

“CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE ISOFORMAS DE LA ENZIMA ALCOHOL ACIL TRANSFERASA (AAT) INVOLUCRADA EN LA BIOSÍNTESIS DE ÉSTERES VOLÁTILES EN *Cucumis melo*. EVALUACIÓN DEL ROL DEL RESIDUO Thr268 PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.”

**SEBASTIÁN EDUARDO GALAZ DÍAZ
INGENIERO EN BIOINFORMÁTICA**

RESUMEN

El aroma es un atributo importante en la calidad de un fruto y está determinado por un grupo de compuestos volátiles de bajo peso molecular. En melón (*Cucumis melo*), los compuestos mayormente producidos corresponden a ésteres, los cuales son sintetizados por la enzima Alcohol Acil Transferasa (AAT) que cataliza la transferencia de un grupo acilo desde un acil-CoA a un alcohol. Se ha descrito que existen cuatro isoformas de AATs en *C. melo* (CmAAT1-4). Estas enzimas, a excepción de la enzima CmAAT2, son activas por expresión heteróloga en levadura y muestran afinidades diferenciales por una amplia batería de sustratos. Se ha demostrado que la falta de actividad en CmAAT2 se debe a la presencia del residuo alanina en la posición 268 en lugar de treonina presente en las tres restantes enzimas activas.

En el presente trabajo, se obtuvo la estructura de las cuatro isoformas CmAAT mediante modelamiento comparativo. CmAAT1, CmAAT3 y CmAAT4 presentaron un canal de solvente cercano al segmento HXXXD correspondiente al sitio activo y CmAAT2 evidenció la ausencia de este. La interacción enzima-sustratos mostró que las energías de interacción para las cuatro isoformas fueron más favorables para los derivados de acil-CoA que para los alcoholes. Los sustratos ingresaron al canal de solvente y se ubicaron en el sitio activo de CmAAT1, CmAAT3 y CmAAT4. Los derivados de acil-CoA posicionaron el grupo carbonilo de éstos cerca del nitrógeno del residuo de histidina y el grupo hidroxilo de los alcoholes hacia el oxígeno del grupo carboxílico del residuo de aspartato. En CmAAT2 los sustratos se posicionaron en regiones lejanas al sitio activo. La mutación de Thr268 por Ala en CmAAT1 impidió la formación del canal de solvente y afectó directamente el ingreso de los sustratos al sitio activo de esta enzima, de modo contrario, en CmAAT2 la mutación de Ala268 por Thr favoreció la formación de un

bolsillo cercano al sitio activo anteriormente inexistente y permitió el ingreso de los sustratos. Mediante dinámica molecular se exploró el comportamiento de acetil-CoA y hexanol en CmAAT1, evidenciando que la movilidad de los sustratos y la participación de Ser363 estaría favoreciendo una interacción directa entre His161 con acetil-CoA y hexanol.

ABSTRACT

Aroma is an important attribute in fruit quality, which determined by a set of low molecular weight volatile compounds. In melon fruit (*Cucumis melo*), esters are the main compounds, which are, synthesized through the action of alcohol acyl transferases (AAT). The enzyme catalyses the formation of esters by transferring an acyl-CoA to an alcohol. Four isoforms of AAT in *C. melo* (CmAAT1-4) have been reported. The expression of these isoforms in yeast showed that three of them are active, being CmAAT2 the only one with no activity. Most importantly all active enzymes showed differential affinities when several different substrates are used. It has been shown that the loss of activity of CmAAT2 is due to the presence of an alanine instead of threonine in position 268. Being present the alanine in the three remaining active enzymes.

In this work we obtained the structure of four CmAAT isoforms through comparative modelling. CmAAT1, CmAAT3 and CmAAT4 present a solvent channel near the HXXXD segment that corresponds to the active site. CmAAT2 has demonstrated the absence of the solvent channel. Enzyme-substrates interaction shows that interaction energies of the four isoforms are more favorable for acyl-CoA substrates than for alcohols. The substrates entered the solvent channel and were located at the active site for CmAAT1, CmAAT3 and CmAAT4. Acyl-CoA derivatives positioned the carbonyl group near the ϵ nitrogen of the histidine residue. The hydroxyl group of the alcohols was moved towards the oxygen of the carboxylic group of aspartate residue. In CmAAT2, the substrates were positioned in the far-off regions of the active site. The mutation Thr268 to Ala in CmAAT1 prevented the formation of the channel solvent and directly affected the entry of the substrates to the active site of this enzyme, otherwise, the mutation of Ala268 to Thr in CmAAT2 would have encouraged the formation of previously nonexistent a pocket near the active site and allowed the entry of substrates. The behaviour of acetyl-CoA and hexanol in CmAAT1 will be explore through molecular dynamics, showing that the mobility of substrates and the participation of Ser363 would favour a direct interaction between His161 with acetyl-CoA and hexanol.

Palabras claves: *CmAAT*