

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
Facultad de Farmacia
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**REDESIGN OF CARNITINE ACETYLTRANSFERASE
SPECIFICITY BY PROTEIN ENGINEERING**

ANTONIO FELIPE GARCIA CORDENTE

2006

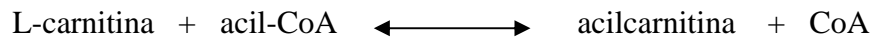
RESUM DE LA TESI

INTRODUCCIÓ

1. LA FAMÍLIA CARNITINA ACILTRANSFERASA

La cèl·lula compta amb el sistema de les carnitina aciltransferases per regular les limitades reserves d'acils-CoA que proporcionen substrats activats per a moltes rutes metabòliques importants com el cicle de Krebs, la síntesi de lípids i colesterol, la modificació post-traducciona de proteïnes i per a mecanismes de detoxificació. El transport d'aquests acils-CoA té lloc durant l'entrada d'àcids grassos per a l'obtenció d'energia en els mitocondris de mamífers (Bremer, 1983) i en els peroxisomes de llevats (van Roermund, 1999). Per tant, el sistema carnitina aciltransferasa connecta les diferents reserves d'acils-CoA i esmorteix les fluctuacions en el seu estat acilat que podrien ser perjudicials per a l'homeòstasi cel·lular.

Les carnitina aciltransferases són enzims que faciliten el transport d'acils-CoA a través de diversos orgànuls, mitjançant la seva conversió a acilcarnitines en presència de L-carnitina, catalitzant la següent reacció reversible de transesterificació.



Els membres de la família difereixen en la seva especificitat cap al grup acil, localització subcel·lular, i funció fisiològica. Les carnitina palmitoiltransferases (CPTs) es troben a la membrana mitocondrial externa (CPT I) i associada a la membrana mitocondrial interna (CPT II); aquests enzims tenen preferència per acils-CoA de cadena llarga (14 i 16 àtoms de carboni), i són necessaris per la β -oxidació d'àcids grassos de cadena llarga en el mitocondri. A més, l'activitat CPT I està inhibida per malonil-CoA, un mecanisme regulador crucial per a l'oxidació d'àcids grassos (McGarry, 1997). La carnitina octanoiltransferasa (COT) actua sobre acils-CoA de cadena mitja (6, 8 i 10 àtoms de carboni), es troba en els peroxisomes, i facilita el transport d'àcids grassos de cadena mitja escurçats en la β -oxidació peroxisomal cap al mitocondri (Ferdinandusse, 1999). Finalment, la carnitina acetiltransferasa (CrAT) actua sobre acils-CoA de cadena curta (2 i 4 àtoms de carboni), i es localitza als

peroxisomes i als mitocondris. CrAT està involucrada en el transport d'acetil-CoA a través de les membranes intracel·lulars, en el manteniment del balanç acetil-CoA/CoA en els compartiments cel·lulars, i en l'excreció de molècules d'acil en excés en forma de acilcarnitines (Colucci, 1988). CrAT juga un paper important en la salut humana. S'han detectat casos aïllats de deficiència d'activitat carnitina acetiltransferasa en pacients amb desordres en el sistema nerviós (Kalaria, 1992), i en malalties vasculars (Brevetti, 1991).

2. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA CARNITINA ACETILTRANSFERASA

Recentment s'han cristal·litzat les CrAT d'humà i ratolí (Wu, 2003; Jogl, 2003), així com la COT de ratolí (Jogl, 2005). Aquest fet és molt important ja que, fins ara, no s'havia cristal·litzat cap proteïna de la família i no es coneixia la seva estructura; només el nostre grup havia realitzat una aproximació a l'estructura tridimensional mitjançant un model bioinformàtic del domini catalític de COT i CPT I (Morillas, 2001). El cristall de CrAT revela una proteïna monomèrica composta per dos dominis, interconnectats entre sí i que defineixen un túnel, que constitueix el centre actiu de la proteïna. La histidina catalítica (His³⁴³ en CrAT) es troba al mig del centre actiu. Els substrats carnitina i CoA s'uneixen en llocs oposats del residu catalític d'histidina. En l'estructura de la CrAT, el lloc d'unió de l'àcid gras es trobaria en una butxaca hidrofòbica. La cadena lateral de la Met⁵⁶⁴ està posicionada en el centre d'aquesta butxaca, i aquest aminoàcid podria constituir la base molecular que determina la preferència de l'enzim per acils-CoA de cadena curta. El residu equivalent en COT i CPTs és una glicina, el que crearia un espai addicional per a la unió d'àcids grassos de cadena més llarga.

L'estructura general de la COT és molt similar a la de la CrAT, això concorda amb el fet que ambdós enzims comparteixen un 36% d'identitat en la seva seqüència d'aminoàcids. No obstant això, s'observen diferències significatives en la zona d'unió a l'àcid gras, cosa que defineix la diferent especificitat pel substrat acil-CoA en ambdós enzims. La informació obtinguda de les estructures cristal·lines de CrAT i COT ha permès aprofundir en la relació estructura-funció en la família de les carnitina aciltransferases.

3. C75-CoA, UN INHIBIDOR DE LA CARNITINA PALMITOÏLTRANSFERASA

El C75 és un fàrmac potencial per al tractament de l'obesitat. Es va identificar per primera vegada com un inhibidor de l'àcid gras sintasa (FAS), i més recentment s'ha descrit com un anàleg de la molècula de malonil-CoA que antagonitza l'efecte inhibitori produït pel malonil-CoA sobre la CPT I (Thupari, 2002). En un estudi dut a terme pel nostre grup d'investigació (Bentebibel, 2006) s'ha demostrat que el derivat CoA d'aquest fàrmac, C75-CoA, és un potent inhibidor de la CPT I. El C75-CoA ocuparia la mateixa butxaca en CPT I que la molècula de palmitoïl-CoA, cosa que suggeriria un mecanisme d'inhibició basat en una exclusió mútua. En aquest estudi ens vam proposar analitzar l'efecte d'aquest inhibidor en l'activitat CrAT.

4. LA CARNITINA ACETILTRANSFERASA I EL SEU EFECTE EN LA SÍNTESI D'ÉSTERS EN LLEVATS EN EL TRANCURS DE LA FERMENTACIÓ ALCOHÒLICA

La indústria alimentària està interessada en la producció d'ésters per al seu ús com aromatitzants. L'habilitat de crear grans quantitats d'un éster, o d'alterar genèticament un organisme per a la producció d'un aroma modificat o més intens, tindria múltiples aplicacions industrials. Els ésters volàtils són responsables del caràcter frutal de begudes fermentades com la cervesa i el vi. Els ésters són produïts durant la fermentació alcohòlica pels llevats en una reacció enzimàtica catalitzada per les alcohol acetiltransferases. La velocitat de la producció dels ésters està influïda, entre altres factors, per les concentracions dels dos substrats de la reacció: un alcohol i una molècula d'acetil-CoA (Verstrepen, 2003a). Donat que la carnitina acetiltransferasa modula els nivells d'acetil-CoA/CoA intracel·lulars, ens vam proposar estudiar l'efecte que produiria la sobreexpressió d'aquest enzim en la formació d'ésters durant la fermentació alcohòlica en llevats.

OBJECTIUS

Els objectius de la present tesi són:

- 1 . Identificació dels aminoàcids responsables de la diferent especificitat de les carnitina aciltransferases pel seu substrat acil-CoA.
- 2 . Identificació dels aminoàcids involucrats en la discriminació colina-carnitina en la família carnitina aciltransferasa.
- 3 . Estudi de l'efecte de la sobreexpressió de l'enzim carnitina acetiltransferasa en la producció d'ésters durant la fermentació alcohòlica en llevats, i les seves possibles aplicacions biotecnològiques.

RESULTATS

1. AÏLLAMENT I CLONATGE DE LA CARNITINA ACETILTRANSFERASA DE RATA

Per primera vegada es va aïllar el cDNA corresponent a la CrAT de rata, mitjançant RT-PCR a partir de mRNAs de testicle de rata. El cDNA de la CrAT de rata presenta un grau d'identitat del 90% amb la CrAT humana i del 96% amb la de ratolí, i codifica per a una proteïna de 626 aminoàcids.

El cDNA de la CrAT de rata es va clonar en un plasmidi d'expressió en llevats (pYES) per tal de caracteritzar cinèticament la proteïna CrAT, i en un plasmidi d'expressió en bacteris (pGEX-6P-1) per a la seva purificació i posterior obtenció d'anticossos. El cDNA de la CrAT de rata havia estat prèviament aïllat i clonat en el plasmidi pYES en el nostre grup d'investigació (Morillas, 2000).

2. OBTENCIÓ DELS ANTICOSSOS ANTI-CrAT DE RATA

Per a l'obtenció d'anticossos es va purificar a homogeneïtat la proteïna CrAT de rata en *Escherichia coli*. Es va administrar a dos conills, per via subcutània, una dosi inicial de 200 µg de la proteïna i 3 records (cada 15 dies) de 150 µg. Finalment, els conills es van dessagnar obtenint-se el sèrum amb els anticossos anti-CrAT de rata. Els anticossos es van provar per Western-blot, i es va comprovar que reconeixen específicament la CrAT de rata. Els anticossos reconeixen una única banda amb un pes molecular aparent de 71 kDa, que correspon al pes esperat per a la CrAT de rata. A més, es va determinar la dilució òptima de treball dels anticossos, que va resultar ser de 1:10,000.

3. EXPRESSIÓ DE LA CrAT I COT DE RATA EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Per a l'expressió de la CrAT i COT es va utilitzar el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, organisme eucariota que no conté ni CPT ni COT, però que sí compta amb activitat CrAT endògena. Per eliminar les interferències endògenes, es va treballar amb una soca deficient en activitat CrAT (FY23 Δ cat2 (Mata *trp1 ura3 Δ cat2::LEU2*)) (Swiegers, 2001).

La CrAT de rata expressada en llevats és molt activa amb acils-CoA de cadena curta (acetil- i butiril-CoA), i la seva activitat decreix ràpidament a partir de hexanoil-CoA. L'activitat de l'enzim és pràcticament nul·la per a lauroil-CoA, i acils-CoA de cadena més llarga. El seu perfil d'activitats és molt similar al de l'enzim purificat de fetge de rata (Miyazawa, 1983a). En canvi, la COT de rata expressada en llevats mostra una preferència per acils-CoA de cadena mitja, especialment pels substrats hexanoil- i decanoil-CoA. Com en el cas de la CrAT, el perfil d'activitats de la COT expressada en llevats és molt semblant al de la proteïna purificada en fetge de rata (Miyazawa, 1983b).

3.1 Anàlisi cinètic de la CrAT de rata expressada en llevats

A continuació es van determinar els paràmetres cinètics K_m i V_{max} de la CrAT *wild-type* (wt) pels substrats acil-CoA i carnitina. Les dades obtingudes s'ajustaren a una equació de Michaelis-Menten i presentaven cinètiques de saturació hiperbòliques. Els valors de K_m pels substrats acil-CoA assajats (des d'acetil-CoA fins a octanoil-CoA) varien molt poc amb la longitud de la cadena acílica, o sigui que l'afinitat de la CrAT cap als acils-CoA no depèn de la longitud d'aquests. No obstant això, els valors de V_{max} sí que depenen de la longitud de l'acil-CoA, i són màxims per a C₃-CoA i C₄-CoA (780 i 685 nmol•min⁻¹•mg proteïna⁻¹, respectivament); això queda reflectit en una major eficiència catalítica (K_{cat}) de l'enzim per a aquests substrats. Els valors de K_m per la carnitina sí que semblen dependre de l'acil-CoA assajat. La K_m de la carnitina augmenta a l'incrementar-se la longitud de l'acil-CoA, indicant una pèrdua d'afinitat de l'enzim per aquest substrat a mesura que augmenta la longitud de l'acil-CoA. D'altra banda, V_{max} i K_{cat} són màximes per C₃-CoA, i ambdós paràmetres cinètics disminueixen a l'incrementar-se la longitud del substrat acil-CoA.

3.2 Anàlisi cinètic de la COT de rata expressada en llevats

Es van determinar els paràmetres cinètics K_m i V_{max} de la COT *wt* pels substrats acil-CoA i carnitina. Les dades es van ajustar a una equació de Michaelis-Menten presentant cinètiques de saturació hiperbòliques. Com en el cas de la CrAT, els valors de K_m per als substrats acil-CoA assajats (de acetil-CoA a decanoil-CoA) no depenen de la longitud de la cadena acílica. En canvi, els valors de V_{max} sí que depenen de la longitud de l'acil-CoA, essent màximes per a C₆-CoA i C₁₀-CoA, la qual cosa es reflecteix en una major eficiència catalítica (K_{cat}) de la COT per a aquests substrats.

4. MUTAGÈNESI DE QUATRE AMINOÀCIDS EN CrAT OBTINGUTS PER ALINEAMENT DE SEQÜÈNCIES

Per tal d'identificar els aminoàcids responsables de la diferent especificitat de les carnitina aciltransferases per l'acil-CoA, es va realitzar una primera aproximació mitjançant un estudi computacional de comparació de seqüències proteïques de 37 carnitina (CPT, CrAT i COT) i colina (ChAT) aciltransferases de diferents organismes. Els residus conservats entre les aciltransferases de cadena curta (ChAT i CrAT), i de cadena mitja (COT) i llarga (CPT), es van analitzar amb l'algoritme SequenceSpace, utilitzant l'alineament múltiple de la família carnitina-colina aciltransferasa com a punt de partida. Mitjançant aquesta anàlisi es van identificar quatre residus comuns en les CrATs de tots els organismes, que eren diferents en les COTs i CPTs, i que podrien estar relacionats amb el lloc d'unió del substrat acil-CoA. Així Ser¹¹⁹, Phe¹³⁸, Gly²⁴⁹ i Ala⁵¹⁵ en coordenades CrAT de rata, estan substituïdes per Asn¹⁰², Arg¹²⁴, Ala²³⁸ i Gly⁵⁰² respectivament, en la COT de rata. Amb l'objectiu de redissenyar l'especificitat de substrat de CrAT d'acils-CoA de cadena curta a acils-CoA de cadena mitja, es va procedir a la mutagènesi dirigida d'aquests quatre residus en el cDNA de la CrAT de rata substituint-los pels presents en COT. Es van expressar en *S. cerevisiae* tant els quatre mutants simples com el mutant quàdruple, i es va analitzar la seva activitat amb el substrat de cadena mitja decanoil-CoA. Cap de les substitucions va mostrar un augment en la seva activitat cap a acils-CoA de cadena mitja en relació a l'enzim *wt*.

5. MUTAGÈNESI D'AMINOÀCIDS EN CrAT OBTINGUTS A PARTIR DE LES ESTRUCTURES CRISTAL·LINES

5.1 Mutagènesi dels aminoàcids involucrats en l'activitat catalítica

Estudis cinètics, bioquímics i de mutagènesi dirigida (Brown, 1994; Morillas, 2000; Morillas 2001) havien identificat un residu d'histidina, equivalent a la His³⁴³ en CrAT de rata, com un dels residus catalítics en les carnitina aciltransferases. Els estudis cristal·logràfics de la CrAT humana i de ratolí (Wu, 2003; Jogl, 2003) confirmen la rellevància funcional d'aquest residu. Per això, vam decidir mutar la His³⁴³ a Ala en la CrAT de rata. El mutant resultant, CrAT H343A, es va expressar en llevats, i la seva activitat amb el substrat acetil-CoA va ser nul·la. A més, per anàlisi de Western-blot es va comprovar que l'expressió del mutant H343A és equivalent a la de la proteïna *wt*. En l'estructura de la CrAT humana, un glutàmic (Glu³⁴⁷) interacciona amb la His³⁴³, i podria estar involucrat en la catàlisi enzimàtica juntament amb la His³⁴³. En gairebé tots els membres de la família un aspàrtic es troba en la mateixa posició, el qual pot ser funcionalment substituït per un glutàmic. Vam decidir mutar el Glu³⁴⁷ a Ala (E347A) en la CrAT de rata, i expressar aquest mutant en llevats. Igual que en el cas de la H343A, l'activitat del mutant E347A va ser nul·la. L'expressió del mutant E347A va ser equivalent a la de la proteïna *wt*.

5.2 El mutant M564G converteix CrAT en COT

Basant-nos en l'estructura cristal·lina de la CrAT de ratolí es va identificar un aminoàcid, Met⁵⁶⁴ en coordenades CrAT de rata, que podria determinar la preferència de l'enzim pels acils-CoA de cadena curta. Aquest residu de metionina es troba conservat en les diferents CrATs, i està substituït per una glicina tant en COT com en CPTs. Per determinar el paper que jugaria aquesta Met⁵⁶⁴ en l'especificitat envers el substrat acil-CoA, vam decidir mutar-la a glicina en la CrAT de rata. El mutant resultant, CrAT M564G, es va expressar en llevats, i es van determinar els seus paràmetres cinètics. En primer lloc, es van assajar les activitats del mutant M564G amb diferents acils-CoA (des de C₂- fins a C₁₆-CoA). Els resultats mostren que el mutant M564G encara manté certa activitat pels acils-CoA de cadena curta, però ha guanyat de manera espectacular activitat pels acils-CoA de cadena més llarga (principalment C₆- i

C₁₄-CoA). La seva activitat amb C₁₄-CoA augmenta 1250 vegades en relació a l'enzim *wt*, i el seu perfil d'activitats és molt semblant al de la COT *wt*. Aquests resultats indiquen que la cadena lateral voluminosa de la Met⁵⁶⁴ impedeix el posicionament dels acils-CoA de cadena mitja i llarga en la butxaca hidrofòbica de l'enzim, però quan aquesta cadena lateral s'escurça (com en el mutant), els acils-CoA de cadena més llarga entren en el lloc catalític i es dona la catàlisi.

Posteriorment, es van determinar els paràmetres cinètics del mutant M564G, tant per cadascun dels substrats acil-CoA com per la carnitina. Els paràmetres cinètics indiquen que el mutant CrAT M564G prefereix els acils-CoA de cadena mitja com substrats. A diferència de la CrAT *wt*, els valors d'eficiència catalítica, tant per l'acil-CoA com per la carnitina, augmenten amb la longitud de l'acil-CoA i són màxims per als substrats hexanoïl- i octanoïl-CoA.

5.3 Redisseny de l'especificitat de COT pels acils-CoA de cadena curta

En els experiments descrits en la secció 5.2, havíem convertit la CrAT de rata en una pseudo-COT mutant un únic aminoàcid (CrAT M564G). A continuació ens vam proposar el contrari: transformar la COT de rata en una pseudo-CrAT, mutant també un únic aminoàcid. Vam decidir mutar la Gly⁵⁵³ en COT (ortòloga de la Met⁵⁶⁴ en CrAT) a metionina. El mutant resultant (COT G553M) es va expressar en llevats, i es va determinar la seva activitat amb diferents acils-CoA, des d'acetil-CoA fins a palmitoil-CoA. La mutació de la Gly⁵⁵³ a Met en COT va disminuir la seva activitat cap als seus substrats naturals, els acils-CoA de cadena mitja, i va incrementar la seva activitat cap a acils-CoA de cadena curta. El perfil d'activitats del mutant COT G553M s'assembla al de la CrAT *wt*.

6. MODELS PER A LA LOCALITZACIÓ DE LA MOLÈCULA D'ACIL-CoA EN CrAT I COT BASATS EN EL CRISTALL DE LA CrAT

Es va proposar un model per a la localització de l'acil-CoA en el lloc actiu de les proteïnes CrAT i COT. Els models tridimensionals es van generar a partir de les estructures cristal·lines de les CrAT de ratolí i humana. En el model per la CrAT *wt* i la

seva interacció amb acetil-CoA, el grup acetil està situat en una cavitat poc profunda. Sorprenentment, la forma de la cavitat és molt diferent en l'estructura del mutant CrAT M564G. La petita grandària de la cadena lateral de la glicina revela una butxaca hidrofòbica profunda, que ara és accessible a acils-CoA de cadena més llarga. Aquesta cavitat estaria preformada en CrAT i la Met⁵⁶⁴ actuaria com una tapa, impeding l'accés dels acils-CoA de cadena mitja i llarga a aquesta butxaca hidrofòbica. Quan s'elimina la cadena lateral de la Met⁵⁶⁴, la butxaca es fa accessible, i s'extén la sensibilitat de l'enzim cap a acils-CoA de cadena més llarga.

El model de la COT *wt* i la seva interacció amb decanoïl-CoA és molt similar al del mutant CrAT M564G i el miristoïl-CoA. En canvi, el model del mutant COT G553M és molt similar al de la CrAT *wt*: la cadena lateral de la Met⁵⁵³ ara tanca l'entrada a la butxaca i defineix una cavitat estreta, estructuralment equivalent a la de la CrAT *wt*. Aquest model correlaciona amb l'activitat del mutant G553M cap a acils-CoA de cadena curta.

Després d'un examen minuciós de la localització de la molècula de miristoïl-CoA en el model tridimensional del mutant M564G, vam identificar un aminoàcid carregat, Asp³⁵⁶, que podria interferir amb el correcte posicionament d'acils-CoA més llargs que el miristoïl-CoA. La presència d'un aminoàcid polar en aquesta posició explicaria per què el mutant M564G era tan actiu amb miristoïl-CoA però la seva activitat disminuïa dràsticament amb palmitoïl-CoA. Vam decidir mutar l'Asp³⁵⁶ a Ala, ja que es tracta d'un residu petit i sense càrrega. El doble mutant CrAT D356A/M564G es va expressar en llevats, i es va determinar la seva activitat enzimàtica amb diferents acils-CoA, des de C₂-A fins a C₂₀-CoA. Igual que el mutant simple M564G, el doble mutant D356A/M564G és molt actiu amb acils-CoA de cadena mitja, però mostra un augment de 6 vegades en la seva activitat cap al palmitoïl-CoA i una nova activitat amb estearoïl-CoA, quan es compara amb el mutant M564G. Les constants cinètiques K_m i K_{cat} del mutant D356A/M564G confirmen la seva preferència catalítica cap a acils-CoA de cadena llarga. Es va construir un model per al posicionament dels acils-CoA de cadena llarga en el centre actiu del doble mutant D356A/M564G. La substitució de l'Asp³⁵⁶ per Ala revela una cavitat més profunda que la del mutant simple M564G, en la qual té cabuda una molècula d'estearoïl-CoA, el que concorda amb l'activitat enzimàtica del doble mutant.

7. EFECTE DEL C75-CoA EN L'ACTIVITAT CrAT

En un estudi previ en el nostre grup d'investigació (Bentebibel, 2006) es va demostrar que el C75-CoA és un inhibidor competitiu de l'activitat CPT I. A més, mitjançant models bioinformàtics es va comprovar que aquest inhibidor ocupa la mateixa butxaca en CPT I que el substrat palmitoil-CoA. A partir d'aquests resultats experimentals, es va postular que si aquest inhibidor ocupa el lloc d'unió a l'àcid gras en CPT I, també podria entrar en la butxaca hidrofòbica dels mutants M564G i D356A/M564G, però no en la cavitat poc profunda de la CrAT *wt*. Així, el C75-CoA competiria amb el substrat acil-CoA per la unió a la butxaca de l'àcid gras en els mutants M564G i D356A/M564G i actuaria com un inhibidor competitiu.

Per confirmar aquesta hipòtesi es van realitzar experiments d'inhibició amb la CrAT *wt* i els mutants amb concentracions creixents de C75-CoA. A una concentració de 60 μ M de l'inhibidor, l'activitat remanent va ser del 83% per a l'enzim *wt*, del 45% per al mutant M564G i només del 21% per al mutant D356A/M564G. Els valors de IC_{50} per al C75-CoA van ser de 44.4 i 12.8 μ M per als mutants M564G i D356A/M564G, respectivament. No es va poder calcular la IC_{50} per a la proteïna *wt* a causa de la seva insensibilitat cap al C75-CoA. Aquests resultats indiquen que el C75-CoA és un potent inhibidor dels mutants M564G i D356A/M564G però no així de la proteïna *wt*. També es va comprovar l'efecte que tindria el malonil-CoA, inhibidor fisiològic de CPT I i COT, en l'activitat dels mutants de CrAT M564G i D356A/M564G. A una concentració de 100 μ M de malonil-CoA, suficient per a inhibir gairebé completament a la CPT I, l'activitat remanent va ser del 84% per a l'enzim CrAT *wt*, 83% per al mutant M564G, i 72% per al mutant D365A/M564G. Aquests resultats indiquen que el malonil-CoA no produeix cap efecte en l'activitat dels mutants assajats.

8. NOU MODEL PER AL POSICIONAMENT DELS ÀCIDS GRASSOS BASAT EN EL CRISTALL DE LA COT

Després de la publicació del cristall de la COT de ratolí (Jogl, 2005), es va generar un nou model per a la COT de rata usant com a motllo l'estructura cristal·lina de la COT

de ratolí. Es va modelar per *docking* la molècula de octanoïlcarnitina en el centre actiu del model de la COT de rata, i això ens va permetre identificar dos residus que podrien interferir amb el correcte posicionament d'acils-CoA de cadena més llarga de 8 carbonis: Ile⁵⁵¹ i Asp³⁴³. Per determinar la rellevància funcional d'aquests aminoàcids, ambdós residus es van mutar individualment a Ala i es van expressar en llevat. Es va assajar la seva activitat amb diferents acils-CoA, des de C₆- fins a C₁₆-CoA, però cap dels mutants va mostrar una activitat augmentada per acils-CoA de cadena llarga. Aquests resultats indiquen que cap d'aquests dos aminoàcids està involucrat en l'especificitat cap el substrat acil-CoA en COT.

9. DISCRIMINACIÓ COLINA-CARNITINA EN CrAT

Amb l'objectiu de canviar l'especificitat de substrat de CrAT de carnitina a colina, es van realitzar experiments de mutagènesi dirigida en el cDNA de la CrAT de rata. En primer lloc, es van mutar tres aminoàcids en CrAT (Thr⁴⁶⁵ a Val, Thr⁴⁶⁷ a Asn, i Arg⁵¹⁸ a Asn) per tal d'eliminar la major part de les interaccions entre l'enzim i el grup carboxilat de la carnitina. Els resultats cinètics amb el triple mutant van mostrar que la seva eficiència catalítica per la colina s'incrementa 5 vegades pel que fa a l'enzim wt, i a més es va produir una disminució de la seva eficiència catalítica per la carnitina de quatre ordres de magnitud. A més, es va preparar un quàdruple mutant que incorpora la substitució addicional de l'Ala¹⁰⁶ per Met. Amb aquesta mutació s'intenta reduir el volum del lloc d'unió a la carnitina, i d'aquesta manera afavorir el correcte posicionament de la molècula de colina de menor grandària. El quàdruple mutant va mostrar un augment de 9 vegades en la seva eficiència catalítica cap a colina respecte a l'enzim wt, i una preferència cap a colina en comptes del seu substrat natural carnitina per un factor de 128 vegades. Al contrari dels resultats amb colina, la mutació d'aquests quatre aminoàcids va disminuir l'eficiència catalítica de l'enzim per la carnitina en més de cinc ordres de magnitud.

10. APLICACIONS BIOTECNOLÒGIQUES DE LA CARNITINA ACETILTRANSFERASA

Amb l'objectiu de modificar els nivells dels ésters produïts durant la fermentació alcohòlica en llevats, vam decidir sobreexpressar la carnitina acetiltransferasa. Dels tres

gens que codifiquen per una activitat carnitina acetiltransferasa en *S. cerevisiae*, vam sobreexpressar el gen *CAT2* ja que és el més estudiat dels tres, i la proteïna codificada per aquest gen (Cat2p) contribueix majoritàriament a l'activitat CrAT total en llevats. Es va clonar *CAT2* en un plasmidi d'expressió en llevats, i es va confirmar la seva sobreexpressió mitjançant un assaig d'activitat en extractes proteics obtinguts de llevats transformats. A continuació, es va analitzar la producció d'ésters volàtils durant la fermentació alcohòlica en una soca de llevats que sobreexpressava *CAT2*, i es va comparar amb una soca transformada amb el vector buit. Els resultats indiquen que la sobreexpressió del gen *CAT2* redueix significativament els nivells d'alguns ésters volàtils com l'acetat d'etil o l'acetat d'isoamil. Al mateix temps, la sobreexpressió del gen *CAT2* causa un increment en els nivells de 2-metil propanol.

DISCUSSIÓ

1. ELS AMINOÀCIDS IDENTIFICATS PER MÈTODES BIOINFORMÀTICS NO PARTICIPEN EN L'ESPECIFICITAT PEL SUBSTRAT ACIL-CoA EN CrAT

Mitjançant una anàlisi de comparació de seqüències proteïques dels diferents membres de la família colina-carnitina aciltransferasa, vam identificar quatre aminoàcids en CrAT que podrien jugar un paper important en l'especificitat pel substrat acil-CoA en l'enzim. La mutació d'aquests aminoàcids als seus equivalents en COT i CPT, i el seu anàlisi cinètic ens indica que cap d'aquests aminoàcids és important en la selectivitat pel substrat acil-CoA en CrAT. Posteriorment a l'anàlisi d'aquests mutants, es van publicar els cristalls de la CrAT humana i de ratolí (Wu, 2003; Jogl, 2003). En localitzar aquests aminoàcids en el cristall s'observà que només la Ser¹¹⁹ està localitzada relativament a prop de la histidina catalítica (a 9.5 Å); els altres aminoàcids es troben a més de 15 Å del centre actiu de l'enzim. Això explicaria per què cap d'aquests aminoàcids està involucrat en l'especificitat pel substrat acil-CoA en CrAT.

2. CrAT His³⁴³ I Glu³⁴⁷ JUGUEN UN PAPER IMPORTANT EN LA CATÀLISI

Els resultats experimentals confirmen el paper de la His³⁴³ com l'histidina catalítica en CrAT, ja que la seva mutació a Ala (H343A) produeix una pèrdua total d'activitat de l'enzim. Els nostres resultats experimentals també confirmen el paper important del Glu³⁴⁷ en la catàlisi, ja que la seva mutació a Ala en CrAT (E347A) elimina completament l'activitat de l'enzim. Per tant, el Glu³⁴⁷, juntament amb la His³⁴³, estarien involucrats en la catàlisi. En el mecanisme de catàlisi enzimàtica, la His catalítica actuaria com una base general extraient un protó del grup 3-hidroxil de la carnitina, i el residu Glu³⁴⁷ potenciaria l'activitat catalítica de la His³⁴³ i al mateix temps estabilitzaria la càrrega positiva que es desenvolupa en l'anell de la His. La desprotonació de la carnitina facilitaria l'atac nucleofílic al grup carbonil de l'enllaç tioéster de la molècula d'acetil-CoA, resultant en la formació d'un intermediari tetraèdric. En el lloc actiu, la Ser⁵⁵⁴ ajuda a estabilitzar la càrrega negativa de l'intermediari. Per tant, aquests resultats confirmen la hipòtesi que CrAT, igual que les

altres carnitina aciltransferases, utilitzen una diada catalítica His-Glu/Asp per la catàlisi, mentre que l'estat de transició està estabilitzat per un residu de Ser.

3. CrAT Met⁵⁶⁴ I COT Gly⁵⁵³ DETERMINEN L'ESPECIFICITAT PEL SUBSTRAT ACIL-CoA

L'aminoàcid responsable de controlar l'accés dels acils-CoA al lloc catalític de la CrAT es va identificar mitjançant un examen minuciós del cristall de la CrAT (Jogl, 2003). L'estructura tridimensional de la CrAT de ratolí suggereix la Met⁵⁶⁴ com a candidat, ja que la seva cadena lateral voluminosa es projecta cap a la cavitat on l'àcid gras entraria, i només permetria l'accés d'acils-CoA de cadena curta tals com l'acetil- i el butiril-CoA. Per alineament de seqüències vam identificar que el residu ortòleg a la Met⁵⁶⁴ és una glicina en COT i CPT. Això va suggerir que la glicina, per ser petita, es probablement el residu que permet l'accés lliure als acils-CoA de cadena mitja i llarga, mentre que la cadena lateral gran de la Met⁵⁶⁴ impedeix l'accés d'aquests substrats. Els resultats experimentals obtinguts amb el mutant CrAT M564G van confirmar aquesta hipòtesi, ja que es comporta com si els seus substrats naturals fossin acils-CoA de cadena mitja. Aquesta hipòtesi es va confirmar amb l'experiment invers: vàrem mutar COT Gly⁵⁵³ a Met, i el nou mutant es va comportar com la CrAT *wt*. L'activitat catalítica del mutant COT G553M amb diferents acils-CoA és molt semblant a la de la CrAT *wt*. El mateix es va observar amb el mutant CrAT M564G i la COT *wt*: el perfil d'activitats pels acils-CoA de diferents longituds de cadena és molt similar. En ambdós casos els enzims que contenen glicina (CrAT M564G i COT *wt*) presenten una alta activitat envers acils-CoA de cadena mitja i llarga, mentre que la seva activitat cap als acils-CoA de cadena curta és baixa.

Els models tridimensionals de la CrAT i COT *wt* i dels mutants confirmen les nostres hipòtesis. Els models dels enzims que contenen Met (CrAT *wt* i COT G553M) són estructuralment equivalents i revelen una cavitat poc profunda que és només accessible a acils-CoA de cadena curta. En canvi, el model del mutant CrAT M564G i la seva interacció amb miristoil-CoA és molt similar al de COT i el decanoil-CoA. En ambdós models, la petita grandària de la cadena lateral de la Gly (Gly564 en CrAT, i Gly553 en COT) revela una cavitat hidrofòbica profunda que és accessible a acils-CoA de cadena més llarga, i correlaciona bé amb la preferència d'ambdós enzims cap als

acils-CoA de cadena mitja. La butxaca hidrofòbica descrita en aquest estudi és molt similar a la proposada per a la CPT I (Morillas, 2004). Recentment, s'ha cristal·litzat el mutant CrAT M564G (Hsiao, 2004), i l'estructura d'aquest mutant confirma el nostre model bioinformàtic, ja que revela una butxaca hidrofòbica profunda en la que es poden acomodar acils-CoA de cadena mitja.

4. PAPER DE L'Asp³⁵⁶ EN L'ESPECIFICITAT CAP AL SUBSTRAT ACIL-CoA EN CrAT

El model tridimensional per a la localització del miristoïl-CoA en el mutant CrAT M564G va mostrar la presència d'un aminoàcid carregat, Asp³⁵⁶, en la part inferior de la butxaca hidrofòbica, que podria impedir el correcte posicionament d'acils-CoA més llargs que el miristoïl-CoA. La substitució de l'Asp³⁵⁶ per Ala, juntament amb la mutació de la Met⁵⁶⁴ a Gly, permet a CrAT catalitzar acils-CoA de cadena llarga com el palmitoïl- i l'estearoïl-CoA. El mutant CrAT D356A M564G es comporta com una CPT en termes d'especificitat cap a l'acil-CoA. El model per la localització d'acils-CoA de cadena llarga en el doble mutant confirma els nostres resultats experimentals, ja que revela una cavitat encara més profunda que la del mutant simple M564G, que permet el correcte posicionament del palmitoïl- i l'estearoïl-CoA. Aquesta cavitat està gairebé completament ocupada amb l'entrada de la molècula d'estearoïl-CoA. Tot i permetent una rotació lliure dels enllaços de la cadena acílica, va ser impossible obtenir un model compatible amb un enzim actiu per a substrats més llargs, el que correlaciona amb la nul·la activitat del doble mutant amb araquidoïl-CoA (C₂₀-CoA).

5. MODEL GENERAL DE DISCRIMINACIÓ DE LA LONGITUD DE LA CADENA DE L'ACIL-CoA EN LES CARNITINA ACILTRANSFERASES

Tenint en compte els resultats obtinguts en aquest estudi, proposem un model per explicar la discriminació de la longitud de la cadena dels acils-CoA en CrAT. Aquest model està basat en la presència de dos aminoàcids, Met⁵⁶⁴ i Asp³⁵⁶, que actuen com punts de control a diferents nivells de l'entrada dels acils-CoA en el lloc d'unió a l'àcid gras. La cadena lateral voluminosa de la Met⁵⁶⁴ impedeix l'entrada d'acils-CoA de cadena mitja i llarga a la butxaca d'unió de l'àcid gras de l'enzim, i explica la selectivitat

de CrAT cap als acils-CoA de cadena curta. La substitució d'aquesta Met per la més petita Gly (M564G) revela una butxaca profunda on es poden acomodar àcids grassos de fins a 14 carbonis. Acils-CoA de cadena més llarga no caben en la butxaca en presència de la cadena lateral carregada de l'Asp³⁵⁶, i per tant no poden ser catalitzats per l'enzim. La substitució d'aquest Asp³⁵⁶ per Ala, juntament amb la mutació M564G, obre completament la butxaca i permet l'entrada d'acils-CoA de cadena més llarga, com el palmitoil-CoA o l'estearoil-CoA.

La substitució de la Met⁵⁶⁴ per Gly està basada en consideracions estructurals i també en un alineament de seqüències proteïques, i es pot considerar com una substitució que ha estat seleccionada durant l'evolució amb la finalitat de permetre a les proteïnes de la família carnitina aciltransferasa la catàlisi d'acils-CoA de cadena llarga. En canvi, la substitució de l'Asp³⁵⁶ a Ala està només basada en consideracions estructurals. Un alineament de les proteïnes de la família mostra una gran variabilitat en la zona propera a l'Asp³⁵⁶, i els residus ortòlegs són His/Tyr en COT, Asn en CPT II, i Glu en CPT I. La mutació d'Asp³⁵⁶ per Ala, juntament amb la mutació M564G, creen un enzim artificial que es comporta com una CPT en termes d'especificitat cap a l'acil-CoA, encara que està clar que aquesta no ha estat l'estratègia seguida per la naturalesa per a utilitzar substrats de cadena llarga en les CPTs. Els nostres estudis de mutagènesi dirigida en COT, indiquen que la selectivitat cap als acils-CoA de cadena llarga ha d'estar determinada per factors més complexos que variacions específiques d'aminoàcids entre els diferents membres de la família. Possiblement estiguin implicades interaccions entre diferents residus, i al mateix temps variacions en elements de l'estructura secundària. La diferència més notòria en els enzims CPT I és la presència d'una inserció de 13 aminoàcids entre dos fulls beta de l'enzim, la qual formaria una butxaca més flexible que permetria acomodar acils-CoA de cadena llarga.

6. DISCRIMINACIÓ COLINA-CARNITINA EN CrAT

Els nostres resultats indiquen que hi ha dos factors que contribueixen a la discriminació entre colina i carnitina en CrAT. En primer lloc, la interacció electrostàtica entre els aminoàcids Thr⁴⁶⁵ i Arg⁵¹⁸ amb el grup carboxilat de la carnitina; quan aquesta interacció s'elimina en el mutant triple de CrAT (T465V/T467N/R518N), la seva eficiència catalítica cap a la carnitina disminueix dràsticament i s'observa un

increment de 5 vegades de l'eficiència catalítica cap a la colina. El segon factor és el volum de les cadenes laterals al voltant de la carnitina en el lloc actiu de CrAT. La substitució addicional de l'Ala¹⁰⁶ per Met en el mutant quàdruple redueix el volum del lloc d'unió a la carnitina, i es bloqueja gairebé completament l'activitat carnitina acetiltransferasa i s'incrementa l'eficiència catalítica cap a la colina unes 9 vegades, gairebé duplicant l'efecte de l'eliminació de les interaccions electrostàtiques.

7. C75-CoA ÉS UN INHIBIDOR DELS MUTANTS DE CrAT M564G I D356A/M564G

Els nostres resultats experimentals mostren que C75-CoA és un inhibidor potent dels mutants de CrAT M564G i D356A/M564G, però en canvi no té cap efecte inhibitori sobre la CrAT *wt*. Aquests resultats indiquen que només en el cas que la butxaca hidrofòbica de CrAT es trobi oberta i accessible a acils-CoA de cadena llarga, com passa en ambdós mutants, la proteïna és sensible a la inhibició per C75-CoA. Això suggereix que l'inhibidor podria ocupar la mateixa butxaca en els mutants que el substrat acil-CoA, i el mecanisme d'inhibició estaria basat en una exclusió mútua, tal com s'ha vist en la CPT I. Els valors de IC₅₀ indiquen que el doble mutant de CrAT és més sensible a la inhibició per C75-CoA que el mutant simple. Això pot ésser degut al fet que el posicionament de la cadena hidrocarbonada de la molècula del C75-CoA estaria afavorit en la cavitat més profunda i més hidrofòbica del doble mutant. No obstant això, cap dels dos mutants de CrAT mostra una sensibilitat similar a la de la CPT I pel C75-CoA. Això indica que existeixen altres factors, a part de la presència d'una butxaca hidrofòbica per a la unió de la cadena hidrocarbonada del C75-CoA, que contribueixen a la potència de l'inhibidor cap a les seves dianes.

8. SOBREEXPRESSIÓ DE LA CrAT I FORMACIÓ D'ÉSTERS EN LLEVAT

Les anàlisis dels productes de fermentació obtinguts amb soques de llevats que sobreexpressen *CAT2* indiquen que la sobreexpressió d'aquest gen té un efecte limitat en la producció d'ésters durant la fermentació. La sobreexpressió de *CAT2* va causar una reducció significativa dels nivells d'alguns ésters, com l'acetat d'etil o l'acetat d'isoamil, quan es va comparar amb el control. Al mateix temps, es va produir un increment en els nivells de 2-metil propanol. Encara que la carnitina acetiltransferasa

catalitza una reacció reversible, la suplementació del medi de fermentació amb L-carnitina hauria afavorit la reacció directa, és a dir, la formació d'acilcarnitina i CoA. Això comportaria una disminució del ratio acetil-CoA/CoA, i consegüentment una disminució dels nivells dels ésters, la qual cosa concorda amb els nostres resultats experimentals. En aquestes condicions, la sobreexpressió de *CAT2* produeix un efecte similar, encara que més modest, a l'observat en una soca deficient en activitat alcohol acetiltransferasa (Verstrepen, 2003b). El fet que la sobreexpressió de *CAT2* tingui un efecte limitat en la formació d'ésters pot ésser degut als següents factors. En primer lloc, vam usar una soca de laboratori (FY23) pels experiments de fermentació, i aquesta soca produeix entre 5 i 10 vegades menys ésters que la que s'utilitza específicament per a la producció de vins, com és la soca VIN13. Això dificulta la quantificació d'alguns ésters, els quals es produeixen en petites quantitats. En segon lloc, per observar un major efecte de la sobreexpressió de *CAT2*, aquest gen hauria d'haver-se expressat conjuntament amb els gens involucrats en la síntesi d'ésters (*ATF1* o *ATF2*) i/o el gen pantotenat quinasa (*panK*), que regula la biosíntesi de CoA.

CONCLUSIONS

1. L'ús de *Saccharomyces cerevisiae* com a sistema d'expressió proporciona un model vàlid per l'estudi de la relació estructura-funció en CrAT i COT.
2. Experiments de mutagènesi dirigida en CrAT mostren que cap dels quatre aminoàcids identificats per mètodes bioinformàtics està involucrat en la selectivitat cap al substrat acil-CoA en CrAT.
3. La mutació de la Met⁵⁶⁴ a Gly en CrAT amplia l'especificitat de l'enzim cap a acils-CoA de cadena mitja. Amb la modificació d'un únic aminoàcid (mutant M564G) s'ha convertit la CrAT de rata en una pseudo-COT.
4. En el cas invers, la mutació de la Gly ortòloga (Gly⁵⁵³) a Met en COT disminueix l'activitat de l'enzim cap als seus substrats naturals, els àcids grassos de cadena mitja, i incrementa l'activitat cap als acils-CoA de cadena curta.
5. Models tridimensionals mostren que la cadena lateral de la Met⁵⁶⁴ actua com una tapa, implicant l'entrada d'acils-CoA de cadena mitja, però quan aquesta cadena lateral voluminosa és eliminada en el mutant CrAT M564G, la butxaca és llavors accessible, i l'enzim pot catalitzar acils-CoA més llargs.
6. Asp³⁵⁶ també està involucrat en l'especificitat cap al substrat acil-CoA en CrAT. La seva mutació a Ala, juntament amb la mutació de la Met⁵⁶⁴ a Gly, crea un enzim artificial amb una especificitat cap al substrat acil-CoA similar a la de la CPT.
7. Els nostres experiments cinètics indiquen que la His³⁴³ i el Glu³⁴⁷ són crítics per a la catàlisi en CrAT.
8. La selectivitat cap als acils-CoA de cadena llarga en COT està determinada per factors més complicats que variacions específiques d'aminoàcids entre els diferents membres de la família.

9. Factors electrostàtics i estèrics contribueixen en la discriminació entre colina i carnitina en CrAT. La mutació de quatre aminoàcids en CrAT (A106M/T465V/T467N/R518N) modifica la discriminació catalítica entre carnitina i colina a favor de l'últim substrat.

10. C75-CoA no té cap efecte sobre l'enzim CrAT *wt*, però en canvi sí que és un potent inhibidor dels mutants CrAT M564G i D356A/M564G. La inhibició del C75-CoA correlaciona amb la presència d'una butxaca hidrofòbica profunda en l'enzim.

11. La sobreexpressió de *CAT2* produeix una reducció significativa en els nivells d'alguns ésters volàtils durant la fermentació en llevats.

BIBLIOGRAFIA

Bentebibel, A., Sebastián, D., Herrero, L., López-Viñas, E., Serra, D., Asins, G., Gómez-Puertas, P., Hegardt, F.G. (2006) *Biochemistry*. **45**, 4329-4350.

Bremer, J. (1983). *Physiol. Rev.* **63**, 1420–1480.

Brevetti, G., Angelini, C., Rosa, M., Carrozzo, R., Perna, S., Corsi, M., Matarazzo, A., Marcialis, A. (1991) *Circulation* **84**, 1490-1495.

Brown, N.F., Anderson, R.C., Caplan, S.L., Foster, D.W., McGarry, J.D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 19157-19162.

Colucci, W.J., Gandour, R.D. (1988) *Bioorg. Chem.* **16**, 307–334.

Ferdinandusse, S., Mulders, J., Ijlst, L., Denis, S., Dacremont, G., Waterham, H.R., Wanders, R.J. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 213-218.

Hsiao, Y.S., Jogl, G., Tong, L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 31584-31589.

Jogl, G., Tong, L. (2003) *Cell* **112**, 113-122.

Jogl, G., Hsiao, Y.S., Tong, L. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 738-744.

Kalaria, R.N., Harik, S.I. (1992) *Ann. Neurol.* **32**, 583-586.

McGarry, J.D., Brown, N.F. (1997) *Eur. J. Biochem.* **244**, 1-14.

Miyazawa, S., Ozasa, H., Furuta, S., Osumi, T., Hashimoto, T. (1983a) *J. Biochem.* **93**, 439-451.

Miyazawa, S., Ozasa, H., Osumi, T., Hashimoto, T. (1983b) *J. Biochem.* **94**, 529-542.

Morillas, M., Clotet, J., Rubi, B., Serra, D., Asins, G., Ariño, J., Hegardt, F.G. (2000) *FEBS Lett.* **466**, 183-186.

Morillas, M., Gómez-Puertas, P., Roca, R., Serra, D., Asins, G., Valencia, A., Hegardt, F.G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 45001-45008.

Morillas, M., López-Viñas, E., Valencia, A., Serra, D., Gómez-Puertas, P., F.G. Hegardt, F.G., Asins, G. (2004) *Biochem. J.* **379**, 777-784.

Swiegers, J.H., Dippenaar, N., Pretorius, I.S., Bauer, F.F. (2001) *Yeast* **18**, 585-595.

Thupari, J.N., Landree, L.E., Ronnett, G.V., Kuhajda F.P. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 9498-9502.

van Roermund C.W., Hettema, E.H., van Der Berg, M., Tabak, H.F., Wanders, R.J. (1999) *EMBO J.* **18**, 5843-5852.

Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S., Delvaux, F.R. (2003a) *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 110-118.

Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D., Vanderhaegen, B.M., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Pretorius, I.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R.. (2003b) *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5228-37.

Wu, D., Govindasamy, L., Lian, W., Gu, Y., Kukar, T., Agbandje-McKenna, M., McKenna, R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 13159-13165.