

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	1
INDICE DE TABLAS	4
INDICE DE FIGURAS	6
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1.- INTRODUCCIÓN	11
1.1.- El fruto de Papaya de montaña y su importancia comercial	11
1.2.- Proceso de maduración del fruto de papaya de montaña.....	12
1.2.- Calidad del fruto.....	13
1.3.- El aroma en el fruto de papaya de montaña	14
1.4.- Los ésteres volátiles y su importancia en el aroma de frutos.....	14
1.5.- La enzima Alcohol Aciltransferasa	17
1.6.- Rol del residuo Serina 370 en el mecanismo de biosíntesis de ésteres volátiles en frutos.	20
2.- HIPÓTESIS	24
2.1.- OBJETIVO GENERAL	25
2.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3.- METODOLOGÍA	26
3.1.- Fundamentos Teóricos de Métodos Computacionales	26
3.1.1.- Minimización de energía.....	26
3.1.2.- Dinámica Molecular.	28
3.1.3.- Acoplamiento Proteína-Ligando o “Docking”	30
3.1.4 Potencial electrostático (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver APBS).	31
3.1.5 MM-GBSA (Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area)	32
3.2.- Metodología Computacional	36

3.2.1.- Mutación in silico de la enzima Alcohol Aciltransferasa de <i>Vasconcellea pubescens</i> (VpAAT1).....	36
3.2.2.- Optimización estructural y equilibrado termodinámico de las proteínas mutantes de Alcohol Aciltransferasa de <i>Vasconcellea pubescens</i>	36
3.2.3.- Evaluación de la interacción enzima-sustrato considerando la enzima en estado silvestre y mutante.	37
3.2.4.- Dinámica Molecular de complejos proteína-ligando.	41
3.2.5.- Estudio del potencial electrostático de las diferentes proteínas mutantes de Alcohol Aciltransferasa de <i>V. pubescens</i>	42
3.2.6.- Cálculo de energía libre de unión enzima-sustrato mediante Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area (MM-GBSA)	42
4.- RESULTADOS	46
4.1.- Minimización energética y equilibrio termodinámico de las enzimas mutantes VpAAT1-S370A y VpAAT1-S370T	46
4.2.- Alineamiento estructural de la enzima Alcohol aciltransferasa de <i>Vasconcellea pubescens</i> (VpAAT1) con la enzima mutante VpAAT1-S370A y VpAAT1-S370T.	47
4.3.- Análisis de los canales de solvente de la enzima nativa (VpAAT1) y enzimas mutantes (VpAAT1-S370A y VpAAT1-S370T).....	48
4.4.- Efecto de la sustitución de Alanina y Treonina sobre el residuo de Serina370 y su implicancia en la interacción proteína-ligando.....	49
4.4.- Simulaciones de dinámica molecular para los complejos VpAAT1-ligandos, VpAAT1-S70A/T-ligandos.	59
4.5.- Análisis de potencial electrostático de VpAAT1 y VpAAT1-S370A/T.....	73
4.6.- Evaluación de la afinidad de unión de la enzima nativa las mutantes VpAAT1-S370A/T por los sustratos que generan un correspondiente éster en alta y nula concentración por parte de la enzima nativa mediante MM-GBSA.....	75
5.- DISCUSIÓN	80

6.- CONCLUSIÓN	88
7.- BIBLIOGRAFIA	89

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Valores de actividad de las enzimas AAT ($\mu\text{kat mg}^{-1}$) hacia diferentes acil-CoA y alcoholes como sustratos.	22
Tabla2: Sistemas utilizados en la estrategia de ligandos simultáneos en el análisis de MM-GBSA.	43
Tabla 3: Sistemas utilizados en la estrategia de ligandos separados en el análisis de MM-GBSA.	45
Tabla 4: Energías de interacción de la proteína silvestre VpAAT1 y proteínas mutantes VpAAT1-S370A/T con diferentes sustratos de alcohol y acil- CoA.....	50
Tabla 5: Pares de sustratos alcohol y acil-coa seleccionados para formar el complejo final Acil-CoA-Alcohol-Proteína.	53
Tabla 6: Energías de interacción de la enzima silvestre VpAAT1 y enzima mutante VpAAT1-S370A/T con diferentes parejas de sustratos acilCoA-alcohol.	54
Tabla 7: Distancia de los ligandos con los residuos del sitio activo de la enzima mutante VpAAT1-S370A y VpAAT1-S370T.	56
Tabla 8: Ocupancia de enlaces de hidrógeno formados durante la trayectoria de dinámica molecular entre el par de sustratos que genera un alto nivel en la producción de ésteres, bencil alcohol – acetil-CoA y la enzima nativa (VpAAT1) y mutante (VpAAT1-S370A/T).....	72

Tabla 9: Ocupancia de enlaces de hidrógeno formados durante la trayectoria de dinámica molecular entre el par de sustratos que genera un nulo nivel en la producción de ésteres, etanol – acetil-CoA y la enzima nativa (VpAAT1) y mutantes (VpAAT1-S370A/T). 72

Tabla 10: Resultados de MM-GBSA para la enzima nativa VpAAT1 y enzimas mutantes VpAAT1-S370A y VpAAT1-S370T interactuando con el par de sustratos que generan un alto nivel en la producción de ésteres, bencil alcohol – acetil-CoA. 76

Tabla 11: Resultados de MM-GBSA para la enzima nativa VpAAT1 y enzimas mutantes VpAAT1-S370A y VpAAT1-S370T interactuando con el par de sustratos que generan un alto nivel en la producción de ésteres, etanol – acetil-CoA. 77

Tabla 12: Resultados de MM-GBSA para la estrategia de “ligandos separados” 78

Tabla 13: Resultados de MM-GBSA para la estrategia de “ligandos separados” 79

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Reacción de esterificación.....	15
Figura 2: Análisis filogenético de aciltransferasas.	16
Figura 3: Estructura cristalográfica de <i>Vinorina sintasa</i>	18
Figura 4: Modelo estructural de VpAAT1.....	19
Figura 5: Orientación de los residuos involucrados en la reacción de esterificación presentes en el canal de solvente de CmAAT1.....	20
Figura 6: Alineamiento múltiple (parcial) de diferentes enzimas AAT con actividad en fruto maduro.....	22
Figura 7: Ciclo termodinámico.. ..	33
Figura 8: Estructura de ligandos. En la parte superior se muestran los alcoholes y en la parte inferior los derivados de acil-CoA.....	39
Figura 9: Estrategía utilizada en el estudio de acoplamiento molecular.. ..	40
Figura 10: Estrategias utilizadas en el estudio de MM-GBSA.	44
Figura 11: Gráfico de energía total de minimización y equilibrio termodinámico de la enzima mutante VpAAT1-S370A y VpAAT1-S370T.....	46
Figura 12: Alineamiento estructural de la proteína silvestre con la proteína mutante VpAAT1-S370A y VpAAT1S370T.. ..	47

Figura 13: Presencia del canal de solvente en la enzima silvestre y enzimas mutantes VpAAT1-S370A/T.....	48
Figura 14: Análisis de interacción proteína-ligando de los sustratos en el sitio activo de VpAAT1-S370A.....	51
Figura 15: Análisis de interacción proteína-ligando de los sustratos en el sitio activo de VpAAT1-S370T.....	52
Figura 16: Análisis de interacción proteína-ligando de los sustratos en el sitio activo de VpAAT1-S370A.....	55
Figura 17: Análisis de interacción proteína-ligando de los sustratos en el sitio activo de VpAAT1-S370A.....	58
Figura 18: Gráficos de energía total calculada durante la simulación molecular.....	60
Figura 19: Gráfico de RMSD durante la trayectoria de dinámica molecular.....	61
Figura 20: Gráfico RMSD de cada ligando durante la trayectoria de dinámica molecular.....	63
Figura 21: Gráfico RMSD de los pares de ligandos durante la trayectoria de dinámica molecular.....	64
Figura 22: Orientación del par de sustratos bencil alcohol – acetil-CoA en el canal solvente de la enzima mutante VpAAT1-S370A.....	65
Figura 23: Orientación del par de sustratos etanol – acetil-CoA en el canal solvente de la enzima mutante VpAAT1-S370A.....	65
Figura 25: Orientación del par de sustratos bencil alcohol – acetil-CoA en el canal solvente de la enzima mutante VpAAT1-S370T.....	67

Figura 24: Orientación del par de sustratos bencil alcohol – acetil-CoA en el canal solvente de la enzima mutante VpAAT1-S370T.....	67
Figura 26: Orientación del par de sustratos bencil alcohol – acetil-CoA en el canal de solvente de la enzima mutante VpAAT1-S370T.....	68
Figura 27: Orientación del par de sustratos bencil alcohol – acetil-CoA en el canal de solvente de la enzima mutante VpAAT1-S370T.....	69
Figura 28: Distancia de ligandos y residuos importantes del sitio activo durante la simulación de dinámica molecular.....	70
Figura 29: Distancia de ligandos y residuos importantes del sitio activo durante la simulación de dinámica molecular.....	71
Figura 30: Superficie de energía potencial del canal de solvente de las enzimas mutantes VpAAT1-S370A/T y de la enzima nativa VpAAT1..	74