

OCTNI

Transportador de carnitina imprescindible per a l'activitat CPT1

L'objectiu del present estudi és dilucidar quin dels dos models d'entrada de substrats al centre catalític de la carnitina-palmitoiltransferasa 1 (CPT1), postulats fins en aquest moment, és funcional. L'interès de l'estudi rau en la possibilitat de definir noves dianes terapèutiques per al tractament de pacients amb episodis d'angina de pit.

S'HA descrit que una inhibició de la betaoxidació en el múscul cardíac, en pacients amb angina de pit, per tal de promoure una utilització més elevada de la glucosa com a font d'energia, disminueix la demanda d'oxigen per part del múscul i, per tant, millora el pronòstic del pacient (Dyck *et al.*, 2004; Lopaschuk *et al.*, 1994). Fins ara s'han fet estudis amb diversos inhibidors de la betaoxidació a nivell de l'enzim CPT1, però tots els inhibidors estudiats presentaven un efecte advers en comú, la hipertrofia del múscul cardíac i, per tant, els estudis no han anat més enllà. La definició del mecanisme d'entrada dels substrats és una nova oportunitat per trobar un nou inhibidor capaç d'inhibir la betaoxidació que no presenti un efecte secundari perjudicial.

Introducció

Els àcids grassos de cadena llarga representen la font principal d'energia per a molts òrgans,

especialment per al múscul i el fetge. Atès que la majoria dels teixits contenen quantitats petites de lípids emmagatzemats, la producció energètica depèn de l'aportació contínua d'àcids grassos que provenen del teixit adipós.

Depenent del teixit i de la demanda metabòlica, els àcids grassos es converteixen en triglicèrids, fosfolípids de membrana o s'oxiden en els mitocondris per a la producció d'energia. Abans de ser dirigits a l'emmagatzematge, membranes o oxidació, els àcids grassos són activats a acils-CoA. Aquesta reacció és catalitzada per la sintetasa d'acils-CoA de cadena llarga (LCAS), un enzim abundant present en el reticle endoplasmàtic i els mitocondris.

En el mitocondri, LCAS s'associa a la membrana externa mitocondrial (MEM) i és una proteïna transmembranosa amb el centre catalític exposat al citosol (Hesler *et al.*, 1990). Aquesta orientació de LCAS dóna lloc a la producció citosòlica dels acils-CoA de cadena llarga, que han de travessar totes dues membranes mitocondrials perquè es produeixi la betaoxidació en la matriu del mitocondri. Per a la impermeabilitat de la membrana respecte als acils-CoA, cal un sistema que permeti la introducció d'aquests fins a la matriu mitocondrial, el sistema CPT (**fig. 1**).

Escrit per

María del Mar Arasa, Dolors Serra,
Guillermina Asins, Fausto G. Hegardt
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona

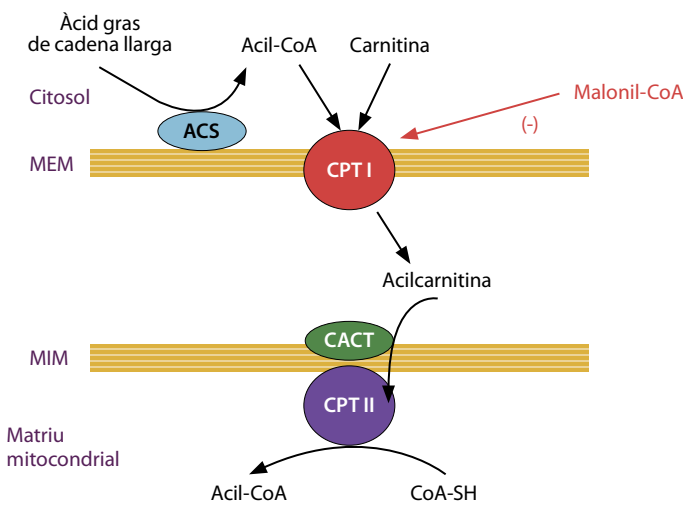


Una vegada formats els acils-CoA, la CPT1 catalitza la formació d'acilcarnitines a partir dels àcids grassos activats i carnitina lliure. CPT1 és inhibida alostèricament per malonil-CoA i, en virtut d'aquesta inhibició, la CPT1 representa el principal punt de regulació del flux de la betaoxidació. Els productes de la reacció catalitzats per CPT1, les acilcarnitines de cadena llarga, són translocats a la matriu mitocondrial en una reacció d'intercanvi en la qual intervé la carnitina acilcarnitina-translocasa (CACT), una proteïna integral de la membrana interna mitocondrial (MIM) (Indiveri *et al.*, 1995). Una vegada dins de la matriu, les acilcarnitines es reconverteixen en acils-CoA per acció de la carnitina-palmitoiltransferasa 2 (CPT2), un enzim associat a la cara matricial de la MIM, que realitza la reacció inversa a la CPT1. Gràcies al sistema de translocació (CPT1 + CACT + CPT2), els àcids grassos són capaços de travessar les membranes del mitocondri fins a arribar a la matriu, on es produeix la betaoxidació.

Des del descobriment de la importància de CPT1 en la regulació de la betaoxidació mitocondrial, molts investigadors han treballat en el coneixement de l'estructura de l'enzim, el mode d'inserció al mitocondri, l'estequiometria de la inhibició per malonil-CoA i els aspectes cinètics d'aquest enzim.

CPT1 encara no ha estat cristal·litzada, però se'n coneix l'estructura quaternària de tipus oligomèric (Faye *et al.*, 2007). Cadascuna de les subunitats està inserida en la MEM amb el domini N-terminal projectat a l'espai citosòlic. La inserció en MEM es produeix a través de dos TMD de 21 aminoàcids amfifílics, que provoca que el domini C-terminal es trobi igualment dirigit a l'espai citosòlic. En el domini C-terminal se situa el centre catalític i el de regulació per malonil-CoA, inhibidor fisiològic, que necessita els dominis N i C-terminal per conformar el lloc d'unió del malonil-CoA (Lopez-Viñas *et al.*, 2007). Recentment, s'han descrit que els TMD de cadascuna de les subunitats podrien combinar-se per formar un canal (Jenei *et al.*, 2009).

La controvèrsia apareix en el moment de discutir quin model d'entrada dels substrats cap a CPT1 és el funcional. Fins avui se n'han descrit dos models. En el primer model, postulat per Zammit *et al.* (1997), es proposa que

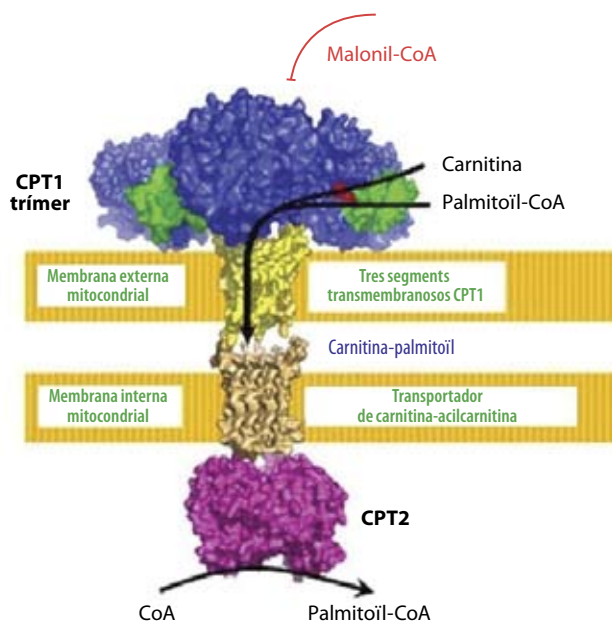


els substrats de CPT1 (acils-CoA i carnitina) entren des de la part citosòlica fins al centre catalític i, una vegada realitzada la reacció de transesterificació que donarà lloc al producte carnitina-palmitoil, aquest s'internalitza cap a l'espai intermembranós mitjançant el canal format pels TMD (fig. 2).

En el segon model, postulat per Hoppel i Kerner (2000), es proposa que els substrats necessiten uns transportadors a la MEM per internalitzar-se (fig. 3). El doctor Charles Hoppel, de la Universitat de Tennessee, va solucionar el problema de l'arribada del palmitoil-CoA a l'espai intermembranós en descobrir, per tècniques proteòmiques, la presència del canal d'anions dependents del voltatge (VDAC) que era capaç de transportar els acils-CoA. Però encara quedava per demostrar com podia accedir la carnitina a l'espai intermembranós.

Figura 1. Sistema CPT per a l'entrada dels acils-CoA de cadena llarga a la matriu mitocondrial. Els acils-CoA necessiten el sistema CPT per poder creuar les membranes mitocondrials que són impermeables a aquests. El sistema CPT (CPT1 + CACT + CPT2) permet aquesta entrada cap a la matriu mitocondrial, on es durà a terme la betaoxidació, mitjançant reaccions successives. El punt de regulació d'aquesta entrada es troba a nivell de CPT1, que es pot inhibir per malonil-CoA.

Figura 2. Il·lustració del model proposat per Zammit *et al.* En aquest model es proposa que els substrats de CPT1 entren des de la cara citosòlica fins al centre catalític i, una vegada es dona la reacció de transesterificació que donarà lloc al producte carnitina-palmitoil, aquest s'internalitza mitjançant el canal format pels TMD cap a l'espai intermembranós, on serà translocat gràcies a la CACT.



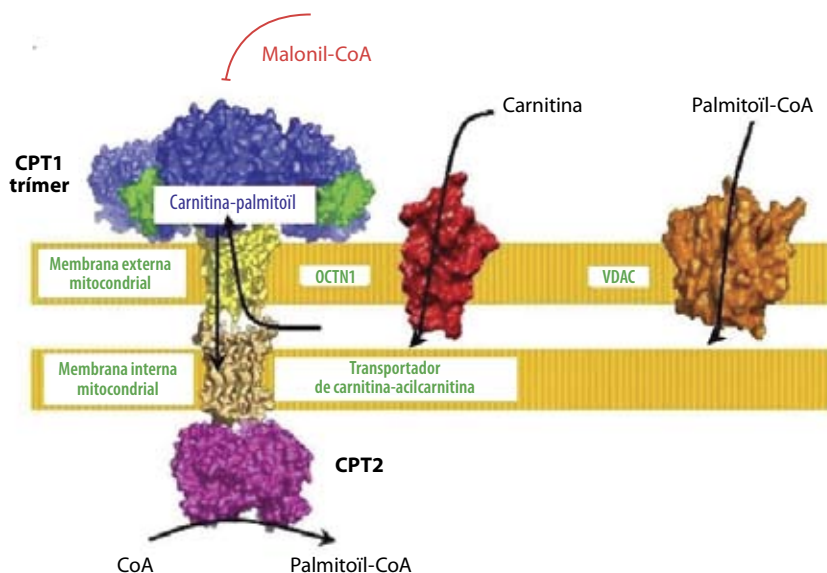


Figura 3. Il·lustració del model proposat per Hoppel *et al.* En aquest model es proposa que els substrats necessiten uns transportadors a la MEM per internalitzar-se. Una vegada són a l'espai intermembranós, arriben al centre catalític de CPT1, on es dona la reacció de transesterificació.

Recentment s'ha descrit la localització d'un transportador anomenat *nou transportador de cations orgànics 1* (OCTN1) capaç de transportar la carnitina. El 2000 es va demostrar mitjançant hibridació *in situ* que OCTN1 (SL-C22A4) es troba expressat en una àmplia varietat de teixits, principalment al fetge, l'intestí prim, el ronyó (còrtex i medul·la, més abundant en la unió corticomedul·lar), el cervell (cerebel, hipocamp, còrtex), el cor (miocardi i vàlvules) i la placenta (zona laberíntica) (Wu *et al.*, 2000; Tamai *et al.*, 2000). Però no va ser fins al 2006 que se'n va descriure la localització específica a la MEM gràcies a estudis de transfecció de línies cel·lulars mamíferes amb GFP-OCTN1 i RFP-OCTN1 i posterior microscòpia fluorescent confocal amb marcadors específics de la MEM (Lamhonwah i Tein, 2006).

Fins en aquest moment es coneixen un gran nombre d'inhibidors d'OCTN1 descrits en la bibliografia, però en el present estudi s'utilitzaran els que hagin presentat més capacitat inhibidora: verapamil i pirlamina.

Material i mètodes
Preparació de les fraccions mitocondrials

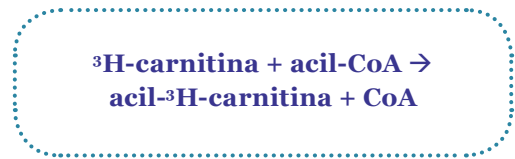
Es fa una sobreexpressió heteròloga de CPT1 en mitocondris de llevat (*Saccharomyces cerevisiae*) (Morillas *et al.*, 2001). *S. cerevisiae* ha estat escollit com a sistema d'expressió de CPT1 per la seva deficiència en activitat CPT1 i OCTN1. Les fraccions enriquides en mitocondris de llevat (*S. cerevisiae*) sobreexpressant CPT1 han estat obtingudes segons el protocol descrit anteriorment (Morillas *et al.*, 2001).

Les fraccions cel·lulars enriquides en mitocondris provinents de línia cel·lular mamífera (HEK293) cultivada en plaques de 15 cm han estat obtingudes mitjançant l'homogeneïtzador Douncer (Rubi *et al.*, 2002) i mantenint sempre la temperatura a 4 °C per evitar la desnaturalització proteica. En el cas de mitocondris de línia cel·lular mamífera, hi ha expressió de CPT1 i OCTN1 a la MEM. Els mitocondris, de llevats o de mamífer obtinguts, resten pràcticament intactes i han estat utilitzats directament per als assajos d'activitat CPT1.

La determinació de les concentracions proteiques de les mostres obtingudes es van determinar utilitzant el reactiu de Bio-Rad, i com a estàndard es va utilitzar BSA.

Estudi de l'activitat CPT1 en presència/absència d'inhibidors d'OCTN1

L'assaig d'activitat és una modificació del mètode radiomètric descrit prèviament (Morillas *et al.*, 2001). L'assaig es realitza en la direcció de síntesi de l'acilcarnitina:



En el cas de l'activitat CPT, els substrats són ³H-carnitina i palmitoil-CoA. L'activitat enzimàtica s'assaja a 30 °C durant un temps mai superior a 4 minuts, en un volum final de 200 µL. La mostra proteica (10 µg de fracció mitocondrial de HEK293 i 3 µg de mitocondris de llevats que sobreexpressen CPT1 heteròlogament) es preincuba 1 minut juntament amb els inhibidors d'OCTN1 a concentracions creixents de 0 a 1 mM en un volum final de 40 µL. Després, s'hi afegeix la mescla de reacció (160 µL). La concentració final dels components de la mescla és de tris-HCl pH 7,2 105 mM, KCl 15 mM, MgCl₂ 4 mM, ATP 4 mM, glutatió reduït 250 µM, palmitoil-CoA 50 µM, L-[metil-³H]carnitina (0,3 µCi) 400 µM, i BSA deslipiditzada 0,1 %.

L'ATP permet la generació del palmitoil-CoA per les acil-CoA sintetases, a partir del palmitoil i del CoA format per acció de les desacilases (i s'evita així que la concentració de l'acil-CoA sigui menor que l'esperada). Com a agent reductor s'utilitza el glutatió reduït i no tiols, com el ditiotreitòl (DTT) o ditioueritrol (DTE), ja que aquests redueixen la sensibilitat al malonil-CoA. La presència d'albumina deslipiditzada és

necessària per protegir el mitocondri de l'efecte detergent dels àcids grassos; tot i això, la seva concentració no ha de ser superior al 0,1 %, amb la finalitat d'evitar un efecte de sigmoidicitat en la cinètica de l'enzim respecte a l'acil-CoA.

El pH elegit per a l'assaig és de 7,2, ja que s'ha observat una dependència de l'activitat i de la sensibilitat a malonil-CoA respecte al pH. Aquest pH és l'òptim per afavorir totes dues condicions. La temperatura de l'assaig és de 30 °C amb la finalitat de compensar una bona activitat enzimàtica, que augmenta amb l'augment de la temperatura, amb una bona inhibició, que disminueix amb l'augment de la temperatura.

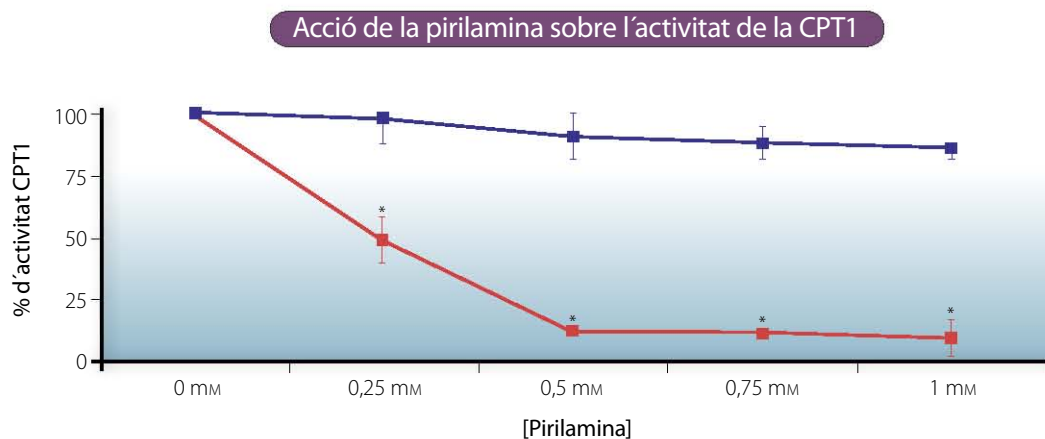
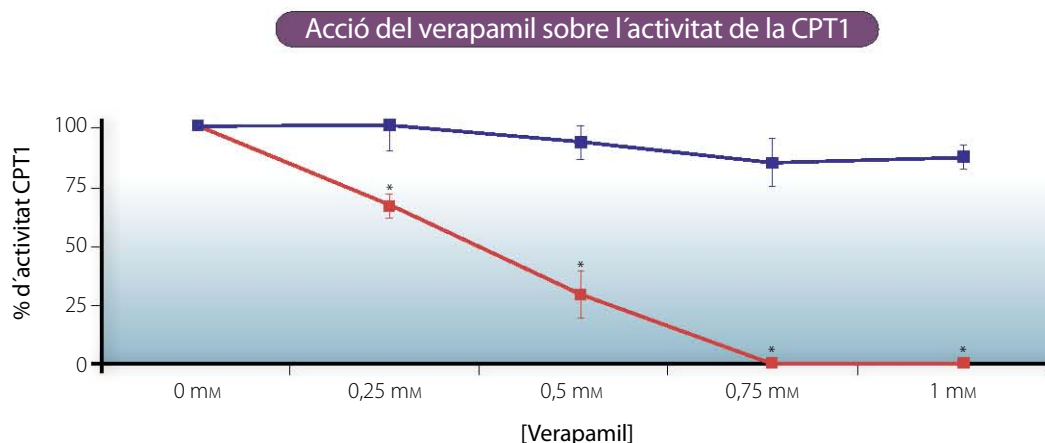
La reacció s'atura per addició de 200 µL de HCl 1,2 N. El producte palmitoil-³H-carnitina s'extrau amb 600 µL de *n*-butanol saturat d'aigua, a causa de la seva lipofília, mentre que la major part de ³H-carnitina no incorporada, hidròfila, quedarà retinguda en la fase aquosa. La

fase butanòlica es renta amb 200 µL d'aigua, i se sembren 250 µL en vials de plàstic que contenen 5 mL de líquid de centelleig Ecolite (ICN). El comptador utilitzat és un RackBeta del servei de radioisòtops de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

Com a valors d'activitat específica (nanomols de substrat transformat per minut i per mg de proteïna) es calculen les mitjanes ± desviació estàndard amb un mínim de tres assajos independents i per a diferents preparacions proteiques. Es fa un control de l'estat dels mitocondris mitjançant la incorporació de malonil-CoA (100 µM) als mitocondris de mamífer, que permet valorar que l'activitat observada no sigui deguda a la CPT2.

Resultats

Per tal de determinar quin dels dos models d'internalització i/o interacció dels substrats amb la CPT1 és el funcional, es van realitzar experiments



—■— HEK293 —■— *S. cerevisiae* sobreexpressió de la CPT1

Figura 4. Efectes del verapamil en l'activitat CPT1. 10 µg de mitocondris aïllats de mamífer (en vermell) i 3 µg de llevat amb sobreexpressió de CPT1 (en blau) han estat preincubats durant 1 minut amb concentracions creixents de verapamil. Les dades representades corresponen a un mínim de tres experiments independents i estan expressades amb relació al valor control en absència d'inhibidor (100 %).

Figura 5. Efectes de la pirlamina en l'activitat CPT1. 10 µg de mitocondris aïllats de mamífer (en vermell) i 3 µg de llevat amb sobreexpressió de CPT1 (en blau) han estat preincubats durant 1 minut amb concentracions creixents de Pirlamina. Les dades representades corresponen a un mínim de tres experiments independents i estan expressades amb relació al valor control en absència d'inhibidor (100 %).

enzimàtics on s'analitzava l'efecte de quantitats creixents de dos inhibidors de l'OCTN1, verapamil i pirilamina, sobre l'activitat CPT1.

Com a font d'activitat CPT1 es va utilitzar fraccions mitocondrials de cèl·lules HEK293, les quals contenen OCTN1, i com a control fraccions mitocondrials de llevat *S. cerevisiae*, que tenien sobreexpressada la CPT1, i en les quals no hi ha OCTN1.

La lògica d'aquest experiment rau en el fet que si es produeix inhibició de l'activitat de la CPT1 indicarà que li falta el substrat carnitina a aquest enzim, com a conseqüència de la inhibició del transport de carnitina que exerceix la OCTN1.

En la figura 4 es mostra que el verapamil inhibeix l'activitat de la CPT1 de les cèl·lules HEK293 i, a la vegada, no ho fa en l'expressada heteròlogament en cèl·lules de llevat. Aquesta última dada corrobora el que ja es coneixia de la literatura, que el verapamil no és un inhibidor farmacològic de l'activitat de la CPT1. En conseqüència, com que la inhibició de l'activitat de la CPT1 en cèl·lules de mamífer és molt alta, indica que s'ha produït la inhibició de l'OCTN1 i que això ha afectat l'ac-

tivitat enzimàtica CPT1 mitocondrial. En ser el verapamil un inhibidor del transport de la carnitina des de l'espai citosòlic a l'espai intermembranós, aquest resultat d'inhibició de l'activitat de la CPT1 està indicant que aquest transport no s'ha donat, i que la CPT1 s'ha quedat sense substrat i sense activitat, del qual s'extreu la necessitat del pas previ de la carnitina a l'espai intermembranós perquè és el substrat natural de la CPT1.

En la figura 5 es mostren els resultats pel segon inhibidor d'OCTN1, pirilamina, i corroboren els del verapamil. Les cinètiques d'inhibició són similars i aquest resultat confirma la hipòtesi que és necessari el transport previ de carnitina a l'espai intermembranós perquè es manifesti l'activitat CPT1.

Els valors d'inhibició 50 % (IC₅₀) de tots dos inhibidors per a l'activitat CPT1 són 0,3 i 0,2 mM per verapamil i pirilamina, respectivament. S'observa també que a concentracions de 0,75 i de 0,5 mM de verapamil i pirilamina, respectivament, l'OCTN1 i, per tant, l'activitat CPT1, queda totalment inhibida, fet que demostra que els inhibidors escollits tenen un efecte inhibitori important.

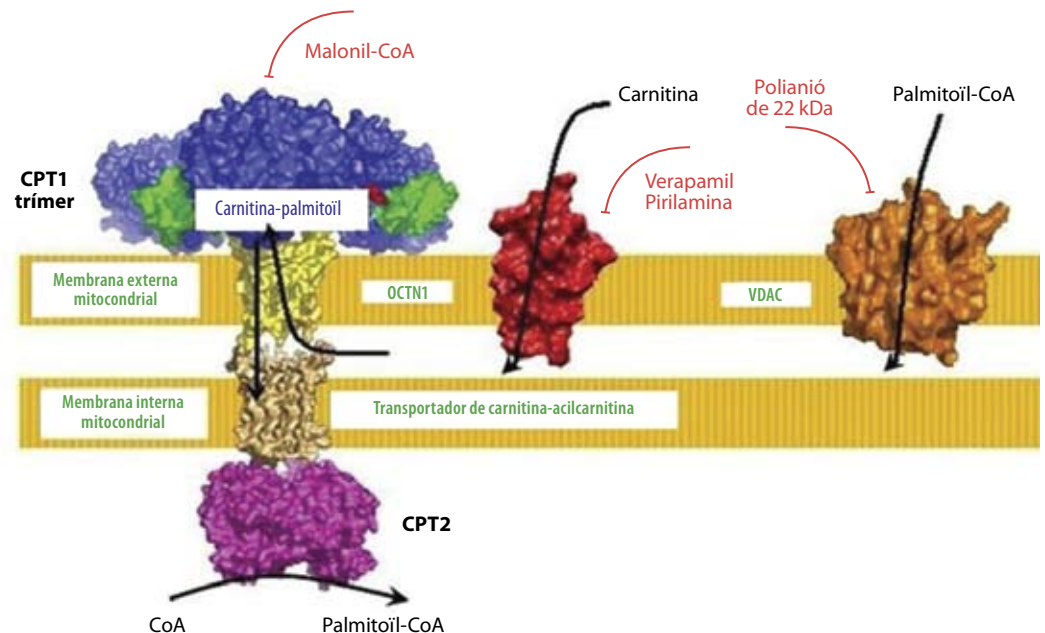


Figura 6. Proposta d'un model d'entrada dels substrats a la CPT1. En el model es pot observar l'estructura de tipus oligomèric de CPT1 on les alfa hèlix que travessen la MEM formen un canal. Cadascuna de les subunitats està formada per un extrem C-terminal orientat al citosol (de color verd) seguit de les dues alfa hèlix que fixen la subunitat a la MEM (color groc) i finalment l'extrem N-terminal que queda a la cara citosòlica de la MEM (color blau) on es localitzen el centre de regulació per malonil-CoA (color vermell) i el centre catalític. Associats a la membrana també podem observar el transportador de carnitina, OCTN1, objecte del nostre estudi (color vermell) i el transportador de palmitoil-CoA, VDAC (color taronja). Un cop internalitzats els substrats i realitzada la reacció de transesterificació, el producte és translocat per la CACT (color veig) i finalment la CPT2 (color rosa) realitza la reacció inversa de la CPT1 i dona lloc a l'acil-CoA. En la representació també es fa constar la capacitat inhibitoria del malonil-CoA, el verapamil, la pirilamina i el polianió de 22 kDa sobre algunes de les proteïnes implicades en la betaoxidació.

L'activitat específica CPT1 és de 473 i 3.090 (nmol/minut × mg de proteïna) pels mitocondris aïllats de HEK293 i de *S. cerevisiae*, respectivament.

Discussió

El nostre projecte s'ha centrat a valorar la necessitat que la carnitina es trobi en l'espai intermembranós com a requisit previ per a la utilització per CPT1. Els nostres resultats donen suport al model proposat pel doctor Charles Hoppel, en el qual la carnitina entra al centre catalític de CPT1 des de l'espai intermembranós, i no des del citosol.

El fet que, en presència d'inhibidors d'OCTN1, l'activitat CPT1 de mitocondris de línia mamífera es vegi totalment inhibida i no pas en els mitocondris de llevats, denota que la inhibició de la betaoxidació observada es dona per afectació del transportador d'OCTN1 i no de l'enzim CPT1 com a tal.

A més, queda demostrat que en mitocondris de mamífer es fa imprescindible l'activitat OCTN1 per tal d'observar activitat CPT1 i que, per tant, el model funcional seria el model

proposat per Charles Hoppel *et al.*, en què es postulava la necessitat de tenir transportadors que internalitzessin els substrats i, una vegada en l'espai intermembranós, es realitzés la reacció de transesterificació.

Amb els resultats obtinguts en els mitocondris de llevats amb sobreexpressió de CPT1, només podem assegurar que no hi ha presència d'OCTN1, però no es pot assegurar si l'entrada dels substrats en aquest cas es realitza per un altre transportador poliespecífic o si aquesta entrada fins a l'espai intermembranós no és necessària.

Els resultats de l'estudi, per tant, ens fan pensar que el model funcional és aquell que descriu la necessitat de transportadors pels substrats. Aquesta necessitat es fa palesa també en un article publicat pel mateix Charles Hoppel en el qual, mitjançant l'addició d'un inhibidor de VDAC (un polianió de 22 kDa), s'observava una disminució de l'activitat CPT1 (Turkaly *et al.*, 1999). En la figura 6 es mostra el model més probable del moviment de carnitina i palmitoil-CoA per subministrar els substrats a l'enzim CPT1. |

Maria del Mar Arasa
(Lleida, 1987)



Estudiant de quart curs de Farmàcia a la Universitat de Barcelona (UB). Des del 2007 ha tingut l'oportunitat de realitzar treballs de col·laboració en el Grup de regulació gènica de l'oxidació dels àcids grassos del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la mateixa Facultat de Farmàcia. El seu camp d'interès són la topologia i el mecanisme dels enzims implicats en la beta-oxidació i, en especial, la carnitina-palmitoiltransferasa 1 (CPT1). El març de 2009 ha estat premiada amb el V Premi Gemma Rossell i Romero, premi de recerca per a estudiants, pel treball que es presenta en l'article.

Referències bibliogràfiques

- DYCK, J. R. [et al.] (2004). «Malonyl coenzyme a decarboxylase inhibition protects the ischemic heart by inhibiting fatty acid oxidation and stimulating glucose oxidation». *Circulation Research*, núm. 94, p. e78-84.
- FAYE, A. [et al.] (2007). «Rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 forms an oligomeric complex within the outer mitochondrial membrane». *The Journal of Biological Chemistry*, núm. 282, p. 26908-26916.
- HESLER, C. B.; OLYMBIOS, C.; HALDAR, D. (1990). «Transverse-plane topography of long-chain acyl-CoA synthetase in the mitochondrial outer membrane». *The Journal of Biological Chemistry*, núm. 265, p. 6600-6605.
- INDIVERI, C. [et al.] (1995). «Probing the active site of the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria with sulfhydryl reagents. A cysteine residue is localized in or near the substrate binding site». *European Journal of Biochemistry / FEBS*, núm. 228, p. 271-278.
- JENEL, Z. A. [et al.] (2009). «Self-association of transmembrane domain 2 (TM2), but not TM1, in carnitine palmitoyltransferase 1A: role of GXXXG(A) motifs». *The Journal of Biological Chemistry*, núm. 284, p. 6988-6997.
- KERNER, J.; HOPPEL, C. (2000). «Fatty acid import into mitochondria». *Biochimica et Biophysica Acta*, núm. 1486, p. 1-17.
- LOPASCHUK, G. D. [et al.] (1994). «Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease». *Biochimica et Biophysica Acta*, núm. 1213, p. 263-276.
- LAMHONWAH, A. M.; TEIN, I. (2006). «Novel localization of OCTN1, an organic cation/carnitine transporter, to mammalian mitochondria». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, núm. 345, p. 1315-1325.
- LÓPEZ-VIÑAS, E. [et al.] (2007). «Definition by functional and structural analysis of two malonyl-CoA sites in carnitine palmitoyltransferase 1A». *The Journal of Biological Chemistry*, núm. 282, p. 18212-18224.
- MORILLAS, M. [et al.] (2001). «Structural model of the catalytic core of carnitine palmitoyltransferase I and carnitine octanoyltransferase (COT): mutation of CPT I histidine 473 and alanine 381 and COT alanine 238 impairs the catalytic activity». *The Journal of Biological Chemistry*, núm. 276, p. 45001-45008.
- RUBI, B. [et al.] (2002). «Adenovirus-mediated overexpression of liver carnitine palmitoyltransferase I in INSIE cells: effects on cell metabolism and insulin secretion». *Biochemical Journal*, núm. 364(1), p. 219-226.
- TAMAI, I. [et al.] (2000). «Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice». *The Journal of biological chemistry*, núm. 275, p. 40064-40072.
- TURKALY, P.; KERNER, J.; HOPPEL, C. (1999). «A 22 kDa polyanion inhibits carnitine-dependent fatty acid oxidation in rat liver mitochondria». *FEBS Letters*, núm. 460, p. 241-245.
- WU, X. [et al.] (2000). «Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta». *Biochimica et Biophysica Acta*, núm. 1466, p. 315-327.
- ZAMMIT, V. A.; FRASER, F.; ORSTORPHINE, C. G. (1997). «Regulation of mitochondrial outer-membrane carnitine palmitoyltransferase (CPT I): role of membrane-topology». *Advances in Enzyme Regulation*, núm. 37, p. 295-317.