



VII Encuentro Argentino de Materia Blanda

Orientación del sustrato en mutantes de P450cam

Alvarez, M. Guadalupe¹, Echave, Julián¹, Ascutto, Eliana K.¹

¹ Escuela de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de San Martín.
gualvarez@unsam.edu.ar

Resumen del trabajo:

El citocromo P450cam (CYP101A1), aislado originalmente en cepas de *Pseudomonas putida*, cataliza la hidroxilación de *d*-alcanfor mediada por oxígeno molecular. Esta reacción ocurre en presencia del compañero redox y efector Pdx (Putidaredoxina) y presenta un alto grado de regio y estereoselectividad, originando como único producto *d*-5-*exo*-hidroxialcanfor. Esta selectividad, implica que la unión del sustrato ocurre en una orientación preferida. En el presente trabajo, estudiamos la respuesta del sustrato en cuanto a su orientación frente a mutaciones en residuos cercanos al sitio activo de P450cam. Para ello, realizamos simulaciones de Dinámica Molecular (DM), partiendo de la estructura del CYP101A1 reducido y coordinado a monóxido de carbono depositada en la entrada de PDB 2L8M, en un ensamblaje NVT a 298 K y analizamos las distintas trayectorias. Estos experimentos *in silico* fueron llevados en forma complementaria a experimentos *in vitro* realizados por nuestros colaboradores experimentales.

Hemos observado que, mas allá de que se sabe que la enzima, y particularmente el grupo hemo, sufre diferentes cambios conformacionales desde la unión del sustrato hasta la abstracción del hidrógeno, en las simulaciones de DM de la enzima WT, que el sustrato rota y es posicionado y orientado de manera adecuada para la abstracción del hidrógeno.

La posición del sustrato es mantenida por una interacción de tipo puente de hidrógeno entre el residuo Y96 y el oxígeno carbonílico del sustrato [Atkins, 1988]. Estudiamos la doble mutante F87Y-Y96F, para evaluar si es posible forzar un reorientación del sustrato para el obtención de nuevos productos, modificando las opciones de formación de puentes de hidrógeno. Observamos que se establece un nuevo puente de hidrógeno, entre el oxígeno carbonílico del alcanfor y el residuo Thr101. Pese a que el cambio en el posicionamiento y orientación del sustrato es muy radical en comparación a la enzima WT, esta mutante es aún capaz de producir *d*-5-*exo*-hidroxialcanfor como producto mayoritario.

Referencias:

- Ascutto E. K., Madura, J. D., Pochapsky, S. S., OuYang, B., Pochapsky, T. C. *Journal of Molecular Biology*, **2009**, 388, 801–814.
- Ascutto, E. K, Dang, M., Pochapsky, S. S., Madura, J. D., Pochapsky, T. C. *Biochemistry*, **2011**, 50: 1664-1671.
- Ascutto, E. K., Young, M. J., Madura, J. D., Pochapsky S. S., and Pochapsky, T. C. *Biochemistry*, **2012**, 51: 3383-3393.
- Ascutto, E. K, Pochapsky, T. C. *Journal of Molecular Biology*, **2018**, 430, 1295-1310.
- Atkins, W. M., Sligar, S. *Journal of Biological Chemistry*, **1988**, 263:18842-18849.
- Tietz, D. R., Colhart, A. M., Pochapsky, S. S., Pochapsky, T. C. *Scientific Reports*, **2017**, 7:13581.

