremos N-terminal (residuos 1-47) y C-terminal (residuos 123-773) están proyectados hacia el citosol, ya que muestra dos regiones hidrofóbicas en los primeros 150 aminoácidos de la proteína (Esser, 1993). Estas dos regiones hidrofóbicas son segmentos transmembranas compuestos de putativas  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas (segmento transmembrana 1 (TM1), residuos 48-75 y segmento transmembrana 2 (TM2), residuos 103-122) y serían las responsables del anclaje del enzima CPT1 en la membrana mitocondrial externa. Los 18 primeros aminoácidos están altamente conservados entre ambas isoformas, de CPT1A y CPT1B. El pequeño lazo de 27 residuos entre los dos segmentos transmembranas se orienta hacia el espacio intermembrana (Esser, 1996) (**Figura 4**). Se ha sugerido que el segmento transmembrana 2 es esencial para la correcta conformación y repliegue del dominio catalítico C-terminal, que es insensible a la acción de las proteasas, y que los residuos 123-147 localizados inmediatamente tras el segmento segmento transmembrana 2 funcionan como señal de direccionamiento a la matriz mitocondrial y no es proteolizada. Estos residuos especifican la localización en mitocondria, mientras que los segmentos transmembranas actúan como una secuencia de “paro de transferencia” que detiene y ancla CPT1 translocada en la mitocondria (Cohen, 2001).

La expresión heteróloga en levadura de proteínas CPT quimeras o parcialmente deleccionadas permitió mostrar que el dominio N-terminal es esencial para la adquisición y la conservación de la conformación de la proteína y también es importante para su actividad enzimática y su sensibilidad a malonil-CoA (Cohen, 1998). Este extremo citosólico N-terminal de CPT1A enmascara un sitio de corte de la tripsina localizado en los 150 últimos residuos del dominio C-terminal que es muy compacto y que se encuentra en parte escondido en el resto de la proteína por el extremo N-terminal. Así, la extremidad N-terminal de CPT1A (residuos 1-47) estaría espacialmente próxima al dominio catalítico C-terminal. Por otra parte, cuando las mitocondrias intactas de levadura que sobreexpresan CPT1A deleccionada de sus 31 últimos aminoácidos C-terminales son incubadas en presencia de tripsina, la proteína es digerida totalmente (Pan, 2002). Esto sugiere que los 31 últimos aminoácidos (residuos 743-773) son esenciales para el plegamiento y estabilidad del enzima.



**Figura 4: Topología de CPT1.** Representación de la topología de CPT1 deducida por Fraser (Fraser, 1997) con algunas modificaciones. Se indican los aminoácidos localizados en las entradas y salidas de los elementos transmembrana TM1 y TM2. MME: membrana mitocondrial externa, N-ter: dominio amino terminal y C-ter: dominio carboxi terminal.

## 5.2 Isoformas de CPT1

Existen varias isoformas de CPT1 codificadas por distintos genes y que presentan propiedades bioquímicas y distribución tisular diferente (McGarry, 1997).

### 5.2.1 Isoforma hepática (L-CPT1 o CPT1A)

El gen de CPT1A humano ha sido localizado en el cromosoma 11q13.1-q13.5 (Britton, 1997). El cADN de CPT1A de rata codifica una proteína de 773 aminoácidos de masa molecular aparente 88 kDa (Esser, 1993). En rata adulta, CPT1A se expresa fuertemente en hígado, pulmón, páncreas, intestino, riñón, cerebro y ovarios. En cambio, se expresa débilmente en corazón y tejido adiposo blanco y está ausente en el músculo esquelético y el tejido adiposo marrón (McGarry, 1997; Brown, 1997). Su actividad es inhibida por malonil-CoA y su sensibilidad frente a este inhibidor varía según las condiciones fisiopatológicas ( $IC_{50} \approx 3-30 \mu M$ ). CPT1A tiene una gran afinidad por los sustratos carnitina ( $K_m \approx 30 \mu M$ ) y acil-CoA de cadena larga ( $K_m$  para el sustrato palmitoil-CoA  $\approx 40 - 150 \mu M$ ).

### 5.2.2 Isoforma muscular (M-CPT1 o CPT1B)

El gen de CPT1B humano ha sido localizado en el cromosoma 22q13.31-q13.32 (Britton, 1997). El cADN de CPT1B de rata codifica una proteína de 772 aminoácidos de masa molecular aparente 82 kDa (Esser, 1996). CPT1B se expresa esencialmente en músculo esquelético, corazón, tejidos adiposos blanco y marrón, testículos y en una sola

región del cerebro, el cerebelo (Lavrentyev, 2004). Una de las funciones importantes del cerebelo es el control de la contracción muscular y se ha sugerido que la expresión de CPT1B en esta región del cerebro permitiría un control más sensible de la  $\beta$ -oxidación. CPT1B presenta una afinidad más débil para el sustrato carnitina ( $K_m \approx 500 \mu\text{M}$ ) pero una afinidad para el acil-CoA de cadena larga es parecida a la de la isoforma hepática. Su sensibilidad a la inhibición por malonil-CoA es de 30 a 100 veces más elevada ( $IC_{50} \approx 0,03 \mu\text{M}$ ) que la de CPT1A (McGarry, 1983; Mills, 1983; McGarry, 1997). Así, la actividad CPT1B dependería únicamente de las variaciones en las concentraciones del inhibidor. De hecho, en el corazón y los músculos esqueléticos donde CPT1B se expresa mayoritariamente, el flujo de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga va a ser modulado por variaciones muy débiles en las concentraciones de malonil-CoA, ya que la sensibilidad del enzima frente a este inhibidor es muy elevada. No obstante, teniendo en cuenta que la concentración intracelular del malonil-CoA es similar en músculo e hígado (1 a 10  $\mu\text{M}$ ) (Saddik, 1993), CPT1B estaría inhibida constantemente. Se ha propuesto que malonil-CoA estaría secuestrado por una proteína impidiéndole interactuar con CPT1B (Brown, 1995).

Se ha demostrado que CPT1B de rata (Yu, 1998b) y humana (Yu, 1998a) pueden sufrir dos formas de *splicing* alternativo de los exones 4 y 5. Esto daría origen a tres ARN maduros:  $\beta 1$  (CPT1B),  $\beta 2$  (CPT1B delecionada del exón 4 y parte del exón 3) y  $\beta 3$  (CPT1B delecionada del exón 5). La forma  $\beta 2$  no tiene el segundo dominio transmembrana (TM2) con lo cual no está claro si puede insertarse en la membrana mitocondrial. En cuanto de la forma  $\beta 3$ , le faltan 34 aminoácidos en el extremo N-terminal y sus propiedades bioquímicas son desconocidas. Ambas isoformas mantienen el extremo C-terminal catalítico y los residuos del extremo N-terminal cruciales para la inhibición por malonil-CoA. Además, se ha sugerido que ambas formas  $\beta 2$  y  $\beta 3$  codificarían para proteínas que, incluso aunque se insertaran correctamente en la membrana mitocondrial externa, tendrían propiedades catalíticas y de sensibilidad al malonil-CoA alteradas. Sin embargo, cuando las formas  $\beta 2$  y  $\beta 3$  se expresan en levadura, no se detecta ninguna actividad CPT1 (Van der Leij, 2002).

### 5.2.3 Isoforma cerebral (CPT1C)

Recientemente, un nuevo miembro de la familia de CPT1, CPT1C, ha sido identificado y su cADN clonado (Price, 2002). El gen de CPT1C humano ha sido localizado en el cromosoma 19q13.33. La secuencia primaria de la proteína, deducida a partir de la secuencia del cADN está formada por 798 aminoácidos. Un alineamiento de secuencias de cADN de las proteínas de ratón y humano muestran una identidad del

83,5% (Price, 2002). Se ha descrito que CPT1C se expresa esencialmente en testículos y en el cerebro, concretamente en regiones implicadas en el control de la ingesta tales como el hipotálamo, hipocampo, corteza y los núcleos paraventriculares. Este enzima presenta una gran similitud de secuencia aminoacídica con CPT1A (70%) y CPT1B (66%) y contiene todos los residuos importantes para la actividad carnitina aciltransferasa y para la unión del malonil-CoA, descritos en otros miembros de la familia. Según el estudio realizado por Lane y sus colaboradores (Dai, 2007), se trata de una proteína integral de membrana presente en la membrana mitocondrial externa y es capaz de unir malonil-CoA con una constante de afinidad  $K_D = 0,3 \mu\text{M}$ , que está dentro de las concentraciones hipotalámicas del inhibidor (0,1-1,4  $\mu\text{M}$ ), lo que sugiere que la actividad de CPT1C puede estar controlada por malonil-CoA (Wolfgang, 2006a). La interacción entre malonil-CoA y CPT1C podría ser importante para la señalización en las neuronas hipotalámicas que regulan el consumo de alimentos y el gasto energético periférico (Cha, 2006).

Otros estudios realizados por el mismo grupo demostraron que los ratones deficientes (knockout) en CPT1C, presentan pérdida de apetito y tienen un peso corporal inferior a los animales control cuando están alimentados con una dieta normal. Paradójicamente, estos ratones knockout de CPT1C son más susceptibles a la obesidad bajo una dieta rica en grasa. La sobreexpresión de CPT1C en el hipotálamo protege estos ratones de la ganancia de peso bajo la dieta rica en grasa, sugiriendo que CPT1C protege contra los efectos de este tipo de alimentación y que este enzima es necesario para la regulación de la homeostasis energética (Wolfgang, 2006b).

Sin embargo, estudios más recientes realizados por nuestro grupo (Sierra, 2008), demuestran que la sobreexpresión de CPT1C fusionada a la proteína fluorescente (*green fluorescent protein*) en células de cultivo (línea celular embrión de riñón humano HEK293T y fibroblastos humano PC-12) indican claramente que CPT1C se localiza en el retículo endoplasmático en vez de la mitocondria y que la región N-terminal de CPT1C es responsable de la localización de la proteína en este orgánulo. El estudio demuestra que CPT1C utiliza el palmitoil-CoA como sustrato y que tiene una actividad carnitina palmitoiltransferasa. Debido a su localización específica en el cerebro, CPT1C no participa en la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos sino que está probablemente implicada en rutas biosintéticas, facilitando el transporte constante del palmitato a través de las membranas del retículo endoplasmático, manteniendo un equilibrio entre las reservas en acil-CoA del citosol y el lumen del retículo endoplasmático.

### 5.3 La proteína CPT2

Contrariamente a CPT1, solo existe una isoforma de CPT2. El gen de CPT2 humano ha sido localizado en el cromosoma 1p32 (Gellera, 1994). El cADN de CPT2 ha sido clonado de rata (Woeltje, 1990a) y de humano (Finocchiaro, 1991) y codifica una proteína de 658 aminoácidos (74 kDa) donde los primeros 25 residuos del dominio amino terminal (N-terminal) constituyen una señal de dirección hacia la matriz mitocondrial, que se parte durante la importación de la proteína a la matriz (Brown, 1991). La forma madura de CPT2 (68 kDa) está débilmente asociada a la membrana mitocondrial interna del lado de la matriz. Su expresión en *Escherichia coli* y en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* permitió poner en evidencia una actividad CPT insensible al malonil-CoA. Su expresión es ubicua en rata y humanos y no varía según las condiciones fisiopatológicas (McGarry, 1997).

## 6. CARNITINA ACILTRANSFERASAS SENSIBLES A MALONIL-CoA

Una característica que diferencia a las varias actividades carnitina aciltransferasas es su sensibilidad frente a la inhibición por malonil-CoA, el primer intermedio en la síntesis de ácidos grasos. CPT1 y COT son sensibles a malonil-CoA mientras que CrAT y CPT 2 no lo son (McGarry, 1997). El malonil-CoA es sintetizado a partir del acetil-CoA por el enzima acetil-CoA carboxilasa. Una clasificación de las carnitina aciltransferasas basada en sus sensibilidades a malonil-CoA, se resume en la **Tabla 1**.

<b>Abreviación</b>	<b>Masa molecular</b>	<b>Localización intracelular</b>	<b>Compartimento accesible</b>	<b>Especificidad de acil-CoA</b>
<i>Sensibles a malonil-CoA</i>				
CPT1	88 kDa	Membrana mitocondrial externa	Citosol	C <sub>16</sub> -CoA
CPT1per	88 kDa	Peroxisomas	Citosol	C <sub>16</sub> -CoA
CPT1ret	88 kDa	Retículo endoplásmico	Citosol	C <sub>16</sub> -CoA
COTper	69 kDa	Peroxisomas	Lumen peroxisomal	C <sub>10</sub> -CoA
<i>Insensibles a malonil-CoA</i>				
CPT2	69 kDa	Membrana mitocondrial interna	Matriz mitocondrial	C <sub>16</sub> -CoA
CrATmit	67,5 kDa	Matriz mitocondrial	Matriz mitocondrial	C <sub>2</sub> -CoA
CrATper	69 kDa	Lumen peroxisomal	Lumen peroxisomal	C <sub>2</sub> -CoA

**Tabla 1. Clasificación de las carnitina aciltransferasas basada en la sensibilidad a malonil-CoA.**

## **7. DEFICIENCIAS HUMANAS EN CARNITINA ACILTRANSFERASAS**

En patología humana sólo son conocidas las deficiencias en CPT1 y CPT2, siendo las más frecuentes las de CPT2. Hay más de 200 casos de deficiencias en CPT2 descritos en el mundo. Sin embargo, sólo se conocen unos 20 casos de deficiencias en CPT1A (ver **Apéndice 4**) y ninguno para CPT1B y CPT1C.

**RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE LAS CARNITINA  
ACILTRANSFERASAS**

## 8. ESTRUCTURA TRIDIMENCIONAL (3-D) DE LAS CARNITINA ACILTRANSFERASAS CRISTALIZADAS

Los modelos estructurales 3-D de CrAT humana (Wu, 2003) y de ratón (Jogl, 2003) fueron descritos casi simultáneamente. CrAT de ratón fue cristalizada sola o con el sustrato CoA o carnitina, mientras que CrAT humana fue cristalizada sola o con la L-carnitina (Govindasamy, 2004a). También, se ha descrito la estructura cristalográfica de COT de ratón sola o unida al sustrato octanoilcarnitina, mostrando por primera vez la estructura del sitio de unión del grupo acil en la familia de las carnitina aciltransferasas (Jogl, 2005). Recientemente, se ha descrito el cristal de una de las enzimas que utiliza aciles-CoA de cadena larga, CPT2 de rata (Hsiao, 2006). Hasta hoy, no se ha obtenido ningún cristal del enzima CPT1 aunque un posible modelo estructural para CPT1A humana y de rata han sido publicados respectivamente por Gobin y sus colaboradores (Gobin, 2003) y por nuestro grupo (Morillas, 2004). Ambos modelos están basados en la similitud de estas enzimas con el cristal de CrAT de ratón.

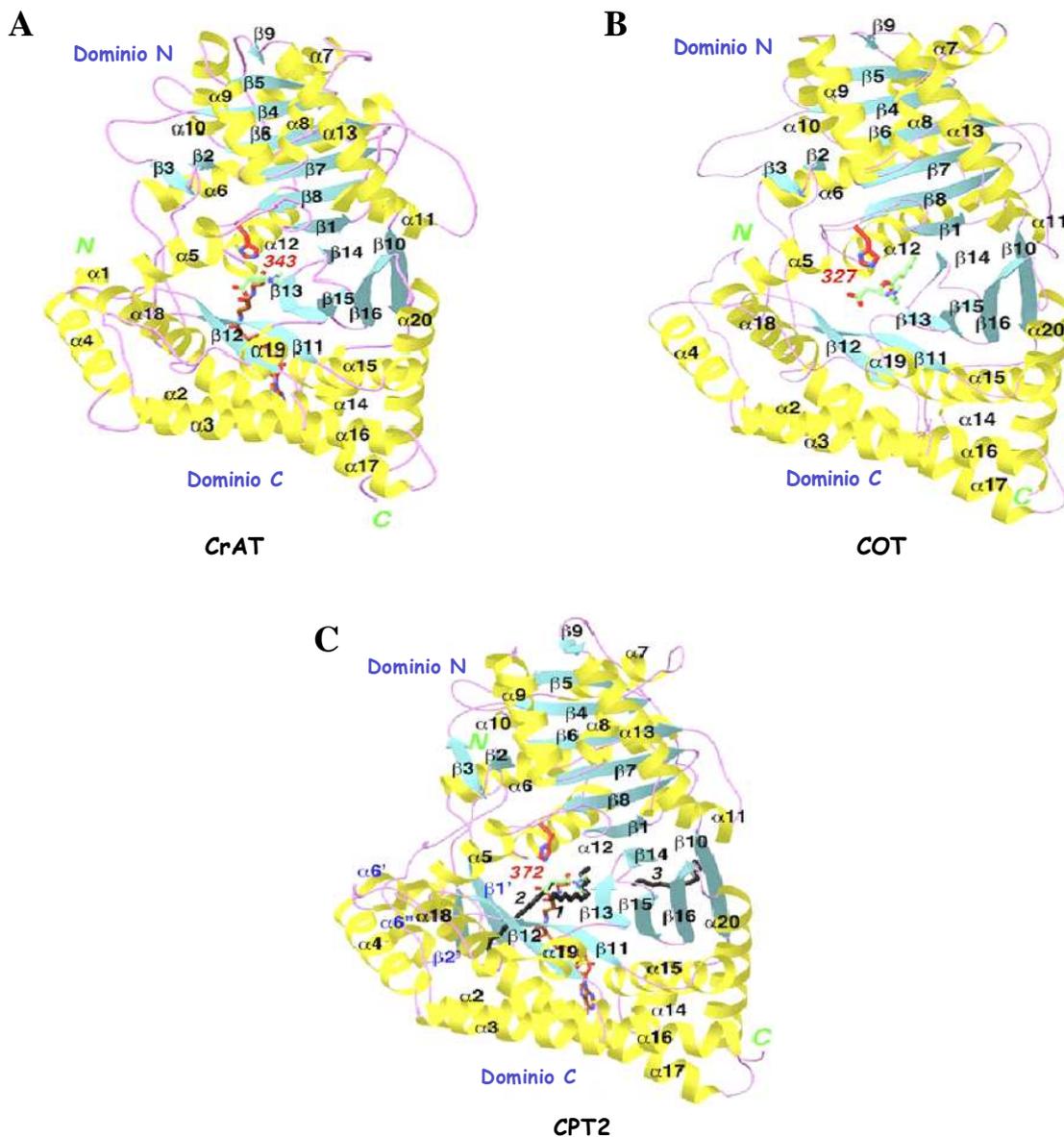
### 8.1 El centro activo y la histidina catalítica

La estructura de CrAT (Jogl, 2003; Wu, 2003) revela una proteína monomérica formada de dos dominios N y C y constituida de 16 hojas  $\beta$  y 20 hélices  $\alpha$  para CrAT de ratón (Jogl, 2003) y de 14 hojas  $\beta$  y 17 hélices  $\alpha$  para CrAT humana (Wu, 2003). Estos dominios tienen una organización similar, presentan muy poca homología de secuencia y crean un túnel de aproximadamente 10Å de diámetro que atraviesa la proteína. Este túnel define una superficie accesible al solvente en el centro de la proteína que constituye el sitio activo (**Figura 5A**).

Las estructuras de COT y de CPT2 son notablemente similares a la de CrAT, consecuente con el hecho que ambas enzimas comparten una identidad de secuencia de aminoácidos del 36% y de 35% respectivamente con CrAT. Sin embargo, se observan diferencias significativas en la región de unión del grupo acil en el sitio activo que define la diferente especificidad del sustrato acil-CoA de ambas enzimas (Jogl, 2005; Hsiao, 2006) (**Figura 5B y 5C**). En la estructura de COT se observa un canal cercano al sitio activo hacia el centro del dominio N que une el grupo acil de los sustratos de cadena media (**Figura 5B**) (Jogl, 2003) y en la estructura del cristal de CPT2, se observan tres dominios: uno de unión de la carnitina, otro de unión del CoA y el último para la unión del grupo acil de cadena larga del sustrato (**Figura 5C**). Además, CPT2 presenta en el dominio N una inserción de 30 residuos formando dos hélices  $\alpha$  ( $\alpha 6'$  y  $\alpha 6''$ ) de naturaleza hidrofóbica y unidas a dos pequeñas hojas  $\beta$  ( $\beta 1'$  y  $\beta 2'$ ). Es probable que esta superficie sea importante para la asociación de este enzima con la membrana

mitocondrial interna. Esta superficie se localiza cerca del túnel de entrada al sitio activo del enzima sugiriendo que las acil-carnitina de cadena larga que hayan sido transportadas a través de la membrana mitocondrial interna pueden ser dirigidas directamente al sitio activo de CPT2. En este sentido, es posible que este inserto pueda favorecer interacciones directas entre CPT2 y carnitina:acil-carnitina translocasa en la membrana mitocondrial interna lo que puede coordinar el transporte de los acil-carnitina y su conversión a acil-CoAs.

Los estudios bioquímicos y de mutagénesis han identificado la His<sup>343</sup> en CrAT como el residuo catalítico. His<sup>343</sup> en CrAT está posicionado en el centro del túnel donde se encuentre el sitio activo y es accesible por los dos canales: uno es el canal para unir el sustrato carnitina y el otro para unir el CoA (**Figura 5A**). Además, el cambio del residuo homólogo de His<sup>343</sup> en CrAT en los enzimas CPT1 de rata (His<sup>473</sup>), CPT2 (His<sup>372</sup>) y COT (His<sup>327</sup>) mostró una inactivación total de estas enzimas (Morillas, 2001; Brown, 1994a; Morillas, 2000).



**Figura 5. Estructuras cristalográficas de carnitina aciltransferasas.** A) Representación en cintas de la estructura de CrAT de ratón (Jogl, 2003). Se representan las hélices  $\alpha$  en amarillo, las hojas  $\beta$  en azul, los lazos en magenta y el residuo catalítico His<sup>343</sup> en rojo. Se muestran las posibles posiciones de la carnitina y los átomos de carbono del CoA en verde y marrón respectivamente. B) En la misma orientación se muestra la estructura del cristal de COT de ratón (Jogl, 2005) en la que se representa el sustrato octanoilcarnitina en verde y el residuo catalítico His<sup>327</sup> en rojo. C) Estructura de CPT2 de rata (Hsiao, 2006). Se representa la carnitina en verde, el CoA en marrón, la His<sup>372</sup> catalítica en rojo y se numeran las hélices  $\alpha$  y las hojas  $\beta$  implicadas en la unión del enzima a la membrana mitocondrial interna en color azul oscuro. Se numeran e indican en negro las tres cadenas alifáticas observadas en la estructura del cristal y que fueron generadas en presencia del detergente BAM (dodecilo-dimetilo-benzil-bromuro de amonio) puesto en la solución de cristalización.

## 8.2 Sitio de unión de la carnitina

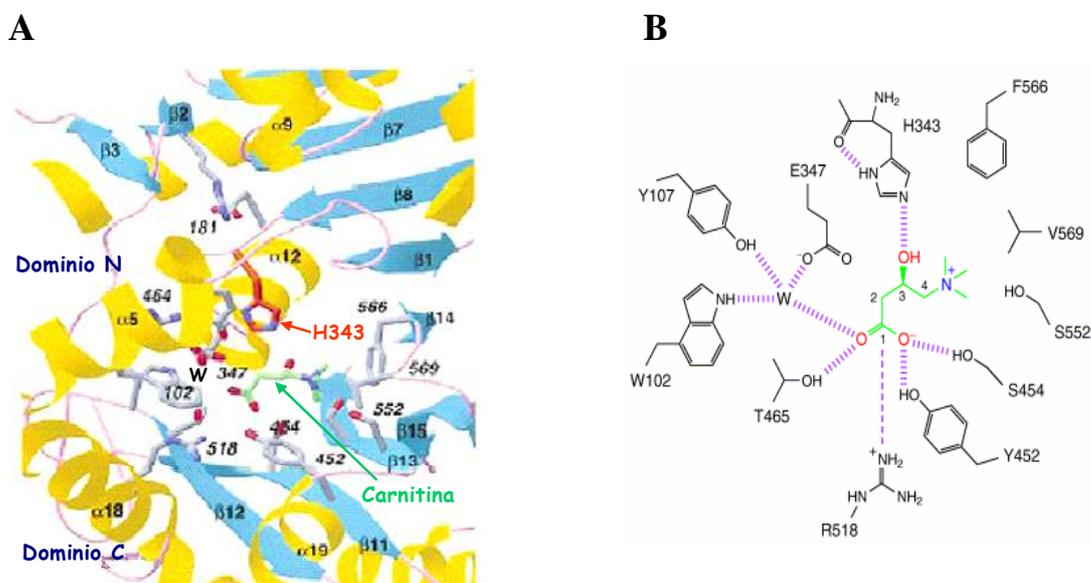
La estructura del cristal de CrAT de ratón unida al sustrato carnitina fue determinada a una resolución de 1,9 Å (Jogl, 2003). Cuando se une la carnitina aparecen cambios estructurales menores en el enzima. Este sustrato se une a la proteína en una conformación parcialmente replegada con sus grupos carboxilo e hidroxilo orientados en direcciones opuestas. El sitio de unión de la carnitina esta formado por las hojas  $\beta$ 11- $\beta$ 14 del dominio C y de la hélice  $\alpha$ 5-hoja  $\beta$ 1 y la hélice  $\alpha$ 12-hoja  $\beta$ 8 del dominio N (**Figura 6A**). Una vez unida al enzima, una sola cara de la molécula de la carnitina esta expuesta y es accesible. Este sustrato interactúa con el enzima vía interacciones de puentes de hidrógeno y interacciones electrostáticas con diferentes residuos del túnel. Según el modelo de ratón es evidente que el grupo hidroxilo de la carnitina interactúa con la histidina catalítica His<sup>343</sup>. El átomo de carbono del grupo carboxilo de la carnitina establece un enlace electrostático con la arginina 518 (Arg<sup>518</sup>) (corresponde a Arg<sup>652</sup> en CPT1A) localizada en la hélice  $\alpha$ 18. Los átomos de oxígeno de este grupo carboxilo interactúan formando puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilos de los residuos Tyr<sup>452</sup> y Ser<sup>454</sup> localizados en la hoja  $\beta$ 11 (Tyr<sup>589</sup> y Ala<sup>591</sup> en CPT1A), con el residuo Thr<sup>465</sup> localizado en la hoja  $\beta$ 12 (Thr<sup>602</sup> en CPT1A) y con una molécula de H<sub>2</sub>O (**Figura 6B**). Esta molécula de agua establece también tres puentes de hidrógeno con los residuos de Trp<sup>102</sup> y Tyr<sup>107</sup> ambos localizados en la hélice  $\alpha$ 5, y otro con el Glu<sup>347</sup> localizado en la intersección entre la hoja  $\beta$ 8 y la hélice  $\alpha$ 12 (Trp<sup>236</sup>, Tyr<sup>241</sup> y Ala<sup>478</sup> en CPT1A).

Finalmente, el grupo amino de la carnitina se localiza en un entorno bastante hidrofóbico y orientado hacia los residuos de Ser<sup>552</sup>, Phe<sup>566</sup> y Val<sup>569</sup> localizados en las hojas  $\beta$ 13 y  $\beta$ 14 (Ser<sup>685</sup>, Phe<sup>712</sup> y Ala<sup>716</sup> en CPT1A) (**Figura 6A y 6B**) (Jogl, 2003). Los residuos Ser<sup>552</sup>-Thr<sup>553</sup>-Ser<sup>554</sup> que han sido modelados en CrAT humana como próximos a la carnitina, pertenecen a un grupo -STS- muy conservado en las aciltransferasas y que jugaría un papel en la estabilización de un estado intermediario durante la catálisis (Wu, 2003). La mutación de esta Ser a Ala en COT bovina (S542A) causó un aumento de 17 veces en el valor de *K<sub>m</sub>* para la carnitina (Cronin, 1997b). El grupo trimetilamonium de la carnitina no muestra muchas interacciones específicas con el enzima ya que su carga positiva no es reconocida por un residuo cargado negativamente próximo a esta carga de la carnitina. El análisis estructural sugiere que esta carga positiva debe ser mantenida y juega un papel importante para la catálisis enzimática.

La gran mayoría de los residuos implicados en la unión de la carnitina están altamente conservados en las carnitina aciltransferasas. Es el caso de la Thr<sup>465</sup> y de la

Arg<sup>518</sup> (Thr<sup>602</sup> y Arg<sup>652</sup> en CPT1A) en el enzima CrAT, que juegan un papel importante en el reconocimiento del grupo carboxilo de la carnitina. La mutación de Arg<sup>518</sup> de CrAT a su homólogo la Asn<sup>514</sup> en COT bovina (R505N) condujo a un aumento de 1650 veces en el valor de *K<sub>m</sub>* para la carnitina sin cambios importantes en la *K<sub>m</sub>* para el CoA o en el valor de *K<sub>cat</sub>* del enzima (Cronin, 1997a), lo que confirma el papel crítico de la Arg en la unión de la carnitina.

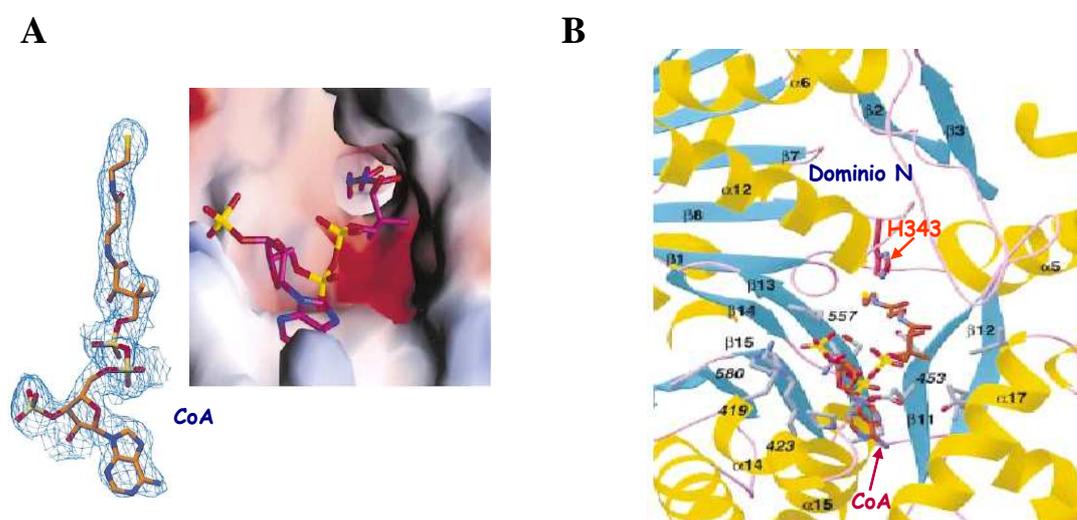
Govindasamy (Govindasamy, 2004a) cristalizó el enzima CrAT humana formando un complejo con la carnitina y caracterizó vía mutagénesis dirigida algunos residuos implicados en la unión con la L-carnitina, como el Tyr<sup>452</sup> y Thr<sup>465</sup>. La mutación de estos residuos posiblemente elimina la interacción del puente de hidrógeno entre el enzima y el grupo carboxílico de la L-carnitina. Además, la mutación del residuo cargado Arg<sup>518</sup> por un residuo no cargado (R518Q), aumentó el valor de *K<sub>m</sub>* para la L-carnitina 232 veces. Tal como se esperaba, esta sustitución interrumpió la interacción electrostática entre el enzima y el grupo carboxilato de la carnitina. Este resultado es consecuente con un estudio previo en COT (Cronin, 1997a).



**Figura 6. Modelo estructural de unión del sustrato carnitina en CrAT de ratón. A)** Representación en cintas del centro activo de unión de la carnitina en CrAT de ratón. Se muestra la cadena lateral del residuo catalítico His<sup>343</sup> en rojo, la carnitina en verde y se indica con una W la molécula de agua cerca de la carnitina. **B)** Dibujo esquemático de las interacciones entre carnitina (verde) y CrAT. Se muestran las interacciones que unen hidrógeno con líneas gruesas discontinuas y la interacción electrostática entre el grupo carboxilato y la Arg<sup>518</sup> se muestra con una línea fina discontinua. Las representaciones se toman de Jogl (Jogl, 2003).

### 8.3 Sitio de unión del CoA

El sitio de unión del CoA se localiza a nivel de la histidina catalítica His<sup>343</sup> en el lado opuesto al sitio de unión de la carnitina en el cristal de CrAT de ratón (**Figura 7A**). El grupo tiol del CoA reacciona con la His<sup>343</sup> a través de un puente de hidrógeno. Esta interacción está directamente implicada en el mecanismo de reacción. El grupo 3'-fosfato del anillo purínico del CoA interactúa con las Lys<sup>419</sup> y Lys<sup>423</sup> (correspondientes a Lys<sup>556</sup> y Lys<sup>560</sup> en CPT1A). También, la cadena pantoténica del CoA interactúa con los residuos Asp<sup>430</sup> y Glu<sup>453</sup> (**Figura 7B**) (Jogl, 2003).



**Figura 7. Modelo estructural de unión del CoA en CrAT de ratón.** A) Mapa de densidad electrónica para el CoA a una resolución de 2,3 Å y representación de la superficie de CrAT en la región de unión del CoA. B) Representación en cintas del sitio de unión del CoA en CrAT de ratón. Se muestra la molécula del CoA en marrón y se indica la cadena lateral del residuo catalítico His<sup>343</sup> en rojo. Representaciones tomadas de Jogl (Jogl, 2004; Jogl, 2005).

### 8.4 Sitio de unión de los ácidos grasos

El modelo estructural de CrAT de ratón sugiere la existencia de un bolsillo hidrofóbico de unión de los ácidos grasos. Este bolsillo estaría formado por las hojas  $\beta 1$  y  $\beta 8$  y también la hélice  $\alpha 12$  del dominio N y por las hojas  $\beta 13$  y  $\beta 14$  del dominio C (**Figura 8A**) (Jogl, 2003). En la hoja  $\beta 14$  se encuentra el residuo Met<sup>564</sup> que juega un papel importante en la selectividad de los sustratos de las carnitina aciltransferasas (Hsiao, 2004; Jogl, 2005) ya que su cadena lateral obstruye la entrada de los sustratos

acil-CoA de cadena media y larga al bolsillo hidrofóbico preformado. Este residuo está conservado solamente en CrAT y está sustituido por una glicina en las otras carnitina aciltransferasas (CPT1, CPT2 y COT). Resultados presentados por nuestro grupo confirmaron que el residuo Met<sup>564</sup> mutado a una glicina era crítico para la especificidad del enzima CrAT de rata hacia el sustrato acetyl-CoA. El mutante CrAT M564G permitió alojar aciles-CoA de cadena media, convirtiendo el enzima CrAT de rata en COT (Cordente, 2004).

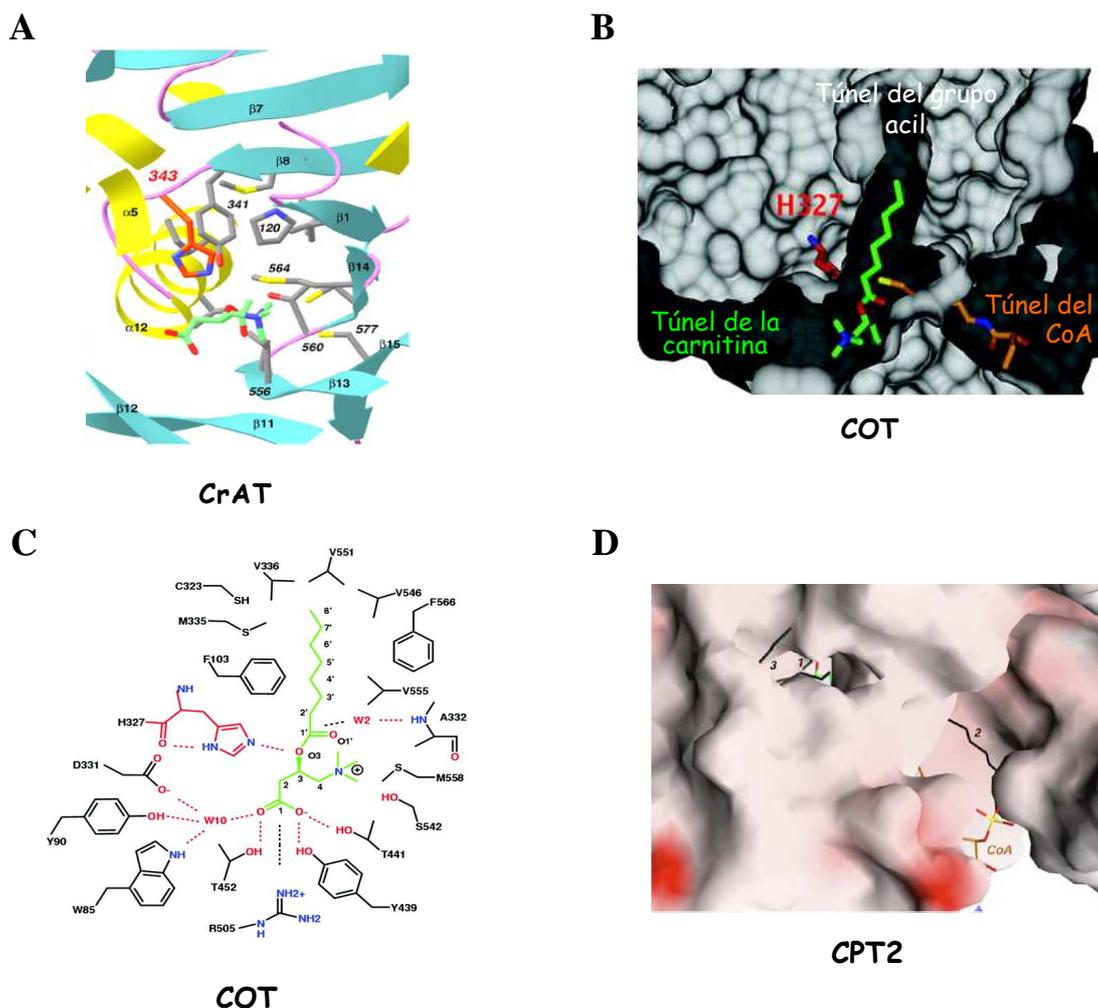
Igual que en el cristal de CPT2, en el cristal de COT de ratón unido a la octanoilcarnitina se observa un tercer canal cercano al sitio activo hacia el centro del dominio N. Esta canal correspondería a un bolsillo de unión al ácido graso de cadena media que está enmarcado longitudinalmente por residuos hidrofóbicos que definen un sitio de unión estrecho y en forma cilíndrica (Jogl, 2005). Este sitio representa un lugar adecuado para el entorno de los grupos acil (**Figura 8B y 8C**). La diferencia más importante entre COT y CrAT es la presencia de una Gly<sup>553</sup> en COT que en CrAT corresponde a la Met<sup>564</sup>. El pequeño tamaño de esta Gly en COT crea un espacio adicional para la unión de aciles-CoA de cadena media. Nuestro grupo demostró que la sustitución del residuo Gly<sup>553</sup> en COT de rata por un residuo más voluminoso, la Met (mutante COT G553M) cambia su especificidad de sustrato hacia aciles-CoA de cadena corta (Cordente, 2004).

El residuo Met<sup>564</sup> forma parte de una secuencia de tres aminoácidos Val<sup>563</sup>-Met<sup>564</sup>-Phe<sup>565</sup> en CrAT de ratón (Hsiao, 2004) y de Val<sup>563</sup>-Met<sup>564</sup>-Ser<sup>565</sup> en CrAT de rata (Cordente, 2004). En el caso de CPT1, esta secuencia corresponde a tres residuos de glicina (Gly<sup>709</sup>-Gly<sup>710</sup>-Gly<sup>711</sup>). Estos residuos que tienen una cadena de átomos de carbono más corta, permiten la existencia de un bolsillo hidrofóbico más ancho accesible a los aciles-CoA de cadena larga. Así, la especificidad por los sustratos acil-CoA de las carnitina aciltransferasas sería dependiente de la naturaleza de tres aminoácidos al nivel de la entrada al bolsillo hidrofóbico. La importancia de estos residuos de glicina se ha puesto de manifiesto en un estudio con pacientes deficientes en CPT1A que permitió identificar a dos pacientes no emparentados que tenían la mutación G709E y G710E, respectivamente. Estas mutaciones sustituyen las pequeñas glicinas por un grupo cargado que seguramente impide la unión del sustrato. El análisis funcional de estas mutaciones mostró que ambas conducían a una pérdida total de la actividad catalítica del enzima (Prip-Buus, 2001; Gobin, 2003).

No solo algunos aminoácidos son fundamentales para la selectividad de la longitud de la cadena del ácido graso, también variaciones estructurales entre las diferentes

carnitina aciltransferasas jugarían un papel relevante. La diferencia más remarcable en las enzimas CPT1 es la presencia de una inserción de 13 aminoácidos entre dos hojas  $\beta$  ( $\beta$ 13 y  $\beta$ 14 en la estructura de CrAT de ratón) que pasa directamente por el sitio activo. Estos cambios en CPT permiten formar un bolsillo de unión flexible que puede acomodar grupos acil-CoA de cadena más larga que CrAT no puede utilizar como sustratos (Wu, 2003).

Se propuso un posible sitio de unión de los grupos acil de cadena larga cuando se cristalizó CPT2 de rata. La utilización del detergente BAM (dodecilo-dimetilo-benzil-bromuro de amonio) que también es un inhibidor de la actividad CPT2 a altas concentraciones, añadido a la solución de cristalización del enzima CPT2, reveló la existencia de tres moléculas de cadenas alifáticas de BAM en la estructura del enzima (Hsiao, 2006). Dos de estas moléculas de BAM se localizan en el sitio activo dentro del túnel y parecen bloquear el acceso de los sustratos carnitina y CoA al enzima (**Figura 5C y Figura 8D**). Es interesante destacar que la tercera cadena alifática de BAM se localiza en otro túnel más estrecho y está relacionado con el sitio activo del enzima (**Figura 8D**). Este sitio correspondería al del grupo acil de cadena larga del sustrato de CPT2. Esta tercera molécula de BAM esta situada entre la hoja  $\beta$ 14 (parte del dominio N) y una cara de las hojas  $\beta$ 15,  $\beta$ 16, y  $\beta$ 10 en el dominio C. Este bolsillo no existe en las estructuras de CrAT y de COT. Sin embargo, la obtención de una estructura cristalográfica de CPT2 formando complejo con el sustrato acil-CoA o el acil-carnitna confirmaría el posicionamiento exacto del grupo acil del sustrato en este bolsillo.



**Figura 8.** Posible sitio de unión del ácido graso en las carnitina aciltransferasas. **A)** Se muestra un modelo para el modo de unión de acetilcarnitina en CrAT. Se indica la His<sup>343</sup> catalítica en rojo y la molécula de acetilcarnitina en verde (Jogl, 2003). **B)** Posicionamiento de los tres túneles de unión de carnitina, el CoA y el grupo acil en el sitio activo de COT; se representa en rojo como punto de referencia la histidina catalítica (His<sup>327</sup>). Ilustración tomada de Jogl (Jogl, 2005). **C)** Dibujo esquemático del modo de unión del octanoilcarnitina en COT. Las interacciones de unión de hidrógeno entre el sustrato y el enzima COT se muestran en líneas rojas discontinuas y la interacción electrostática entre el grupo carboxilato y la Arg<sup>505</sup> se muestra con una línea negra discontinua (Jogl, 2005). **D)** Superficie molecular del sitio activo de CPT2. Se representa el CoA en marrón y se numeran las tres cadenas alifáticas del inhibidor BAM en negro (Hsiao, 2006).

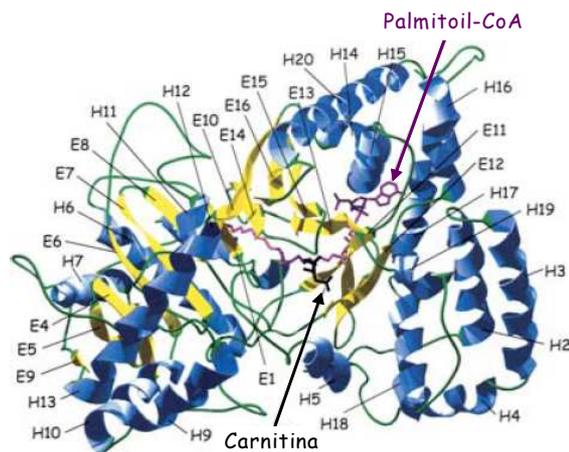
## 9. MODELO BIOINFORMÁTICO 3-D DE CPT1A

Tras la cristalización de CrAT de ratón (Jogl, 2003) un modelo 3-D “in silico” de CPT1A de rata fue obtenido por nuestro grupo (Morillas, 2004) y por otro grupo el de CPT1A humana (Gobin, 2003).

Nuestro modelo basado en el cristal de CrAT de ratón, comprende los residuos 166-773 de CPT1A ya que CrAT carece de la región N-terminal de CPT1A que comprende ambos segmentos transmembrana. La estructura 3-D del dominio catalítico de CPT1A es semejante al de CrAT e implica 20 hélices  $\alpha$  y 16 hojas  $\beta$ . No obstante, se observan ciertas diferencias, CPT1A posee un lazo adicional entre la hélice  $\alpha$ 12 y la hoja  $\beta$ 9 y entre las hojas  $\beta$ 13 y  $\beta$ 14 (**Figura 9A**) (Morillas, 2004). Los residuos Asp<sup>477</sup> y Asp<sup>567</sup> en CPT1A de rata son importantes para la catálisis ya que sus mutaciones a Ala producen una pérdida casi total de la actividad enzimática (Morillas, 2004). Según el modelo, estos residuos se localizan cerca de la histidina catalítica, His<sup>473</sup> y participarían en la reacción enzimática. En cambio, el Asp<sup>353</sup> en CPT2 (Asp<sup>454</sup> en CPT1A) estaría implicado en la estabilidad de la proteína (Brown, 1994a). Los residuos del tripéptido STS (Ser<sup>685</sup>-Thr<sup>686</sup>-Ser<sup>687</sup>) están muy próximos a la carnitina y participarían en la reacción enzimática. La mutación de los residuos Thr<sup>686</sup> y Ser<sup>687</sup> a Ala produce una pérdida total de la actividad enzimática. Estos residuos mantendrían el sitio activo del enzima en una conformación óptima para la catálisis (Morillas, 2004).

También se han descritos algunos residuos implicados en la unión del sustrato palmitoil-CoA en CPT1. Los residuos Glu<sup>590</sup>, Asp<sup>567</sup>, Leu<sup>297</sup>, Ser<sup>565</sup>, Lys<sup>556</sup> y Lys<sup>560</sup> localizados a menos de 5 Å de distancia del CoA interactuarían con éste mediante puentes de hidrogeno o interacciones electrostáticas (Morillas, 2004; Jogl, 2003). Además, se ha propuesto un sitio de unión del grupo palmitato del palmitoil-CoA en un bolsillo hidrofóbico que está formado por la helice  $\alpha$ 12 y la hoja  $\beta$ 14 (Morillas, 2004). Los tres residuos Gly<sup>709</sup>-Gly<sup>710</sup>-Gly<sup>711</sup> mencionados anteriormente (**apartado 8.4**), serían importantes para la correcta ubicación de la cadena hidrocarbonada del acil-CoA.

Tras la cristalización de otros 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), presentamos en este trabajo un nuevo modelo estructural 3-D de CPT1A y CPT1B basado en las informaciones proporcionadas por los cristales (**ver apartado Resultados**).



**Figura 9. Modelo estructural de CPT1A de rata.** Representación en cintas del modelo propuesto para CPT1A. Se representan las hojas  $\beta$  (amarillo), las hélices  $\alpha$  (azul), los sitios putativos de la carnitina (negro) y del palmitoil-CoA (magenta). Se numeran los elementos secundarios según la estructura cristalográfica de CrAT de ratón (Jogl, 2003). Representaciones tomadas de Morillas (Morillas, 2004).

Otros residuos han sido caracterizados como esenciales para la actividad catalítica del enzima. Sin embargo, estos residuos se localizan lejos del sitio catalítico y jugarían un papel estructural más que funcional. El tratamiento de mitocondrias de levadura que sobreexpresan CPT1A con fenilglioxilato y N-bromosuccinimida (agentes químicos que modifican específicamente y respectivamente los residuos de Arg y Trp) inducen una pérdida importante de la actividad enzimática (Dai, 2000). Esto sugiere que uno o varios residuos de Arg y Trp juegan un papel esencial en la actividad catalítica del enzima. Se ha mostrado por mutagénesis dirigida que los residuos de Arg<sup>388</sup> y Arg<sup>451</sup> así como los residuos Trp<sup>391</sup> y Trp<sup>452</sup> están implicados en la actividad catalítica del enzima CPT1A de rata ya que su sustitución por Ala, reduce considerablemente la actividad enzimática (Dai, 2000). Sus mutaciones conducen a una disminución de la afinidad por los sustratos carnitina y palmitoil-CoA. Se ha propuesto que estos cuatro residuos (Trp<sup>391</sup>, Trp<sup>452</sup>, Arg<sup>388</sup> y Arg<sup>451</sup>), aunque alejados del sitio catalítico, están implicados en la estabilidad del complejo enzima-sustrato (Dai, 2000).

El análisis de los residuos C-terminales de CPT1B puso en evidencia el papel esencial de la Leu<sup>764</sup> en la actividad enzimática (Dai, 2003). Su mutación conduce a una disminución de la actividad del enzima. Se ha sugerido que este residuo jugaría un papel importante en el plegamiento correcto de la proteína (Dai, 2003). También, se ha mostrado que la delección de los 31 últimos aminoácidos del dominio C-terminal de CPT1A, conduce a un plegamiento anormal del enzima lo que la hace totalmente

inactiva (Pan, 2002). Así el residuo Leu<sup>764</sup> constituiría un determinante estructural esencial para la adquisición de una correcta conformación de CPT1.

## 10. CPT1, PRINCIPAL SITIO DE REGULACIÓN DE LA $\beta$ -OXIDACIÓN

Tres mecanismos de regulación de la oxidación de ácidos grasos permiten modular la actividad de CPT1: 1) modificaciones en la expresión del gen que en consecuencia producen variaciones de la cantidad de proteína (Thumelin, 1994; Chatelain, 1996); 2) variaciones de la concentración hepática de su inhibidor fisiológico, malonil-CoA (McGarry, 1977); 3) alteraciones de su sensibilidad a la inhibición por malonil-CoA.

### 10.1 Regulación transcripcional

En función de las situaciones fisiológicas y patológicas, la actividad CPT1A se controla a largo plazo por modificaciones de la expresión de su gen (McGarry, 1997). La concentración de mRNA de CPT1A se eleva durante el ayuno y tras un régimen hiperlipídico (situaciones asociadas con un aumento de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga) y opuestamente, la concentración de mRNA está reducida en las situaciones donde la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga es débil (realimentación después de un ayuno y un régimen rico en carbohidratos) (Thumelin, 1994; Park, 1995). Estas situaciones están asociadas a una modificación de la ratio molar de las concentraciones plasmáticas de insulina y de glucagón (Girard, 1992; Chatelain, 1996).

El estudio de los mecanismos de regulación de la oxidación hepática de los ácidos grasos de cadena larga permitió mostrar que en el nacimiento la inducción de la capacidad del hígado para oxidar los ácidos grasos de cadena larga estaba bajo el control de las hormonas pancreáticas. El AMPc estimula de un modo dosis-dependiente la expresión del gen de CPT1A mientras que la insulina se opone a estos efectos (Chatelain, 1996). El promotor de CPT1A dispone de elementos de respuesta al AMPc: CRE (*cAMP Response Element*). El gen de CPT1A de rata posee un elemento CRU (*cAMP Response Unit*) (-2938 a -2831) funcional constituido por un motivo CRE y por un motivo DR1 (*Direct Repeat 1*). Se ha mostrado en hepatocitos de rata que estas dos secuencias unen respectivamente, la proteína CREB (*CRE Binding Protein*) y el factor hepático HNF4 $\alpha$  en forma de dímero (Louet, 2002). HNF4 $\alpha$  es un factor nuclear que tiene un papel central en la conservación de la expresión de genes hepáticos implicados en la homeostasis lipídica (Hayhurst, 2001). Además, experimentos de co-transfección mostraron que la presencia del co-activador PGC-1 (*PPAR $\gamma$  Coactivator 1*) ampliaba

considerablemente la inducción de la transcripción del gen de CPT1A por AMPc (Louet, 2002). PGC-1 se uniría al complejo CREB-HNF4 $\alpha$  preformado sobre el elemento CRU del promotor para estimular la expresión del gen de CPT1A (Song, 2004).

La expresión de CPT1A también está bajo el control de los ácidos grasos de cadena larga que inducen un aumento de mARN. La acumulación dosis-dependiente de mARN es consecuencia de dos mecanismos: una estimulación de la expresión del gen de CPT1A y una estabilización del mARN. El nivel de los mARN de CPT1A es más elevado en animales tratados con fibratos que son ligandos de PPAR $\alpha$  (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha$* ) (Chatelain, 1996). Los ácidos grasos de cadena larga activan la expresión de CPT1A vía un sitio de respuesta FARE (*Fatty Acid Response Element*) situado en el primer intrón del gen (+19 a +1225) (Chatelain, 1996; Louet, 2001). CPT1B también responde a la acumulación de intermediarios de los ácidos grasos intracelulares mediante la presencia de un FARE en el promotor (Mascaró, 1998). Aunque hacen falta más estudios para definir los mecanismos moleculares implicados en esta regulación, se sabe que la activación de la transcripción por los ácidos grasos de cadena larga sería independiente de PPAR $\alpha$  (Issemann, 1990; Desvergne, 1999). Esto se ha confirmado por el estudio fenotípico de ratón knockout de PPAR $\alpha$  (Leone, 1999; Le May, 2000; Louet, 2001). El gen de CPT1A contiene un sitio PPRE (*PPAR response element*) correspondiente a un DR1 alejado del sitio de iniciación de la transcripción (-2883 a -2773). Los fibratos se unen a los receptores de PPAR $\alpha$ , los cuales una vez activados, van a fijarse sobre el elemento PPRE formando un heterodímero con el receptor RXR $\alpha$  (Louet, 2001).

La expresión del gen de CPT1A está también bajo el control de las hormonas tiroideas. Así, las ratas hipertiroideas presentan una acumulación de mARN que codifica para CPT1A con respecto a ratas hipotiroideas (Mynatt, 1994). Un sitio TRE (*Thyroid hormone Response Element*) ha sido identificado a nivel del promotor de CPT1A (-2938 a -2923) (Barrero, 2000). Para activar la transcripción del gen, la hormona T3 se fija a su receptor TR (*Thyroid hormone Receptor*) que a su vez se fija sobre el elemento TRE formando un heterodímero con el receptor del ácido retinóico RXR $\alpha$  (*Retinoid X Receptor  $\alpha$* ) (Sharma, 2000). Se ha mostrado que la activación de la expresión del gen de CPT1A por las hormonas tiroideas requiere otros factores: C/EBP $\alpha$  (*CCAAT/enhancer-binding protein*) y USF1 y USF2 (*Upstream Stimulatory Factor*). Estos factores se fijan en secuencias distintas localizadas en el primer intrón entre los nucleótidos +659 y +729 (Jackson-Hayes, 2003).

## 10.2 Regulación de la actividad CPT1A por malonil-CoA

Existe una competición entre la unión del malonil-CoA y del acil-CoA de cadena larga (McGarry, 1978; Saggerson, 1981b; Mills, 1983). La presencia del sustrato palmitoil-CoA reduce la capacidad de unión del malonil-CoA en mitocondrias intactas de hígado, de corazón y de músculo esquelético de rata (Mills, 1983). Sin embargo, varias evidencias sugieren que malonil-CoA no sería un simple inhibidor competitivo sino que se comportaría también como un inhibidor de tipo alostérico (Cook, 1994; McMillin, 1994) y que por tanto existiría un sitio de unión para el inhibidor diferente del sitio catalítico. Esto se ha demostrado por experimentos de unión del malonil-CoA que pusieron en evidencia dos sitios distintos de unión uno de alta y otro de baja afinidad para el inhibidor (Mills, 1983; Bird, 1984). La utilización de moléculas inhibidoras permitió mostrar que el sitio de baja afinidad está solapando al sitio de unión del acil-CoA que está oculto en la proteína y que es insensible a la acción de las proteasas (Cook, 1994). Al nivel de este sitio, existe una competición de unión entre los aciles-CoA y malonil-CoA. En cambio, el sitio de unión de alta afinidad es independiente del sitio activo del enzima y estaría localizado en la superficie de la proteína al nivel de una región sensible a la acción de las proteasas (Cook, 1994). Este sitio se comportaría como un sitio alostérico donde la unión del inhibidor conlleva un cambio conformacional del enzima el cual hace que la proteína sea menos sensible a la acción de las proteasas (Esser, 1993). A pesar de estos estudios no se conoce la localización exacta de estos dos sitios de unión del malonil-CoA en CPT1.

### 10.2.1 Importancia del dominio N-terminal en la inhibición de CPT1 por malonil-CoA

La proteólisis del extremo N-terminal por la acción de la proteinasa K (Fraser, 1997) o la delección de los 18 primeros aminoácidos de CPT1A (Shi, 1998) causa una pérdida total de la sensibilidad al malonil-CoA y del sitio de unión de alta afinidad. Con el fin de determinar qué aminoácidos de los 18 son importantes para la sensibilidad a malonil-CoA, varias mutaciones han sido realizadas. Estos experimentos de mutagénesis mostraron que el Glu<sup>3</sup> y la His<sup>5</sup> eran esenciales para la conservación de la sensibilidad al malonil-CoA y de su sitio de unión de alta afinidad (Shi, 1999; Woldegiorgis, 2000). La longitud de la cadena de átomos de carbono y la carga negativa del glutamato son importantes para la conservación funcional del sitio de alta afinidad (Jackson, 2001). El glutamato podría establecer una interacción con el dominio C-terminal del enzima vía un puente de hidrógeno o un puente salino (Jackson, 2001). La implicación de los residuos Glu<sup>3</sup> y His<sup>5</sup> difiere ligeramente entre la isoforma hepática y muscular. La mutación E3A tiene un efecto menos pronunciado sobre la afinidad al malonil-CoA de

CPT1B que de CPT1A. La mutación H5A altera completamente el sitio de unión de baja afinidad de CPT1B mientras que afecta débilmente a la de CPT1A (Shi, 1999; Zhu, 2003). Por otro lado, un estudio reciente demostró que el residuo Glu17 en CPT1B de cerdo era importante no solo para la sensibilidad a malonil-CoA sino también para la alta afinidad del enzima hacia el sustrato carnitina (Relat, 2008).

Los estudios funcionales de las proteínas quimeras de CPT1A y CPT1B indican que la naturaleza de ambos dominios de la proteína determina el grado de sensibilidad de CPT1A frente al malonil-CoA (Jackson, 2000a). CPT1A delecionada en sus 82 residuos N-terminales, además de ser activa, conserva su sensibilidad frente al malonil-CoA (Jackson, 2000b; Cohen, 2001). Sin embargo, la deleción de los 6 primeros residuos induce una pérdida total de la sensibilidad al malonil-CoA. Esto sugiere que el dominio N-terminal de CPT1A contiene dos tipos de elementos importantes para la sensibilidad al malonil-CoA: un elemento positivo (los 18 primeros aminoácidos de N-terminal) y un elemento negativo (entre los aminoácidos 19 y 82 de N-terminal). Experimentos de deleción parcial permitieron poner en evidencia estos elementos positivos y negativos. La deleción de los residuos 19-30 provoca un aumento importante de la sensibilidad al malonil-CoA (Jackson, 2000b) lo que los convierte en elementos negativos ya que reducen la sensibilidad al malonil-CoA. En cambio, esta modulación negativa no se observa en CPT1B, sugiriendo que esta región ejerce un “freno” en CPT1A presentando una menor sensibilidad al malonil-CoA respecto a CPT1B. El estudio descrito por Nicot y sus colaboradores (Nicot, 2002) en quimeras entre CPT1A de rata y de cerdo demostró que en el dominio C-terminal de la proteína radica la sensibilidad del enzima hacia malonil-CoA y que el grado de sensibilidad viene determinada por la estructura de este dominio. La deleción de los primeros 18 aminoácidos del dominio N-terminal en CPT1A de cerdo confirman que la sensibilidad de CPT1A hacía malonil-CoA depende de las interacciones entre ambos dominios N- y C-terminal. Otro análisis permitió mostrar que esta regulación negativa se lleva a cabo por los residuos Ser<sup>24</sup> y Gln<sup>30</sup> ya que sus sustituciones conduce a un aumento en la sensibilidad por el inhibidor comparable o igual a la observada en respuesta a la deleción de la región 19-30 (Jackson, 2001).

Además, un estudio por un método físico-químico demostró que CPT1A adopta estados conformacionales diferentes que son más o menos sensibles a la inhibición por malonil-CoA. Estos estados estructurales también implican diferentes grados de proximidad entre unos residuos específicos del dominio N- y C-terminal en condiciones caracterizadas por cambios en la sensibilidad al malonil-CoA (Faye, 2005). Por otro lado, ha sido observado que los cambios (bien por inserciones o deleciones) en la

longitud del lazo próximo al dominio transmembrana 2 en CPT1A pueden aumentar su sensibilidad frente al malonil-CoA (Borthwick, 2006). Recientemente durante la realización del presente trabajo, nuestro grupo ha mostrado la importancia de la interacción estructural entre el dominio N- y C-terminal de CPT1A de rata por mutación de dos residuos Glu<sup>26</sup> (N-terminal) y Lys<sup>561</sup> (C-terminal). Dichas mutaciones eliminan la interacción entre ambos dominios ya que los ensayos de inhibición mostraron una disminución de 12 veces en el valor de la IC<sub>50</sub> respecto al control (López-Viñas, 2007).

Así, el extremo N-terminal de CPT1A juega un papel muy importante en los mecanismos implicados en la inhibición por malonil-CoA. Sin embargo, este dominio es incapaz, independientemente del dominio C-terminal, de unir con una alta afinidad malonil-CoA (Pan, 2002). El papel del extremo N-terminal sería pues el de mantener el dominio C-terminal en un estado conformacional óptimo para la unión del inhibidor.

#### 10.2.2 Residuos del dominio C-terminal implicados en la inhibición por malonil-CoA

Se reportó que los residuos Arg<sup>601</sup>, Glu<sup>603</sup> y Arg<sup>606</sup> además de ser esenciales para la actividad catalítica del enzima, también juegan un papel importante en la sensibilidad al malonil-CoA. Sus mutaciones inducen una pérdida de la actividad enzimática asociada a una fuerte disminución de la sensibilidad al malonil-CoA (Treber, 2003). En cambio, la mutación del residuo Glu<sup>590</sup> esencial también para la actividad del enzima, conduce a un aumento en la sensibilidad del enzima al malonil-CoA (Napal, 2003). Se ha sugerido que estos cuatro residuos estarían implicados en la formación del bolsillo de unión del CoA del sustrato (palmitoil-CoA) y del inhibidor (malonil-CoA) (Treber, 2003; Napal, 2003). Este sitio correspondería al sitio de unión de baja afinidad para malonil-CoA donde existe una competición entre el sustrato y el inhibidor. Estos resultados han sido confirmados por la localización del Glu<sup>590</sup> en nuestro modelo estructural de CPT1A al nivel del sitio de unión del palmitoil-CoA y en concreto del grupo CoA (Morillas, 2004).

El análisis de otros residuos conservados en las aciltransferasas sensibles al malonil-CoA mostró que los residuos de His<sup>277</sup> y His<sup>483</sup> así como la Ala<sup>478</sup> y la Met<sup>593</sup> juegan un papel importante en la inhibición de CPT1A de rata por malonil-CoA ya que sus mutaciones conducen a una pérdida importante de la sensibilidad frente al inhibidor (Morillas, 2002; Morillas, 2003). Todos estos estudios de mutagénesis dirigida analizados en el modelo de CPT1 propuesto por nuestro grupo aportaron información en cuanto a la comprensión del funcionamiento catalítico de CPT1A. Sin embargo, este modelo obtenido a partir del cristal de CrAT tiene sus límites ya que no tiene en cuenta

el dominio N-terminal de la proteína y no permite estudiar las relaciones que existen entre este dominio y el dominio catalítico C-terminal del enzima.

### 10.3 Regulación de la cantidad de malonil-CoA

Según el estado nutritivo y de desarrollo, las concentraciones intracelulares del malonil-CoA varían. En un estado de alimentación, la vía de síntesis *de novo* de los ácidos grasos de cadena larga es estimulada y conduce a un aumento en la concentración del malonil-CoA que inhibe CPT1 y por lo tanto se impide su entrada en la vía de la  $\beta$ -oxidación. Por el contrario, en el ayuno, la síntesis del malonil-CoA está reducida y conduce a una ausencia de la inhibición de la  $\beta$ -oxidación. Así, cualquiera que sea el tejido considerado, el papel doble del malonil-CoA (metabolito e inhibidor) permite el control coordinado de la síntesis y de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga en la célula (McGarry, 1989). Además, la interacción malonil-CoA/CPT1 representa para la célula un mecanismo que le permite estar informada sobre la disponibilidad relativa de ácidos grasos y de glucosa (Ruderman, 1999). La alteración de este sistema de control, podría ser la base de ciertos desórdenes metabólicos tales como la obesidad y la diabetes tipo 2.

Malonil-CoA es sintetizado por el enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) (**Figura 3**). Existen dos isoformas de esta enzima, ACC1 (o ACC $\alpha$ ) y ACC2 (o ACC $\beta$ ) codificadas por diferentes genes. ACC1 es la isoforma predominante de los tejidos lipogénicos tales como el hígado y el tejido adiposo, mientras que ACC2 se expresa mayoritariamente en el corazón y el músculo esquelético (Thampy, 1989; Bianchi, 1990; Ha, 1996; Abu-Elheiga, 1997). La estructura molecular de estas dos isoformas difiere a nivel de su extremo N-terminal ya que ACC2 posee 114 aminoácidos suplementarios. Se ha mostrado que esta secuencia que es muy hidrofóbica sirve como un punto de anclaje de ACC2 en la membrana mitocondrial externa (Abu-Elheiga, 2000). ACC1 no posee esta secuencia y se localiza en el citosol. Se ha sugerido que malonil-CoA producido por ACC1 participaría en la vía de la lipogénesis, mientras que el producido por ACC2 a nivel de la mitocondria tendría como papel el de inhibir CPT1. Además, los ratones transgénicos del gen ACC2 presentan un aumento de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga no sólo en el músculo, sino que también en el hígado y el tejido adiposo, lo que indica que esta isoforma juega un papel importante en el control del flujo de oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (Abu-Elheiga, 2001; Oh, 2005). La actividad ACC está regulada estrechamente por factores hormonales y nutricionales (Thampy, 1988; Mabrouk, 1990). En efecto, en un estado de alimentación, la síntesis de ACC es estimulada y su actividad aumentada. En

cambio, durante el ayuno o la diabetes, su expresión es reprimida y su actividad disminuida. La actividad de ACC se modula a corto plazo por una activación alostérica por citrato, por una inhibición por acil-CoA de cadena larga y por modificaciones reversibles de su estado de fosforilación (Allred, 1996). El glucagon estimula la fosforilación de ACC, provocando su inactivación. Esta fosforilación es catalizada por AMPK (*AMP-activated protein kinase*) (Hardie, 1997; Brownsey, 1997).

La concentración de malonil-CoA en los tejidos está controlada no sólo por la modulación de la actividad de ACC, sino también a nivel de su degradación que esta catalizada por malonil-CoA decarboxilasa (MCD) (Kolattukudy, 1981). La expresión de este enzima está elevada en las situaciones donde la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga es importante y su actividad también estaría controlada por una modificación de su estado de fosforilación, siendo la forma fosforilada, la forma activa del enzima (Dyck, 2000). La inhibición farmacológica a corto plazo de MCD protege el corazón de la isquemia, aumentando los niveles intracelulares de malonil-CoA, disminuyendo la oxidación de ácidos grasos y aumentando la oxidación de glucosa *ex vivo* (corazones de rata) e *in vivo* (corazones de cerdo) (Dyck, 2004). En un estudio realizado en ratones knockout de MCD en corazón, no se observó un cambio en la oxidación de los ácidos grasos y de la glucosa comparado con los ratones salvajes. Sin embargo, los corazones de los ratones deficientes en MCD mostraron un aumento en la expresión de genes que regulan la utilización de los ácidos grasos y una preferencia marcada para la utilización de la glucosa después de una isquemia, lo que indica que una inhibición crónica de MCD puede ser una buena aproximación para el tratamiento de la isquemia cardiaca (Dyck, 2006).

Además de los cambios de concentración del malonil-CoA, CPT1A presenta en función de las situaciones fisiopatológicas, variaciones de sensibilidad hacia su inhibidor (Prip-Buus, 1995). La sensibilidad de CPT1A está reducida en las situaciones asociadas a un aumento de la oxidación hepática de los ácidos grasos de cadena larga (periodo neonatal, ayuno, diabetes de tipo 1, régimen hiperlipídico) (McGarry, 1997) y al contrario, en las situaciones asociadas con una bajada de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (realimentación, diabetes de tipo 1 tratado con insulina, destete sobre régimen hiperglucídico, obesidad, gestación y lactancia) (McGarry, 1997). Estas observaciones sugieren que los cambios de sensibilidad estarían bajo el control de las hormonas pancreáticas. En hepatocitos fetales de conejo, el glucagon (AMPc) provoca a largo plazo una disminución de la sensibilidad de CPT1A hacia malonil-CoA, mientras que la insulina se opone a los efectos del glucagon (Prip-Buus, 1990).

#### 10.4 Otros factores que modulan la actividad y la sensibilidad de CPT1 al malonil-CoA

El cambio de pH podría afectar la actividad del enzima CPT1. Cuando se varía el pH de 7,6 a 6,8, se reduce la afinidad de CPT1A por el sustrato carnitina pero no se afecta la del palmitoil-CoA (Mills, 1984) y además, aumenta la sensibilidad del enzima hacia su inhibidor fisiológico (Stephens, 1983). Este aumento de sensibilidad se explica por una disminución de la constante de disociación ( $K_d$ ), es decir, un aumento en la afinidad del malonil-CoA por el enzima CPT1A (Mills, 1984). La modulación de la sensibilidad de CPT1A hacia malonil-CoA en función del pH, podría jugar un papel importante en las situaciones de cetosis ácida. La disminución del pH observada en estas situaciones atenuaría el flujo de oxidación de los ácidos grasos de cadena larga aumentando así la sensibilidad de CPT1A hacia malonil-CoA.

La sensibilidad de CPT1 hacia su inhibidor fisiológico depende también de la temperatura. Varios parámetros pueden variar con la temperatura tales como la estructura del enzima y la estabilidad del complejo enzima-sustrato o enzima-inhibidor que llevan a una modificación de las propiedades cinéticas. Ensayos de actividad realizados a 20°C y a 37°C en presencia de concentraciones crecientes del malonil-CoA muestran que CPT1A es menos sensible a la inhibición a 37°C que a 20°C (Kolodziej, 1990). Esta disminución de sensibilidad se debería a un aumento del valor de  $K_i$  indicando que la afinidad del enzima por malonil-CoA así como la capacidad de inhibición disminuye con la temperatura (Kashfi, 1995).

Existe una dependencia de las propiedades funcionales de CPT1 hacia su microentorno en las membranas (Woeltje, 1987). Cuando CPT1A se solubiliza por detergentes, la proteína es inactiva e insensible al malonil-CoA (Woeltje, 1987; Prip-Buus, 1998; McGarry, 2000). A la inversa, cuando la proteína solubilizada se reinserta en una membrana biológica, su actividad y su sensibilidad al malonil-CoA son restauradas (Woldegiorgis, 1992; McGarry, 2000). Se ha establecido una correlación entre la fluidez de las membranas, la actividad de CPT1A y su sensibilidad al malonil-CoA. Un aumento en la fluidez de la membrana mitocondrial externa inducida *in vitro* por el alcohol bencílico produce un aumento de su actividad catalítica y una desensibilización de CPT1A al efecto inhibidor del malonil-CoA (Kolodziej, 1990).

El estudio de la ubicación de CPT1A al nivel de la membrana mitocondrial externa muestra la existencia de dos localizaciones diferentes de CPT1 de hígado de rata alimentada. Un 40-60% de las moléculas estarían localizadas al nivel de los sitios de

contacto mitocondriales (Fraser, 1998; Hoppel, 1998). Estos sitios corresponden a zonas de acercamiento entre la membrana mitocondrial externa y la membrana mitocondrial interna y representan únicamente el 5-10% de la superficie mitocondrial, lo que sugiere un enriquecimiento de CPT1A al nivel de estos sitios de contacto. A este nivel, CPT1A colocalizaría con otras proteínas como acil-CoA sintetasa y porina (Fraser, 1998; Hoppel, 1998). Además, CPT1A cuando se localiza en estos sitios de contacto presenta una afinidad más alta por el palmitoil-CoA y una sensibilidad más débil por malonil-CoA. Se ha demostrado que el tipo de inhibición de CPT1A por malonil-CoA es diferente según la localización de este enzima en la membrana mitocondrial externa. Malonil-CoA se comporta como un inhibidor no competitivo de CPT1A respecto al sustrato palmitoil-CoA fuera de los sitios de contacto, mientras que actúa como un inhibidor competitivo frente a los aciles-CoA a nivel de estos sitios (Fraser, 2001). Sin embargo, la repartición de CPT1A a nivel de la membrana mitocondrial externa en situaciones asociadas con un aumento de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (ayuno y diabetes) no es del todo conocida. De hecho, no se pudo establecer ninguna relación entre el estado fisiopatológico del animal y la localización de CPT1A en la superficie de la membrana mitocondrial externa (Fraser, 1998).

Varios estudios pusieron en evidencia una modulación de la actividad CPT1A por interacciones con el citoesqueleto. En primer lugar, se ha sugerido que la actividad CPT1A podría ser controlada a corto plazo por un mecanismo de fosforilación/defosforilación de la proteína (Guzmán, 2000; Velasco, 1998). La incubación con el ácido okadaico, un inhibidor de las fosfatasa 1 y 2A, muestra una estimulación del 50% de la actividad de CPT1A en hepatocitos aislados y permeabilizados (Guzman, 1991; Guzman, 1992). Sin embargo, no se observa este efecto cuando se realizan los experimentos con mitocondrias aisladas. Además, la incubación de mitocondrias aisladas o de membrana mitocondrial externa en presencia de proteínas quinasas (PKA, AMPK) o de fosfatasa (1, 2A) no afecta la actividad de CPT1A (Guzman, 1994). Así el aumento de la actividad CPT1A observado no sería debido a una fosforilación directa de la proteína por estas quinasas, sino implicaría la fosforilación de componentes citosólicos o de membranas perdidos en el momento del aislamiento de las mitocondrias (Guzman, 1994). Se ha descrito que al inhibir las fosfatasa 1 y 2A por el ácido okadaico en células, se mantenía la proteína quinasa II  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de calmodulina (proteína quinasa II  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina) bajo su forma fosforilada activa la cual fosforilaría los elementos del citoesqueleto conduciendo a su reorganización y rotura de su interacción con CPT1A que se vuelve más activa (Velasco, 1997). Además, AMPK también participaría en un aumento ligero de la actividad de CPT1A tras la fosforilación de las proteínas del citoesqueleto tales como

las citoquinas, citocreatininas 8 y 18 (Velasco, 1997; Velasco, 1998).

Kerner y sus colaboradores pusieron en evidencia que la actividad de CPT1A es modulada por fosforilación/defosforilación directa (Kerner, 2004). Este trabajo mostró que cuando se aíslan las mitocondrias de hígado de rata alimentada en presencia de inhibidores de fosfatasas, se fosforilan los residuos de Ser<sup>741</sup> y Ser<sup>747</sup> de CPT1A y que este enzima presenta una sensibilidad más débil a la inhibición por malonil-CoA. Además, se modifica el tipo de inhibición del malonil-CoA que pasa de una inhibición de tipo competitiva a una inhibición no competitiva. Sin embargo, entre las proteínas quinasas normalmente implicadas en el control del metabolismo, sólo la caseína quinasa II (CKII) es capaz de fosforilar CPT1A, ya que PKA, AMPK, PKC y la proteína quinasa II Ca<sup>2+</sup>/calmodulina son ineficaces. Sin embargo, los cambios de sensibilidad de CPT1A a la inhibición por malonil-CoA, han sido observados *in vivo* (Ontko, 1980; Bremer, 1981; Grantham, 1986; Grantham, 1988) e *in vitro* (Prip-Buus, 1990) en mitocondrias aisladas en ausencia de inhibidores de fosfatasas. Esto sugiere que la fosforilación de CPT1A en el estado de alimentación, sería constitutivo y contribuiría al establecimiento de las propiedades cinéticas intrínsecas del enzima. Por otra parte, no se sabe si el estado de fosforilación de CPT1A se modifica en situaciones asociadas con una disminución de su sensibilidad frente al malonil-CoA como, por ejemplo, durante el ayuno.

## **Regulación farmacológica de CPT1**

La inhibición de la oxidación de ácidos grasos podría ser una buena estrategia para disminuir los niveles de glucosa en sangre en animales diabéticos y en la diabetes de tipo 2 en general (Anderson, 1998). En la literatura se han utilizado varios inhibidores con el fin de caracterizar la actividad de CPT1 como el 4-hidroxifenilglioxilato (HPG), Ro 25-0187, succinil-CoA, metilmalonil-CoA, (*R*)-*N*-(tetradecilcarbamoil)-aminocarnitina (ST-1326), ácido tetradecilglicídico (TDGA) y 2-[6-(4-clorofenoxi)hexil]oxirano-2-carboxilato o etomoxir (Cook, 1994; Kashfi, 1994; Obici, 2003; Weis, 1994).

Etomoxir es uno de los inhibidores de CPT1 más estudiados. Actúa como un inhibidor irreversible y sólo es activo una vez transformado a etomoxir-CoA (Weis, 1994). Tomado oralmente, etomoxir es un inhibidor eficaz de la actividad CPT1 en hígado y músculo proporcionando una actividad anticetogénica e hipoglucémica en animales modelo de diabetes tipo 2. Se ha demostrado que mejora la sensibilidad a la insulina en pacientes diabéticos (Hubinger, 1992). Sin embargo, el fármaco no ha sido desarrollado como un agente antidiabético debido a que causa hipertrofia del corazón. Además, de momento, las estrategias usadas para la inhibición de la oxidación de ácidos grasos a nivel de la  $\beta$ -oxidación no han sido satisfactorias debido a toxicidades y hipoglucemias incontroladas.

## 11. C75, UN INHIBIDOR DE LA ÁCIDO GRASO SINTASA

C75 es un inhibidor sintético y químicamente estable de la ácido graso sintasa (*Fatty Acid Synthase*: FAS), el enzima encargado de la síntesis de los ácidos grasos. C75 es un derivado de la cerulenina, otro inhibidor de FAS obtenido de forma natural del hongo *Cephalosporium caerulens*. Cerulenina se une irreversiblemente al centro catalítico de FAS de tipo I (FAS de mamíferos y levaduras) y de tipo II (FAS de bacterias) mediante una modificación covalente del dominio transportador de la proteína, la  $\beta$ -cetoacile-ACP sintasa (Moche, 1999; Price, 2001). Estructuralmente, C75 es una  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -butirolactona y ha sido diseñado para ser menos reactivo que cerulenina, ya que no tiene el epóxido presente en cerulenina, con lo cual su estabilidad química y su especificidad aumentarían, permitiendo su posible uso como fármaco (**Figura 10**). Del mismo modo que cerulenina, que inhibe FAS formando un enlace covalente con la proteína, C75 se comporta como un inhibidor irreversible de unión lenta (Kuhajda, 2000a).

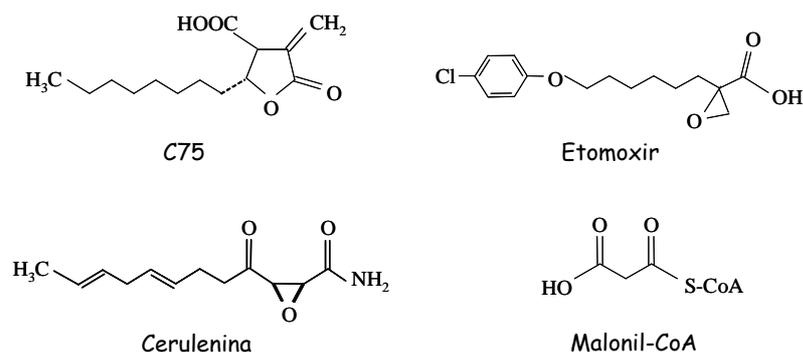


Figura 10. Estructuras químicas del C75, cerulenina, etomoxir y malonil-CoA.

## 12. C75 COMO AGENTE ANTITUMORAL

FAS (EC. 2.3.1.85) es el único enzima responsable de la síntesis *de novo* de ácidos grasos a partir del malonil-CoA y el acetil-CoA, provenientes del metabolismo de carbohidratos. El mecanismo por el cual dos unidades de carbono del malonil-CoA se adicionan secuencialmente a la cadena creciente del ácido graso es único entre los vertebrados, convirtiendo a FAS en una diana atractiva para el diseño de agentes terapéuticos. De hecho, una actividad elevada de FAS y una síntesis de ácidos grasos aumentada son dos alteraciones frecuentes presentes en varios cánceres humanos, incluyendo carcinomas de pecho, próstata, ovario, colon, pulmones, estómago, piel y endometrio (Kuhajda, 2000b). Esta diferente expresión de FAS entre tejidos normales y cancerosos ha llevado a la noción que FAS puede ser una diana para el tratamiento del cáncer.

C75 se ha ensayado como droga antitumoral capaz de inhibir a la FAS en el tratamiento *in vivo* de xenotransplantes de cánceres humanos. Este tratamiento produjo una potente y rápida inhibición de la replicación de ADN y de la progresión a la fase S del ciclo celular, conduciendo a apoptosis (Pizer, 1998).

Debido a la inhibición de FAS, C75 produciría un aumento de los niveles de malonil-CoA, primer metabolito de la síntesis de ácidos grasos. Se ha propuesto que los niveles aumentados de malonil-CoA son los responsables de la citotoxicidad de las células. Además, experimento en el que TOFA, 5-(tetradeciloxi)-2-ácido furoico, un inhibidor competitivo de acetil-CoA carboxilasa, el enzima implicado en la síntesis de malonil-CoA, inhibe drásticamente la síntesis de ácidos grasos, pero no es tóxico para las células de cáncer humano en cultivo (Pizer, 2000). El tratamiento de células de cáncer con TOFA antes de la administración del C75 rescata a las células del efecto citotóxico y previene los incrementos en los niveles de malonil-CoA inducidos por C75

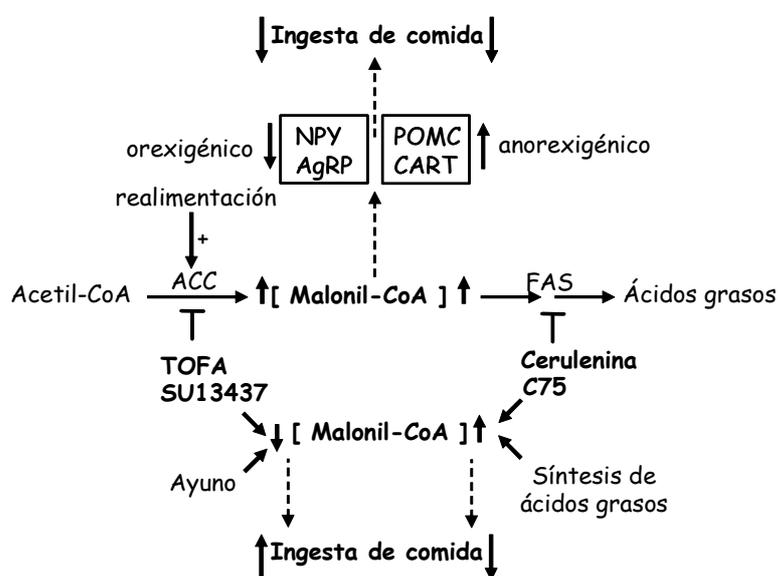
(Pizer, 2000). Por lo tanto, C75 bloquea a FAS con lo que los niveles de malonil-CoA aumentan y desencadenan la apoptosis, mientras que TOFA bloquea los incrementos en los niveles de malonil-CoA inducidos por C75, protegiendo a las células de la apoptosis. Todo ello, sugiere que son los niveles de malonil-CoA incrementados, los responsables de la señal proapoptótica. Además, de los efectos citotóxicos descritos, C75 tiene también efectos citoestáticos que cursan a través de la depleción de los ácidos grasos en las células tumorales (Li, 2001).

### **13. EFECTO CENTRAL DEL C75 Y DE LAS ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS EN LA INGESTA Y EL PESO CORPORAL**

Se ha descubierto otra propiedad muy interesante del C75 en relación al tratamiento de la obesidad y la diabetes de tipo 2. Loftus y colaboradores (Loftus, 2000) demostraron que el tratamiento sistémico e intracerebroventricular (i.c.v) con C75 conducía a una inhibición del apetito y a una dramática pérdida de peso en ratones delgados, obesos inducidos por una dieta grasa (DIO) y también en ratones genéticamente obesos y deficientes en leptina (*ob/ob*). Esta acción era independiente de la leptina, ya que C75 causaba pérdida de peso en ratones deficientes en leptina. Sin embargo, los ratones delgados se volvieron resistentes al C75 tras unos días con el tratamiento y exhibieron una hiperfagia después del tratamiento. En cambio, los ratones obesos mostraron una tolerancia incipiente al C75, la cual sólo fue evidente tras la pérdida de peso.

Recientemente se ha implicado al malonil-CoA como el mediador de la vía hipotalámica que indica el estado energético y media el comportamiento de la ingesta en ratón (Gao, 2003; Hu, 2003). Así, C75, aumentando los niveles del malonil-CoA, alteraría el metabolismo de las neuronas del hipotálamo responsables de la regulación de la ingesta. Además, TOFA (inhibe acetil-CoA carboxilasa y por lo tanto evitaría la síntesis de malonil-CoA) restaura la ingesta a valores normales en ratones tratados previamente con C75, apoyando la hipótesis de que malonil-CoA media la inhibición de la ingesta (Hu, 2003). Este efecto del malonil-CoA podría cursar a través de la inhibición de CPT1, y por lo tanto de la oxidación de los ácidos grasos, haciendo que se acumularan y creando una señal de disponibilidad de nutrientes aumentada, llevando a señales de inhibición de la ingesta. Esta posibilidad viene apoyada por el hecho de que en el hipotálamo los inhibidores de CPT1 provocan una disminución de la ingesta (Obici, 2003).

El hipotálamo es el responsable de monitorizar el balance energético que responde a señales periféricas promoviendo la liberación de neuropéptidos que regulan la ingesta y el gasto de energía. La restricción en la ingesta (ayuno) conduce a una expresión incrementada de neuropéptidos orexigénicos, como el neuropéptido Y (NPY), y la AgRP (*agouti-related protein*), y a una expresión disminuida de péptidos anorexigénicos, como la proopiomelanocortina (POMC), y el transcrito regulado por cocaína-anfetamina (CART). En conjunto, estos cambios provocan un aumento en la ingesta y un menor gasto de energía. Cuando se realimentan los animales en ayuno, ocurre lo contrario (**Figura 11**).



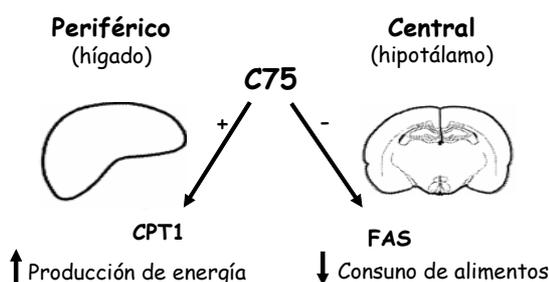
**Figura 11. Modelo del papel del malonil-CoA como mediador hipotalámico de la expresión de los neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos y la ingesta de comida.** Se representa un esquema de regulación de la ingesta por los inhibidores de FAS via malonil-CoA. Figura obtenida de (Hu, 2003; Loftus, 2000) con algunas modificaciones.

La administración i.c.v del C75 provoca un aumento en los niveles del malonil-CoA en el hipotálamo causados por la inhibición de FAS, bloquea la expresión inducida por el ayuno del NPY y reduce la ingesta (Loftus, 2000). Además, parece que C75 ejerce sus efectos a corto y largo plazo previniendo la sobreexpresión de los neuropéptidos orexigénicos y la disminución en la expresión de los neuropéptidos anorexigénicos (Shimokawa, 2002; Cha, 2004). Datos recientes sugieren que la modulación de la actividad de FAS por C75 en el hipotálamo puede, además, alterar la percepción del estado energético reduciendo la actividad de AMPK, que actúa como un sensor energético fisiológico en este órgano (Kim, 2004).

## 14. EFECTO PERIFÉRICO DEL C75 Y DE LA ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Además de sus acciones hipotalámicas, se ha descrito que C75 reduce la acumulación de grasa en hígado y tejido adiposo de ratones obesos inducidos por dieta (ratones DIO) (Loftus, 2000). Esta interesante observación plantea la siguiente pregunta ¿cómo puede haber una reducción de los niveles de grasa en tejidos periféricos (por aumento en la  $\beta$ -oxidación) en una situación donde los niveles de malonil-CoA están aumentados y con ellos CPT1 inhibida?

En un estudio llevado a cabo en ratones DIO se ha observado un aumento del gasto de energía y de oxidación de ácidos grasos tras la administración del C75, mientras que la administración del etomoxir, un potente inhibidor de la actividad CPT1, revierte este incremento en la producción de energía y la pérdida de peso inducida por C75 (Thupari, 2002). Además, el tratamiento de adipocitos, hepatocitos y células humanas de cáncer de mama con C75 produjo un aumento en la oxidación de ácidos grasos y de ATP, aumentando la actividad CPT1, incluso en presencia de concentraciones elevadas de malonil-CoA. En este estudio se propuso un segundo mecanismo de acción para C75 que se resume en la **Figura 12**. Por un lado, C75 tiene una acción central sobre el hipotálamo donde inhibe FAS e incrementa los niveles del malonil-CoA, alterando la expresión de neuropéptidos que conducen a una disminución de la ingesta y por otro lado, también actúa sobre tejidos periféricos activando CPT1, la oxidación de ácidos grasos y la producción de energía llevando a una disminución de la masa grasa del tejido adiposo y del hígado, ayudando así a la pérdida del peso. Por lo tanto, estos datos describen por primera vez un fármaco capaz de activar CPT1 e identifican a este enzima como una posible diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad y la diabetes de tipo 2. En otros estudios se ha observado que C75 también activa CPT1 sobreexpresada en levaduras sin desplazar al malonil-CoA unido (Yang, 2005). Estos resultados sugieren un mecanismo de acción dual para C75. Se ha observado también en otro estudio en ratones obesos inducidos por dieta que un tratamiento con C75 a largo plazo resultaba en un aumento en la expresión de mRNA de UCP-3 en músculo esquelético, sugiriendo que esta estimulación de la regulación de UCP-3 puede aumentar la termogénesis y esto explicaría el aumento en el gasto de energía (Cha, 2004).



**Figura 12. Modelo propuesto para los mecanismos de acción del C75 a nivel central y periférico.** Centralmente, C75 inhibe FAS, conduciendo a cambios en la expresión de neuropéptidos que causan una reducción neta del consumo de alimentos. En los tejidos periféricos como el hígado y el tejido adiposo, C75 aumenta la actividad CPT1, conduciendo a un aumento en la oxidación de ácidos grasos y producción de energía. Ambos mecanismos contribuyen a la pérdida de peso, pero el mecanismo periférico es el responsable de la reducción selectiva de la masa del tejido adiposo y la resolución del hígado. Figura tomada de (Thupari, 2002).

La naturaleza anfipática del C75 puede tener importancia en la estimulación de CPT1 ya que el palmitoil-CoA, el sustrato de CPT1, es también una molécula anfipática, activa a CPT1 y en exceso puede revertir la inhibición por malonil-CoA (Bremer, 1985). Cerulenina que tiene un único grupo dicarboxílico en su forma cíclica, no es anfipática, y al contrario que C75, se ha descrito que inhibe la actividad CPT1 (Thupari, 2001; Jin, 2004). En el caso del C75, (Thupari, 2001), la disminución de la actividad CPT1 se ha correlacionado con una reducción de la oxidación de ácidos grasos y un incremento en la citotoxicidad en células de cáncer de mama humano tratadas con cerulenina. Jin y sus colaboradores (Jin, 2004), han demostrado que el tratamiento de ratones con cerulenina tiene un efecto dual en hígado y músculo, con una inhibición de la actividad CPT1 en primer lugar, seguida por una estimulación después de un tratamiento intraperitoneal con cerulenina, probablemente mediada por una activación del sistema nervioso simpático.

En resumen, C75 actúa tanto centralmente reduciendo la ingesta de comida y podría estimular periféricamente la actividad CPT1 y la oxidación de ácidos grasos, conduciendo a una drástica pérdida de peso y a una pérdida de masa grasa en tejido adiposo e hígado. En tejidos periféricos *in vivo*, el efecto inhibitorio de la actividad CPT1 causado por un alto contenido en malonil-CoA debido a la inhibición de FAS, parece ser superado por la estimulación de la actividad CPT1 por C75.

Además del malonil-CoA, sustrato de FAS, otras moléculas son necesarias para la síntesis del palmitato incluyendo el ATP (requerido por ACC para generar malonil-CoA) y el NADPH requerido por FAS. También han sido considerados varios candidatos metabólicos que podrían estar afectados por un cambio de la disponibilidad de energía mediada por C75. Es bien conocido que AMPK es un sensor del balance de energía periférico (Winder, 1999). Los aumentos en el ratio celular de AMP/ATP, cambios en el pH y el estado redox, y aumentos en el ratio creatina/fosfocreatina fosforilan y activan AMPK (Winder, 2001) que a su vez, altera el metabolismo celular y la expresión de genes para inhibir los procesos anabólicos (síntesis de ácidos grasos y TG) y para estimular los procesos de catabolismo (oxidación de ácidos grasos, glicólisis y consumo de glucosa) con el fin de restaurar los niveles de ATP (Hardie, 2001). En lo que concierne la síntesis de los ácidos grasos, AMPK fosforila y inactiva ACC inhibiendo así la síntesis de ácidos grasos y disminuyendo la disponibilidad en malonil-CoA (Frederich, 2002). AMPK también fosforila y inactiva HMG (3-hidroxi-3-metilglutarilo)-CoA reductasa, afectando así la biosíntesis de isoprenoides y colesterol (Clarke, 1990).

En este estudio se examina con más detalle el efecto y la interacción del C75 sobre la actividad CPT1 *in vitro* e *in vivo* en diferentes tejidos de rata y ratón y también en levadura sobreexpresando CPT1.