



**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

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. CEPAS BACTERIANAS

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* utilizadas para realizar este trabajo son:

Cepa	Genotipo/Fenotipo	Resistente a	Referencia
DH5 α	<i>sup</i> E44, Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lac</i> Z Δ M15), <i>hsd</i> R17, <i>rec</i> A1, <i>gyr</i> A96, <i>thi</i> -1, <i>rel</i> A1	Ampicilina	Stratagene
XL1-Blue	<i>end</i> A1, <i>hsd</i> R17 (rk-, mk+), <i>sup</i> E44, <i>thi</i> -1, λ^- , <i>rec</i> A1, <i>gyr</i> A96, <i>rel</i> A1, <i>lac</i> ⁻ [F ⁺ , pro AB, <i>lac</i> ^d Z Δ M15, Tn10(tet ^r)]	Tetraciclina	Stratagene

2. CEPAS DE LEVADURA

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) utilizadas para la expresión de proteínas son:

Cepa	Genotipo/ Fenotipo	Referencia
YPH499	<i>MAT a ura3-52 leu2-D1 ade2-101 lys2-801 his3-D200 trp1-D63</i>	Invitrogen
FY23 Δ <i>cat2</i>	<i>MATa trp1 ura3 cat2::LEU2</i>	Swiegers, 2001

Ambas cepas de *S. cerevisiae* carecen de actividad COT y CPT. La cepa (FY23 Δ *cat2*) además, carecen del gen *CAT2* endógeno y fueron utilizadas como sistema de expresión para determinar la especificidad de sustrato de CPT1 hacia sustratos de cadena de carbono corta. Aunque esta cepa conserve dos genes CrAT adicionales (*YAT1* y *YAT2*), su actividad carnitina acetiltransferasa en las condiciones en las cuales fue expresada en este estudio no fue detectada.

3. ANIMALES

En este trabajo se han empleado ratones machos de la cepa C57BL/6J de seis semanas de edad adquiridos a Harlan Co. Las ratas de la cepa Wistar de 200-250 g, se han obtenido del estabulario de la Facultad de Farmacia. Los animales se mantuvieron a 23°C en un ciclo de 12 h de oscuridad y 12 h de luz y con libre acceso a agua y comida. Después de una semana de aclimatación, se sacrificaron los ratones y las ratas por dislocación cervical previa anestesia con ketamina/xilacina. Todos los protocolos han sido aprobados por el comité de ética de experimentación animal de la Universidad de Barcelona.

3.1 Tratamiento con C75 y etomoxir

C75 (Alexis Biochemicals, ref. 270-286-M005) o etomoxir (obtenido del Dr. H.P.O. Wolf, Allensbach, Alemania) se inyectaron separadamente por inyección intraperitoneal en ratones a una concentración de 20 mg/kg de peso en medio RPMI 1640 (Gibco, ref. 21857-034) a partir de una solución stock de 100 mM en DMSO (Sigma, ref. D-8418). A los animales control se les administraron sólo el medio RPMI 1640. Se sacrificaron los animales a diferentes tiempos post-inyección y se obtuvieron las fracciones enriquecidas en mitocondrias de los diferentes tejidos, hígado, músculo y páncreas. Con estas fracciones mitocondriales se ensayó la actividad CPT1.

4. VECTORES PLASMÍDICOS

En el **Apéndice 1** se muestran los plásmidos utilizados para el clonaje de fragmentos de ADN y para la expresión en levadura. A continuación, se hace una reseña de los vectores plasmídicos usados.

5. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de amplificación en cadena de la ADN polimerasa (PCR) fueron sintetizados por Sigma-Genosys. En el **Apéndice 2** se muestra una lista de secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

MÉTODOS

1. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE ADN

Para la obtención, modificación enzimática y construcción de moléculas de ADN recombinante, se han seguido los protocolos de otras tesis doctorales de nuestro grupo (Morillas, 2002; Cordente, 2006). Además, se utilizó la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para la amplificación de ADN y para la introducción de mutaciones en una secuencia subclonada en un vector. Para introducir mutaciones puntuales, cambio de aminoácidos y suprimir o insertar uno o múltiples aminoácidos, se utilizó el *Kit* comercial *QuiKChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, ref. 200518).

2. SECUENCIACIÓN DE ADN

Las secuencias realizadas se llevaron a cabo por el método del dideoxinucleótido siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial del *kit BigDye Terminato v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, ref. 4337455). Este *Kit* lleva nucleótidos fluorescentes, por lo que los productos de secuenciación pueden ser detectados por fluorescencia. A partir de un ADN de doble cadena o de cadena simple, se puede determinar la secuencia con este *kit*, con un oligonucleótido y con un termociclador.

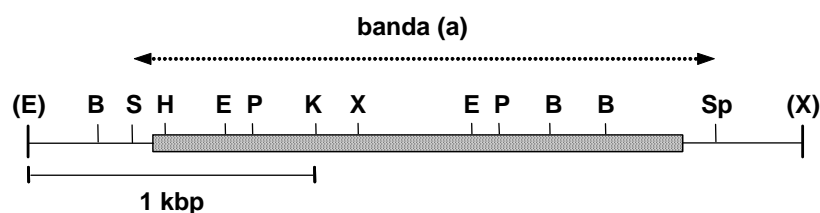
3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN *S. cerevisiae*

El cultivo de la cepa de levadura *S. cerevisiae*, la transformación en estas células de levadura con ADN plasmídico y la selección y crecimiento de los transformantes fueron realizados según los protocolos de otras tesis doctorales de nuestro grupo mencionados anteriormente.

3.1 La secuencia *CTTCCTC* en el cADN de carnitina palmitoiltransferasa 1 de músculo (CPT1B) permite la expresión en levaduras

Construcción del plásmido de expresión pYES-CPT1B-wt

Partimos del clon DS112-36 obtenido tras el análisis de librería de cADNs del tejido adiposo marrón de rata (Yamazaki, 1995) y que contiene el cADN codificante para la proteína CPT1B de rata, subclonado en el plásmido pBS-SK⁻. El plásmido se digiere con las enzimas de restricción *Sall* y *SphI* y se purifica la banda de 2351 pb (**banda a**).



Mapa de Restricción del fragmento de cADN del clon DS112-36. Se muestran las abreviaturas de la mayoría de los sitios de restricción usados para el análisis estructural, como sigue: E: *EcoRI*, B: *BglII*, K: *KpnI*, P: *PstI*, Sp: *SphI*, X: *XhoI*, H: *HindIII*, S: *SalI*. (E) y (X) son sitios de restricción adicionales usados para la construcción de la librería de cADN. La caja en color gris, representa la zona codificante.

Para iniciar los experimentos de expresión en este trabajo, el fragmento de CPT1B con los nucleótidos 27-2377, que incluye la secuencia codificante, fue subclonado en el plásmido de expresión en *S. cerevisiae* pYES 2.0 (Invitrogen). El extremo amino terminal de la proteína se ha obtenido por PCR para poder introducir la secuencia *consensus* para la traducción en levadura que difiere de la secuencia Kozak utilizada en eucariotas. El cebador forward (CPT1.*HindIII*.ATG.for) incluye además de la secuencia para una óptima traducción en levadura, una secuencia diana de restricción *HindIII*, lo que nos facilitó el subclonado del fragmento de PCR. El cebador reverse (CPT1B.*HindIII*.rev) se encuentra más allá de la diana interna *HindIII* en CPT1B. Con ello, el fragmento de PCR puede cortarse con *HindIII*, con lo que se obtiene un fragmento *HindIII* de 550 pb. Una vez subclonado en pYES 2.0 digerido con *HindIII*, se obtiene el plásmido pYES2-CPT1B-ATG. Se comprueba por secuenciación que el PCR no haya introducido ninguna mutación no deseada y que se ha incluido correctamente la secuencia *consensus* (TATAAA) delante del ATG.

Este plásmido, paso intermedio, se digiere ahora con las dianas únicas *SalI* y *SphI*, la primera diana en CPT1B y la segunda en el vector pYES 2.0. El fragmento (**banda a**) que contiene el resto de la zona codificante, puede ahora subclonarse de forma dirigida en este vector con lo que obtenemos definitivamente el plásmido pYES2-CPT1B-wt con toda la zona codificante y con las secuencias correctas para la expresión en levadura.

Las sustituciones adecuadas, así como la comprobación de la secuencia de los fragmentos de PCR incorporados a los plásmidos se han confirmado por secuenciación realizadas en los servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

Cambio de la secuencia TTTTTTA por CTCCTC

La secuencia presente en el cADN de rata de CPT1B, TTTTTTA (387-393 pb) es una secuencia de parada de transcripción en levadura (Jackson, 2000a). Esta secuencia está cambiada por la secuencia CTCCTC en el cADN de CPT1B humano. Por ello se hace preciso cambiar la secuencia de parada por su equivalente en CPT1B humana, sin cambiar la secuencia peptídica. Hemos utilizado como molde el plásmido pBS-SK⁻ que contiene el clon DS112-36 y los cebadores (CPT1.HindIII.ATG.for) y (CPT1B.AAAA.rev) y con esto, amplificamos un fragmento de 408 pb por PCR. Por otro lado, utilizando el mismo plásmido y los cebadores (CPT1B.AAAA.for) y (CPT1B-MseI.rev), amplificamos un fragmento de 347 pb por PCR. Con los fragmentos de amplificación obtenidos y purificados, se hace otra PCR con los cebadores (CPT1.HindIII.ATG.for) y (CPT1B-MseI.rev) y con una *Taq* polimerasa del tipo *Pfu*, con lo que el fragmento romo (755 pb) se liga en el plásmido pBS-SK⁻ digerido con *Ecl136II* (diana roma). Obtenemos así, el plásmido pBS-SK⁻-CTCCTC.

Una vez comprobado por secuenciación que no se han introducido más mutaciones que las deseadas, se digiere el plásmido pBS-SK⁻-CTCCTC con la diana *HindIII* y el fragmento *HindIII-HindIII* resultante (543 pb) con la mutación deseada, se intercambia en el plásmido pYES2-CPT1B-wt. El plásmido resultante, se transforma en células de levadura.

La secuencia del cADN de la isoforma muscular de CPT1 está indicada en el apartado **Apéndice 3**.

4. OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS

4.1 Obtención de proteínas recombinantes a partir de *S. cerevisiae*

Para la obtención de fracciones mitocondriales de levadura se sigue el método de las bolas de vidrio. En este método, se rompen las células con agitación rigurosa en presencia de bolas de vidrio (425-600 microns, lavadas con ácido: Sigma, ref. G-8772). Por ello, se sigue el siguiente protocolo:

1. Centrifugar las levaduras a 3000 g durante 5 min a temperatura ambiente.
2. Lavar 2 veces con 30 ml de agua destilada.
3. Resuspender en volumen pequeño de agua destilada y pasar el resuspendido a

- tubos de 10 ml y centrifugar de nuevo a 3000 g durante 5 min.
4. Resuspender en el tampón con inhibidores de proteasas (700 μ l por 250 ml de cultivo). Repartir en varios tubos si es necesario, para no sobrepasar 1 ml de volumen.
 5. Añadir el mismo volumen de bolas de vidrio previamente enfriadas.
 6. Vortear durante 10 min, alternando 30 segundos de vórtex y 30 segundos en hielo, para romper las paredes de las células de levadura.
 7. Aumentar el volumen a 1-2 ml y centrifugar a 500 g durante 10 min, a 4°C.
 8. Tomar el sobrenadante y centrifugar a 17000 g durante 45 min, a 4°C.
 9. Resuspender el pellet (las mitocondrias) en el tampón con inhibidores de proteasas (~ 500 μ l/250 ml de cultivo).
 10. Determinar la concentración de las mitocondrias obtenidas por el método de Bradford y se puede realizar un análisis por Western Blot de las mitocondrias.
 11. Alicuotar y congelar a -80°C.

Tampón: 10 mM Hepes pH 7,8, 1 mM EDTA, 10% glicerol.

Inhibidores de proteasas: 1 mM PMSF (Sigma, ref. P-7626), 0,5 μ M benzamidina (Sigma, ref. 12072), 1 μ g/ml pepstatina (Sigma, ref. P-5318), 2 μ g/ml leupeptina (Sigma, ref. L-2884).

4.2 Obtención de mitocondrias a partir de hígado murino

Una vez diseccionado, el hígado se trocea y se homogeniza en una solución fría isotónica de sacarosa. Por centrifugación diferencial se separan los orgánulos de interés de los otros componentes celulares (Derrick, 1989).

Para la obtención de fracciones enriquecidas en mitocondrias de hígado de rata o de ratón se parte de unos 10 gramos de hígado de rata adulta (preferiblemente, un macho de unos 200 gramos) y de 1 gramo de hígado de ratón adulto (Saggerson, 1982b). Se realizó una homogenización mecánica en tampón de homogenización 1/10 (p/v) a 4°C, utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem y un pistilo de teflón conectado a un rotor, a una velocidad de 600 r.p.m. Tras la homogenización, se centrifuga la suspensión a 560 g durante 15 min a 4°C. Se toma el sobrenadante y se centrifuga a 12000 g

durante 20 min a 4°C. Se resuspende el precipitado en 2 ml de tampón de homogenización y se centrifuga a 7000 g durante 10 min a 4°C, se lava dos veces. Finalmente, se resuspende el precipitado en 1 ml de tampón de homogenización y se determina la concentración de las mitocondrias obtenidas por el método de Bradford. Generalmente se obtiene una concentración de 4-10 µg/µl y se ensayan 20 µg de proteínas frescas para la actividad CPT1A. También, se puede realizar un análisis por Western Blot de las mitocondrias.

4.3 Obtención de mitocondrias a partir de músculo murino

Una vez diseccionado, se trocea el músculo y se homogeniza en una solución fría isotónica de sacarosa. Por centrifugación diferencial se separan los orgánulos de interés de los otros componentes celulares (Derrick, 1989).

Para la obtención de mitocondrias de músculo de rata o de ratón (Saggerson, 1981a), se extrae el músculo de interés (*soleus*, *gastrocnemius*, abdominal y corazón) del animal y se homogeniza en 9 volúmenes de tampón de homogenización (A) utilizando un homogenizador mecánico (Politrón). El homogenizado se centrifuga a 1000 g durante 15 min a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se vuelve a homogenizar el precipitado de forma análoga al paso anterior. Se centrifuga a 600 g durante 10 min y el sobrenadante obtenido se centrifuga a 15000 g durante 15 min a 4°C. De esta forma, y tras dos lavados con el tampón de homogenización (B), obtenemos un precipitado rico en mitocondrias. La concentración de esta suspensión se determina mediante el método de Bradford y se puede realizar un análisis por Western Blot de las mitocondrias. El ensayo de actividad CPT1 se realiza con 20 µg de proteína fresca. Con este proceso, las mitocondrias quedan mayoritariamente intactas.

Tampón (A) de homogenización y resuspensión: 250 mM sacarosa (Sigma, ref. S-9378). Se guarda a 4°C.

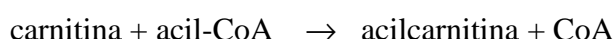
Tampón (B) de homogenización y resuspensión: 150 mM KCl, 5 mM Tris-HCl pH 7,2. Se guarda a temperatura ambiente.

En el análisis por Western Blot de la expresión de las diferentes proteínas, los anticuerpos primarios utilizados han sido: anticuerpo policlonal anti-CPT1A contra los aminoácidos 317-430 de CPT1A de rata producido en conejo cedidos por la Dra. Prip-Buus (Prip-Buus, 1998) y el anticuerpo anti-CPT1B contra los aminoácidos 259-760 de CPT1B de rata producido en oveja cedido por el Dr. Zammit (Van der Leij, 2002). Los

anticuerpos se diluyen en solución de bloqueo; 1/6000 para el anticuerpo anti-CPT1A y 1/1000 para los anticuerpos anti-CPT1B.

5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD CPT1

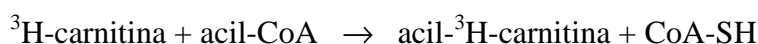
Se ensaya la actividad CPT1 utilizando dos diferentes métodos; radiométrico y fluorimétrico. En ambos casos, el ensayo se realiza en el siguiente sentido de la reacción:



5.1 Método radiométrico

Para la determinación de actividad CPT1 se han utilizado fracciones enriquecidas en mitocondrias obtenidas a partir de células de levadura *S. cerevisiae* o de tejido de rata y ratón. Con estas dos últimas fracciones, el ensayo de actividad se realiza con las fracciones frescas y sin congelar, para evitar la pérdida de actividad debida al proceso de congelación y la aparición de actividad CPT2 (localizada dentro de la mitocondria) debido a la rotura de la mitocondria, que podría conducir a datos erróneos de la actividad CPT1.

El ensayo de actividad CPT1 ha sido previamente descrito por Morillas (Morillas, 2000). Los sustratos de la reacción son L-[*metil*-³H]carnitina hidrocloreuro (Amersham Biosciences, ref. TRK762) y palmitoil-CoA.



La ventaja de este método es el hecho de que el producto de la reacción, acil-³H-carnitina, es lipofílico y es soluble en un medio orgánico. Así, se puede separar por extracción de la fase acuosa, el sustrato ³H-carnitina que es hidrófilo y que no se ha incorporado en el producto de la reacción. Este método es más sensible para aciles-CoAs de cadenas de carbono media y larga pero no para aciles-CoAs de cadena de carbono corta, ya que los ésteres de acilcarnitina de cadena corta no son solubles en medio orgánico.

La concentración final de cada componente en la reacción es:

Mezcla de reacción	
Tris-HCl pH 7,2	105 mM
KCl	15 mM
MgCl ₂	4 mM
ATP	4 mM
Glutación reducido (GSH)	250 μM
Palmitoil-CoA	50 μM
BSA deslipidizada	0,1%
L-[<i>metil</i> - ³ H]carnitina (0,3 μCi)	400 μM en el caso de ensayar CPT1A y 1 mM en el caso de ensayar CPT1B

El ATP permite la regeneración del palmitoil-CoA por las acil-CoA sintetasas, a partir del palmitoil y del CoA formado por acción de las deacilasas (evitando así que la concentración del acil-CoA disminuya). Como agente reductor se utilizó el glutación reducido y no tioles como el ditiotreitrol (DTT) o ditioneitol (DTE), ya que éstos reducen la sensibilidad a malonil-CoA (Saggerson, 1982a). La presencia de albúmina deslipidizada es necesaria para proteger a la mitocondria del efecto detergente de los ácidos grasos, sin embargo, su concentración no ha de ser superior al 0,1% con el fin de evitar un efecto de sigmoicidad en la cinética del enzima respecto al acil-CoA (Prijs-Buus, 1998). Finalmente, se añade KCl ya que se ha observado que aumenta la actividad del enzima (Saggerson, 1982b). El pH elegido para el ensayo es de 7,2, ya que se ha observado una dependencia de la actividad y de la sensibilidad a malonil-CoA al pH (Mills, 1984; Bieber, 1996). Este pH es el óptimo para favorecer ambas condiciones.

En el caso del estudio de los residuos de CPT1B de rata implicados en el cambio de afinidad del sustrato carnitina por el del sustrato colina, se utiliza en la reacción como sustratos, la L-[*metil*-³H]colina hidrocloreuro (Amersham Biosciences, ref. CFA424) a 1 mM y 10 mM de concentración final y 50 μM de palmitoil-CoA. La reacción se realiza en el sentido *forward*.

El procedimiento para el ensayo de actividad CPT1 se detalla a continuación. La actividad enzimática se ensaya a 30°C durante un tiempo nunca superior a 4 min, en un volumen final de 200 μl. Primero se prepara la mezcla de reacción en un tubo de 15 ml y se mantiene en hielo. El GSH se disuelve en agua justo antes de usarlo.

En segundo lugar se prepara la mezcla de proteína. Las muestras se preparan por duplicado en tubos de 1,5 ml diluyendo la proteína en tampón CPT1 4X y ajustando a 40 µl con agua destilada. El blanco contiene sólo agua destilada y tampón 4X.

Muestra proteica	
Proteína (suspensión de mitocondrias)	5-10 µg
Tampón de reacción CPT1 4X	10 µl
Agua milliQ c.s.p	40 µl

Se añaden uno por uno, 160 µl de la mezcla de reacción a cada tubo de 1,5 ml preparado con la muestra proteica. Se vortea el tubo y se incuba 4 min en un baño de agua a 30°C. Se para la reacción por adición de 200 µl de HCl 1,2 N. El producto palmitoil-³H-carnitina se extrae con la adición de 600 µl de n-butanol saturado de agua. Se vortean las muestras y se centrifugan durante 2 min a 16000 g en una microcentrífuga. Después, 400 µl de la fase butanólica se lavan con 200 µl de agua en un nuevo tubo de 1,5 ml. Se centrifuga 2 min a 16000 g y se toman 250 µl de la fase superior para el contaje. Este se realiza en viales de plástico con 5 ml de líquido de centelleo Ecolite (ICN). El contador utilizado es un *liquid scintillation analyzer* (TRI-CARB 2100TR, Packard) del servicio de radioisótopos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

Para calcular la actividad específica (A.E.) del enzima se aplicaba la siguiente fórmula:

$$A.E. (\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}) = \frac{c.p.m}{R.E} \times \frac{1}{t} \times \frac{1000}{\mu\text{g}} \times f$$

Donde:

c.p.m: cuentas por minuto.

R.E: radioactividad específica de la ³H-carnitina (~3000 c.p.m./nmol).

t: tiempo de incubación en el ensayo, expresado en minutos (generalmente, 4 min).

µg: microgramos de muestra proteica ensayada.

f: factor de dilución que es generalmente de 2,4 (600µl/250µl).

Los valores de actividad se dan como medias ± desviación estándar para al menos tres ensayos independientes con diferentes preparaciones proteicas.

Tampón de reacción CPT1 4X: 420 mM Tris-HCl pH 7,2, 60 mM KCl, 16 mM MgCl₂. Se guarda a 4°C.

Stock ³H-carnitina: Para CPT1A se prepara un stock al 16 mM; se disuelven 6,6 mg de L-carnitina en 1964,6 µl de etanol 95%:agua destilada (1:1), se añaden 125 µl de L-[metil-³H]carnitina hidrocloreuro (80 Ci/mmol) y se guardan alícuotas a -80°C. Para CPT1B se prepara un stock al 32 mM; se sigue el mismo procedimiento que en el caso de CPT1A pero se pesan 13,2 mg de carnitina.

5.1.1 Ensayo en presencia de inhibidores

El malonil-CoA es un inhibidor reversible de la actividad CPT1. El stock de malonil-CoA (Sigma, ref. M-4263) a 2 mM se prepara en una solución de acetato sódico a 1 mM pH 5,9 y se guarda a -20°C. Para los ensayos de inhibición por malonil-CoA, la concentración de acil-CoA se fija a 50 µM y la de carnitina a 400 µM en el caso de CPT1A y a 1 mM en el caso de CPT1B. Se añade el inhibidor a la muestra proteica ajustando el volumen final a 40 µl. Se vortean las muestras y se preincuban 1 min antes de la adición de la mezcla de reacción, ya que se ha observado que esta preincubación aumenta el nivel de inhibición (Zammit, 1984a). Se vortea el tubo antes de ponerlo en el baño a 30°C para el ensayo.

Dependiendo de la isoforma de CPT1 ensayada, las concentraciones de malonil-CoA utilizadas para el cálculo de IC₅₀ son distintas. En el caso de CPT1A, se utilizan concentraciones de malonil-CoA en el rango de 1-100 µM y en el caso de CPT1B, de 0,01-50 µM. IC₅₀ se define como la concentración del inhibidor que produce una inhibición de la actividad enzimática del 50%. Los valores de IC₅₀ se dan como media ± desviación estándar para al menos tres ensayos independientes con diferentes preparaciones proteicas.

Se calcula la IC₅₀ correspondiente a cada inhibidor empleado en esta tesis, utilizando el programa Excel de Microsoft, por linealización de los datos y las siguientes representación y ecuación:

$$\text{Actividad} = f(\log [\text{inhibidor}]) \quad \text{y} \quad \text{IC}_{50} (\mu\text{M}) = 10^{\left(\frac{(50-b)}{a}\right)}$$

Donde:

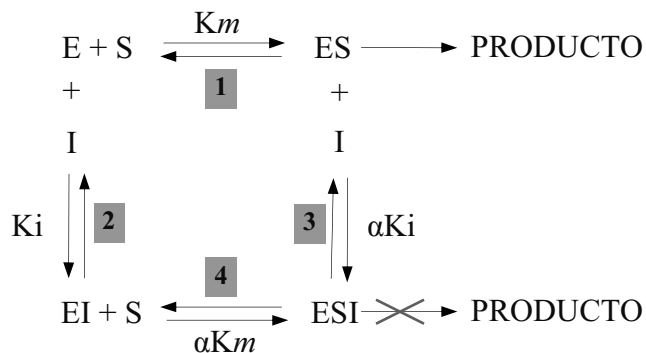
a : es la pendiente de la recta resultante de la representación indicada anteriormente.

b : es el valor de la intersección de la recta con el eje de ordenadas (% de actividad).

Se utilizaron otros inhibidores de la actividad CPT1 que veremos en el apartado **Métodos 7.1**. Para los ensayos de los inhibidores; etomoxir-CoA, C75, C75-CoA, cerulenina o cerulenina-CoA, se añade el inhibidor a la muestra proteica, se preincuba durante 1-5 min a 30°C dependiendo del tipo de fracciones mitocondriales y se ensaya durante 4 min, como se ha descrito previamente en el caso de ensayos de inhibición con malonil-CoA. Después, se vortean las muestras y se ensaya la actividad CPT1. Los valores de IC_{50} se determinan en cada caso utilizando un rango de concentraciones de etomoxir-CoA, C75-CoA y cerulenina-CoA de 0,01-50 μ M. Se realizan también del mismo modo, ensayos de actividad CPT1 incubada con concentraciones crecientes de C75 (0-200 μ M) o de cerulenina (0-50 μ M).

Análisis de la inhibición reversible

La unión de un enzima a su sustrato e inhibidor, puede ser representado en las siguientes reacciones:



El enzima libre (E) es capaz de reaccionar con el sustrato (S), para formar el complejo enzima/sustrato (ES), o con el inhibidor (I), para formar el complejo enzima/inhibidor (EI). Además, cualquiera de estos complejos, puede ser convertido al complejo ternario enzima/sustrato/inhibidor (ESI) ligándose con el segundo componente. Hay por lo tanto cuatro reacciones a considerar, cada una tiene su propia constante de disociación mencionadas como K_m , αK_m , K_i , y αK_i en el diagrama. Como referencia, se numeran las diferentes reacciones.

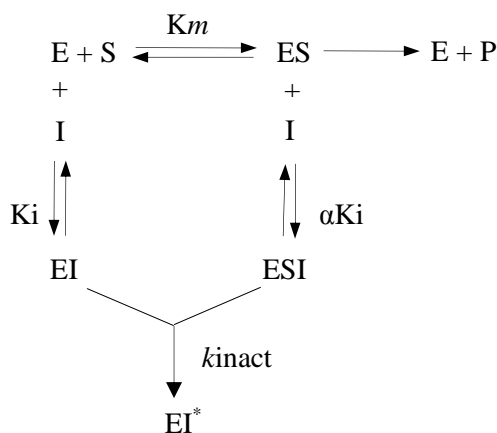
Existen varios tipos de inhibidores; competitivos, no competitivos, acompetitivos o mixtos. No todos los inhibidores son capaces de formar parte en todas estas reacciones:

- 1 Es siempre posible.
- 2 No es posible con inhibidores acompetitivos.
- 3 No es posible con inhibidores competitivos.
- 4 No es posible con inhibidores competitivos o acompetitivos.

Un inhibidor no competitivo es capaz de formar parte de las cuatro reacciones, pero el inhibidor no competitivo clásico (puro), a diferencia de un inhibidor mixto, es un caso especial. Con estos inhibidores clásicos, K_m y αK_m son iguales, cómo lo son K_i y αK_i . Sin embargo, en los inhibidores mixtos, $K_i \neq \alpha K_i$. Los inhibidores mixtos son el tipo más complejo cinéticamente hablando, ya que pueden realizar las cuatro reacciones y cada una tiene una constante diferente. Se determina la constante de inhibición K_i (también llamada constante de disociación del complejo EI y refleja el grado de afinidad de I para E) y la constante de disociación del complejo ESI ($\alpha K_i = K_I$), utilizando representaciones secundarias deducidas de la representación primaria de Lineweaver-Burk tal cómo se detalla a continuación.

Con el objetivo de definir el tipo de inhibición que presenta el malonil-CoA con respecto al sustrato carnitina, se ensayó la actividad CPT1A salvaje sobreexpresada en levadura, variando las concentraciones del sustrato carnitina (50-600 μM) en presencia de 0, 10, 50 y 100 μM malonil-CoA. La concentración del segundo sustrato, palmitoil-CoA se fija a 135 μM . Se calculan las constantes aparentes de inhibición y disociación para malonil-CoA (K_i y K_I) a partir de representaciones de Lineweaver-Burk ($1/v = f(1/[\text{Inhibidor}])$), de plots secundarios (pendientes (obtenidas de la representación de Lineweaver-Burk) = $f[\text{Inhibidor}]$) y de representación de Dixon ($1/V_{\text{max,app}}$ vs $[\text{Inhibidor}]$). K_i se define como la constante de inhibición que no depende de la concentración del enzima (E) o del sustrato (S) y se calcula de la representación secundaria. Mientras que K_I que es igual a αK_i , se define como la constante de disociación del complejo enzima/sustrato/inhibidor (ESI), y se calcula de la representación de Dixon. Los datos se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten con el programa SigmaPlot 8.0. Los valores de IC_{50} y de constantes de inhibición y disociación, se estiman analizando los datos de tres experimentos realizados en duplicado usando el programa de Excel (*Microsoft softwar*).

Análisis de la inhibición irreversible



Como se muestra en la figura del esquema de la cinética enzimática de los inhibidores irreversibles, éstos, forman inicialmente un complejo reversible y no covalente con el enzima (EI o ESI), que reaccionará posteriormente para producir una modificación covalente en lo que se denomina el "complejo del punto muerto" EI*. La tasa a la cual se forma EI* se llama tasa de inactivación o *kinact*. Puesto que la formación de EI puede competir con ES, la unión de los inhibidores irreversibles puede ser prevenida por competencia tanto con el sustrato como con un segundo inhibidor reversible. Este efecto de protección es una buena evidencia de una reacción específica del inhibidor irreversible con el sitio activo.

Los pasos de unión e inactivación de esta reacción son analizados preincubando el enzima CPT1A sobreexpresada en levadura (desde 0,5 a 5 min) con una concentración fija del inhibidor C75-CoA (50 µM), y midiendo la actividad que va quedando a lo largo del tiempo. La actividad irá disminuyendo de forma paulatina con tiempo, generalmente siguiendo una dinámica de decaimiento exponencial.

En el caso del estudio de la interacción del inhibidor C75-CoA y etomoxir-CoA con el enzima CPT1A salvaje y mutante CPT1A M593S sobreexpresados en levadura, se varían las concentraciones de C75-CoA o de etomoxir-CoA de 0,2-10 µM, en presencia de concentraciones fijas de sustrato carnitina (400 µM) y palmitoil-CoA (50 µM). Las constantes aparentes de inhibición y de inactivación (K_i y *kinact*) fueron determinadas utilizando análisis de regresión por método no lineal basado en el método descrito por Kitz-Wilson (Maurer, 2000) ya que una linealización de datos, puede afectar negativamente la precisión de los resultados. Por ello, se utiliza un método no lineal utilizando la siguiente ecuación:

$$\ln\left(\frac{E}{E(o)}\right) = -\left(\frac{k_{inact}}{[I] + K_i}\right) \times [I] t$$

Esta ecuación es un reajuste de la ecuación de Kitz-Wilson, que describe la pérdida de actividad del enzima con el tiempo:

$$\ln\left(\frac{E(t)}{E(o)}\right) = \frac{-k_{inact} \times t}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} = -k_{app} \times t$$

Donde:

E y $E(t)$: es la actividad máxima del enzima tras la preincubación con el inhibidor durante un tiempo t .

$E(o)$: es la actividad máxima del enzima tras la preincubación en ausencia del inhibidor.

t : tiempo de preincubación del inhibidor con el enzima.

$[I]$: es la concentración del inhibidor.

k_{app} : nivel de inactivación aparente. Se describe por la pendiente obtenida cuando se representa $\ln(E/E_o)$ frente al tiempo (t). El valor de k_{app} depende en $[I]$, K_i y el valor de la constante de inactivación del primer orden, k_{inact} .

Se utilizó el mismo método de determinación de las constantes aparentes de inhibición y de inactivación (K_i y k_{inact}) durante el estudio cinético de CPT1A salvaje sobreexpresada en levadura con C75-CoA y con respecto al sustrato palmitoil-CoA. Se varían las concentraciones de C75-CoA de 1-5 μM , en presencia de concentraciones crecientes del sustrato palmitoil-CoA (1-100 μM) y una concentración fija de 400 μM de carnitina. Durante este estudio cinético, se mantiene siempre el ratio molar del palmitoil-CoA y albúmina a (5:1) para evitar la presencia de acil-CoA libre y sus efectos detergentes y también para evitar la formación de micelas.

En cuanto al estudio de la interacción del inhibidor C75-CoA con respecto al segundo sustrato carnitina, en CPT1A sobreexpresada en levadura, se varían las concentraciones de C75-CoA de 0,0001-5 μM , en presencia de concentraciones crecientes del sustrato carnitina (50-800 μM) y una concentración fija de 135 μM de palmitoil-CoA. En este caso, la constante de inhibición K_i aparente, fue determinada utilizando análisis de regresión por método lineal y de la representación secundaria del plot de Lineweaver-Burk. Para comprobar que se trata de una inhibición competitiva, se calcula también el valor aparente de K_i por la representación de las pendientes obtenidas de la

representación de Henderson ($([I]/(1-(v_i/v_o)))$ frente a v_o/v_i), en función de concentraciones de carnitina.

Ecuación de Henderson:

$$\frac{[I]}{1 - \left(\frac{v_i}{v_o}\right)} = K_i \times \left(\frac{v_o}{v_i}\right) + [E_o]$$

Donde:

[I]: concentración del inhibidor.

v_i : actividad del enzima tras la preincubación en presencia del inhibidor.

v_o : actividad del enzima tras la preincubación en ausencia del inhibidor.

[E_o]: concentración inicial del enzima.

5.1.2 Ensayos de estabilidad de la unión enzima-inhibidor

Para evaluar la unión de los derivados CoA que veremos más adelante en el apartado **Métodos 7.1** (Malonil-CoA, C75-CoA y etomoxir-CoA) en CPT1, se realizan experimentos basados en los procedimientos descritos por Tutwiler (Tutwiler, 1980) con algunas modificaciones. Las fracciones mitocondriales de levadura sobre-expresando CPT1A (aproximadamente 10 μ g de proteína) se preincuban durante 5 min a 30°C con 50 μ M de cada derivado-CoA. Una alícuota es directamente usada para el ensayo de actividad CPT1 (muestra no lavada) y otra alícuota es centrifugada a 13000 g durante 5 min a 4°C, se resuspende el precipitado en el tampón de lavado antes de procesar el ensayo (muestra lavada). Estas muestras son ensayadas durante 4 min a 30°C.

Tampón de lavado: 5 mM Tris-HCl pH 7,2, 150 mM KCl, 1 mM PMSF, 0,5 μ M benzamidina, 1 μ g/ml pepstatina, 2 μ g/ml leupeptina. Se guarda a 4°C.

A continuación, se realizan ensayos de diálisis para comprobar la reversibilidad de la interacción del C75-CoA con el enzima CPT1. 160 μ g de fracciones enriquecidas en mitocondrias obtenidas de células de levadura que sobre-expresan CPT1A, son preincubadas durante 5 min a 30°C (en ausencia del inhibidor), o con una concentración final de 50 μ M de C75-CoA o 50 μ M etomoxir-CoA. Estas muestras se dializan (sacos de diálisis de Sigma, ref. D-6191) en el tampón de diálisis a 4°C. Se toman alícuotas antes de la diálisis (tiempo 0 h), a 24 h y 36 h. Estas muestras se ensayan para la actividad CPT1.

Tampón de dialisis: 10 mM Hepes pH 7,4, 1 mM EDTA y 10% glicerol. Se guarda a 4°C.

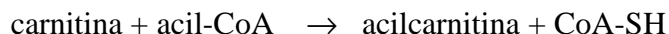
5.1.3 Determinación de parámetros cinéticos

Se determinan los valores aparentes de K_m y V_{max} de ambos sustratos carnitina y palmitoil-CoA de las dos isoformas de CPT1 salvaje o mutada sobreexpresada en levadura, extrapolando los datos cinéticos a la ecuación de Michaelis-Menten, utilizando la representación de Lineweaver- Burk y el programa SigmaPlot 8.0. Se calcula la $K_{m_{app}}$ para carnitina variando la concentración de este sustrato entre 50-800 μM en presencia de una cantidad constante de 135 μM de palmitoil-CoA (Fraser, 2001). La $K_{m_{app}}$ para el sustrato palmitoil-CoA se calcula variando la concentración de acil-CoA entre 1-100 μM en presencia de una cantidad constante de 400 μM de carnitina en el caso de CPT1A y de 1 mM en el caso de CPT1B.

De la misma manera, se calculan los parámetros cinéticos, en el caso del estudio del tipo de inhibición de CPT1A por malonil-CoA con respecto al sustrato carnitina y por C75-CoA con respecto a ambos sustratos carnitina y palmitoil-CoA. Todos los valores aparentes de los parámetros cinéticos se estiman analizando los datos de tres experimentos realizados en duplicado usando el programa de computador Enzfitter (Biosoft).

5.2 Método fluorimétrico

La actividad CPT1 se determina también por un método fluorimétrico (Hassett, 2000) con algunas modificaciones. El método mide la liberación de CoA-SH a partir del acil-CoA dependiendo en la presencia de carnitina, según la siguiente reacción:



Este método permite el análisis de actividad CPT1 utilizando como sustratos, la carnitina y aciles-CoA de cadena de carbono corta ya que el CoA-SH es soluble en agua. El CoA-SH formado reacciona con el reactivo 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide (ABD-F) para dar un producto muy fluorescente que permite medir la actividad carnitina aciltransferasa.

El ensayo de actividad CPT1 utilizando fracciones mitocondriales de levadura sobre-expresando ambas isoformas de CPT1, se realiza durante 8 min a 30°C en un volumen final de 600 µl. La concentración final de los componentes de la reacción es:

Mezcla de reacción	
HEPES pH 7,8	40 mM
EDTA	1,5 mM
L-carnitina	1,5 mM
Acil-CoA	0,1 mM

Se preparan las muestras en un tubo de 1,5 ml y se empieza el ensayo añadiendo 5 µg de muestra proteica. Paralelamente, se prepara el blanco en ausencia de L-carnitina, para determinar la rotura del grupo acil de su CoA (por ejemplo, la actividad acil-CoA hidrolasa), un proceso independiente de la carnitina. Se para la reacción enzimática por desnaturalización de las proteínas por calor durante 10 min a 70°C. Se centrifuga durante 10 min a 13400 g y se recogen 550 µl del sobrenadante a los cuales se les añaden 35 µl de la solución ABD-F a 2 mg/ml, se agita bien el tubo y se incuba durante 30 min a 50°C. La unión de la sonda ABD-F al CoA-SH es completa después de este tiempo.

Las intensidades de fluorescencia, indicativas de la unión del grupo tiol del CoA-SH a la sonda ABD-F, se miden en cubetas de cristal de 10 mm (700 µ l) en 391 nm (longitud de onda de excitación) y 515 nm (longitud de onda de emisión). Estas intensidades de fluorescencia fueron comparadas con una curva estándar para CoA/ABD-F que era lineal entre el rango de 0-30 nmol. Las actividades enzimáticas se miden por duplicado y todas las estimaciones de fluorescencia se realizan con el espectrómetro de luminescencia Perkin Elmer LS 45.

Para calcular la actividad específica (A.E.) del enzima se aplica la siguiente fórmula:

$$A.E. (\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}) = \frac{(F.I.)}{(t \times \text{mg de proteína} \times \text{Pendiente})}$$

Donde:

F.I.: es la intensidad de fluorescencia.

t: tiempo de incubación en el ensayo, expresado en minutos.

Pendiente: es la pendiente de la curva estándar de CoA/ABD-F, aproximadamente 12 unidades de intensidad de fluorescencia por nmol de CoA.

Los valores de actividad se dan como medias \pm desviación estándar para al menos tres ensayos independientes con diferentes preparaciones proteicas.

Solución stock de ABD-F: se disuelven en 2,5 ml de DMSO, 50 mg de ABD-F (Sigma, ref. F-3639) para una concentración de 20 mg/ml, se alicuota y se guarda a -20 °C. En el momento de proceder al experimento, se diluye la solución de stock en agua destilada a una concentración de 2 mg/ml.

Acil-CoA a 1 mM: El stock de acil-CoA se prepara a 1 mM en acetato sódico 1 mM pH 5,9, se alicuota y se guarda a -20°C.

L-carnitina a 50 mM: Se disuelven 10 mg de L-carnitina (Sigma, ref. C-0283) en 10 ml de agua destilada y se guarda a -20°C una vez alicuotada.

Este método fluorimétrico nos permitió analizar la especificidad del enzima CPT1 a diferentes sustratos aciles-CoA de cadena de átomos de carbono desde el acetil-CoA (C₂) hasta el decanoil-CoA (C₁₀).

Sustratos utilizados			
Aciles-CoA	Referencia	Aciles-CoA	Referencia
Acetil-CoA (C ₂)	Sigma, ref. A-2181	Lauril-CoA (C ₁₂)	Sigma, ref. L-2659
Butiril-CoA (C ₄)	Sigma, ref. B-1508	Miristoil-CoA (C ₁₄)	Sigma, ref. M-4414
Hexanoil-CoA (C ₆)	Sigma, ref. H-2012	Palmitoil-CoA (C ₁₆)	Sigma, ref. P-9716
Octanoil-CoA (C ₈)	Sigma, ref. O-6877	Estearoil-CoA (C ₁₈)	Sigma, ref. S-0802
Decanoil-CoA (C ₁₀)	Sigma, ref. D-5269	Araquidoil-CoA (C ₂₀)	Sigma, ref. A-3164

6. ACTIVACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ACILES-CoA

6.1 Activación de etomoxir, C75 y cerulenina a sus derivados-CoA *in vitro*

Etomoxir (R-(+)-2-[6-(4-clorofenoxi)hexil]oxirano-2-carboxilato de sodio) es un inhibidor irreversible de CPT1 y sólo es activo cuando ha sido transformado a etomoxir-CoA (Adams, 1998). Etomoxir ha sido obtenido del Dr. H.P.O. Wolf (GMBH, Allensbach, Alemania). C75 (4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofurano-3-ácido carboxílico) (Alexis Biochemicals, ref. 270-286-M005) es un antitumoral derivado de la cerulenina y que ha sido reportado como una posible diana para el tratamiento de la diabetes. Cerulenina (2,3-Epoxi-4-oxo-7,10-dodecadienamida) es un inhibidor natural de FAS.

En la presente tesis, se estudia el efecto del etomoxir y del C75 tanto en células en cultivo (la línea celular L6E9 derivada de músculo esquelético de rata y la línea celular INS(823/13) de páncreas) como en fracciones enriquecidas en mitocondrias de células, de páncreas, músculo y hígado de ratón, y también en extractos mitocondriales de levadura sobre-expresando ambas izoformas de CPT1. El efecto de los esteres de CoA de estos compuestos también se estudia en extractos mitocondriales de levadura sobre-expresando ambas izoformas de CPT1 y en fracciones mitocondriales frescas de músculo y hígado de rata (Bentebibel, 2006). También, se estudia el efecto de la cerulenina y su derivado CoA en la actividad CPT1A de rata.

La activación de estos productos a sus esteres de CoA, se realiza mediante un método enzimático sencillo basado en el uso de acil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.3) de *Pseudomonas* sp. (Sigma, ref. A-3352) descrito por Taylor (Taylor, 1990). Partimos de un stock de 100 mM de etomoxir, o de C75 o bien de cerulenina disueltos en DMSO, de CoA-SH (sal de litio) y acil-CoA sintetasa (2-6 unidades/mg de proteína). Siempre que se activan C75 o cerulenina, se lleva a cabo también, la activación del etomoxir como control de la activación a ester de CoA. En dos tubos de 1,5 ml se añade 1 μ mol de etomoxir y en el otro tubo, 1 μ mol de C75 o de cerulenina, y en un volumen final de 1 ml, se añade el tampón de activación recién preparado a cada tubo.

Tampón de activación	
Triton X-100	0,1% (p/v)
CoA-SH	5 mM
DTT	1 mM
ATP	10 mM
MgCl ₂	10 mM
MOPS-NaOH pH 7,5	100 mM

La mezcla se sonica durante 2 min en un baño de ultrasonidos para permitir la emulsión del etomoxir, del C75 o de la cerulenina. Acil-CoA sintetasa (0,25 unidades disueltos en 100 mM MOPS-NaOH) se añade y se lleva a un volumen final de 1 ml. La reacción se lleva a cabo, agitando de vez en cuando, a 35°C durante 2 horas. Se alícuota y se congela a -80°C.

En el caso del análisis por MALDI-TOF, para detectar la formación del C75-CoA, se elimina el enzima acil-CoA sintetasa tras la reacción de activación, utilizando columnas de tipo Millipore (ref. 42410, Microcon YM-30), con el fin de evitar posibles interacciones inespecíficas con la matriz del MALDI-TOF.

Para los ensayos de interacción de C75-CoA, etomoxir-CoA o cerulenina-CoA con el enzima CPT1, se considera que todo C75, etomoxir o cerulenina se hayan activados a sus esteres de CoA y que sus concentraciones finales son de 1 mM, respectivamente. Esto se confirma por el método fluorimétrico, a la hora de valorar la concentración del ester de CoA formado, tal cómo se detalla más adelante.

Cuando se prepara la reacción de activación, justo después de poner el enzima acil-CoA sintetasa, se agita el tubo y se cogen 20 µl inmediatamente antes de empezar la reacción de activación (2h a 35°C) y se incuban estos 20 µl durante 2-3 min a 80°C para inactivar el enzima acil-CoA sintetasa. Esta alícuota (ester-CoA, antes de la activación = t₀), se reserva para valorar posteriormente, la concentración del ester-CoA formado. Después de la reacción de activación, se guarda de nuevo una alícuota de 20 µl (ester-CoA, después de la activación = t₁) y se reserva para valorar la concentración del ester-CoA formado.

Cuantificación del ester-CoA formado tras la reacción de activación

Para esto, se utiliza un método fluorimétrico y una sonda de DTNB que es conveniente para la determinación de grupos sulfhídricos. Se prepara el tampón DTNB a 4 mM (disolviendo 16 mg de DTNB en 10 ml de tampón 2X fluorimétrico; 40 mM HEPES pH 7,8, 1,5 mM EDTA) y se preparan las siguientes muestras por duplicado:

	Tampón 2X fluorimétrico	DTNB (4mM)	H ₂ O	Muestra
Blanco	75 µl	75 µl	150 µl	-
Ester-CoA (antes de la activación = t ₀)	75 µl	75 µl	142 µl	8 µl
Ester-CoA (después de la activación = t ₁)	75 µl	75 µl	142 µl	8 µl

Se añade a cada tubo 600 µl de H₂O y se lee la absorbancia (Abs) a 412 nm.

Para calcular la concentración del ester-CoA formado tras la reacción de activación, se calcula la concentración del CoA-SH que haya reaccionado con C75, etomoxir o cerulenina. Conociendo la concentración del CoA-SH inicial que es de 5 mM, se utiliza la siguiente fórmula para determinar la concentración del ester-CoA tras la reacción de activación:

$$[\text{Ester-CoA}] \text{ (mM)} = \frac{(\text{Abs } t_0 - \text{Abs } t_1) \times 5 \text{ mM}}{\text{Abs } t_0}$$

6.2 Purificación de los derivados-CoA

El exceso del CoA-SH de la reacción de activación de los compuestos a sus esteres de CoA, se elimina incubando la reacción de activación con una resina de tipo *SulfoLink Coupling Gel* (Pierce Biotechnology, Ref. 20401). Los grupos iodoacetil de la resina reaccionan específicamente con el grupo sulfhídrico del CoA-SH permitiendo así la inmovilización de las moléculas de CoA libres mediante una unión covalente. Se sigue el siguiente protocolo:

1. Equilibrar 2,8 ml de resina al 50% con 11,2 ml de tampón de unión “Coupling Buffer” en un tubo (lavar la resina).
2. Poner el tubo en agitación orbital moderada durante 10 min a 4°C.
3. Centrifugar el tubo a 500 g durante 5 min a 4°C.
4. Se descarta el sobrenadante (SN) y se queda con los 1,4 ml de resina en forma de gel (precipitado). Se repiten estos pasos de lavado, 3 veces en total.
5. Tras la última centrifugación, se resuspende el precipitado con 1,4 ml de tampón de unión (invirtiendo el tubo). Se reparte este volumen en dos tubos.
6. Se centrifugan los 2 tubos a 500 g durante 5 min a 4°C, y se descarta el SN. Se guardan los 700 µl de resina en forma de gel en cada tubo.
7. Se añaden a cada tubo, 500 µl de la reacción de activación de C75, etomoxir o cerulenina a sus derivados-CoA. Se resuspende el gel invirtiendo los tubos.
8. Incubar estos dos tubos durante 30 min a 4°C con una agitación orbital moderada.
9. Centrifugar los 2 tubos a 500 g durante 5 min a 4°C.
10. Coger el SN donde hay el derivado-CoA purificado del exceso de CoA-SH, y pasarlo en un nuevo eppendorf. Centrifugar el eppendorf en una minicentrífuga a 500 g durante 5 min a 4°C. Se guarda el SN a -20°C.

Tampón de unión “Coupling Buffer”: 50 mM Tris pH 8,5, 5 mM EDTA-Na, y se guarda a 4°C.

Tras este protocolo, se valora el CoA-SH residual por el método fluorimétrico. Se toman 20 µl del sobrenadante que contiene el ester-CoA (ester-CoA, pasado por la resina = t₂) y se preparan las siguientes muestras por duplicado:

	Tampón 2X fluorimétrico	DTNB (4mM)	H ₂ O	Muestra
Blanco	75 µl	75 µl	150 µl	-
Ester-CoA (después de la activación = t ₁)	75 µl	75 µl	142 µl	8 µl
Ester-CoA (pasado por la resina = t ₂)	75 µl	75 µl	142 µl	8 µl

Se añade a cada tubo 600 µl de H₂O y se lee la absorbancia (Abs) a 412 nm.

Tampón fluorimétrico 2X: 40 mM HEPES pH 7,8, 1,5 mM EDTA. Se guarda a 4°C.

Se utiliza la siguiente fórmula para determinar la presencia o ausencia de CoA-SH residual tras el proceso de purificación del ester-CoA del exceso de coenzima A:

$$\% \text{ CoA-SH residual} = \frac{\text{Abs } t_2 \times 100}{\text{Abs } t_1}$$

Esta resina es capaz de retener más de 95% de CoA-SH inicial.

6.3 Cuantificación por DTNB

Tras la purificación del exceso de CoA-SH de la reacción de activación de C75, etomoxir y cerulenina a sus derivados-CoA, se cuantifica el ester de CoA por un método sencillo que consiste en romper el enlace -CoA utilizando 0,4 M NaOH. Para este análisis, se utiliza como control, uno o dos aciles-CoA (palmitoil-CoA o decanoil-CoA) de concentración inicial conocida (1 mM). Se preparan las siguientes muestras por duplicado, tanto en las muestras con NaOH (presencia de enlace -CoA) como en las muestras sin NaOH (presencia de acil-CoA), en un volumen final de 25 µl:

	Muestras de Palmitoil-CoA		Muestras de Ester-CoA	
NaOH (1 M)	10 µl	-	10 µl	-
H ₂ O	2,5 µl	12,5 µl	2,5 µl	12,5 µl
Palmitoil-CoA (control, 1mM)	12,5 µl	12,5 µl	-	-
Ester-CoA (pasado por la resina = t ₂)	-	-	12,5 µl	12,5 µl

Se incuban las muestras durante 15 min a 55°C. Tras este tiempo, se ajusta el pH añadiendo a cada tubo 200 µl de 75 mM Tris-Hcl y se vortea. Se añaden 75 µl de 4 mM DTNB (5,5'-Dithiobis(2-ácido nitrobenzóico)) a cada tubo y se mezcla. Después, se añaden 600 µl de H₂O y se mezcla. Finalmente, se lee la absorbancia (Abs) a 412 nm.

Tampón 4 mM DTNB (Sigma, ref. D8130): disolver 16 mg de DTNB en 10 ml de 75 mM Tris-Hcl.

Para calcular la concentración del ester-CoA tras el proceso de purificación por la resina, se utiliza el valor de Abs del palmitoil-CoA como parámetro de comparación con la Abs del ester-CoA (pasado por la resina = t₂). La siguiente fórmula resume este cálculo:

$$[\text{C75-CoA purificado}] = \frac{(\text{Abs}_{+\text{NaOH de } t_2} - \text{Abs}_{-\text{NaOH de } t_2}) \times [\text{palmitoil-CoA}]_{\text{initial}}}{(\text{Abs}_{+\text{NaOH del control}} - \text{Abs}_{-\text{NaOH del control}})}$$

7. ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS

7.1 Análisis por MALDI-TOF

Los espectros de MALDI-TOF del C75, C75-CoA, etomoxir, etomoxiril-CoA, cerulenina y cerulenina-CoA, se han obtenido en un espectrómetro de masas Voyager DE-RP (Applied Biosystems) equipado con un láser de nitrógeno (337 nm, pulso de 3 ns). El voltaje de aceleración se fija a 20 kV. Los datos se adquieren en el modo reflector con tiempos de 320 ns tanto para la polaridad negativa como la positiva. Los espectros se calibran externamente usando como mezcla de calibración (mezcla de calibración 1, Applied Biosystems): CHCA, des-Arg¹-Bradykinina, Angiotensina I, Glu¹-Fibrinopeptido B, Neurotensina m/z 300-1700.

Las muestras se preparan diluyendo 1 µl de la mezcla de activación del C75 o etomoxir o cerulenina a C75-CoA o etomoxiril-CoA o cerulenina-CoA, respectivamente, con 100 µl de H₂O y mezclando 1 µl de esta solución diluida con 1 µl de la solución matriz (10 mg/ml de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB, Aldrich) en metanol:agua 1:1). 1 µl de la mezcla muestra:matriz se pone en una placa de acero, se deja secar al aire y se introduce en el espectrómetro de masas. Los espectros se adquieren en el modo positivo y negativo.

Los espectros de MALDI-TOF se realizan en el servicio de espectrometría de masas de la Universidad de Barcelona (SCT).

7.2 Análisis por HPLC-MS/MS

Se realizó también experimentos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a la espectrometría de masas y tándem (HPLC-MS/MS). Un equipo cromatográfico para HPLC está formado por un *sistema de bombeo* para impulsar la fase móvil, una *válvula de inyección* para introducir las muestras en el sistema cromatográfico en flujo continuo y a altas presiones, una *columna cromatográfica* que contiene la fase estacionaria, un *detector* para determinar las sustancias separadas y un *sistema registrador* que permite obtener los cromatogramas.

En nuestros estudios para la determinación de la formación del C75-CoA en las diferentes muestras analizadas, utilizamos el sistema Perkin Elmer series 200 equipado con una bomba cuaternaria y un inyector de muestras automático termoestabilizado. Se utiliza una columna de fase inversa Luna (Phenomenex, UK) C₁₈ (2,0 x 150 mm, 3,5 µm) a temperatura ambiente y un volumen de inyección de las muestras de 10 µl.

Esta técnica está específicamente indicada para el análisis de compuestos poco volátiles. Se inyecta la muestra en el cromatógrafo de líquidos, y sus compuestos se separan en la columna cromatográfica. Los componentes individuales pasan por orden de elución al espectrómetro de masas para ser detectados y cuantificados.

En nuestro caso, los experimentos en modo *full scan* (barrido completo, MS) y los experimentos en tándem (MS/MS) fueron realizados en un espectrómetro de masas API 3000 triple cuadrupolo equipado con una fuente de *Turbo Ion Spray*. Todos los análisis fueron realizados en el modo positivo. Antes de analizar las muestras, se realiza en primer lugar un análisis de detección de tiempo de retención de una mezcla de aciles-CoA de tamaño y concentración conocidos, que nos sirve como patrón. Se utiliza la mezcla C₆-CoA, C₈-CoA, C₁₀-CoA y C₁₆-CoA como patrón, en el caso de estudiar las muestras de aciles-CoA obtenidos de mitocondrias de hígado y de músculo de rata, incubadas con C75. También, utilizamos la mezcla: C₆-CoA, C₈-CoA, C₁₆-CoA, C₁₇-CoA (patrón interno) y C75-CoA (estándar) como patrón, en el caso de analizar la detección de la formación del C75-CoA en las muestras obtenidas de los hepatocitos primarios de rata.

Las fases móviles y las condiciones cromatográficas son las siguientes:

- (A); 50% acetonitrilo (Sigma, ref. 34967) en tampón 10 mM acetato de amonio (Sigma, ref. A-1542) a pH 5,3 ajustado con ácido acético.
- (B); 10% acetonitrilo en tampón 10 mM acetato de amonio pH 5,3 ajustado con ácido acético.
- (C); 100% acetona (Sigma, ref. 34850).

En el caso de las muestras de aciles-CoA obtenidas de mitocondrias aisladas de hígado y de músculo de rata, incubadas con C75, se utilizan las fases móviles (A) y (B). Se equilibria en primero la columna con el 22% de la fase móvil (A) durante 5 min, luego, el gradiente de elución es el siguiente: 22% a 85% (A) durante 30 min y 85% a 22% (B) durante 10 min.

En el caso de la detección de la formación del C75-CoA en las muestras obtenidas de los hepatocitos primarios de rata, se equilibria la columna con el 22% de la fase móvil (A) durante 10 min, luego, se aplica el siguiente gradiente de elución: 22% a 90% (A) durante 10,5 min, 5% (C) durante 5,5 min, 90% a 50% (A) y 5% a 45% (C) durante 10 min, 50% (A) y 45% (C) durante 25 min, 22% a 90% (A) durante 10,5 min. El flujo de trabajo es de 0,4 ml/min.

Se aplican las siguientes condiciones: voltaje capilar (IS) de +3000V; gas nebulizador (N₂), 10 (unidades arbitrarias); gas cortina (N₂), 12 (unidades arbitrarias); gas de colisión (CAD) (N₂), 4 (unidades arbitrarias); potencial declustering (DP), + 30 V; potencial de focalización (PF), + 200 V; potencial de entrada (EP), + 10 V; energía de colisión (CE), + 40 V; potencial a la salida de la celda de colisión (C x P), + 15 V. El gas auxiliar (N₂) es caliente a 300°C y se introduce en la fuente de ionización chocando a 90° respecto al spray, a un flujo de 6000 cm³/min.

La adquisición de datos en el modo *Full scan* se realiza desde 500-1200 *m/z* en el modo continuo y utilizando un ciclo de 2 s con un paso de 0,1 u y una pausa entre cada ciclo de 2 ms. Con el objetivo de conseguir una máxima sensibilidad de detección, se inyectan las muestras en el modo MRM (*multiple reaction monitoring*) monitorizando la transición 1022,5/515,6 y la transición 1020,7/513,5 obtenidas de los experimento de *Product Ion Scan* (PSI) con los estándares C75-CoA y C₁₇-CoA, respectivamente.

Los experimentos de análisis por HPLC-MS/MS, se realizan en el servicio de espectrometría de masas del Parque Científico de Barcelona (PCB).

7.3 Extracción y cuantificación de aciles-CoA de tejidos

7.3.1 Extracción de aciles-CoA

El aislamiento y preparación de los hepatocitos primarios de rata macho alimentada, se realiza en nuestro laboratorio según el método descrito por Christofferson (Seglen, 1976) con algunas modificaciones. Una vez obtenidos los hepatocitos, se incuban con 50 μM o con 100 μM de C75 (100 mM solución stock en DMSO) o bien con DMSO sólo como control, durante 1 h en un volumen total de 5 ml de medio de cultivo. Las células control o tratadas con C75 se recogen separadamente, en un volumen de 1 ml de tampón KH_2PO_4 (100 mM, pH 4,9) y se guardan a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el día siguiente para la extracción de aciles-CoA.

La extracción de los aciles-CoA se realiza según el protocolo descrito en la literatura (Golovko, 2004; Deutsch, 1994) con algunas modificaciones:

1. Todos los pasos se realizan entre $0-4\text{ }^\circ\text{C}$.
2. Se descongelan las células control y tratadas con C75 y se les añaden 16 nmol de heptadecanoil-CoA ($\text{C}_{17}\text{-CoA}$) como un control interno y luego se sonicán las muestras durante 20 sec a baja velocidad.
3. Se añade 1 ml de n-propanol a cada fracción celular y se sonica la emulsión resultante 20 sec más, dos veces, con un intervalo de 20 sec en hielo.
4. Se añade 0,125 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado seguido de 2 ml de acetonitrilo al 100% a cada fracción celular y se vortea durante 5 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$.
5. Se centrifugan los tubos a 2100 g durante 5 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$.
6. Se toma la fase superior que contiene los aciles-CoA y se filtra con un filtro estéril de $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore, ref. Millex-GS, catálogo: SLGL0250S).
7. Se liofiliza la solución resultante y se redisuelve en 200 μl de la misma fase móvil utilizada en el análisis por HPLC-MS/MS (en nuestro caso es la fase B).

Se calculó por método de Bradford la concentración de proteínas en cuatro placas de 5 ml de cultivo celular de hepatocitos primarios de rata (aproximadamente 6 millones de células). Esta concentración es de 10,5 mg de proteína/placa.

7.3.2 Cuantificación de aciles-CoA

Para calcular la concentración del C75-CoA formado en las células de hepatocitos primarios de rata tratados con C75, tal cómo se ha descrito anteriormente, se realiza en primer lugar, una recta patrón de calibración ($\text{Área del pico} = f([\text{ester de CoA}])$), una para C75-CoA (estándar de activación del C75 a C75-CoA) y otra para el C₁₇-CoA (estándar interno). Esta recta patrón, se realiza inyectando directamente en el HPLC-MS/MS, concentraciones de C75-CoA o de C₁₇-CoA desde 10 hasta 5000 nM, separadamente. Luego, se calcula el área de los picos resultantes a cada concentración de estándar, y con estos datos y las concentraciones de los esters de CoA utilizadas, se representó la recta patrón de calibración utilizando el programa Excel (Microsoft).

A continuación, se calcula por HPLC-MS/MS, el área del pico del C₁₇-CoA y del C75-CoA formado en las muestras de aciles-CoA obtenidas de las células de hepatocitos. Esta área se extrapola en la recta patrón de calibración correspondiente a la del C₁₇-CoA o a la del C75-CoA, para obtener la concentración de cada ester-CoA en las células. Se tuvo en cuenta también, el porcentaje de recuperación del estándar C₁₇-CoA.

Se añade 8 nmol de C₁₇-CoA a las fracciones de células de hepatocitos primarios de rata tratados con C75, antes de proceder a la extracción de los aciles-CoA. Se inyectan a continuación en el HPLC-MS/MS, los extractos de aciles-CoA obtenidos de estas células. El área del pico correspondiente a la detección del C₁₇-CoA, se extrapola en la recta patrón de calibración del C₁₇-CoA. Este estándar interno, se utiliza para calcular el porcentaje de recuperación tras el procedimiento de extracción de los aciles-CoA de las muestras de hepatocitos primarios de rata. Del mismo modo, se calcula el área del pico correspondiente al C75-CoA formado en estas muestras, y se extrapola el área en la recta patrón de calibración del C75-CoA. Se pudo calcular así la concentración del C75-CoA, recuperada tras el procedimiento de extracción de los aciles-CoA.

Teniendo en cuenta, la concentración inicial del C₁₇-CoA puesto con las células de hepatocitos antes de proceder a la extracción de los aciles-CoA, el porcentaje de recuperación del C₁₇-CoA, y suponiendo que tras el proceso de extracción, el porcentaje de recuperación de los aciles-CoA durante este proceso, es igual al del C₁₇-CoA, esto nos conduce a deducir la concentración del C75-CoA formado en estas células.

7.3.3 Tratamiento de fracciones mitocondriales con C75

Con el objetivo de determinar si C75 se puede convertir a C75-CoA *in vivo*, se incuban fracciones frescas enriquecidas en mitocondrias (1 mg) obtenidas a partir de hígado y músculo de rata, con C75 y CoA-SH. La incubación se realizó con 0,5 μmol de C75, en un volumen final de 500 μl de un tampón que contiene: 0,1% (w/v) Triton X-100, 5 mM CoA-SH, 10 mM ATP, 10 mM MgCl_2 y 100 mM MOPS-NaOH (pH 7,5). Se lleva a cabo la reacción a 30°C durante 2 horas, y se descartan las mitocondrias por centrifugación a 12000 *g* durante 20 min. La formación del C75-CoA en el sobrenadante se analiza por HPLC-MS/MS.

8. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS

8.1 Herramientas bioinformáticas básicas y bases de datos

Las secuencias proteicas se obtienen del servidor del banco de datos *Swiss Prot* (<http://www.expasy.org/sprot/>) y las secuencias de ADN, del servidor de la base de datos *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>).

El banco de datos de proteína RCSB (RSCB-PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>) es un depósito para el procesamiento y la distribución de datos de estructuras 3-D de macromoléculas biológicas. Este sitio Web fue usado para obtener las estructuras de datos cristalográficos, actualmente disponibles, de proteínas de la familia de carnitina/colina aciltransferasas.

RasMol (la versión 2.7.1., <http://www.RasMol.org>) se utiliza para la visualización de proteínas, ácidos nucleicos y pequeñas moléculas. El programa lee en un archivo las coordenadas de una molécula e interactivamente, muestra en una variedad de representaciones como en diagramas de cintas, la molécula en la pantalla del ordenador, con unas combinaciones de colores que se pueden modificar (Sayle, 1995).

Con el fin de obtener secuencias homólogas a CPT1A, COT, CPT2 y CrAT de rata, se utiliza el programa de búsqueda de alineamiento local básico (BLAST) (Altschul, 1990; Altschul, 1997) que permite identificar secuencias de miembros de la familia de carnitina/colina aciltransferasas. El programa compara nucleótidos o secuencias de proteínas con secuencias en la base de datos y calcula las equivalencias estadísticamente significativas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). El análisis de estructuras

secundarias de las secuencias se realiza utilizando los servidores públicos PHD (Rost, 1996), Jpred (Cuff, 1998) y Psi-Pred (Jones, 1999).

La herramienta EMBOSS-Transeq, (Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), <http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/>) se utiliza para la traducción de una secuencia de ácido nucleico a la correspondiente secuencia de aminoácido. La base de datos BRENDA (<http://www.brenda.uni-koeln.de>) es una fuente para obtener datos de enzimas. Esta base de datos se utiliza para obtener información de las enzimas de la familia carnitina/colina aciltransferasas, incluso datos sobre la reacción de catálisis, de cinéticas, sustratos/productos, inhibidores, estructura y estabilidad.

8.2 Alineamiento y comparación de secuencias

Los alineamientos múltiples de ácidos nucleicos o de secuencias protéicas fueron realizados usando el programa ClustalW (Thompson, 1994) que puede ser encontrado en el sitio Web EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>).

Se utiliza la herramienta EMBOSS-Align (sitio Web de EBI, <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) para emparejar el alineamiento de secuencias. Este programa compara dos secuencias y determina el porcentaje de identidad y semejanza entre ellas.

8.3 Análisis de residuos conservados en las subfamilias de enzimas (*tree-determinants*)

Las diferencias conservadas entre las aciltransferasas de cadena corta (colina o carnitina acetiltransferasas) o de cadena media-larga (carnitina octanoil o palmitoiltransferasas), o bien, las diferencias conservadas entre las carnitina aciltransferasas inhibibles y no inhibibles por malonil-CoA, se analizan con el algoritmo SequenceSpace (Casari, 1995; Pazos, 1997), utilizando el alineamiento múltiple de la familia carnitina-colina aciltransferasas.

8.4 Construcción del modelo 3-D del dominio C-terminal de CPT1

Los modelos estructurales de CPT1A y CPT1B se construyen usando procedimientos de modelaje por homología basado en alineamiento múltiple, basado en estructuras de secuencias de aminoácidos de la familia de carnitina aciltransferasas

incluyendo las coordenadas cristalográficas de COT de ratón unida al acilcarnitina (entrada PDB 1XL8, cadena A) (Jogl, 2005) y de CPT2 de rata (entrada PDB 2H4T) (Hsiao, 2006).

Los modelos 3-D se construyen usando el programa *Swiss-Pdb Viewer* y el servidor SWISS-MODEL (Guex, 1999; Peitsch, 1996; Schwede, 2003) (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>).

Se comprueba la validez y la calidad de los modelos estructurales del centro activo de CPT1 utilizando los programas ProsaII (Sippl, 1993), WHAT-CHECK (Hooft, 1996) del programa WHAT IF (Vriend, 1990) y el programa de validación PROCHECK del servidor SWISS-MODEL. Los cálculos y las representaciones de potenciales electrostáticos se realizan usando GRASP (Nicholls, 1993) y el programa Pymol.

8.5 Docking molecular de los sustratos carnitina y palmitoil-CoA y de los inhibidores malonil-CoA, C75-CoA, etomoxir-CoA y Ro 25-0187 en CPT1

Los putativos sitios de unión del sustrato palmitoil-CoA y carnitina en CPT1, fueron preparados básicamente como se describe en Morillas y Cordente (Morillas, 2004; Cordente, 2006). El modelo estructural de la interacción molecular entre el sustrato palmitoil-CoA y el modelo 3-D de CPT1 fue modelado basándonos en la información obtenida de los procedimientos de Docking, utilizando programas incluidos en el paquete de AutoDock 3.0 (Goodsell, 1996, Morris, 1998). Se realizó también, una búsqueda global de los sitios de unión del acil-CoA usando AutoGrid y AutoDock (100 ciclos). El programa de Docking macromolecular Hex (Ritchie, 2000) fue utilizado para refinar manualmente la posición de la extensión del grupo acil de la molécula del palmitoil-CoA y se probó intensivamente su espacio estructural, utilizando todas las posibles rotaciones de la cadena lateral del acil. Se seleccionaron a continuación, las estructuras de los ligandos (palmitoil-CoA y carnitina) cerca de la posición original para la molécula del CoA reportada en el cristal de COT (Jogl, 2005).

Con el fin de obtener un modelo estructural de la interacción entre CPT1 y su inhibidor fisiológico principal malonil-CoA, los procedimientos moleculares de Docking entre ambas estructuras se realizan implementando los mismos programas de AutoDock 3.0 utilizados para el Docking de los sustratos. Se obtuvieron las coordenadas de la molécula de malonil-CoA a partir de la entrada PDB 1hnj (estructura 3-D de la β -cetoacil-proteína transportadora de acilos sintasa III).

La estructura 3-D de los inhibidores C75-CoA, etomoxir-CoA y Ro 25-0187 se modelaron utilizando métodos de cálculo molecular-orbital implementados en el programa Mopac (Stewart, 1990). Los programas de acoplamiento molecular “in silico” AutoGrid y AutoDock se utilizan para generar y evaluar modelos de baja energía conformacional para las posibles posiciones de cada inhibidor, obteniendo así los modelos individuales de la interacción del C75-CoA, etomoxir-CoA y Ro 25-0187 con el centro activo de CPT1A.

Para todos los modelos de Docking generados, la minimización de energía de los mecanismos molecular sobre el campo de fuerza implementado en Hex, fue finalmente mejorada. De la totalidad de los modelos, se selecciona el mejor complejo en términos de “steric” más alto y correlación electrostática entre el par de estructuras de proteína.

Los modelos estructurales en forma de cinta fueron dibujados usando RASMOL (Sayle, 1995) y el Swiss-Pdb Viewer.

Todos los modelos 3-D y de de Dockinh molecular fueron realizados por otro miembro de nuestro grupo, el Dr. Paulino Gómez-Puertas del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Campus UAM. Cantoblanco, 28049 Madrid, España.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos son expresados como medias \pm desviación estándar para al menos tres ensayos independientes con diferentes preparaciones proteicas y para al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. Los diferentes grupos experimentales son analizados con el análisis estadístico “t” de *Student*. Un nivel de probabilidad de $p < 0,05$ se considera como estadísticamente significativo.