

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

---

---



ESTUDIO TEÓRICO DEL COMPORTAMIENTO  
CONFORMACIONAL Y DE INTERACCIÓN DE LA  
FENILALANINA HIDROXILASA HUMANA.

Tesis que para obtener el título de  
LICENCIADO (A) EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:  
LUCIA J. PEÑA ORTIZ

ASESOR: DRA. NORMA A. CABALLERO CONCHA  
CO-ASESOR: DR. RAMSÉS E. RAMÍREZ GUTIÉRREZ



AGOSTO 2018

Agradecimientos.

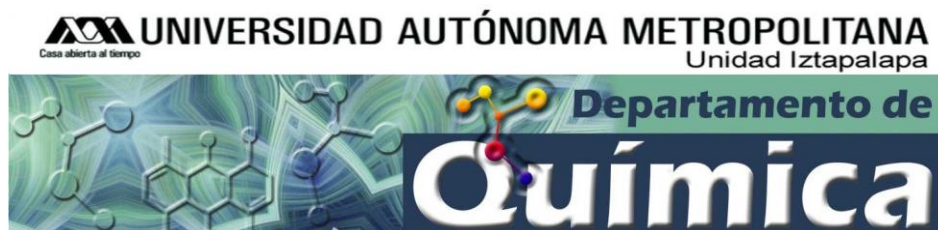
A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por el apoyo al proyecto titulado “Estructura y reactividad del enlace por puente de Hidrógeno en sistemas moleculares”. VIEP-BUAP RAGR-NAT-I16.



Al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS-BUAP) por las facilidades de cómputo prestadas a través del proyecto titulado “Estructura y reactividad del enlace por puente de Hidrógeno en sistemas moleculares”.



Al Departamento de Fisicoquímica Teórica de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa, que bajo la supervisión del Dr. Joel Ireta Moreno, me dio la oportunidad de realizar una estancia que involucró el aprendizaje básico de la técnica computacional “Simulaciones de Dinámica Molecular de proteínas”.



A la beca obtenida del Cuerpo Académico: Investigación Experimental y Teórica de Nuevos Materiales y Educación en Ciencias CA-263.

*A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.*

*La investigación de las enfermedades ha avanzado tanto que es cada vez más difícil encontrar a alguien que esté completamente sano.*

*Aldous Huxley.*

Los resultados preliminares de este proyecto de investigación fueron presentados en los siguientes congresos:

- Participación como expositora en la modalidad cartel en la XIV Reunión Mexicana de Fisiología Teórica llevada a cabo el 19Z1, 20 y 21 de noviembre de 2015 en Tonalá, Jalisco, con el título “Análisis del acoplamiento molecular entre la fenilalanina hidroxilasa y su ligando natural L-fenilalanina, y sus implicaciones en la fenilcetonuria (PKU)”:



- Participación como expositora en la modalidad cartel en la XV Reunión Mexicana de Fisiología Teórica llevada a cabo el 17, 18 y 19 de noviembre de 2016 en Mérida, Yucatán, con el título “Análisis teórico del acoplamiento molecular entre la fenilalanina hidroxilasa y su ligando natural L-fenilalanina”.



Dedicatoria.

Los resultados de este proyecto de investigación, están dedicados a todas aquellas personas que, de alguna forma, son parte de su culminación.

Agradezco a mis padres y hermanos, a quienes les debo todo lo que soy el día de hoy. A mi mamá, quién se encargó desde muy temprana edad a inculcar en mí un espíritu con ansias de perfección, dedicación y disciplina, características que me han llevado al camino de la ciencia que sigo en el presente. A mi papá, quién me formó toda la vida como una persona con calidad humana y a mi hermano Leonardo del cual siempre recibí apoyo y comprensión incondicional.

Gracias a mis tutores a quienes les debo lo que seré el día de mañana. Un agradecimiento especial al Dr. Ramsés E. Ramírez Gutiérrez, quién desde el comienzo me apadrinó y guió velando por lo mejor para mí como científico y persona. Además sin él, no me hubiera sido posible ampliar ágilmente mis horizontes en el área de química computacional que finalmente me llevó a conocer al Dr. Joel Ireta Moreno, quién con su paciencia y enseñanza ayudo a culminar una parte importante en este trabajo de investigación.

A mis amigos incondicionales, quienes lograron que realmente creyera en mí. Personas que me ayudaron a sentir que realmente podía cumplir mis sueños, jamás dejaron de apoyarme y no me permitieron rendirme.

Y finalmente, pero no menos importante, agradezco a José Miguel Méndez Castro, una persona muy especial, quién con gran disposición me proporcionó vigor y perseverancia para jamás quebrantarme ante ningún obstáculo.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS - BUAP

ASUNTO: FECHA DE EXAMEN.

DRA. HORTENSIA CARRILLO RUÍZ  
Secretaría Académica  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, BUAP  
Presente

Por medio de la presente le comunico que se ha revisado y concluido con las correcciones pertinentes del escrito de tesis titulada "*Estudio teórico del comportamiento conformacional y de interacción de la fenilalanina hidroxilasa humana*", presentada por la pasante de Biotecnología, Lucía Juana Peña Ortiz, con número de matrícula 201346200, por tal motivo los abajo citados estamos de acuerdo en que se continúen los trámites necesarios para la presentación del examen profesional con fecha del día 10 de agosto de 2018 a las 10:00 hrs, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Sin otro particular, se expide la presente solicitud del interesado.

ATENTAMENTE

Puebla, Puebla a 4 de julio de 2018



Dra. Norma Alondra Caballero  
Concha.  
Director de Tesis.



Dr. Francisco Javier Meléndez  
Bustamante.  
Miembro de la Comisión Revisora de  
Tesis.



Dr. Joel Ireta Moreno.  
Miembro de la Comisión Revisora de  
Tesis.



Dra. María Eugenia Castro Sánchez.  
Miembro de la Comisión Revisora de  
Tesis.

## Índice General

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>2</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS. ....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN. ....</b>	<b>13</b>
1.1 FENILCETONURIA. ....	13
1.2 FUNCIÓN, ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DE LA FENILALANINA HIDROXILASA (PHEOH). ...	15
1.3 PROBLEMÁTICA DE ESTUDIO.....	18
1.4 ANTECEDENTES TEÓRICO-EXPERIMENTALES. ....	19
<b>CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS. ....</b>	<b>24</b>
2.1 HIPÓTESIS.....	24
2.2 OBJETIVO GENERAL.....	24
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	24
<b>CAPÍTULO 3. FUNDAMENTO TEÓRICO.....</b>	<b>25</b>
3.1 MODELADO MOLECULAR POR HOMOLOGÍA. ....	25
3.2 ACOPLAMIENTO MOLECULAR. ....	26
3.2.1 <i>AutoDock Vina</i> . ....	27
3.3 DINÁMICA MOLECULAR.....	28
3.3.1 <i>El método de dinámica molecular</i> . ....	29
<b>CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA. ....</b>	<b>33</b>
4.1 CONSTRUCCIÓN DE SIETE MODELOS DE LONGITUD COMPLETA PARA PHEOH HUMANA Y UN MODELO DE UN SEGMENTO DEL DOMINIO DE REGULACIÓN N-TERMINAL CORRESPONDIENTE AL DOMINIO ACT.....	33
4.2 EJECUCIÓN DE SIMULACIONES DE <i>ACOPLAMIENTO MOLECULAR</i> ENTRE PHEOH HUMANA, BH4 Y DOS CHAPERONAS FARMACOLÓGICAS.....	35
4.3 EJECUCIÓN DE SIMULACIONES DE <i>DINÁMICA MOLECULAR</i> DEL DOMINIO ACT DE PHEOH HUMANA ENLAZADO A UNA MOLÉCULA DE L-PHE. ....	37
<b>CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>38</b>
5.1 CONSTRUCCIÓN DE SIETE MODELOS DE LONGITUD COMPLETA PARA PHEOH HUMANA Y UN MODELO DE UN SEGMENTO DEL DOMINIO DE REGULACIÓN N-TERMINAL CORRESPONDIENTE AL DOMINIO ACT.....	38
5.2 SIMULACIONES DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR ENTRE PHEOH, BH4 Y DOS CHAPERONAS FARMACOLÓGICAS. ....	42

5.3 SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR (DM) DEL DOMINIO ACT DE PHEOH HUMANA ENLAZADO A UNA MOLÉCULA DE L-PHE. ....	46
.....	56
<b>CAPÍTULO 6. CONCLUSIÓN. ....</b>	<b>57</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>58</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXOS. ....</b>	<b>66</b>
ANEXO 1. ALGORITMOS DE MUESTRO, CARACTERÍSTICAS E IMPLEMENTACIÓN EN SOFTWARES DE <i>DOCKING MOLECULAR</i> . FUENTE: XUAN-YU Y COL. (2012). ....	66
ANEXO 2. RECOPIACIÓN DE ESTRUCTURAS CRISTALIZADAS DE LA ENZIMA FENILALANINA HIDROXILASA DESDE EL <i>PROTEIN DATA BANK</i> (PDB). FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA BASADA EN MARIE, G., & HARRIS, E. (2014). ....	67
ANEXO 3. RESUMEN DE CARACTERÍSTICAS PARA LAS VARIANTES DE PHEOH HUMANA ESTUDIADAS. FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA BASADA EN ERLANDSEN, H. Y COL. (2002) Y TRUNZO, R. Y COL. (2016). ....	69

## Índice de figuras.

ILUSTRACIÓN 1. DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES EN UNA SUBUNIDAD DE PHEOH. FUENTE: BASE DE DATOS DE PACIENTES Y GENOTIPOS QUE CAUSAN HPA/PKU (BIOPKUDB). IMAGEN OBTENIDA DE <a href="http://www.biopku.org/biopku/search-start.asp">HTTP://WWW.BIOPKU.ORG/BIOPKU/SEARCH-START.ASP</a> .....	14
ILUSTRACIÓN 2. ORGANIZACIÓN DE DOMINIOS FUNCIONALES EN UNA SUBUNIDAD DE PHEOH. ELABORACIÓN PROPIA BASADA EN MARIE, G., & HARRIS, E. (2014) <sup>[26]</sup> . ....	16
ILUSTRACIÓN 3. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS SITIOS DE ENLACE DE BH4 (EN AZUL) Y THA (ANÁLOGO DE L-PHE, EN AMARILLO) EN EL SITIO ACTIVO DE PHEOH. EL ÁTOMO DE HIERRO ESTÁ REPRESENTADO COMO UNA ESFERA DE COLOR NARANJA. IMAGEN OBTENIDA DE MARIE, G., & HARRIS, E. (2014) <sup>[26]</sup> . ....	17
ILUSTRACIÓN 4. A) REPRESENTACIÓN 2D Y B) REPRESENTACIÓN 3D DEL MODO DE ENLACE DEL COMPONENTE IV EN EL SITIO ACTIVO DE PHEOH HUMANA, RESPECTIVAMENTE. IMAGEN OBTENIDA DE TORREBLANCA, R. Y COL. (2012) <sup>[19]</sup> . ....	20
ILUSTRACIÓN 5. ORGANIZACIÓN DEL DOMINIO ACT DE PHEOH HUMANA. LAS SECUENCIAS GAL E IERSP SE MUESTRAN EN COLOR MAGENTA CLARO. LAS REGIONES QUE CONTIENEN LOOPS DESDE L1 HASTA L4 SE MUESTRAN EN COLOR CIAN, VERDE, ROJO Y NARANJA, RESPECTIVAMENTE. IMAGEN OBTENIDA DE CARLUCCIO, C. Y COL. <sup>[27]</sup> . ....	21
ILUSTRACIÓN 6. INTERACCIONES DENTRO DEL COMPLEJO FORMADO POR PHEOH DIMÉRICA HUMANA Y L-PHE (REPRESENTADO EN BASTONES COLOR NARANJA). LAS LETRAS R Y C SE REFIEREN A LOS DOMINIOS DE REGULACIÓN N-TERMINAL Y CATALÍTICO, RESPECTIVAMENTE. IMAGEN OBTENIDA DE CARLUCCIO, C. Y COL. <sup>[28]</sup> . ....	23
ILUSTRACIÓN 7. COMPARACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DEL AMINOÁCIDO L-PHE SOBRE EL DOMINIO ACT PARA EL MALLADO 4 Y 5, RESPECTIVAMENTE. A Y C PARA COMPLEJO FORMADO CON LA FORMA PROTONADA DEL AMINOÁCIDO. B Y D PARA EL COMPLEJO FORMADO CON LA FORMA DESPROTONADA DEL AMINOÁCIDO. ....	48
ILUSTRACIÓN 8. A) ESTRUCTURAS DEL DOMINIO ACT AL INICIO (VERDE) Y AL FINAL (LILA) DE LA SIMULACIÓN DE DM. IMAGEN OBTENIDA DE CARLUCCIO, C. Y COL. (2013) <sup>[27]</sup> . B) ESTRUCTURAS DEL DOMINIO ACT AL INICIO (CAFÉ) Y AL FINAL (AZUL) DE LA SIMULACIÓN DE DM DEL SISTEMA CERO. ELABORACIÓN PROPIA CON AYUDA DEL PROGRAMA UCSF CHIMERA. EL CAMBIO CONFORMACIONAL PREVIAMENTE DESCRITO SE SEÑALA DENTRO DEL CÍRCULO ROJO. ....	56

## Índice de tablas.

TABLA 1. CRITERIOS CONCLUYENTES EN LA SELECCIÓN DE LA ESTRUCTURA MOLDE PARA LA CONSTRUCCIÓN DE SIETE MODELOS DE LONGITUD COMPLETA DE PHEOH HUMANA.....	35
TABLA 2. CRITERIOS CONCLUYENTES EN LA SELECCIÓN DE LA ESTRUCTURA MOLDE PARA LA CONSTRUCCIÓN DE UN MODELO DEL DOMINIO ACT DE PHEOH HUMANA.....	35
TABLA 3. ESTIMADO DE CALIDAD GLOBAL PARA CADA MODELO CONSTRUIDO POR SWISS-MODEL EN TÉRMINOS DE LA FUNCIÓN DE PUNTUACIÓN QMEAN Y CUATRO DESCRIPTORES ESTRUCTURALES ESTADÍSTICOS.....	40
TABLA 4. ENERGÍA DE AFINIDAD DE ENLACE E INTERACCIONES RESULTANTES PARA EL RE-ACOPPLAMIENTO DE LAS ENTRADAS PDB 1J8U Y 4ANP.....	42
TABLA 5. ENERGÍA DE AFINIDAD DE ENLACE E INTERACCIONES RESULTANTES PARA EL DOCKING ENTRE BH4 Y CADA UNO DE LOS MODELOS DE PHEOH HUMANA. ....	43
TABLA 6. ENERGÍA DE AFINIDAD DE ENLACE E INTERACCIONES RESULTANTES PARA EL DOCKING ENTRE EL COMPONENTE III Y CADA UNO DE LOS MODELOS DE PHEOH HUMANA.....	44
TABLA 7. ENERGÍA DE AFINIDAD DE ENLACE E INTERACCIONES RESULTANTES PARA EL DOCKING ENTRE EL COMPONENTE IV Y CADA UNO DE LOS MODELOS DE PHEOH HUMANA. ....	45
TABLA 8. ENERGÍA DE AFINIDAD DE ENLACE E INTERACCIONES RESULTANTES PARA EL DOCKING SEMIFLEXIBLE ENTRE BH4, PHEOH WT Y LA VARIANTE PR270K.....	45
TABLA 9. ENERGÍA DE AFINIDAD DE ENLACE E INTERACCIONES ESTABLECIDAS EN EL COMPLEJO DOMINIO ACT-L-PHE EN SU FORMA PROTONADA. ....	46
TABLA 10. ENERGÍA DE AFINIDAD DE ENLACE E INTERACCIONES ESTABLECIDAS EN EL COMPLEJO DOMINIO ACT-L-PHE EN SU FORMA DESPROTONADA. ....	47

## Resumen.

La fenilcetonuria es la disfunción innata más común en el metabolismo de aminoácidos que, si no es tratada, da lugar a consecuencias graves como retraso global del desarrollo y discapacidad intelectual en las personas afectadas. Esta condición se genera a partir de mutaciones sobre el gen que codifica a la enzima fenilalanina hidroxilasa humana, encargada de catalizar el primer paso de degradación de la fenilalanina y sintetizar tirosina. El resultado de las mutaciones se ve reflejado en el mantenimiento de la estructura funcional y la regulación alostérica de la enzima que finalmente la lleva a la pérdida total o parcial de la función catalítica.

Partiendo de un enfoque computacional, este proyecto de investigación se inclinó hacia la realización de un análisis estructural de la enzima fenilalanina hidroxilasa humana (en su forma silvestre y mutante) que pudiera contribuir a mejorar la comprensión de su función y proveer una explicación molecular para los efectos estructura/función inducidos por mutaciones.

La primera parte del estudio involucró la elaboración de modelos tridimensionales de la enzima humana justificados por la ausencia de información acerca de la estructura tridimensional completa. La utilización de la técnica de *modelado molecular por homología*, permitió obtener buenos modelos representativos de la forma silvestre y seis mutantes asociadas a fenotipos severos de fenilcetonuria. La evaluación de la calidad de los modelos obtenidos se realizó en términos de la función de puntuación QMEAN y cuatro descriptores estructurales estadísticos que incluyen dos potenciales de interacción de fuerza media (dependientes de la distancia) para describir las interacciones de largo alcance, un ángulo de torsión potencial para analizar la geometría del esqueleto local de la estructura y un potencial de solvatación para describir el estado de exposición de los residuos en la estructura.

La segunda parte de este estudio se asoció con la identificación de los determinantes moleculares importantes dentro de la modulación de la interacción entre modelos tridimensionales representativos de la enzima humana y dos compuestos químicos particularmente interesantes en el ámbito farmacoterapéutico de la fenilcetonuria basado en chaperonas farmacológicas. La técnica computacional utilizada para el desarrollo de

esta etapa incluyó *acoplamiento molecular*, para la cual los resultados obtenidos fueron dependientes de la flexibilidad del receptor.

La tercera y última etapa de este estudio involucró el análisis individual de una secuencia motivo conocida como dominio ACT importante dentro de la base estructural para la regulación alostérica de la enzima. Se ejecutaron dos simulaciones de dinámica molecular de 30 y 105 nanosegundos de duración, con lo cual se alcanzó el equilibrio estructural. La primera simulación incluyó el dominio ACT sin enlazar como sistema control, mientras que la segunda incluyó el modelo tridimensional enlazado a una molécula de fenilalanina. En general, se observó que la fenilalanina no interactúa con el sitio de enlace predicho por medio de la metodología de *acoplamiento molecular ciego*. De cualquier forma el resultado de ambas simulaciones permitió identificar los cambios estructurales importantes del dominio ACT

## Capítulo 1. Introducción.

### 1.1 Fenilcetonuria.

Etimológicamente el origen de la palabra metabolismo procede del griego *metabolé* que significa cambio o transformación. El metabolismo por su parte se define como el conjunto regulado y coordinado de reacciones físicas y químicas que tienen lugar en un organismo vivo. Partiendo de esta idea, las enfermedades metabólicas son aquellas patologías causadas por alteraciones adquiridas o congénitas en las proteínas implicadas en estas reacciones. Cuando el defecto es hereditario, hablamos entonces de enfermedades metabólicas hereditarias. Dentro de este grupo de enfermedades el desorden más común es la enfermedad de Fölling o también conocida como fenilcetonuria.

La fenilcetonuria es una enfermedad metabólica humana con base genética que se hereda con carácter autosómico recesivo y cuyo origen es la deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa (de aquí en adelante descrita como PheOH) [1]. El defecto de PheOH genera una acumulación patológica de fenilalanina en sangre y cerebro. Si no es tratada, da lugar a consecuencias graves como retraso global del desarrollo y discapacidad intelectual, acompañados por síntomas adicionales como eczema eritematoso, piel y cabello claros, convulsiones, rasgos autistas y comportamiento agresivo, así como diversos síntomas psiquiátricos a medida que el paciente crece [2-4].

La incidencia global de esta enfermedad oscila entre 1:10,000-20,000 recién nacidos vivos (RNV). Aunque se ha descrito una variabilidad geográfica significativa, los caucásicos parecen ser el grupo étnico más afectado. En México, la Coordinación de Atención Integral a la Salud en el Primer Nivel del IMSS registró en 2015 una incidencia acumulativa de 1:101,133 RNV. Los casos se encontraron en Aguascalientes, Baja California Sur, Chihuahua, Ciudad de México, Guanajuato, Jalisco, Guerrero, Estado de México, Nayarit, Nuevo León, Tabasco, Veracruz y Zacatecas [5, 6].

El mecanismo molecular descrito en este desorden metabólico se asocia a mutaciones en el gen PAH (mapeado en el cromosoma 12q22-q24.2), que codifica a PheOH. Actualmente se han identificado a nivel mundial más de 500 mutaciones asociadas a fenilcetonuria y la mayoría resulta en una disminución de la eficiencia de plegamiento

correcto y estabilidad conformacional de la enzima, que llevan finalmente a la pérdida de la función.

Las mutaciones se distribuyen a lo largo de los 452 residuos de PheOH y cada uno de sus tres dominios funcionales (obsérvese Ilustración 1). Sin embargo, mutaciones sobre residuos estructurales clave como los ubicados en los dominios catalítico y de regulación N-terminal afectan el mantenimiento de la estructura funcional y la regulación alostérica de esta enzima por lo que se asocian a fenotipos severos de fenilcetonuria [7-9].

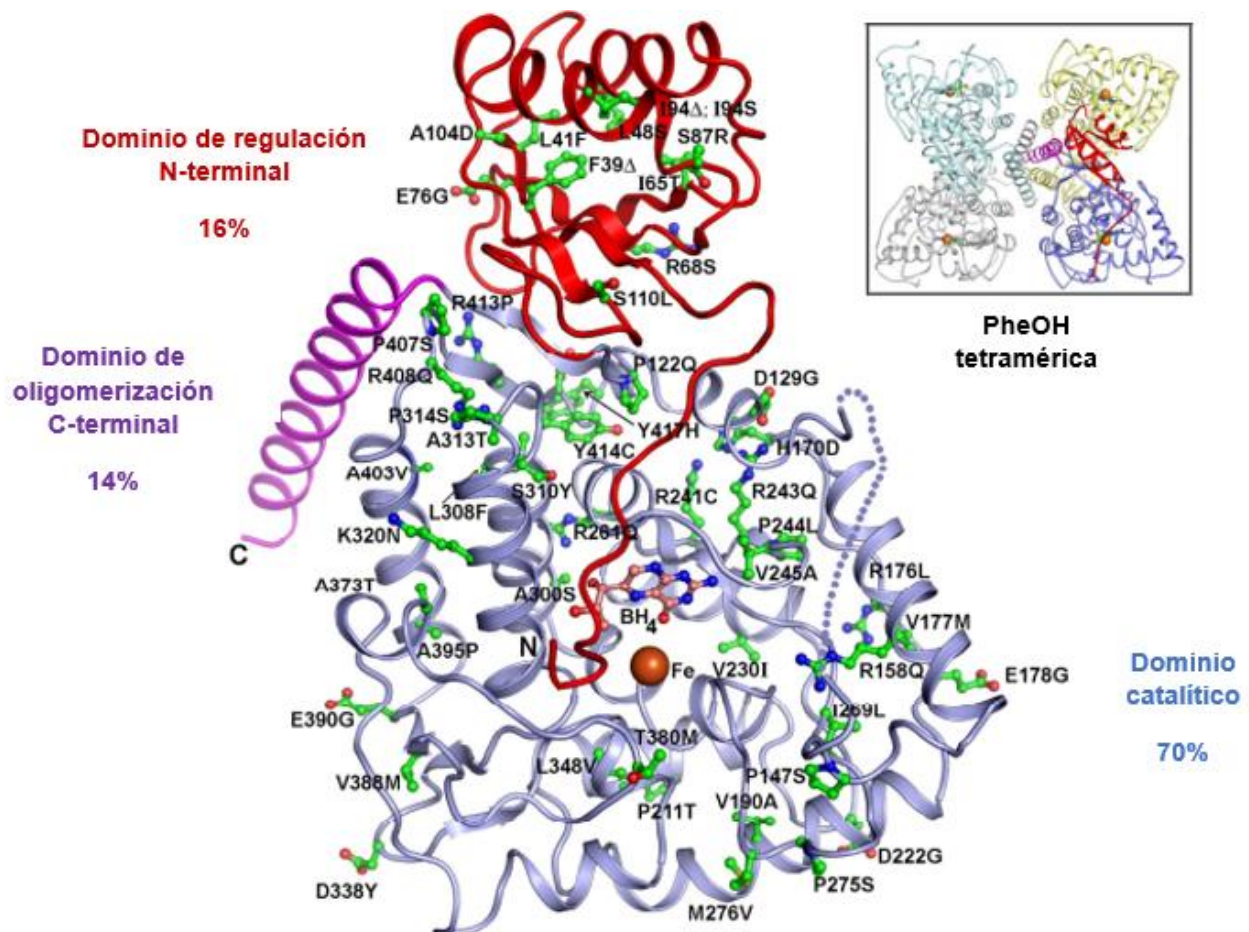


Ilustración 1. Distribución de mutaciones en una subunidad de PheOH. Fuente: Base de datos de pacientes y genotipos que causan HPA/PKU (BIOPKUdb). Imagen obtenida de <http://www.biopku.org/biopku/search-start.asp>

La restricción en la ingesta proteica para evitar un incremento en los niveles de fenilalanina es la base del tratamiento a largo plazo en la fenilcetonuria. Sin embargo, este tratamiento dietético suele ser exigente y, a menudo conduce a la aparición de patologías carenciales secundarias y complicaciones psicosociales en el paciente, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas terapias eficaces que mejoren la calidad de vida de estos pacientes. En la última década, el uso de moléculas pequeñas denominadas chaperonas farmacológicas (*Pharmacological Chaperones* o PCs) para prevenir o rescatar el plegamiento anómalo de proteínas mutantes, ha conseguido mantener una dirección interesante en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el plegamiento anómalo de proteínas, incluyendo a la fenilcetonuria y, por lo tanto, su desarrollo e investigación demanda un reto importante.

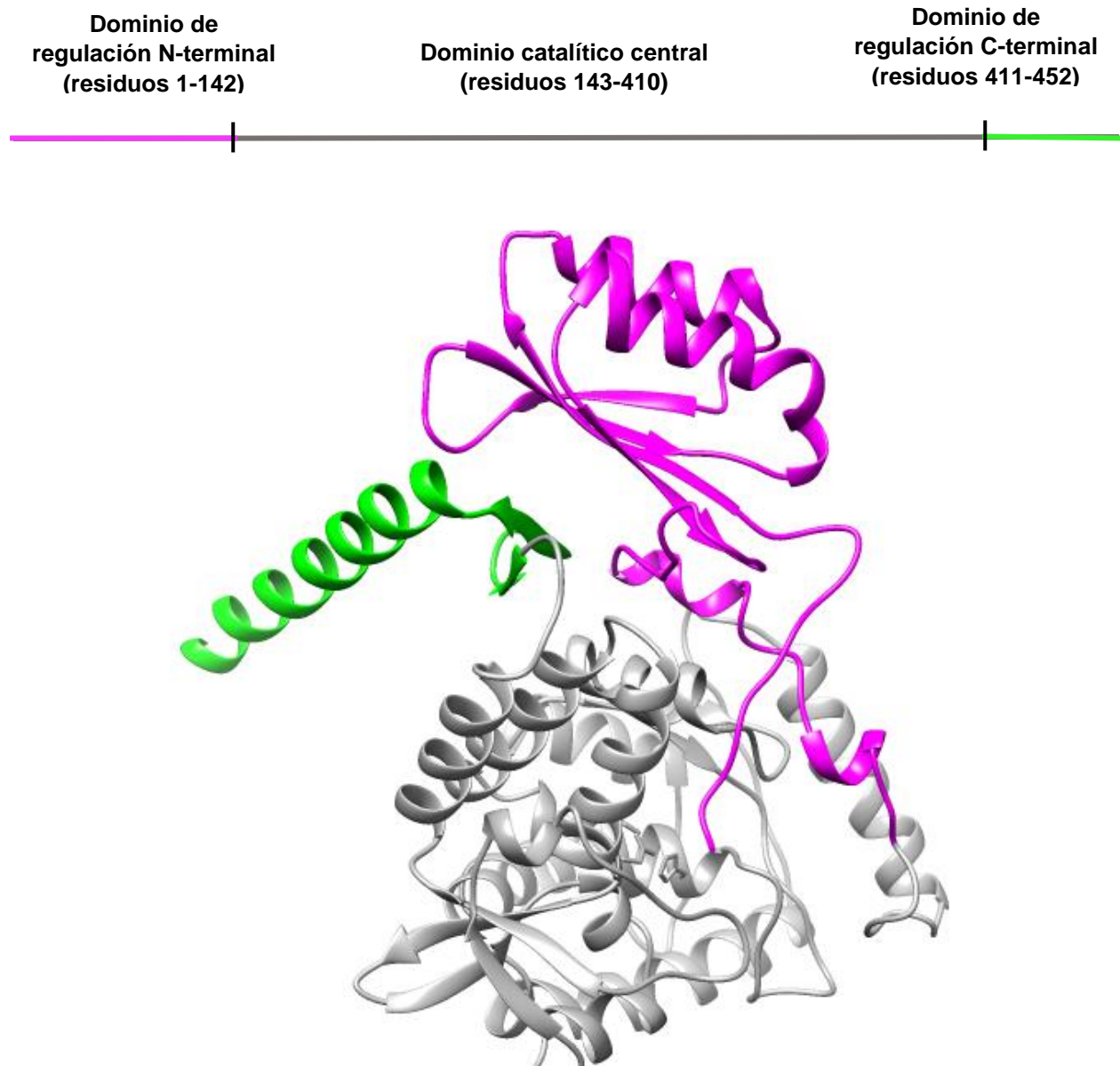
#### 1.2 Función, estructura y regulación de la fenilalanina hidroxilasa (PheOH).

PheOH es una monooxigenasa de función mixta que se encarga de llevar a cabo la parahidroxilación del anillo aromático de L-fenilalanina (L-Phe) para sintetizar L-tirosina (L-Tyr), paso limitante de velocidad en el catabolismo de L-Phe y la biosíntesis de neurotransmisores. En la reacción interviene un átomo de hierro no hemínico ( $\text{Fe}^{2+}$ ), tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) como donador de electrones y oxígeno molecular como sustrato adicional.

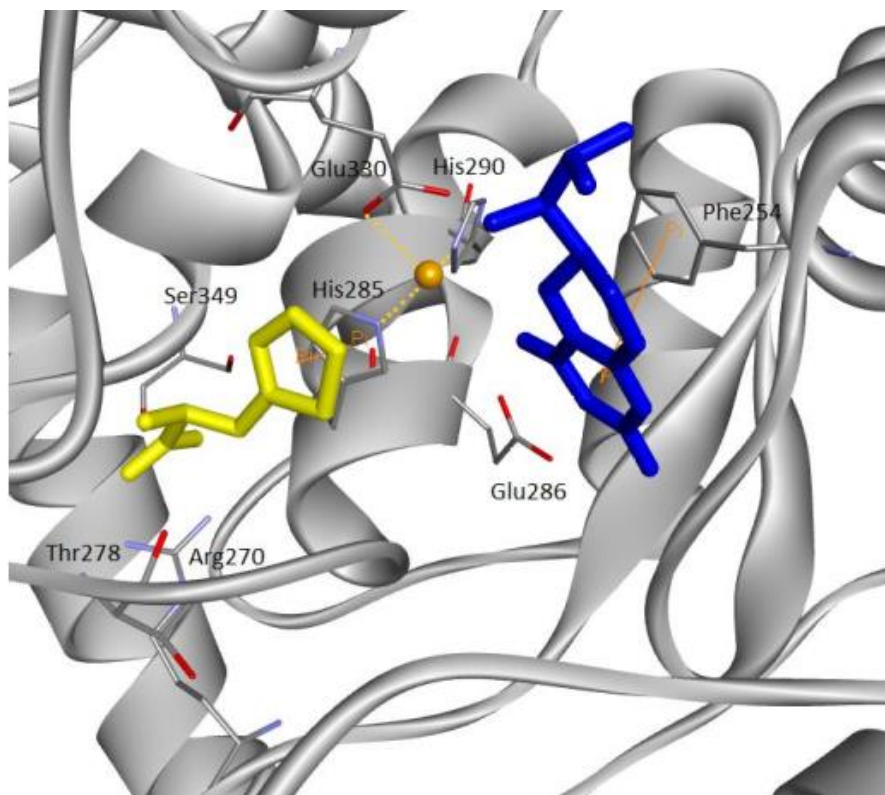
BH<sub>4</sub>, además de ser cofactor natural de PheOH, ha demostrado actuar como chaperona farmacológica que, sobre el enlace específico al sitio activo, restaura la función a través de la estabilización de variantes de PheOH mal plegadas <sup>[10]</sup>. No obstante, su eficiencia limitada así como su alto costo de síntesis, ha impulsado la búsqueda de PCs más potentes a través del cribado virtual de bases de datos de compuestos químicos.

Estructuralmente hablando, PheOH es una enzima tetramérica ensamblada como un dímero de dímeros y coexiste en equilibrio con una forma dimérica. Cada subunidad de 452 aminoácidos (cerca de 52 kDa) está organizada en tres dominios: *i*) un dominio de oligomerización C-terminal constituido por los residuos 411 al 452 que contiene una lámina  $\beta$  antiparalela implicada en la dimerización (residuos 411-427) seguida de un motivo de tetramerización helicoidal (residuos 428-452) que promueve la oligomerización a través de interacciones hélice-hélice antiparalelas, *ii*) un dominio catalítico central

constituido por los residuos 143 al 410 en el que se encuentra el sitio activo con un átomo de hierro coordinado a dos residuos de histidina (H<sub>285</sub>, H<sub>290</sub>), un residuo de ácido glutámico (E<sub>330</sub>) y tres moléculas de agua, además de los sitios de unión para el sustrato y el cofactor (BH<sub>4</sub>); y *iii*) un dominio de regulación N-terminal constituido por los residuos 1 al 142 <sup>[11]</sup> (obsérvese Ilustración 2 y 3).



*Ilustración 2. Organización de dominios funcionales en una subunidad de PheOH. Elaboración propia basada en Marie, G., & Harris, E. (2014) <sup>[26]</sup>.*



*Ilustración 3. Representación gráfica de los sitios de enlace de BH4 (en azul) y THA (análogo de L-Phe, en amarillo) en el sitio activo de PheOH. El átomo de hierro está representado como una esfera de color naranja. Imagen obtenida de Marie, G., & Harris, E. (2014) [26].*

El núcleo principal del dominio de regulación N-terminal contiene una secuencia motivo de alrededor de 79 aminoácidos (residuos 33-111) identificada como dominio ACT e involucrada en la regulación alostérica de un gran número de proteínas a través de aminoácidos específicos [12, 13]. Conjuntamente, también está presente una secuencia autoregulatoria (residuos 19-33) que se extiende sobre el sitio activo del dominio catalítico obstruyendo su entrada y, a menudo, es referida como un mecanismo de regulación intraestérico de la enzima [14].

En condiciones fisiológicas, PheOH es cuidadosamente regulada para mantener los niveles correctos de L-Phe en la sangre. Los principales mecanismos regulatorios incluyen: 1) activación alostérica por L-Phe, 2) inhibición por BH4 que mantiene a la enzima en estado de baja actividad específica y 3) activación adicional por fosforilación que incrementa la eficiencia alostérica de L-Phe [15, 16]. Particularmente, la forma

tetramérica funcional de PheOH exhibe una activación por sustrato y una cooperatividad positiva involucrando los tres dominios funcionales y cada una de las subunidades de la enzima <sup>[17]</sup>. La localización del sitio de enlace alostérico de L-Phe en la enzima aún no se ha definido completamente; sin embargo, tal ha sido el aporte de varias investigaciones acerca de éste modelo de regulación en PheOH, que pareciera se ha desatado una carrera para su pronta identificación que ayude a vislumbrar las bases moleculares para el mecanismo de regulación alostérico de esta enzima.

### 1.3 Problemática de estudio.

La fenilcetonuria ha sido objeto de una extensa investigación a lo largo de varios años, sin embargo, aún restan diversos aspectos que demandan más estudio. En este sentido, la realización de análisis estructurales de la enzima PheOH humana (en su forma silvestre y mutante) puede contribuir a mejorar la comprensión de la función y proveer una explicación molecular para los efectos estructura/función inducidos por mutaciones. Por lo tanto, este proyecto de investigación está encaminado a esclarecer cuidadosamente algunos aspectos estructurales que demandan una relevancia importante.

Partiendo de un enfoque computacional, el primer aspecto se asocia con la identificación de los determinantes moleculares que modulan la interacción entre PheOH humana y dos compuestos químicos particularmente interesantes en el ámbito farmacoterapéutico de la fenilcetonuria basado en chaperonas farmacológicas. Un segundo aspecto, pero no menos importante, involucra el estudio individual de una región estructuralmente importante dentro de la base estructural para la regulación alostérica de PheOH humana. Ya que a pesar de la gran cantidad de información recopilada a lo largo de las últimas décadas, la comprensión del papel que juega el dominio ACT como un módulo regulatorio estructural aún es limitada.

A continuación se detallan algunos datos experimentales y teóricos relevantes que servirán como punto de partida para desarrollar el análisis de la problemática abordada en este estudio.

#### 1.4 Antecedentes teórico-experimentales.

De un cribado virtual de 1,000 moléculas disponibles comercialmente en conjunto con ensayos de estabilidad térmica *in vitro*, se identificaron dos compuestos químicos descritos como componente III (3-amino-2-benzil-7-nitro-4-(2-quinolil)-1,2-dihidroisoquinolina-1-uno) y componente IV (5,6-dimetil-3-(4-metil-2-piridinil)-2-tioxo-2,3-dihidrotieno[2,3-d]pirimidina-4(1H)-uno) relevantes en el tratamiento de la fenilcetonuria basado en chaperonas farmacológicas. Ambos incrementaban significativamente la estabilidad y plegamiento de la conformación tetramérica funcional de PheOH humana de tipo silvestre y mutantes asociadas a fenilcetonuria clásica, la forma más frecuente y severa de la fenilcetonuria <sup>[18]</sup>.

A estas alturas aun resultaba difícil determinar la selectividad de ambos componentes en PheOH humana. No obstante, unos años más tarde se resolvió la primera estructura cristalizada de uno de ellos (correspondiente al componente IV) en complejo con PheOH humana <sup>[19]</sup>. En ella, el componente IV mostró coordinarse directamente con el átomo de hierro ( $Fe^{3+}$ ) a través de un átomo de nitrógeno (N1) sin desplazar ninguno de los aminoácidos que conforman el sitio activo (obsérvese Ilustración 4). Además, resultó ser un inhibidor competitivo débil de la actividad catalítica de PheOH humana, pero con la capacidad de estabilizar a ambas formas (tipo silvestre y mutante) *in vitro* e *in vivo*.

Debido a la alta similitud estructural entre PheOH humana y algunas enzimas dentro de la superfamilia de hidroxilasas de aminoácidos aromáticos (AAAHs), también se probó el efecto de ambos componentes (III y IV) en la enzimas de cerebro: tirosina hidroxilasa (TyrOH) y la isoforma TPH2 de la triptófano hidroxilasa (TrpOH), descartando la posibilidad de aparición de efectos indeseados para el tratamiento con ambos compuestos <sup>[20]</sup>, sentando así las bases para utilizarse como candidatos potenciales en el diseño racional de fármacos para el tratamiento de fenilcetonuria.

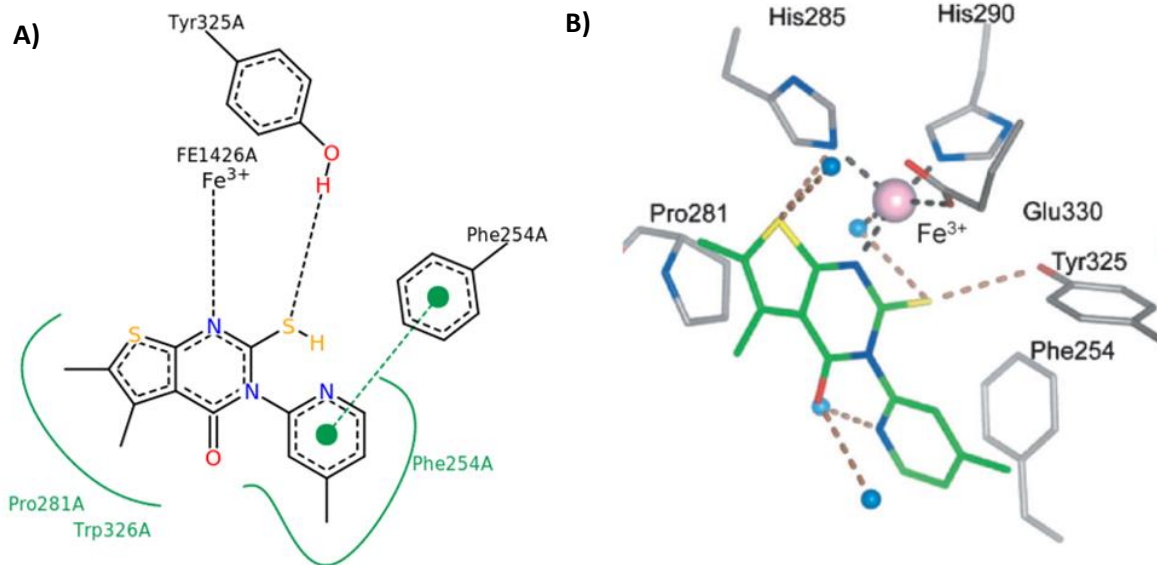
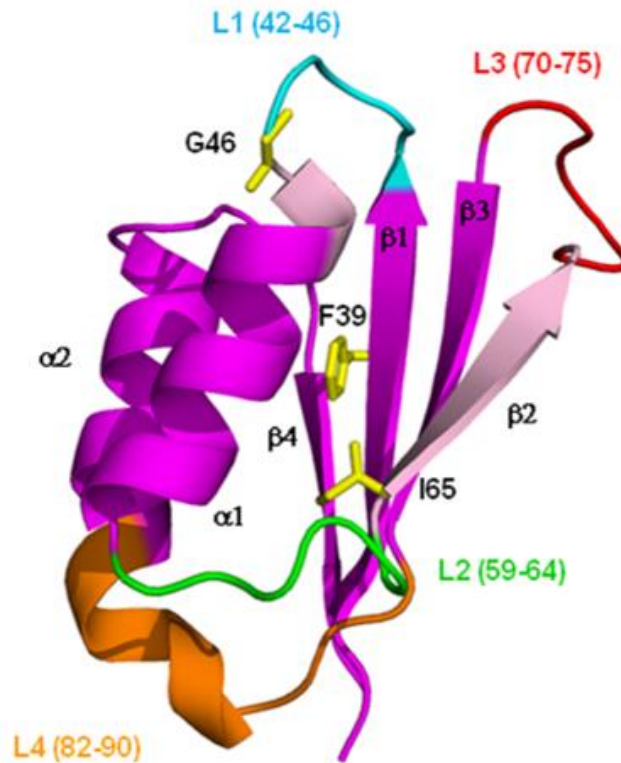


Ilustración 4. A) Representación 2D y B) representación 3D del modo de enlace del componente IV en el sitio activo de PheOH humana, respectivamente. Imagen obtenida de Torreblanca, R. y col. (2012) [19].

Por otra parte, gracias a varios estudios espectroscópicos y enzimáticos de formas truncadas y de longitud completa de PheOH humana, la activación cooperativa de la enzima por su sustrato (L-Phe) se interpretó como resultado de dos mecanismos principales. El primer mecanismo sugiere el enlace de L-Phe en un sitio de activación por subunidad, físicamente distinto del sitio activo y probablemente ubicado en el dominio de regulación N-terminal, permitiéndole a la enzima la transición de una forma inactiva a una activa como resultado de cambios conformacionales importantes tales como la exposición de regiones hidrofóbicas y cambios espectroscópicos [9, 17]. Por otro lado, el segundo mecanismo respalda el enlace cooperativo homotrópico de L-Phe a sitios activos, en el que el dominio de regulación N-terminal se involucra a través de interacciones con el dominio catalítico de la subunidad adyacente y el dominio de oligomerización en la misma subunidad, ambos indispensables para la transferencia de cambios conformacionales cooperativos a través de un *loop* prominente constituido por los residuos 68 al 75 [21, 22].

En 1999, a través de un análisis de secuencias iterativo, se reveló la existencia de una secuencia motivo que funciona como un módulo regulatorio estructural en un amplio

número de proteínas, todas ellas involucradas en la síntesis de purinas y aminoácidos y reguladas por aminoácidos específicos. Esta secuencia motivo a la cual llamaron dominio ACT (de las iniciales de las enzimas **A**spartato cinasa-**C**lorismato mutasa-**T**yrA (prefenato deshidrogenasa)) está constituida alrededor de 51 a 102 aminoácidos y presenta un plegamiento arquetípico  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ . Además, contiene dos secuencias motivo altamente conservadas GA(S)L e IERSP involucradas en el sitio de enlace de ligandos específicos en esta familia de proteínas. La existencia de esta secuencia motivo en PheOH humana (obsérvese Ilustración 5), extendió el debate sobre un sitio alostérico de enlace de L-Phe sobre el dominio de regulación N-terminal, más aun cuando apareció evidencia directa en la que la activación de la enzima por L-Phe no requería del enlace en sitios activos [23-25].



*Ilustración 5. Organización del dominio ACT de PheOH humana. Las secuencias GAL e IERSP se muestran en color magenta claro. Las regiones que contienen loops desde L1 hasta L4 se muestran en color cian, verde, rojo y naranja, respectivamente. Imagen obtenida de Carluccio, C. y col. [27].*

Debido a la importancia otorgada a la secuencia motivo o dominio ACT para la activación y cooperatividad positiva de PheOH humana por su sustrato (L-Phe), análisis estructurales y dinámicos, a través de simulaciones de dinámica molecular (DM), marcaron la pauta en la identificación de valiosos detalles para la comprensión de las bases moleculares para la regulación alostérica de esta enzima. A continuación, se enlistan aquellos más relevantes:

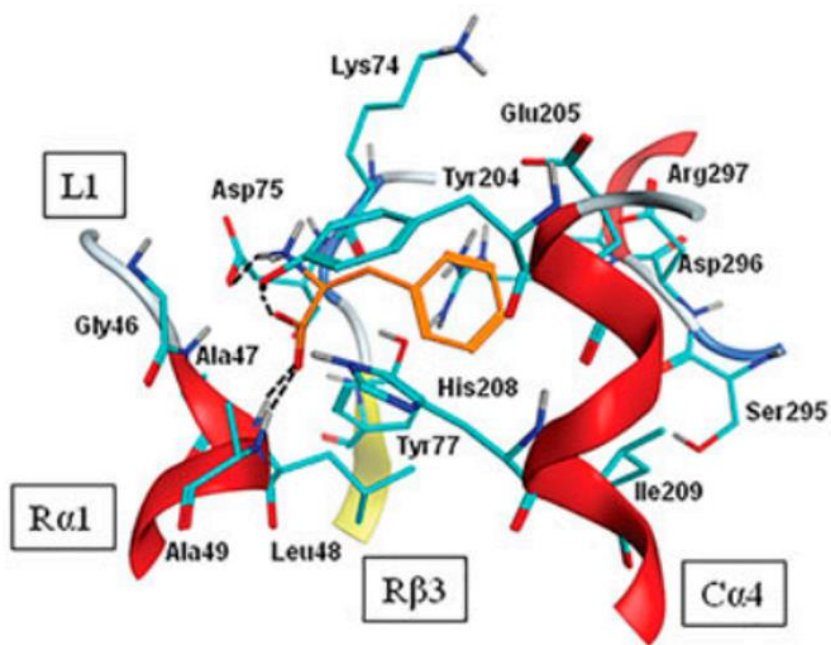
- Simulaciones del dominio ACT aislado (residuos 33-111) de PheOH humana registró importantes movimientos en las regiones *L2* (residuos 59-64), *L3* (residuos 70-75), *L4* (residuos 82-90) y una pequeña fluctuación de *L1* (residuos 42-45). En particular, la región *L2* sufrió un cambio conformacional de giro a una lámina  $\beta$  que resultó en la elongación de la lámina  $\beta 2$  (residuos 65-69, correspondiente a la secuencia motivo conservada IESRP). La elongación de  $\beta 2$  se asoció con la formación de un patrón de enlaces por puente de hidrógeno con la lámina  $\beta 3$  adyacente que permitió la estabilización de la lámina  $\beta$ , sugiriendo que ésta conformación derivada de la región *L2* es una conformación accesible e intrínsecamente estable del dominio de regulación N-terminal.

Una característica común de todos los movimientos intrínsecos globales del sistema, particularmente, los movimientos de las regiones *L1* y *L2*, se asoció a la existencia de un parche hidrofóbico, ubicado en la región entre la hélice  $\alpha 1$  y la lámina  $\beta 2$ . Este parche curiosamente contiene las secuencias motivo GAL e IERSP involucradas en el sitio de enlace de ligandos específicos de la familia de proteínas que contienen el dominio ACT, lo que permitió sugerir un probable sitio de interacción de la cadena lateral bencil de L-Phe <sup>[27]</sup>.

- Retomando éste hecho, el mismo grupo de trabajo tres años más tarde y apoyándose en la metodología de *acoplamiento molecular*, determinó un sitio de enlace alostérico de L-Phe ubicado en la interface entre los dominios de regulación N-terminal (subunidad A) y catalítico (subunidad B) de una forma dimérica de PheOH humana, correspondiente al parche hidrofóbico previamente identificado dentro del dominio ACT. El sitio de enlace fue definido por las residuos 43–49 (subunidad A), 51–52 (subunidad A), 54–55 (subunidad A), 60–63 (subunidad A),

65 (subunidad A), 67 (subunidad A), 77 (subunidad A), 204 (subunidad B), 207–208 (subunidad B), 211–212 (subunidad B), 215–216 (subunidad B), obsérvese Ilustración 6.

Por lo tanto, el siguiente punto es la identificación de los cambios estructurales asociados a la presencia de L-Phe en este supuesto sitio de enlace alostérico, mismos que darían paso a explicar los cambios conformacionales existentes en PheOH dimérica que, de acuerdo a estudios experimentales, generan a la forma tetramérica funcional de PheOH humana.



*Ilustración 6. Interacciones dentro del complejo formado por PheOH dimérica humana y L-Phe (representado en bastones color naranja). Las letras R y C se refieren a los dominios de regulación N-terminal y catalítico, respectivamente. Imagen obtenida de Carluccio, C. y col. [28].*

## Capítulo 2. Hipótesis y objetivos.

### 2.1 Hipótesis.

De acuerdo con los antecedentes previamente descritos, la hipótesis de este proyecto de investigación se expone de la siguiente manera:

A partir de siete modelos representativos de PheOH humana, que incluyen la forma silvestre y seis mutantes asociadas a fenotipos severos de fenilcetonuria, es posible determinar datos estructurales y energéticos que representen cómo el componente III y el componente IV se enlazan a la enzima, el sitio de enlace y las interacciones que gobiernan tal especificidad, mediante un estudio de *acoplamiento molecular*.

Además, a través de un estudio dinámico y estructural utilizando simulaciones de dinámica molecular (DM), es posible identificar cambios estructurales asociados a la presencia del aminoácido L-Phe sobre el dominio ACT.

### 2.2 Objetivo general.

Obtener datos estructurales y energéticos relevantes de la interacción entre dos chaperonas farmacológicamente activas y siete modelos representativos de PheOH humana y, de manera paralela, identificar datos dinámicos y estructurales asociados a la presencia del aminoácido L-Phe sobre el dominio ACT.

### 2.3 Objetivos específicos.

- Obtener ocho modelos tridimensionales representativos de PheOH humana a través del modelado molecular de estructuras proteicas basado en homología de secuencia.
- Aplicar metodología de *acoplamiento molecular* en modelos tridimensionales de PheOH humana, BH4 y dos chaperonas farmacológicas.
- Aplicar metodología de *acoplamiento molecular ciego* entre el modelo tridimensional del dominio ACT de PheOH humana y una molécula de L-Phe, utilizando a ambas especies químicas del aminoácido (la protonada y la desprotonada) por separado.
- Ejecutar simulaciones de Dinámica Molecular (MD) del dominio ACT sin enlazar y enlazado a una molécula de L-Phe.

## Capítulo 3. Fundamento teórico.

La utilización de métodos computacionales en distintas áreas de la ciencia es un campo que ha crecido exponencialmente durante los últimos años. Particularmente, la química computacional ha resultado ser eficiente en el estudio de la estructura y dinámica de sistemas tales como proteínas y membranas a diferentes escalas de tiempo (que van desde los femtosegundos hasta los milisegundos) <sup>[29]</sup>.

En esta sección se describirá brevemente el fundamento teórico de algunas técnicas computacionales más utilizadas en Biología: (1) modelado molecular de proteínas por homología (2) *acoplamiento molecular* y (3) dinámica molecular, mismas que resultan adecuadas para el desarrollo de los objetivos establecidos a lo largo de este proyecto de investigación.

### 3.1 Modelado molecular por homología.

La mayoría de las proteínas se forman con sólo 20 aminoácidos, pero sus posibles combinaciones conducen a un número inmanejable de secuencias y de probables conformaciones. La predicción de la estructura tridimensional real, a partir de la información de la secuencia de aminoácidos es un problema aún sin solución. Sin embargo, existen estrategias de cómputo que permiten estimar buenas predicciones y la de mayor éxito es el modelado por homología <sup>[30]</sup>.

Llamamos modelado molecular por homología a la técnica predictiva que permite obtener una aproximación de la estructura molecular de una cadena polipeptídica con base en estructuras conocidas de proteínas relacionadas (casi siempre homólogas). La proteína cuya secuencia se sabe, pero cuya estructura es desconocida, es el blanco, y el modelo conocido es el molde. Entre sus aplicaciones más importantes se incluyen desde el análisis del efecto de mutaciones hasta la predicción de ligandos y actividades catalíticas, en función de la calidad de los modelos, que a su vez depende de la elección de las estructuras molde y sus alineamientos contra la secuencia problema <sup>[31,32]</sup>.

En lo que respecta a las estructuras molde, en promedio el uso de varios de ellos produce modelos más precisos. Por otro lado, el alineamiento es la parte más importante del proceso de modelado, al establecer exactamente qué residuos de la estructura molde se

corresponden con qué residuos de la secuencia blanco. La medida más utilizada para medir esta semejanza o divergencia es el porcentaje de identidad de secuencia, o bien, los valores esperados de programas como BLAST.

Para realizar un modelado molecular por homología se requiere un uso extensivo y conocimiento de bases de datos de estructuras y de programas de cómputo adecuados. Una manera sencilla de realizar esta tarea involucra el empleo de servicios bioinformáticos automatizados tales como NCBI-BLAST. En estos servicios sólo tiene que someter la secuencia que desea modelar y esperar el resultado.

### 3.2 Acoplamiento molecular.

Esencialmente, el objetivo de la herramienta *acoplamiento molecular* es modelar la interacción del complejo receptor-ligando utilizando métodos de cómputo. Lo anterior se puede conseguir a través de dos pasos directamente interrelacionados: 1) el muestro de las conformaciones del ligando en los posibles sitios de enlace del receptor (generalmente una proteína) y 2) la evaluación de esas conformaciones a través de una función de puntuación.

A partir de la estructura tridimensional de una enzima, preferentemente con un ligando enlazado para identificar el sitio activo, el ligando puede removerse, y otros componentes pueden acoplarse dentro del sitio activo para identificar nuevas moléculas con una afinidad de enlace más fuerte. Dado que muchos medicamentos actúan inhibiendo enzimas específicas, en los últimos años esta herramienta se ha considerado esencial en el descubrimiento y desarrollo de fármacos con base en el cribado de bases de datos de compuestos químicos para seleccionar aquellos con efecto biológico en una categoría terapéutica deseada [33-35].

Un ligando dentro del sitio activo de una enzima rígida tiene seis grados de libertad (tres traslacionales y tres rotacionales) y considerando los grados de libertad conformacionales del receptor, se generan cientos de posibles modos de enlaces (también referidos como poses) entre ambas moléculas. En la práctica, el muestro de cada una de estas conformaciones resulta computacionalmente caro y, por lo tanto, se ha puesto particular énfasis en el desarrollado de algoritmos de muestro para utilizarse en programas de *acoplamiento molecular* (obsérvese Anexo 1).

Particularmente, los métodos estocásticos cobran una relevancia importante entre todos ellos, los cuales buscan aleatoriamente un espacio conformacional modificando la conformación del ligando o una población de ligandos. La ventaja principal de este tipo de métodos reside en la magnitud de la modificación de la conformación del ligando permitiéndole cruzar la barrera de energía sobre la superficie de energía potencial, un punto que no puede lograrse fácilmente a través de métodos como dinámica molecular. Ejemplo de algoritmos típicos dentro de esta categoría son los algoritmos genéticos y de Monte Carlo (MC) [36].

Los programas de *acoplamiento molecular* también utilizan una función de puntuación, que se puede entender como un intento de aproximar los potenciales químicos estándar del sistema. El propósito de ésta es diferenciar las poses correctas de las incorrectas en un tiempo razonable de cálculo.

Las funciones de puntuación pueden clasificarse en: a) empíricas, b) basadas en información experimental y c) basadas en campos de fuerza clásicos. El empleo de cada una de ellas depende estrictamente del objetivo de la investigación. Las funciones de puntuación basadas en campos de fuerza clásicos ofrecen particularmente la ventaja de refinar los resultados con otras técnicas, tales como métodos de energía lineal y perturbación de energía libre (PEL), mejorando significativamente la exactitud en la predicción de las energías de enlace [36].

Tomando en cuenta cada uno de los criterios antes mencionados y el cumplimiento de los objetivos planteados en este proyecto de investigación, se propuso la utilización del programa AutoDock Vina.

### 3.2.1 AutoDock Vina.

AutoDock Vina incorpora métodos estocásticos de optimización global tales como algoritmos genéticos, optimizaciones por enjambre de partículas (*Particle Swarm Optimization* o PSO) y alineamientos simulados de Monte Carlo, entre otros, combinados con procedimientos de optimización local para acelerar la optimización [37].

Su función de puntuación (EC. 1) está basada en el campo de fuerza AMBER e incluye interacciones electrostáticas, van der Waals, enlaces por puente de hidrógeno, entropía conformacional y términos de solvatación. La energía está en función del conjunto de

coordenadas cartesianas ( $r$ ), las cuales especifican las posiciones de los átomos implicados ( $i, j$ ). También está presente una serie de parámetros energéticos (A, B, C y D), las cargas atómicas ( $q$ ), la constante dieléctrica del medio ( $\epsilon$ ) y los valores geométricos de equilibrio. Cada término está ponderado usando un factor de escalamiento empírico obtenido de datos experimentales ( $W$ ) [38].

$$V(r) = W_{vdw_{i,j}} \sum \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond_{i,j}} \sum E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec_{i,j}} \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol_{i,j}} \sum (S_i V_j + S_j V_i e^{\left( \frac{-r_{ij}^2}{2\sigma^2} \right)}) \quad \text{EC. 1}$$

En general, el proceso de cálculo consiste de un número de ejecuciones independientes, empezando con conformaciones al azar generadas por variaciones en los ángulos torsionales del ligando. Cada ejecución cuenta con un número de pasos secuenciales, en la que cada paso secuencial involucra una perturbación de la conformación del ligando a través de una optimización local utilizando el algoritmo Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) y una selección en la cual se evalúa si el paso es aceptado o no. Cada optimización local involucra evaluaciones de la función de puntuación así como sus derivadas en las coordenadas posición-orientación-torsión, razón por la cual se acelera la optimización significativamente. El número de evaluaciones en la optimización local se determina de acuerdo con el criterio energético de Metrópolis. Finalmente, cada conformación resultante es combinada, refinada, agrupada y sorteada automáticamente para producir el resultado final.

### 3.3 Dinámica molecular.

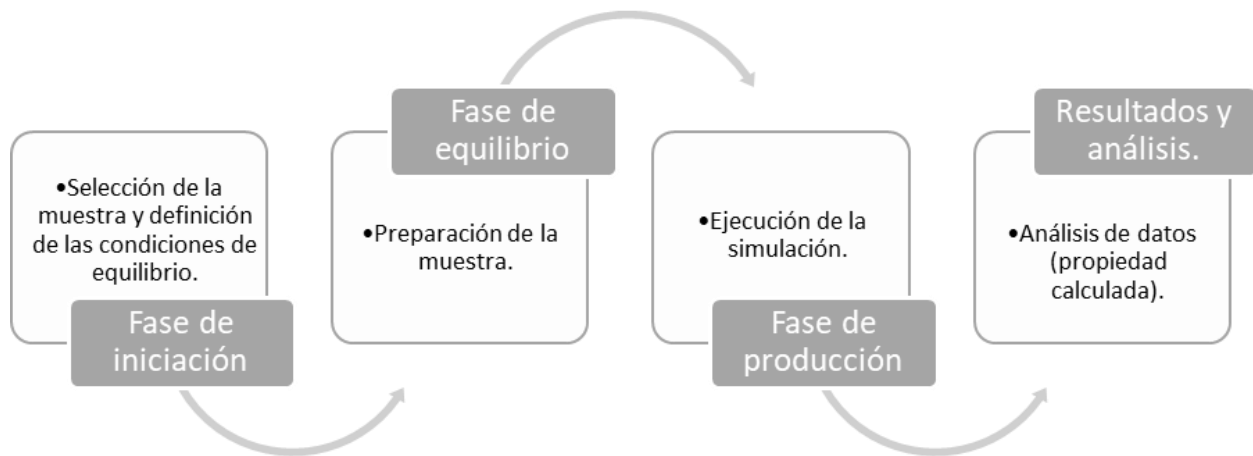
La dinámica molecular (*Molecular dynamics*) es una técnica computacional que permite estudiar el comportamiento de un sistema físico (sólido, líquido o gaseoso) a nivel atómico. Operacionalmente, a partir de la integración de las ecuaciones de movimiento de Newton, se generan una serie de configuraciones sucesivas del sistema dando como resultado una trayectoria que describe como las posiciones, velocidades y orientaciones de las partículas cambian con el tiempo y, es entonces, cuando a partir de la trayectoria se pueden obtener las propiedades macroscópicas del sistema de tipo estáticas y dinámicas [39].

En general, el uso de esta técnica se aplica para el análisis de prácticamente cualquier sistema fisicoquímico, siempre y cuando se disponga de una configuración inicial adecuada. En los últimos años, quizás el mayor interés ha surgido alrededor de su aplicación a sistemas biológicos tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc. [40].

### 3.3.1 El método de dinámica molecular.

Una simulación de dinámica molecular se constituye de cuatro etapas básicas: 1) fase de iniciación, 2) fase de equilibrio, 3) fase de producción y 4) resultados y análisis (obsérvese Diagrama 1) [38-43].

Diagrama 1. Diferentes etapas de una simulación de dinámica molecular. Obtenido de Lozano-Aponte, J. & Scior, T. (2014) [40].



Para iniciar una simulación de dinámica molecular, es necesario disponer de un modelo conformado por partículas del sistema físico que se desea simular.

Para un sistema compuesto por  $N$  partículas, una caracterización detallada de las interacciones entre las partículas del sistema se realiza a través de una función de energía potencial intermolecular representada como  $U(r^N)$ . La notación  $r^N$  representa el conjunto de vectores que localizan los centros de masas atómicos,  $r^N = \{r_1, r_2, r_3, \dots, r_N\}$ . Cuando se asignan valores para el conjunto  $r^N$  entonces se define la configuración del sistema. En general, se asume que las partículas interactúan bajo una función de energía potencial por pares. Por lo tanto,  $U(r^N)$  ahora se ve representada como:

$$U = \sum \sum_{i < j} u(r_{ij}) \quad \text{EC. 2}$$

donde  $u(r_{ij})$  es una función de energía potencial entre dos partículas, cuya forma es conocida y  $r_{ij}$  es la distancia escalar entre las partículas  $i$  y  $j$ .

Una vez generada la estructura de partida, ésta se refina energéticamente utilizando un algoritmo de minimización, que permite eliminar posibles tensiones locales derivadas de solapamientos atómicos o de distorsiones de enlaces o ángulos. Además, es convencional añadir condiciones de límite periódicas, creciendo el sistema periódicamente en todas las direcciones garantizando que el número total de partículas se mantenga constante.

Finalmente para completar la definición del sistema, es necesario agregar moléculas de disolvente (generalmente agua) y contraiones, como un intento de modelar las moléculas en disolución de la forma más realista posible. La omisión de moléculas de agua en el modelo podría conllevar a la distorsión de la estructura proteica. Por otro lado, los contraiones (por ejemplo, moléculas de NaCl) cumplen con la función de mantener la neutralidad eléctrica de la solución.

El paso más importante dentro de la fase de iniciación consiste en la asignación de velocidades a las partículas que conforman el sistema. Lo anterior se logra seleccionándolas aleatoriamente desde una distribución de Maxwell-Boltzmann a una temperatura de interés.

Continuando con la preparación de la muestra, la siguiente etapa constituye la fase de equilibración, en la cual el objetivo es que el promedio de las variables termodinámicas que describen el sistema, no cambien al incrementarse el tiempo de simulación. Lo anterior se logra incluyendo algunos ensambles estadísticos dictado por el problema de estudio abordado. Si se describe al sistema en el ensamble microcanónico NVE (son constantes el número de partículas, volumen y energía total), en el ensamble canónico NVT (son constantes el número de partículas, volumen y la temperatura) o en el ensamble isobárico-isotérmico NPT (son constantes el número de partículas, la presión y la temperatura).

La temperatura y la presión son un factor importante dentro de la etapa de equilibración. Varias medidas experimentales son hechas bajo condiciones como 300 K y una presión de 1 bar. Por lo tanto, las simulaciones bajo estas condiciones deben ser mucho más relevantes para poder comparar con los datos experimentales.

El valor instantáneo de la temperatura se mide en términos de la energía cinética media:

$$\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i \langle v_i^2 \rangle = \frac{3}{2} N k_B T \quad \text{EC. 3}$$

donde  $m_i$  y  $\langle v_i^2 \rangle$  son la masa y el cuadrado de la velocidad media del átomo  $i$ , respectivamente. Y  $k_B$ , es la constante de Maxwell-Boltzmann.

Una práctica común para controlar la temperatura en el sistema es escalar las velocidades hasta alcanzar la temperatura deseada (por ejemplo, 300 K). Lo anterior se logra ajustando al sistema un baño de calor externo a la temperatura deseada (por ejemplo, un termostato de Berendsen), el cual funciona como una fuente de energía térmica que suple o elimina calor al sistema tanto como sea apropiado. Las velocidades son escaladas en cada paso, de tal forma que la velocidad de cambio de la temperatura sea proporcional a la diferencia de temperatura entre el baño y el sistema:

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{1}{\tau} (T_{\text{baño}} - T(t)) \quad \text{EC. 4}$$

donde  $\tau$  es un parámetro de acoplamiento que indica qué tan acoplado está el baño de calor y el sistema,  $T_{\text{baño}}$  es la temperatura del baño externo y  $T(t)$  es la temperatura a la que se encuentra el sistema en el tiempo  $t$ .

Por otro lado, así como es necesario mantener el sistema a temperatura constante, también es necesario mantenerlo a presión constante, lo que permite al sistema ser explorado como función de la presión. Un sistema macroscópico mantiene la presión constante variando su volumen (como lo describe el ensamble isotérmico-isobárico). La mayoría de los métodos para el control de la presión son análogos a aquellos utilizados para el control de la temperatura. Una alternativa es acoplar al sistema a un baño externo de presión a la presión deseada (por ejemplo, 1 bar). Por lo tanto, retomando la definición de la EC.4, la velocidad de cambio para la presión está dada por:

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_p} (P_{baño} - P(t)) \quad \text{EC. 5}$$

donde  $\tau_p$  es un parámetro de acoplamiento que indica qué tan acoplado está el baño de presión y el sistema.  $P_{baño}$  es la presión del baño externo y  $P(t)$  es la presión a la que se encuentra el sistema en el tiempo  $t$ .

Durante la etapa de equilibración, las variables termodinámicas que describen el sistema son monitoreados e independientemente del sistema simulado, estas incluyen energías potencial, cinética y total, velocidades, temperatura y presión. Cuando esas variables alcanzan valores estables, es cuando la fase de producción puede iniciar.

Durante la fase de producción se calculan las propiedades macroscópicas y otros datos relevantes del sistema a partir de los valores promedios extraídos de la trayectoria del sistema.

La trayectoria se obtiene integrando numéricamente las ecuaciones diferenciales de la segunda ley de Newton (EC. 6), la cual describe el movimiento de una partícula de masa  $m_i$  a lo largo de la coordenada  $x_i$  con  $F_{x_i}$  siendo la fuerza sobre la partícula en esa dirección.

$$\frac{d^2x_i}{dt^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \quad \text{EC. 6}$$

Existen varios algoritmos para integrar las ecuaciones de movimiento de Newton usando métodos de diferencia finita, los cuales son utilizados para generar trayectorias cuando se trabaja con modelos de potencial continuo, es decir, modelos donde el movimiento de las partículas que lo componen está acoplado, dando lugar a un problema de varios cuerpos que no puede resolverse analíticamente. Los diferentes algoritmos incluyen el algoritmo de Varlet estándar, el algoritmo *Leap-frog*, el algoritmo de velocidad de Varlet, así como como el algoritmo corrector-predictor.

Todos los algoritmos asumen que las posiciones y propiedades dinámicas (velocidades, aceleración, etc.) pueden aproximarse como expansiones de las series de Taylor:

$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta t v(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 a(t) + \dots \quad \text{EC. 7}$$

donde  $r(t)$ , es la posición al tiempo  $t$ ,  $v$  es la velocidad (la primera derivada de la posición respecto del tiempo),  $a$  es la aceleración (la segunda derivada de la posición respecto del tiempo) y  $r(t + \delta t)$  la nueva posición tras un pequeño intervalo de tiempo, también llamado paso de tiempo  $\delta t$ . El paso de tiempo debe ser lo suficientemente breve (del orden de 0.5-1 femtosegundos) para que la fuerza que actúa sobre la nueva posición no difiera mucho de la registrada en la posición original.

Aunque no lo pareciera, el paso de tiempo ( $\delta t$ ) puede considerarse un factor limitante de la duración de la simulación que generalmente se ve restringida a tiempos menores debido a los movimientos de alta frecuencia presentes en el sistema tales como la vibración de enlaces y ángulos que, son a menudo, de menor interés que los modos de frecuencia más baja para los cuales corresponden cambios conformacionales importantes. Una forma de solucionar esta limitación, particularmente en la dinámica molecular, es forzar al sistema a satisfacer ciertas restricciones que generalmente incluyen valores de equilibrio para enlaces y ángulos de enlace entre las partículas del sistema. El método comúnmente utilizado para aplicar restricciones es el procedimiento SHAKE de Ryckaert, Ciccotti y Berendsen, la ventaja general de este procedimiento implica prolongar el paso de tiempo hasta 2 femtosegundos.

## Capítulo 4. Metodología.

La metodología general contempló las siguientes tres etapas:

4.1 Construcción de siete modelos de longitud completa para PheOH humana y un modelo de un segmento del dominio de regulación N-terminal correspondiente al dominio ACT.

Pese a la diversidad de estructuras reportadas para PheOH humana (obsérvese Anexo 2), aún no ha sido determinada íntegramente una estructura de longitud completa para esta enzima. En este contexto, la predicción de la estructura tridimensional de longitud completa resulta ser un paso determinante en el análisis estructural descrito a lo largo de este proyecto de investigación. Razón por la cual, se propone el uso de la técnica *modelado molecular por homología*.

La forma más sencilla de llevar a cabo un modelado por homología, incluye el manejo de servicios bioinformáticos que convierten una tarea compleja en algo sencillo para el

usuario. Para la construcción de ocho modelos representativos de PheOH humana, que incluyen la forma silvestre, seis variantes asociadas a fenotipos severos de fenilcetonuria (obsérvese Anexo 3) y un segmento del dominio de regulación N-terminal correspondiente al dominio ACT, se consideró el uso de un servicio en línea dedicado a la construcción de modelos por homología de estructuras proteicas a diferentes niveles de complejidad llamado SWISS-MODEL <sup>[44]</sup>. Entre sus ventajas principales se destacan la disposición de un espacio personal de trabajo en donde varios proyectos de modelado molecular pueden llevarse a cabo en paralelo, la inclusión del usuario en los detalles del proceso de modelado según lo desee y una excelente evaluación posterior de la calidad del modelo construido.

Dependiendo de la dificultad de la tarea de modelado, SWISS-MODEL ofrece tres tipos diferentes de modos para realizarla y cada uno difiere en la cantidad de intervención del usuario: 1) modo automatizado, 2) modo alineamiento y 3) modo proyecto.

Para el modo automatizado, elegido en el proceso de construcción de nuestros modelos, se proporcionó únicamente el código de acceso UniprotKB <sup>[45]</sup>, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de PheOH humana como dato inicial. Para el caso particular de las variantes de PheOH humana y el dominio ACT, las secuencias de aminoácidos fueron proporcionadas manualmente.

La búsqueda de las estructuras molde involucró la examinación de la librería de moldes de SWISS-MODEL con ayuda de las herramientas BLAST <sup>[46]</sup> y HHblits <sup>[47]</sup>. Para cada estructura molde identificada, la predicción de su calidad en base a las características del alineamiento secuencia blanco y estructura molde, permitió la clasificación y selección de aquella con la calidad más alta.

En ambos casos, la estructura molde seleccionada para la construcción de nuestros modelos corresponde a la estructura de una forma tetramérica de PheOH de rata <sup>[48]</sup>. Los criterios que determinaron su selección se incluyen en la Tabla 1 y 2, respectivamente.

La evaluación de la calidad para cada modelo construido se llevó a cabo en términos de la función de puntuación QMEAN <sup>[49]</sup>.

Tabla 1. Criterios concluyentes en la selección de la estructura molde para la construcción de siete modelos de longitud completa de PheOH humana.

Estructura molde (Código PDB)	Identidad de secuencia	Estado oligomérico	Encontrado por	Método	Resolución	Similaridad de secuencia	Cobertura
Fenilalanina hidroxilasa de rata (5DEN)	92.48 %	Homo-tetramero	HHblits	Difracción de rayos X	2.9 Å	0.59	1.00

Tabla 2. Criterios concluyentes en la selección de la estructura molde para la construcción de un modelo del dominio ACT de PheOH humana.

Estructura molde (Código PDB)	Identidad de secuencia	Estado oligomérico	Encontrado por	Método	Resolución	Similaridad de secuencia	Cobertura
Fenilalanina hidroxilasa de rata (5DEN)	88.6 %	Homo-tetramero	BLAST	Difracción de rayos X	2.9 Å	0.55	1.00

4.2 Ejecución de simulaciones de *acoplamiento molecular* entre PheOH humana, BH4 y dos chaperonas farmacológicas.

Como primera aproximación, BH4, el componente III y el componente IV fueron acoplados en cada uno de los modelos de PheOH humana previamente construidos, utilizando la metodología de *acoplamiento molecular semirígido*. En ella, la estructura molecular del receptor fue tratada como rígida y los ligandos como moléculas flexibles con un número de enlaces rotables activos que oscilan entre 1 y 5.

Las estructuras químicas de los ligandos, excepto para el componente IV, fueron extraídas de la base de datos PubChem [50]. El identificador de estructura única (CID, por su siglas en inglés) para BH4 y el componente III corresponde a 1125 y 272925, respectivamente. Para el caso particular del componente IV, su estructura química fue extraída de la estructura cristalizada resuelta por Torreblanca y col. (2012). El código de

acceso Protein Data Bank (PDB) <sup>[51]</sup> corresponde a 4ANP. A la par, como parte del proceso de aprendizaje se propuso la construcción de las estructuras químicas para cada molécula seguida de una optimización de geometrías a través del método B3LYP y la función de base 6-31+G\*\* con ayuda de los programas GaussView <sup>[52]</sup> y Gaussian 09 <sup>[53]</sup>. Sin embargo, como parte del método de validación de cálculo a través de la comparación de tres parámetros estructurales (entre los que se incluyen distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros) calculados frente a los determinados experimentalmente para cada molécula, éste falló para los ángulos diedros mostrando desviaciones estándar poco favorables, razón por la cual se optó por utilizar sólo las estructuras cristalizadas de rayos X.

Para asegurar la eficiencia de cada simulación, se tomó particular cuidado en el proceso de preparación de las estructuras moleculares del receptor y de los ligandos. Llevándose a cabo según lo establecido en el manual de usuario *Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDock Tools* <sup>[54]</sup> y un video tutorial disponible en el sitio web oficial de AutoDock Vina <sup>[55]</sup>.

La interface gráfica AutoDock Tools <sup>[56]</sup> se utilizó para generar los archivos de estructura molecular (extensión PDBQT) necesarios para llevar a cabo cada simulación de *acoplamiento molecular* y, una vez completadas, permitió visualizar interactivamente los resultados en tercera dimensión.

La definición del espacio tridimensional de búsqueda de posibles configuraciones espaciales entre el receptor y el ligando conocido como *mallado* se determinó a raíz de la evidencia biológica proporcionada por Torreblanca, R. y col (2012) <sup>[19]</sup>, por lo que se posicionó directamente sobre el sitio activo de la enzima.

Los parámetros para cada simulación fueron los mismos para mantener una igualdad de condiciones al momento de analizar los resultados. El *mallado* posee un tamaño de 27,000 Å<sup>3</sup>. Cuyos valores en sus ejes (X, Y y Z) se fijaron a 30 Å y el espaciado correspondió al valor predeterminado (0.375 Å), según lo establecido en el manual de usuario <sup>[54]</sup>. El número máximo de ejecuciones se fijó a 8, mientras que 9 fue el número máximo de modos de enlace a generar con una diferencia de energía máxima entre el

mejor modo de enlace y el peor de 3 kcal/mol, criterio que permitió descartar cambios significativos en la afinidad por el receptor de las soluciones seleccionadas.

Para validar el funcionamiento del programa AutoDock Vina, previo al *acoplamiento* de los 21 complejos abordados en este proyecto, se realizó un *re-acoplamiento* del ligando co-cristalizado de las estructuras de las entradas PDB: IJ8U y 4ANP (ver Anexo 2) para utilizarlas como referencia en el análisis de los resultados obtenidos.

4.3 Ejecución de simulaciones de Dinámica Molecular del dominio ACT de PheOH humana enlazado a una molécula de L-Phe.

Una vez obtenido el modelo por homología del dominio ACT de PheOH humana, se efectuó una optimización de geometría exclusivamente sobre la estructura para disminuir la tensión contenida y evitar que se colapse durante el procedimiento de preparación para simulaciones de dinámica molecular (DM). La optimización de geometría del sistema se realizó en el programa WebLab Viewer <sup>[57]</sup> con un campo de fuerzas tipo Dreiden <sup>[58]</sup>, propio del programa.

Se ejecutaron dos simulaciones de dinámica molecular con una longitud de 30 y 105 nanosegundos logrando asegurar un equilibrio estructural para ambos sistemas. Se utilizó el paquete GROMACS 4.6.5 <sup>[59]</sup> y el campo de fuerzas GROMOS43A1 <sup>[60]</sup>. La primera simulación incluyó el dominio ACT sin enlazar como sistema control. La segunda simulación incluyó al dominio ACT enlazado a una molécula de L-Phe. Ésta fue adjunta a una región aproximada a la descrita por Carluccio, C. y col. (2016) <sup>[28]</sup> como supuesto sitio de enlace del aminoácido.

Para unir L-Phe al dominio ACT, se usó la metodología de *acoplamiento molecular* y el paquete AutoDock Vina. Empleando ambas herramientas, se realizó un *acoplamiento molecular ciego* explorando cada posibilidad de enlace del aminoácido sobre el dominio ACT. Para lo cual se optó por utilizar ambas especies químicas del aminoácido, es decir, su forma protonada y desprotonada. Finalmente, para obtener un archivo único de estructura molecular que incluyera al complejo formado entre el dominio ACT y L-Phe nuevamente se usaron las herramientas dispuestas en WebLab Viewer.

El procedimiento general para la configuración de ambas simulaciones involucró las mismas variables para delimitar inconsistencias en los resultados. El sistema inicial fue minimizado energéticamente con 5,000 pasos del método de máxima pendiente. Posterior a ello, el sistema fue solvatado en una celda unitaria triclinica que contenía moléculas de agua tipo SPC (*Simple Point Charge*) [61]. La distancia mínima entre el modelo del dominio ACT y el borde de la celda se fijó en 12 Å. No fue necesario agregar iones de Na<sup>+</sup> o Cl<sup>-</sup> en exceso ya que el sistema presentó una carga neta de cero.

El sistema se equilibró durante 2.5 picosegundos con restricciones en todos los átomos del sistema para las condiciones NPR (dinámica molecular de posición restringida), de la misma forma ocurrió para las condiciones NVT (simulación a volumen, temperatura y número de partículas constante) y NPT (simulación a presión, temperatura y número de partículas constante) a temperatura de 300 K y una presión de 1 bar.

El algoritmo Berendsen [62] fue aplicado para la temperatura y la presión de acoplamiento. El método campo reactivo (*Reaction-Field*) [63, 64] fue utilizado para calcular la contribución electrostática de las interacciones no enlazantes con un *corte* en la distancia de 14 Å para el sistema sin enlazar y 11 Å para el sistema enlazado. Ambos cortes en la distancia también se aplicaron para las interacciones van der Waals, respectivamente.

Las trayectorias de ambas dinámicas fueron analizadas usando las herramientas de análisis de GROMACS 4.6.5. La representación gráfica de las trayectorias fue reproducida con el software Visual Molecular Dynamics [65] y PyMOL [66].

## Capítulo 5. Resultados y discusión.

A continuación, el análisis y discusión de los resultados obtenidos se presentan en orden a la metodología antes planteada.

5.1 Construcción de siete modelos de longitud completa para PheOH humana y un modelo de un segmento del dominio de regulación N-terminal correspondiente al dominio ACT.

La calidad global y local para cada uno de los modelos construidos por SWISS-MODEL, se evaluó en términos de la función de puntuación QMEAN y cuatro descriptores estructurales estadísticos (obsérvese Tabla 3). La función de puntuación QMEAN provee

un estimado del *grado de naturaleza* de las características observadas en el modelo e indica si éste es de calidad comparable a las estructuras experimentales en promedio. Para evaluar la calidad de los modelos, QMEAN utiliza cuatro descriptores estructurales: dos potenciales de interacción de fuerza media (dependientes de la distancia) basados en los átomos de C $\beta$  y en todos los átomos para evaluar interacciones de largo alcance, un ángulo de torsión potencial sobre tres aminoácidos consecutivos para analizar la geometría del esqueleto local de la estructura y un potencial de solvatación para describir el estado de exposición de los residuos en la estructura.

En general, la predicción de la calidad global para la mayoría de los modelos construidos se clasificó como *buena* comparada a la de las estructuras experimentales en promedio, ya que los puntajes asociados a QMEAN están muy cerca del cero. Valores por encima de cero, es decir, valores positivos indican una predicción de la calidad mucho más alta que las de las propiedades descritas en las estructuras experimentales en promedio, ejemplo de ello, son los descriptores estructurales de *interacción potencial entre todos los tipos de átomos y energía de solvatación*.

El descriptor *ángulos de torsión* presentó diferencias significativas, especialmente para los modelos de las variantes p.R261P, p.R270K y el dominio ACT. Además, estos modelos también presentaron variaciones en los puntajes para cada uno de los descriptores restantes. Por lo que es posible asociar, al menos para el caso de las variantes, la disminución de la predicción de la calidad de los modelos con el efecto de la mutación pertinente.

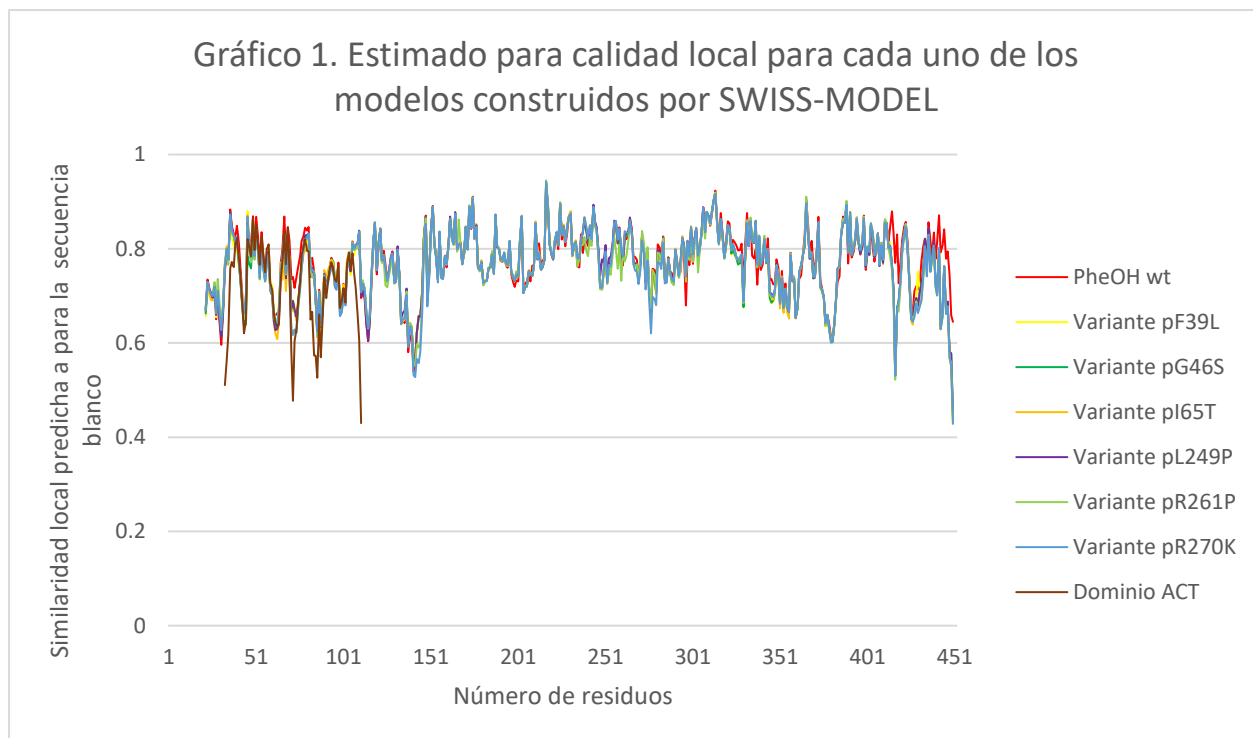
Para las variantes p.F39L y p.I65T, los puntajes asociados a QMEAN y cada uno de los descriptores estructurales estadísticos son muy parecidos entre ellos pero aún están por encima de los puntajes para PheOH de tipo silvestre (de aquí en adelante descrita como PheOHwt) , también haciendo evidente un posible efecto de las mutaciones asociadas.

Tabla 3. Estimado de calidad global para cada modelo construido por SWISS-MODEL en términos de la función de puntuación QMEAN y cuatro descriptores estructurales estadísticos.

Modelo construido	QMEAN	Interacción entre los átomos de C $\beta$	Interacción entre todos los tipos de átomos	Energía de solvatación	Ángulos de torsión
PheOHwt	-1.12	-0.52	0.04	0.40	-1.08
Variante p.F39L	-1.16	-0.59	0.16	0.44	-1.19
Variante p.G46S	-1.22	-0.44	0.17	0.47	-1.28
Variante p.I65T	-1.18	-0.58	0.11	0.48	-1.22
Variante p.L249P	-1.04	-0.58	0.16	0.47	-1.08
Variante p.R261P	-1.46	-0.52	0.14	0.55	-1.54
Variante p.R270K	-1.41	-0.51	0.16	0.46	-1.47
Dominio ACT	-1.36	-1.00	-0.77	0.11	-1.08

Por otro lado, para resaltar la predicción de la calidad local de cada modelo, se optó por utilizar un gráfico de dispersión básico. Éste muestra, para cada residuo del modelo (expresados en el eje x), la similitud esperada frente a la secuencia blanco (expresada en el eje y). Cada conjunto de valores está representado con un color diferente (obsérvese Gráfico 1).

En general, no se observan diferencias significativas en los estimados de calidad local para cada modelo, indicando un buen ajuste con los resultados del estimado para la calidad global.



Puntajes por debajo de 0.6 representan una predicción de baja calidad. En PheOHwt el 0.95% de residuos presentó una similaridad de secuencia por debajo de 0.6. Para todas las variantes, este porcentaje aumentó a 1.63%. No obstante, el Dominio ACT presentó el mayor porcentaje de residuos (11.39%) con una similaridad de secuencia por debajo de 0.6.

Para PheOHwt y cada una de las variantes, existen residuos que no pueden predecirse correctamente tales como Y<sub>138</sub>, E<sub>141</sub> y L<sub>142</sub>, para los cuales la predicción de su calidad resultó ser baja (0.59, 0.54 y 0.55, respectivamente). Este hecho puede atribuirse probablemente a la variación existente para el descriptor *ángulos de torsión* observada en la evaluación del estimado para la calidad global. Por otro lado, resulta particularmente interesante el estimado de la calidad local para el modelo del dominio ACT. En éste, la mayoría de los residuos que presentan una similaridad de secuencia por debajo de 0.6 están ubicados en las estructuras de los *loops* (G<sub>33</sub>, A<sub>34</sub>, R<sub>71</sub>, L<sub>72</sub>, D<sub>84</sub>, K<sub>85</sub>, R<sub>86</sub>, L<sub>88</sub>, R<sub>111</sub>) y, por lo tanto, se puede inferir una posible relación entre la movilidad incrementada de la estructura debido a su modelado individual y, en consecuencia, la pérdida de contactos importantes que ayuden a estabilizarla.

5.2 Simulaciones de acoplamiento molecular entre PheOH, BH4 y dos chaperonas farmacológicas.

A continuación en las Tablas 4-7, se presentan los resultados de todos los complejos moleculares considerados. Para cada una, los residuos en azul claro están involucrados en enlaces por puente de hidrógeno.

*Tabla 4. Energía de afinidad de enlace e interacciones resultantes para el re-acoplamiento de las Entradas PDB 1J8U y 4ANP.*

Entrada PDB	Ligando	Energía de afinidad de enlace (kcal/mol)	Interacciones resultantes en los sitios de enlace	Interacciones reportadas <sup>[19, 29]</sup>
1J8U	BH4	-7.2	S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , Y <sub>325</sub> , FE <sub>2428</sub>	G <sub>247</sub> , L <sub>249</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub>
4ANP	Componente IV	-8.7	L <sub>249</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , W <sub>326</sub> , FE <sub>1428</sub>	F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , Y <sub>325</sub> , W <sub>326</sub> , FE <sub>1426</sub>

La evaluación de los resultados de la Tabla 4 permitió asegurar exitosamente el funcionamiento del programa AutoDock Vina. En ambas entradas PDB, se logró reproducir la mayoría de las interacciones reportadas en la base de datos Protein Data Bank (PDB). Para la entrada PDB 1J8U se reprodujeron dos de cuatro interacciones, mientras que para la entrada PDB 4ANP, se reprodujeron cuatro de cinco interacciones. En cuanto a la energía de afinidad de enlace, existe una diferencia importante entre cada entrada PDB (~1.5 kcal/mol). Por lo que es posible inferir la importancia del número de interacciones presentes en cada complejo. Además, la presencia de un enlace por puente de hidrógeno entre BH4 y el residuo de Y325, parece desempeñar un papel importante en la orientación de la molécula de BH4 dificultando el contacto con otros residuos que le permitan una mayor afinidad de enlace.

Para las tablas 5 y 6, la información arrojada para la energía de afinidad de enlace no permite obtener información relevante puesto que para cada compuesto (BH4, componente III y componente IV) acoplado en sus respectivos modelos 3D de PheOH los valores no varían. Sin embargo, es importante destacar el repentino incremento del valor de la energía de afinidad de enlace para BH4 (~1.2 kcal/mol). Así como la

disminución para el componente IV de aproximadamente una 1 kcal/mol. Este comportamiento podría verse influenciado por la presencia de enlaces por puente de hidrógeno diferente a los presentados en el *re-acoplamiento* de la entrada PDB IJ8U.

Para las interacciones en el sitio de enlace en cada ligando, se observa que la presencia de la mayoría de ellas se mantiene constante, especialmente para el caso del componente IV, destacando además que cada complejo continúa manteniendo cuatro de cinco interacciones de las reportadas en la base de datos PDB.

Para BH4, las mutaciones en el dominio de regulación N-terminal promueven la interacción con un residuo de la cadena autoregulatoria de PheOH (S<sub>23</sub>), elemento que podría alterar el desplazamiento de la secuencia autoregulatoria en el sitio activo. Este papel se hace evidente al analizar las mutaciones en el dominio catalítico, para los cuales la interacción de BH4 con S<sub>23</sub> desaparece (con excepción de la variante pR270K).

*Tabla 5. Energía de afinidad de enlace e interacciones resultantes para el docking entre BH4 y cada uno de los modelos de PheOH humana.*

Modelo	Energía de afinidad de enlace (kcal/mol)	Interacciones resultantes en los sitios de enlace
PheOHwt	-8.4	FE <sub>1</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , H <sub>264</sub> , E <sub>286</sub> , Y <sub>325</sub>
Variante pF39L	-8.4	FE <sub>1</sub> , S <sub>23</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , E <sub>286</sub> , A <sub>322</sub> , Y <sub>325</sub>
Variante pG46S	-8.4	FE <sub>1</sub> , S <sub>23</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , H <sub>264</sub> , E <sub>286</sub> , Y <sub>325</sub>
Variante pI65T	-8.3	FE <sub>1</sub> , S <sub>23</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , E <sub>286</sub> , Y <sub>325</sub>
Variante pL249P	-8.4	FE <sub>1</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , E <sub>286</sub> , Y <sub>325</sub>
Variante pR261P	-8.4	FE <sub>1</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , E <sub>286</sub> , Y <sub>325</sub>
Variante pR270K	-8.4	FE <sub>1</sub> , S <sub>23</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , H <sub>264</sub> , E <sub>286</sub> , Y <sub>325</sub>

Tabla 6. Energía de afinidad de enlace e interacciones resultantes para el docking entre el componente III y cada uno de los modelos de PheOH humana.

Modelo	Energía de afinidad de enlace (kcal/mol)	Interacciones resultantes en los sitios de enlace
PheOHwt	-11.7	FE <sub>1</sub> , I <sub>25</sub> , L <sub>248</sub> , L <sub>249</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , H <sub>285</sub> , W <sub>326</sub> , E <sub>330</sub> , V <sub>379</sub>
Variante pF39L	-11.7	FE <sub>1</sub> , I <sub>25</sub> , L <sub>248</sub> , L <sub>249</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , H <sub>285</sub> , W <sub>326</sub> , V <sub>379</sub>
Variante pG46S	-11.7	FE <sub>1</sub> , I <sub>25</sub> , L <sub>248</sub> , L <sub>249</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , H <sub>285</sub> , W <sub>326</sub> , E <sub>330</sub> , V <sub>379</sub>
Variante pI65T	-11.7	FE <sub>1</sub> , I <sub>25</sub> , L <sub>248</sub> , L <sub>249</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , H <sub>285</sub> , W <sub>326</sub> , E <sub>330</sub> , V <sub>379</sub>
Variante pL249P	-11.4	FE <sub>1</sub> , I <sub>25</sub> , L <sub>248</sub> , L <sub>249</sub> , F <sub>254</sub> , H <sub>264</sub> , P <sub>281</sub> , H <sub>285</sub> , E <sub>330</sub> , V <sub>379</sub>
Variante pR261P	-11.7	FE <sub>1</sub> , I <sub>25</sub> , L <sub>248</sub> , L <sub>249</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , W <sub>326</sub> , E <sub>330</sub> , V <sub>379</sub>
Variante pR270K	-11.7	FE <sub>1</sub> , I <sub>25</sub> , L <sub>248</sub> , L <sub>249</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , H <sub>285</sub> , W <sub>326</sub> , V <sub>379</sub>

A diferencia de BH4 y el componente IV, no se cuenta con datos biológicos suficientes para analizar los resultados obtenidos para el componente III (obsérvese Tabla 7), así que es importante destacar la elevada energía de afinidad de enlace resultante en cada complejo formado. Además, la mayoría de las interacciones se mantienen constantes a pesar de las mutaciones pertinentes en cada modelo. En este caso, el papel de los enlaces por puente de hidrógeno parecer no ser significativo indicando que la cantidad de interacciones puede estar relacionada incluso con el tamaño del ligando.

Debido a que los resultados obtenidos no fueron del todo concluyentes, lo cual puede estar relacionado con la falta de flexibilidad en el receptor, se propuso integrar parcialmente flexibilidad a alguno de los residuos importantes dentro de la interacción de BH4, para el cual existe evidencia biológica bien definida del sitio de enlace en PheOH humana. Para lo anterior, se tomó como muestra la variante pR270K y PheOHwt, como muestra control. En ambos modelos, se seleccionó el residuo implicado en la mutación, la R<sub>270</sub> en PheOHwt y la K<sub>270</sub> en la variante pR270K. Los resultados para ambos procedimientos se presentan en la Tabla 8.

Tabla 7. Energía de afinidad de enlace e interacciones resultantes para el docking entre el componente IV y cada uno de los modelos de PheOH humana.

Modelo	Energía de afinidad de enlace (kcal/mol)	Interacciones resultantes en los sitios de enlace
PheOHwt	-7.6	FE <sub>1</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , Y <sub>325</sub> , V <sub>379</sub>
Variante pF39L	-7.7	FE <sub>1</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , Y <sub>325</sub> , V <sub>379</sub>
Variante pG46S	-7.7	FE <sub>1</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , Y <sub>325</sub> , V <sub>379</sub>
Variante pI65T	-7.7	FE <sub>1</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , Y <sub>325</sub> , V <sub>379</sub>
Variante pL249P	-7.7	FE <sub>1</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , Y <sub>325</sub> , V <sub>379</sub>
Variante pR261P	-7.6	FE <sub>1</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , Y <sub>325</sub> , V <sub>379</sub>
Variante pR270K	-7.6	FE <sub>1</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , P <sub>281</sub> , Y <sub>325</sub> , V <sub>379</sub>

Tabla 8. Energía de afinidad de enlace e interacciones resultantes para el docking semiflexible entre BH<sub>4</sub>, PheOH wt y la variante pR270K.

Modelo	Energía de afinidad de enlace (kcal/mol)	Interacciones resultantes en los sitios de enlace
PheOH wt	-8.4	FE <sub>1</sub> , S <sub>23</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , H <sub>264</sub> , E <sub>286</sub> , Y <sub>325</sub>
Variante pR270K	-8.4	FE <sub>1</sub> , S <sub>23</sub> , S <sub>251</sub> , F <sub>254</sub> , H <sub>264</sub> , E <sub>286</sub> , A <sub>322</sub> , Y <sub>325</sub>

Como consecuencia de integrar flexibilidad a alguno de los residuos relevantes dentro de la interacción de la enzima con BH<sub>4</sub>, las energías de afinidad de enlace no presenta cambios significativos (su valor se mantiene en -8.4 kcal/mol).

Para ambos *acoplamientos* entre PheOHwt y la variante pR270K solo se registró una nueva interacción S<sub>23</sub> y A<sub>322</sub>, respectivamente. En este sentido, es importante destacar que la presencia de estas nuevas interacciones vaya de la mano con la ruptura del enlace

por puente de hidrógeno antes presentado durante el *acoplamiento* sin flexibilidad en los residuos del receptor. La ruptura del enlace por puente de hidrógeno podría representar una reorientación del ligando que, sin embargo, no resultó suficiente como para verse reflejada en la energía de afinidad de enlace.

5.3 Simulaciones de Dinámica Molecular (DM) del dominio ACT de PheOH humana enlazado a una molécula de L-Phe.

A continuación en las Tablas 9 y 10, se presentan los resultados arrojados por AutoDock Vina para el *acoplamiento ciego* entre el dominio ACT y ambas especies químicas del aminoácido fenilalanina (L-Phe). La exploración total de la estructura tridimensional del dominio ACT se aseguró utilizando seis *mallados*. Para cada *mallado*, las dimensiones en sus ejes (X, Y y Z) se fijaron a 30 Å, mientras que el espaciado correspondió al valor predeterminado del programa (0.375 Å).

Tabla 9. Energía de afinidad de enlace e interacciones establecidas en el complejo Dominio ACT-L-Phe en su forma protonada.

No. de Grid	Energía de afinidad de enlace (kcal/mol)	Interacciones establecidas entre el complejo
1	-4.1	L <sub>5</sub> , T <sub>60</sub> , R <sub>67</sub> , V <sub>74</sub> , E <sub>76</sub>
2	-4.1	K <sub>18</sub> , L <sub>22</sub> , I <sub>65</sub> , D <sub>69</sub>
3	-4.5	E <sub>11</sub> , S <sub>38</sub> , K <sub>41</sub> , E <sub>44</sub>
4	-4.5	E <sub>11</sub> , S <sub>38</sub> , K <sub>41</sub> , E <sub>44</sub> , Y <sub>45</sub>
5	-4.5	I <sub>6</sub> , F <sub>7</sub> , K <sub>41</sub> , E <sub>46</sub>
6	-4.0	L <sub>5</sub> , T <sub>60</sub> , I <sub>63</sub> , R <sub>67</sub> , V <sub>74</sub>

Tabla 10. Energía de afinidad de enlace e interacciones establecidas en el complejo Dominio ACT-L-Phe en su forma desprotonada.

No. de Grid	Energía de afinidad de enlace (kcal/mol)	Interacciones establecidas entre el complejo
1	-3.9	L5, K53, R54, L56, P57
2	-4.3	R21, L22, D69
3	-4.4	K18, R21, L22, I65, D69
4	-4.2	E11, S38, K41, K42, D43, E44, Y45,
5	-4.2	I6, K41, E46, F47, H75
6	-4.1	T60, R67, V74, E76

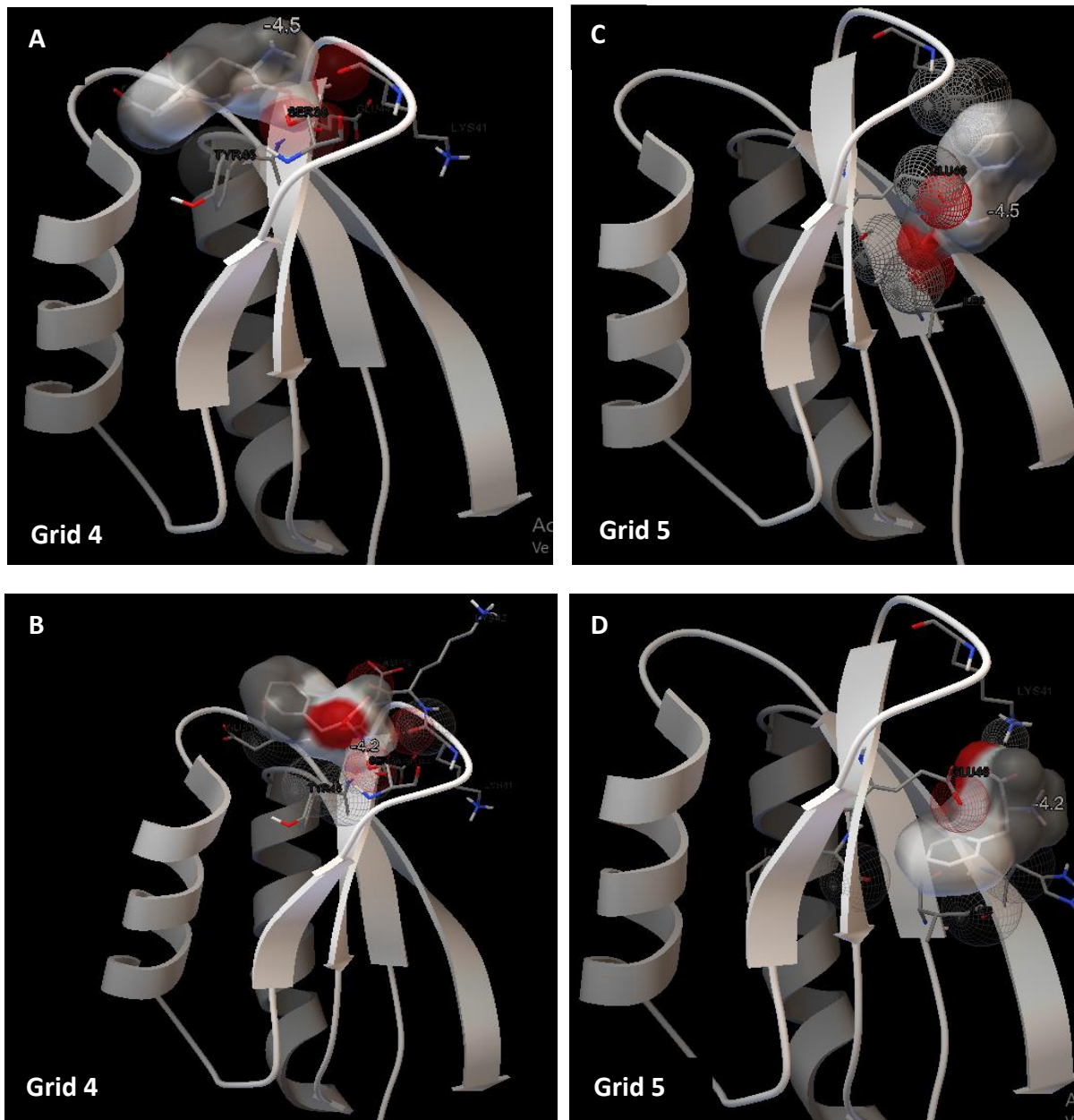
Nota. Para ambas tablas, los residuos en azul oscuro representan las interacciones compatibles con las reportadas por Carluccio, C. y col., 2016. Los residuos en azul claro están involucrados en enlaces por puente de hidrógeno.

La determinación del complejo más favorable para la ejecución de las simulaciones de dinámica molecular se basó en tres criterios ordenados de menor a mayor de acuerdo a su prioridad:

- Energía de afinidad de enlace.
- Número de interacciones presentes en el complejo de acuerdo con las reportadas por Carluccio, C. y col. (2016) <sup>[28]</sup> (discutidas en la sección “Antecedentes teórico/experimentales”).
- Localización del aminoácido dentro del complejo formado, de tal forma que al superponerse en el homotetrámero de PheOH humana, éste se encontraría ubicado en la interface entre los dominios de regulación N-terminal de la subunidad A y catalítico de la subunidad B.

A diferencia de los complejos formados entre el dominio ACT y su correspondiente especie química del aminoácido dentro de los *mallados* 1, 2, 3 y 6, los *mallados* 4 y 5 se ajustaron mejor a cada criterio señalado, especialmente con el tercero, para el cual la mayoría falló. Sin embargo, al analizar detenidamente la posición de L-Phe en el

sobre la estructura del dominio ACT se observó que para el *mallado* 5 en ambos complejos, el aminoácido se ubicaba del lado contrario a lo esperado descartando completamente esta posibilidad (obsérvese Ilustración 7).



*Ilustración 7. Comparación de la localización del aminoácido L-Phe sobre el dominio ACT para el mallado 4 y 5, respectivamente. A y C para complejo formado con la forma protonada del aminoácido. B y D para el complejo formado con la forma desprotonada del aminoácido.*

Por otro lado, de entre ambos complejos resultantes para el *mallado* 4, aunque la energía de afinidad de enlace y el número de interacciones presentes de acuerdo con las reportadas por Carluccio, C. y col. (2016) <sup>[28]</sup> no mostraron diferencias importantes, al analizar la contribución de los enlaces por puente de hidrógeno en la orientación de la cadena bencil del aminoácido sobre la estructura del dominio ACT se determinó que el complejo formado con la forma protonada de L-Phe se asimilaba más al complejo obtenido por Carluccio, C. y col. (2016) <sup>[28]</sup> (regrese a Ilustración 6) y, por lo tanto, aquel sería el apropiado para realizar la correspondiente simulación de dinámica molecular.

El paquete GROMACS ofrece una amplia variedad de herramientas que permiten dirigir el análisis personalizado del sistema o sistemas de interés. Para ilustrar claramente los resultados obtenidos a partir de este estudio, se usaron dos conjuntos de datos importantes tales como la desviación de la media cuadrática (RMSD, por sus siglas en inglés) y el comportamiento conformacional, ambos conjuntos de datos dependientes del tiempo.

El RMSD, comúnmente utilizado como un indicador de la estructura hacia un estado de equilibrio, permitió observar que el sistema sin enlazar (comprendido únicamente por el modelo tridimensional del dominio ACT) logró alcanzar el equilibrio estructural (obsérvese Gráfico 2) y, por lo tanto, el análisis para su comportamiento conformacional resultaría de interés relevante dentro de la comparación para el sistema enlazado.

En el Gráfico 2, que representa la trayectoria del sistema a lo largo del tiempo, se puede observar la transición de dos estados en el sistema incluso alcanzado el equilibrio estructural aproximadamente a los 60,000 picosegundos. El primer estado en el sistema se presenta entre 30,000 y 55,000 picosegundos mientras que el segundo estado se presenta a partir de los 55,000 picosegundos. El alcance del equilibrio estructural del sistema se ve reflejando por la fluctuación constante de la trayectoria del sistema alrededor de un valor único del RMSD, aproximadamente a los 2.9 nm.

Para identificar la transformación que lleva al sistema a alcanzar el equilibrio estructural, se realizó un análisis de las fluctuaciones de la estructura secundaria del sistema a lo largo del tiempo (obsérvese Gráfico 3). En el gráfico puede identificarse un cambio estructural importante involucrando los primeros 25 y 30 residuos del sistema

(correspondientes a los residuos 59-64 ubicado en el Loop 2 del modelo de dominio ACT). El cambio estructural se presenta durante el intervalo 15,000-30,000 picosegundos y se observa la transición de la estructura hoja  $\beta$  a una estructura desordenada (*coil*). La misma transición parece presentarse dos veces más a lo largo de la simulación una alrededor del intervalo 45,000-60,000 picosegundos y la última alrededor del intervalo 80,000 y 100,000 picosegundos. Dentro del mismo gráfico también se pueden observar dos cambios estructurales más que involucran los primeros 10 residuos del sistema. El primer cambio estructural involucra la transición de una estructura *Bend* a una estructura de giro (*coil*), mientras que el segundo cambio estructural involucra la transición de una estructura 3-Hélice a una estructura Puente  $\beta$ . Sin embargo, estos cambios estructurales a menudo pueden considerarse de interés menor ya que los extremos del sistema suelen relacionarse con una mayor frecuencia de fluctuaciones.

Gráfico 2. Fluctuaciones del RMSD a lo largo del tiempo para el *sistema sin enlazar* (comprendiendo únicamente el esqueleto de la estructura).

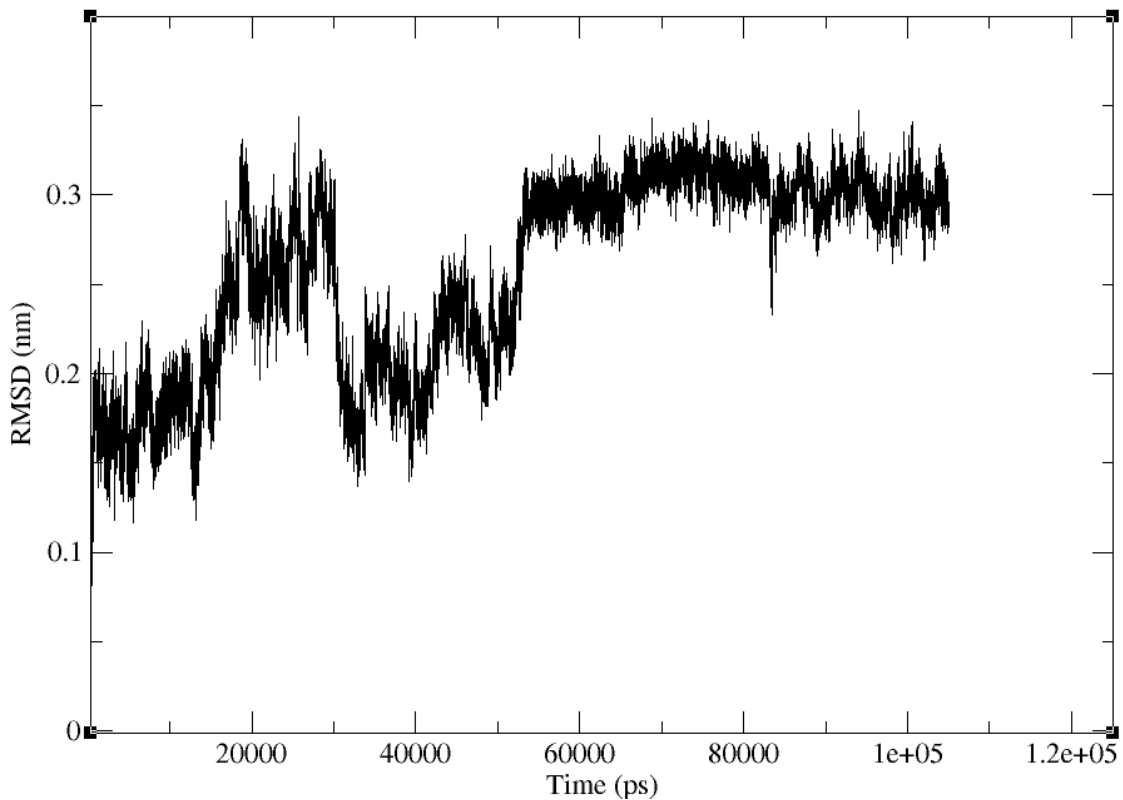
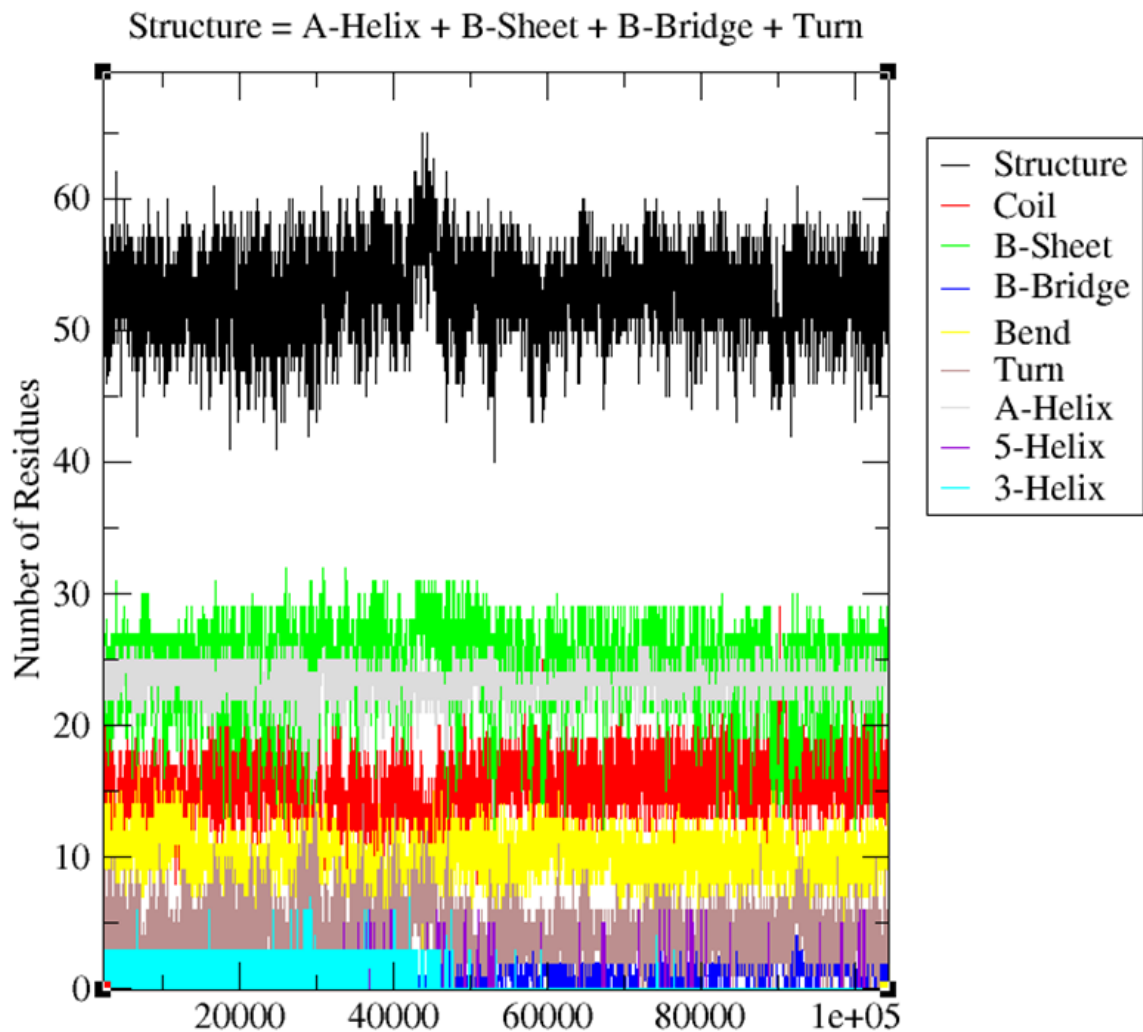


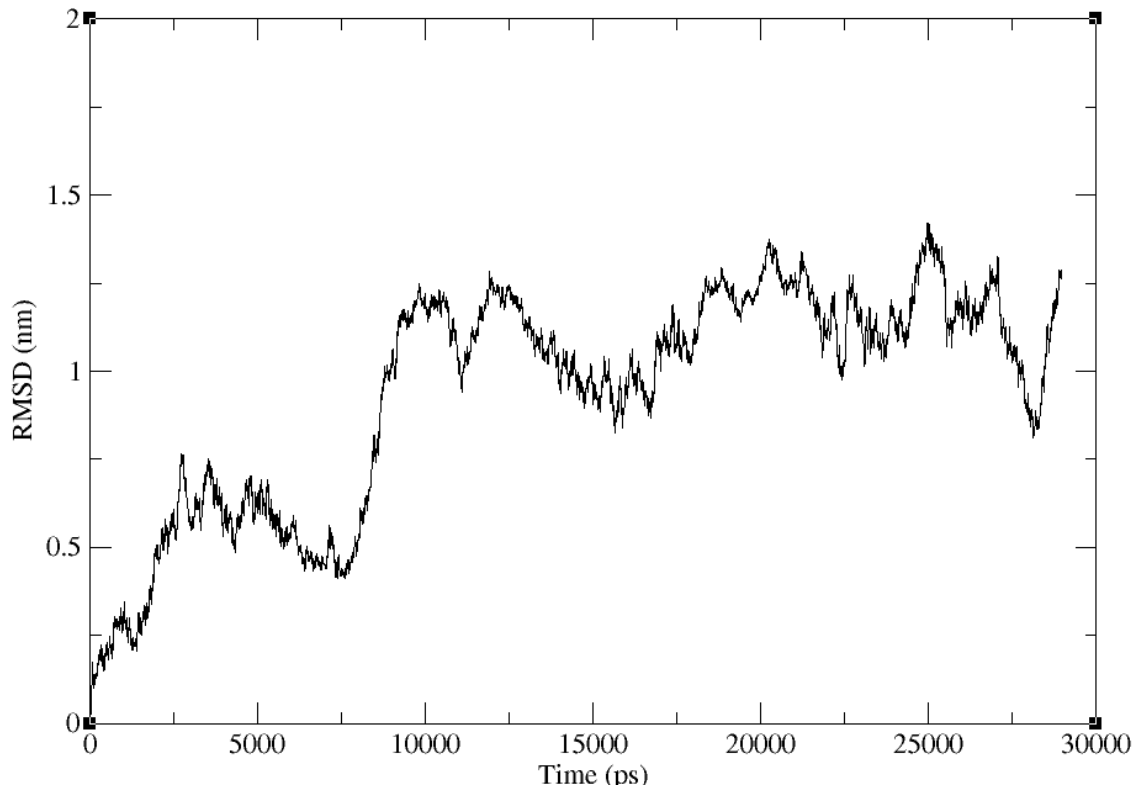
Gráfico 3. Fluctuaciones de la estructura secundaria a lo largo del tiempo del *sistema sin enlazar*.



En lo que respecta al sistema enlazado, el análisis de las fluctuaciones del RMSD (obsérvese Gráfico 4), durante los primeros 5,500 picosegundos pueden observarse ligeras fluctuaciones dentro de la trayectoria del sistema que después más o menos estabilizan la estructura aproximadamente a los 10,000 picosegundos. Esto último da la percepción de que el sistema alcanzó el equilibrio estructural aproximadamente a un RMSD de 1.1 nm. Sin embargo, las fluctuaciones de la trayectoria del sistema alrededor de este valor aún varían significativamente. De ahí que es correcto inferir que el sistema

apenas alcanzó el equilibrio estructural, y por lo tanto, la extensión de la simulación resultaría relevante.

Gráfico 4. Fluctuaciones del RMSD a lo largo del tiempo para el *sistema enlazado* a una molécula de L-Phe en su forma protonada (comprendiendo únicamente el esqueleto de la estructura).

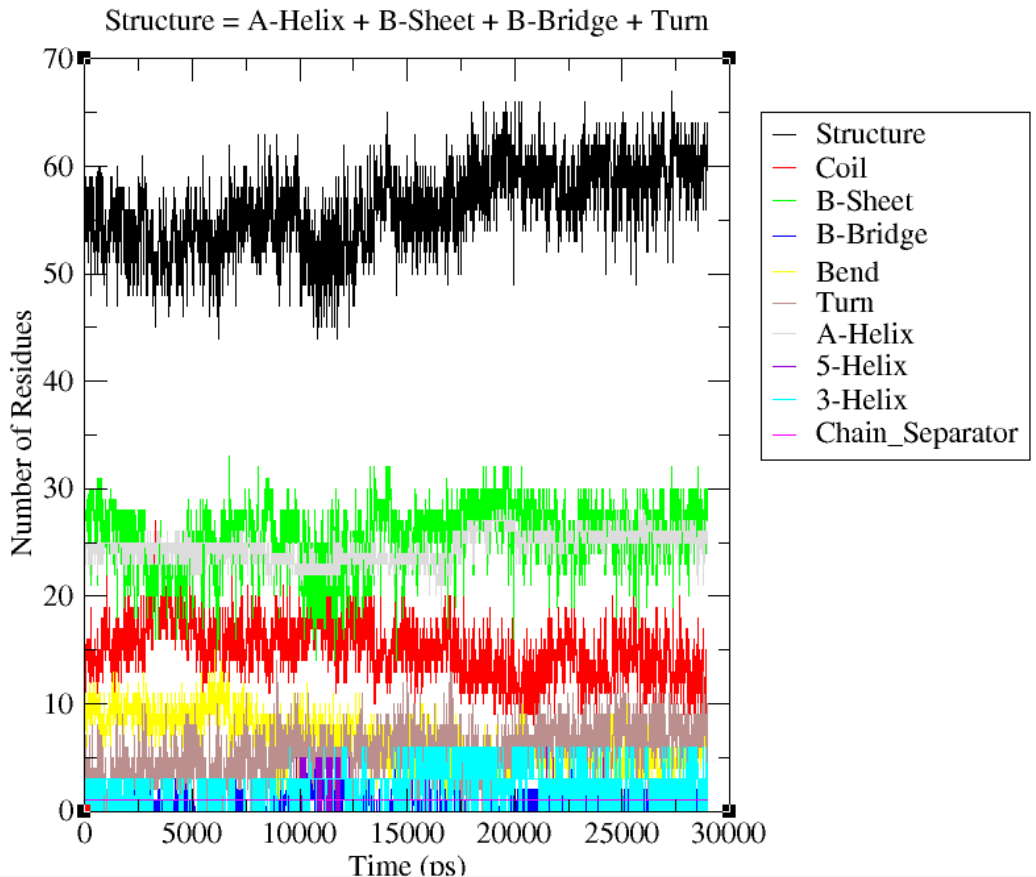


Ahora bien, durante la mayor parte de la fase de equilibrio del sistema enlazado la molécula del aminoácido se movió en promedio  $10 \text{ \AA}$  del lugar predispuesto por el método de *acoplamiento molecular ciego*, distancia que se mantuvo incluso al inicio de la fase de producción. Sin embargo, para el final de la fase de producción de la simulación, la distancia promedio incrementó más de 3 veces (es decir,  $30 \text{ \AA}$ ). De estas observaciones, por lo tanto, se puede inferir que la molécula de L-Phe no provoca efecto alguno sobre la dinámica general de la estructura del dominio ACT ya que no hay interacción directa entre ellas.

Un análisis de las fluctuaciones de la estructura secundaria a lo largo del tiempo para ese sistema (obsérvese Gráfico 5), pudo confirmar que se comporta de forma similar al

sistema sin enlazar evidenciando así el nulo efecto de la molécula de L-Phe sobre la dinámica general de la estructura del dominio ACT. En el gráfico 5, pueden observarse dos cambios estructurales, el primero en el intervalo 2,500-5,000 picosegundos y el segundo en el intervalo 10,00-13,000 picosegundos, justo cuando el sistema comienza a estabilizarse (~10,000 picosegundos). Ambos cambios estructurales involucran nuevamente a la estructura de hoja  $\beta$  de los residuos 25 a 30 del sistema (correspondientes a los residuos 59-64 ubicados en el Loop 2 del modelo del dominio ACT), mismos que sufren una transición hasta una estructura desordenada (*coil*).

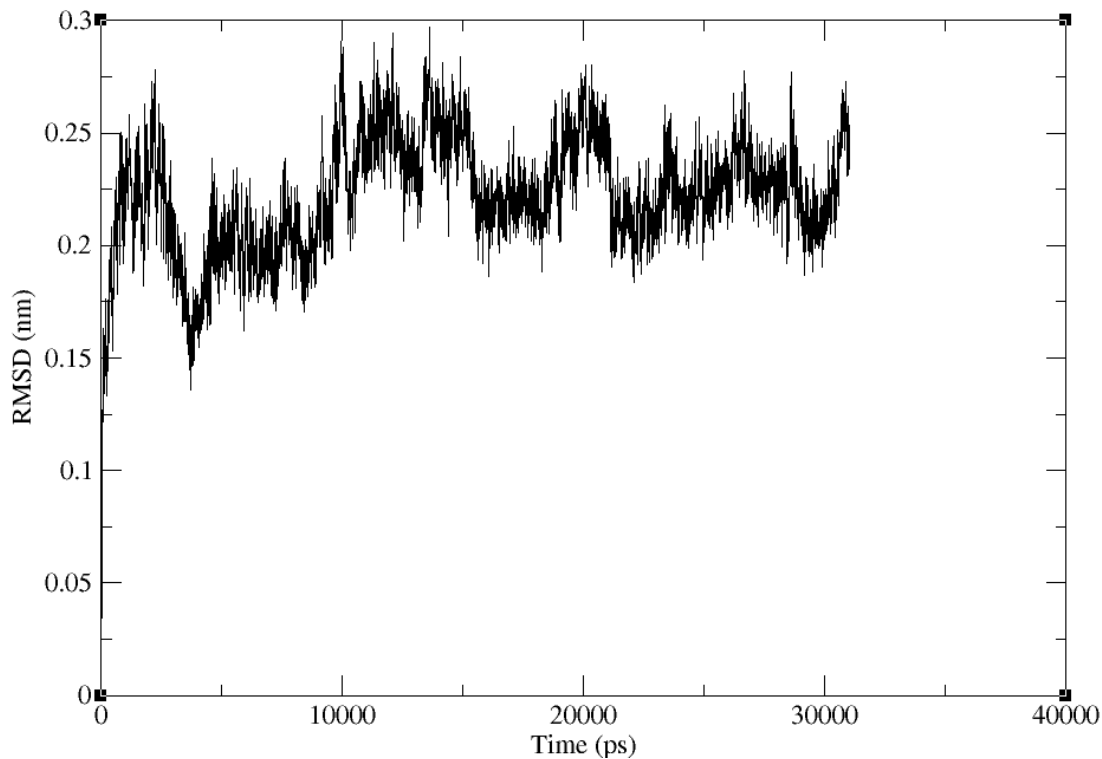
Gráfico 5. Fluctuaciones de la estructura secundaria a lo largo del tiempo del *sistema enlazado* a una molécula de L-Phe en su forma protonada.



Previo a las dos simulaciones aquí presentadas también se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular de 30 nanosegundos para un sistema sin enlazar. Este sistema correspondió al proceso descrito al inicio de la metodología, aquel obtenido a partir del modelado molecular por homología de secuencia y la optimización de geometría con el programa WebLab Viewer. Así que el sistema sin enlazar y enlazado sometido a simulación de dinámica molecular durante 105 y 30 nanosegundos, respectivamente, derivaron de este sistema anterior (al cual llamamos *sistema cero*).

El *sistema cero* logró alcanzar el equilibrio aproximadamente a los 10,000 picosegundos (obsérvese Gráfico 6). Las fluctuaciones de la trayectoria alrededor de los 0.25 y 0.23 nm del RMSD indica la transición de dos estados en la proteína a lo largo de los 20, 000 nanosegundos restantes de la simulación.

Gráfico 6. Fluctuaciones del RMSD a lo largo del tiempo para *el sistema cero* (comprendiendo únicamente el esqueleto de la estructura).

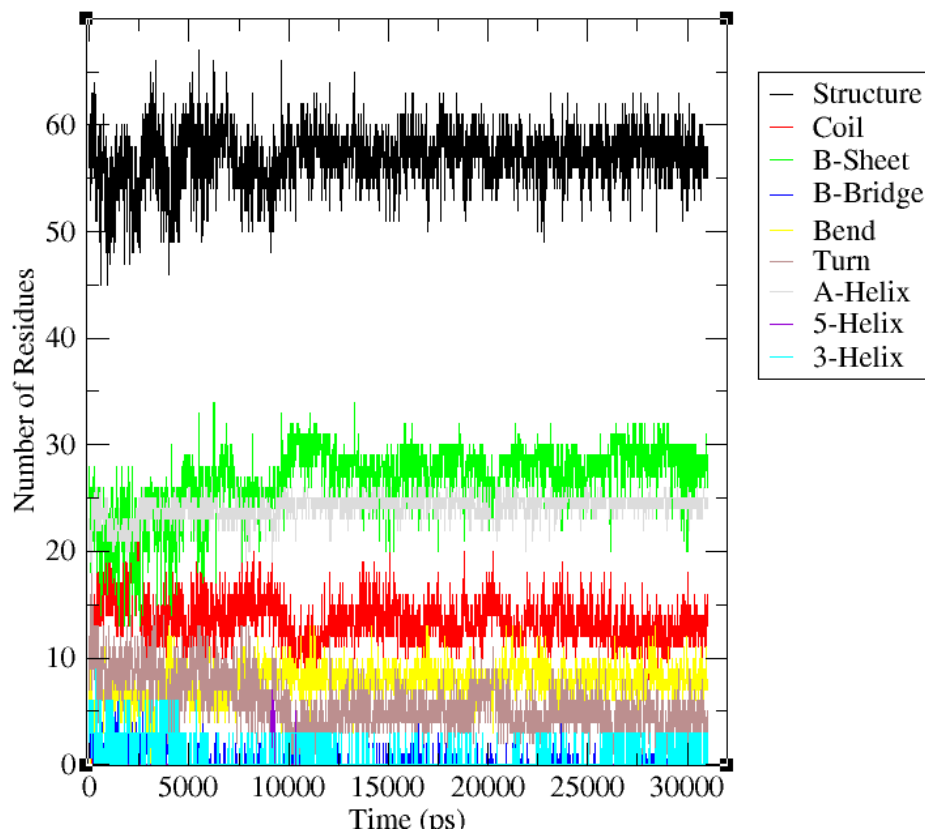


Para identificar la transición entre los dos estados del sistema que se observan en la trayectoria, se recurrió al análisis de las fluctuaciones de la estructura secundaria a lo largo del tiempo (obsérvese Gráfico 7). De acuerdo al Gráfico 7, puede observarse sólo

un cambio estructural durante los primeros 2,500 picosegundos. Este cambio estructural nuevamente involucra los primeros residuos 25 a 30 del sistema (correspondientes a los residuos 59-64 ubicados en del Loop 2 del modelo de Dominio ACT). El cambio conformacional inicia con una transición de una estructura de hoja  $\beta$ , pasa a una estructura  $\alpha$ -hélice y termina en una estructura desordenada (*coil*). Durante los siguientes 7,500 nanosegundos la hoja  $\beta$  intenta restaurarse hasta finalmente lograrlo, alrededor de los 10,000 picosegundos, exactamente cuando la estructura secundaria de todo el sistema alcanza el equilibrio estructural. Así que la transición entre los estados observados en la trayectoria del Gráfico 6, se reduce a la estabilización de la hoja  $\beta$ , que sólo incluye la transición entre una estructura de hoja  $\beta$  y una  $\alpha$ -hélice.

Gráfico 7. Fluctuaciones de la estructura secundaria a lo largo del tiempo del *sistema cero*.

Structure = A-Helix + B-Sheet + B-Bridge + Turn



Hasta este punto, los resultados arrojados por el *sistema cero* permiten corroborar los resultados obtenidos por Carluccio, C. y col. (2013) <sup>[27]</sup>, en el que la región del Loop 2 del modelo del dominio ACT sufrió un cambio conformacional de una estructura desordenada (*coil*) a una lámina  $\beta$  resultando finalmente en la elongación de la lámina  $\beta 2$  (obsérvese Ilustración 8). Sugiriendo que esta transformación podría ser el cambio conformacional más importante y estable dentro de la dinámica general del dominio ACT, además de que es necesaria para que la estructura del dominio ACT alcance el equilibrio estructural.

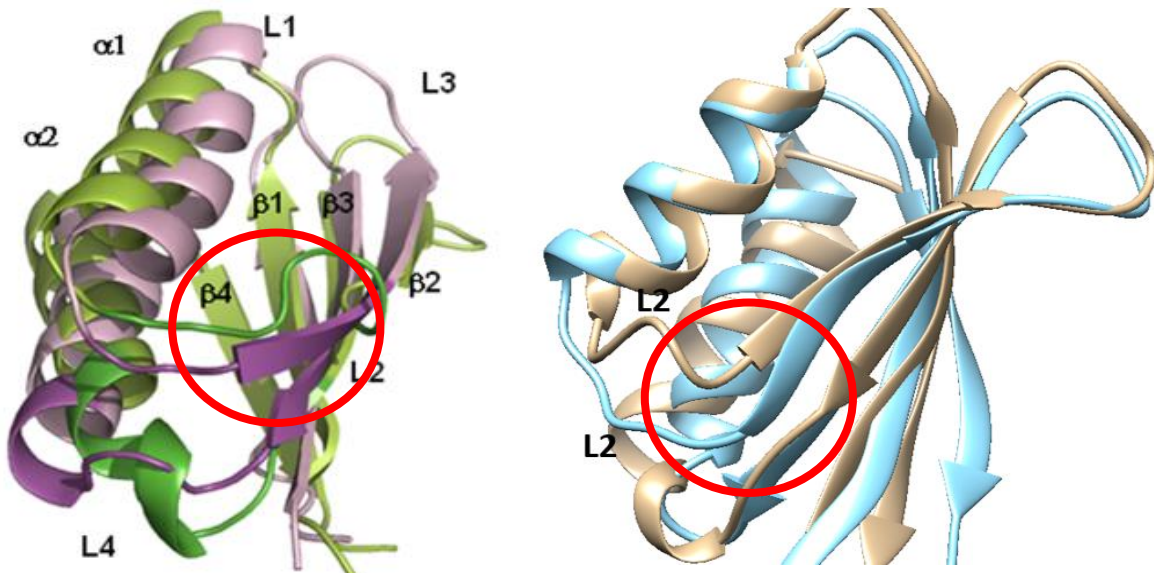


Ilustración 8. A) Estructuras del dominio ACT al inicio (verde) y al final (lila) de la simulación de DM. Imagen obtenida de Carluccio, C. y col. (2013) <sup>[27]</sup>. B) Estructuras del dominio ACT al inicio (café) y al final (azul) de la simulación de DM del sistema cero. Elaboración propia con ayuda del programa UCSF Chimera. El cambio conformacional previamente descrito se señala dentro del círculo rojo.

## Capítulo 6. Conclusión.

Las conclusiones más relevantes se resumen en los siguientes puntos:

- La utilización de la técnica *modelado molecular de proteínas basado en homología de secuencia*, permitió obtener *buenos* modelos tridimensionales representativos de la forma silvestre y seis mutantes de la enzima fenilalanina hidroxilasa humana. La evaluación de la calidad de los modelos obtenidos se realizó en términos de la función de puntuación QMEAN y cuatro descriptores estructurales estadísticos.
- En general, la utilización de la técnica computacional de *acoplamiento molecular semirígido* dentro de la identificación de los determinantes moleculares que modularán la interacción entre diferentes modelos representativos PheOH humana y dos chaperonas farmacológicamente activas, no arrojaron resultados concluyentes. Por lo que resulta interesante recurrir a técnicas computacionales alternativas que permitan resolver los problemas de receptor flexible.
- La realización de un estudio dinámico y estructural, a través de tres simulaciones de dinámica molecular (DM) de 30, 105 y 30 nanosegundos respectivamente, permitió determinar el cambio estructural más importante dentro del comportamiento conformacional del dominio ACT, el cual se relacionó con la transición de una estructura desordenada (*coil*), pasando por una estructura de  $\alpha$ -hélice hasta llegar una lámina  $\beta$ , resultando finalmente en la elongación de la lámina  $\beta$ 2. Este cambio estructural involucró los residuos 59-64 ubicados en del Loop 2 del modelo de dominio ACT. Tal transición además parece ser necesaria para que la estructura alcance el equilibrio e incluso una vez alcanzado, la transición puede observarse repetitivamente a lo largo del tiempo de simulación restante (tal y como lo indica la simulación del sistema sin enlazar):

## Perspectivas.

Las perspectivas derivadas de las conclusiones ya expuestas, se enlistan como:

- Una alternativa para resolver los problemas de flexibilidad en el receptor dentro de la primera parte de estudio de esta investigación involucra el uso de simulaciones de dinámica molecular, sin embargo, el hecho de no haberse desarrollado aún un método eficiente que permita parametrizar el átomo de  $Fe^{+2}$  para cualquiera de los campos de fuerza que maneja Gromacs, nos mantiene aún limitados para el desarrollo completo de esta parte de la investigación.
- Como ya se ha mencionado, la extensión de la simulación de dinámica molecular para el sistema enlazado resulta relevante en el sentido de indagar un poco más en la posible influencia estructural de la molécula del aminoácido fenilalanina sobre la dinámica general del dominio ACT. Sin embargo, extender la simulación implicaría forzar al sistema a mantenerse enlazado a lo largo de la simulación (de principio a fin) y la forma de llevarlo a cabo implicaría *fijar el centro de masa de cada uno de los sistemas a dos puntos fijos dentro de la caja de simulación.*

## Bibliografía.

- [1] Orphanet. Fenilcetonuria [en línea]. Disponible en [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search\\_Simple.php?lng=ES](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_Simple.php?lng=ES). Consultado en diciembre 2017.
- [2] Calderón López, G. M., Jiménez Parrilla, F. & Losada Martínez, A. (2008). Screening neonatal. Servicio de Neonatología. H. Infantil. Virgen del Rocío de Sevilla; pg. 423-433.
- [3] Martínez Pardo, M., Bélanger Quintana, A., García Muñoz, M. J., Desviat, L., Pérez, B. & Ugarte, M. (2015). Fenilcetonuria: protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las hiperfenilalaninemias. Unidad de Enfermedades Metabólicas, Servicio de Pediatría, Hospital Ramón y Cajal, Madrid; pg. 71-108.
- [4] Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2013). Diagnóstico y tratamiento nutricional del paciente pediátrico y adolescente con fenilcetonuria. Guía de práctica clínica (GPC). Quito: Ministerio de Salud Pública, Dirección Nacional de Normalización-MSP; 64 p.
- [5] Alcántara-Ortigoza, M. A., García-de Teresa, B., Barrientos-Ríos, R., & Gonzáles-del Ángel, A. (2012). Aspectos generales y panorama actual del estudio molecular de la fenilcetonuria (PKU) en México. *Acta Pediatr. Mex.* 2012; 33(6): 324-328.
- [6] Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (2016). Tratamiento dietético-nutricional del paciente pediátrico y adolescente con Fenilcetonuria en 1°, 2° y 3° nivel de atención. Guía Práctica Clínica (GPC). México, DF., 52 p.
- [7] Trunzo, R., Jung klawitter, S., & Leccese, A. (2016). In vitro residual activity of phenylalanine hydroxylase variants and correlation with metabolic phenotypes in PKU. *Gene*, 594(1), 138–143.
- [8] Eiken, H.G., Knappskog, P.M., Apold, J. & Flatmark, T. (1996). PKU mutation G46S is associated with increased aggregation and degradation of the phenylalanine hydroxylase enzyme. *Hum. Mutat.*, 7: 228–238.
- [9] Gjetting, T., Petersen, M., Guldberg, P., & Guttler, F. (2001). Missense mutations in the N-terminal domain of human phenylalanine hydroxylase interfere with binding of regulatory phenylalanine, 7: 1353–1360.

- [10] Erlandsen, H., Pey, A. L., Gámez, A., Pérez, B., Desviat, L. R., Aguado, C., Koch, R., Surendran, S. Tying, S., Matalon, R., Scriver, C. R., Ugarte, M., Martínez, A. & Stevens, R. C. (2004). Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations, 101(48), 16903–16908.
- [11] Agudo, C. (2008). Investigación en terapias específicas de mutación en enfermedades metabólicas hereditarias. Respuesta a cofactores y terapia antisentido. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- [12] Liberles, J. S., Thórolfsson, M. & Martínez, A. (2005). Allosteric mechanisms in ACT domain containing enzymes involved in amino acid metabolism. Review Article, 1–12.
- [13] Grant, G. A. (2007). The ACT Domain: A Small Molecule Binding Domain and Its Role as a Common Regulatory Element, 281(45), 33825–33829.
- [14] Kobe, B., Jennings, I. G., & House, C. M. (1999). Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase, 6: 442-448.
- [15] Shiman, R., Milton, T., & Gray, W. (1990). Mechanism of Phenylalanine Regulation of Phenylalanine hydroxylase, 265 (20), 11633–11642.
- [16] Hufton, S. E., Jennings, I. G., & Cotton, R. G. H. (1995). Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases, 366, 353–366.
- [17] Knappskog, P.M, Flatmark, T., Aarden, J.M., Haavik, J. & Martinez, A. (1996). Structure/function relationships in human phenylalanine hydroxylase. Effect of terminal deletions on the oligomerization, activation and cooperativity of substrate binding to the enzyme. Eur. J. Biochem., 242: 813–821
- [18] Pey, A. L., Ying, M., Cremades, N., Velazquez Campoy, A., Scherer, T., Thöny, B. Martinez, A. (2008). Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria, 118 (8).

- [19] Torreblanca, R., Lira Navarrete, E., Sancho, J., & Hurtado Guerrero, R. (2012). Structural and Mechanistic Basis of the Interaction between a Pharmacological Chaperone and Human Phenylalanine Hydroxylase, 1–4.
- [20] Winge, I., & Mckinney, J. A. (2010). Effect of pharmacological chaperones on brain tyrosine hydroxylase and tryptophan. *International Society for Neurochemistry, J. Neurochem.* (2010) 114, 853–863.
- [21] Thórólfsson, M., Ibarra-Molero, B., Fojan, P., Petersen, S. B., Sanchez-Ruiz, J. M. & Martínez, A. (2002). L-Phenylalanine Binding and Domain Organization in Human Phenylalanine Hydroxylase: A Differential Scanning Calorimetry Study, (iii), 7573–7585.
- [22] Thórólfsson, M., Teigen, K. & Martínez, A. (2003). Activation of Phenylalanine Hydroxylase: Effect of Substitutions at Arg68 and Cys237, 3419–3428.
- [23] Li, J., Ilangoan, U., Daubner, S. C., Hinck, A. P., & Fitzpatrick, P. F. (2011). Direct evidence for a phenylalanine site in the regulatory domain of phenylalanine hydroxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 505(2), 250–255.
- [24] Roberts, K. M., Khan, C. A., Hinck, C. S., & Fitzpatrick, P. F. (2014). Activation of Phenylalanine Hydroxylase by Phenylalanine Does Not Require Binding in the Active Site.
- [25] Jaffe, E. K., Stith, L., Lawrence, S. H., Andrade, M., & Jr, R., L. D. (2014). A New Model for Allosteric Regulation of Phenylalanine Hydroxylase: Implications for Disease and Therapeutics. *NIH Public Access*, 530(2), 73–82.
- [26] Marie, G., & Harris, E. (2014). Identification of pharmacological chaperones for Phenylalanine Hydroxylase. Tesis de maestría en Farmacia. Centro de Farmacia y Departamento de Biomedicina, Universidad de Bergen, Noruega; 83 p.
- [27] Carluccio, C., Fraternali, F., Salvatore, F., Fornili, A., & Zagari, A. (2013). Structural Features of the Regulatory ACT Domain of Phenylalanine Hydroxylase, 8(11), 1–13.
- [28] Carluccio, C., Fraternali, F., Salvatore, F., Fornili, A. & Zagari, A. (2016). Towards the identification of the allosteric Phe-binding site in phenylalanine hydroxylase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 34:3, 497-507.

[29] Maldonado Arce, A. D., Contreras Aburto, C., Favela Rosales, F., Arvayo Zatarain, J. A. & Urrutia Bañuelos, E. (2016). Métodos de simulación computacional en biología. *EPISTEMUS* ISSN: 2007-8196 (electrónico), 84–92.

[30] Rodríguez-Sotres, R., Gaytán-Mondragón, S. A., Hernández-Domínguez, E. E. & Valencia Turcotte, L. G. (2011). Estructuras tridimensionales *in silico*, a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína ¿Cómo saber que el modelo es realista? Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 143–156 (14).

[31] Contreras Moreira, B. (2013). Modelado comparativo de proteínas *Homology modelling*. Fundación ARAID y Estación Experimental de Aula Dei/CSIC, Zaragoza, España. 29 p.

[32] Martínez Castilla, L. P. (n.d.). Bioinformática y modelación de proteínas por homología: un tutorial para principiantes. Exploración de los pigmentos visuales humanos. Facultad de química, Departamento de Fisicoquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 45 p.

[33] Xavier Barril, R. P. & Luque, F. J. (2014). Química computacional en diseño de fármacos. Universidad de Barcelona; Revista: Life Sciences Lab.

[34] Saldívar González, F., Marinez Prieo, F. D. & Medina Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educación Química*, 28(1), 51–58.

[35] Jensen, F. (2007) Optimization Techniques. En: Jensen, F. Introduction to Computational Chemistry. Segunda edición. England, Editorial John Wiley & Sons Ltd., 380-419.

[36] Xuan-Yu, M., Hong-Xing, Z., Mihaly, M., & Meng, C. (2012). Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *NIH Public Access*, 7(2), 146–157.

[37] Trott, O. & Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31: 455-461

- [38] Gago Badenas, F. (1993) Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos. Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, 253-327.
- [39] Aristizabal Soto, H. D. (2015). Técnica de simulación por dinámica molecular para la nanoindentación y nanorayado de películas delgadas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Física y Química, Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia. 80 p.
- [40] Lozano-Aponte, J. & Scior, T. (2014). ¿Qué sabe usted a cerca de...Dinámica Molecular? What do you know about ... Molecular Dynamics? Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 45, núm.1, enero-marzo, 2014, pp. 86-88. Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. Distrito Federal, México.
- [41] Haile, J. M. Molecular dynamics simulation: elementary methods. (1992). A Wiley-Interscience Publication. JOHN WILEY & SONS, INC. ISBN 0-471-81966-2. 506 p.
- [42] Gulín-González, J., Demontis, P., & Suffritti, B. (2010). Métodos deterministas y estocásticos aplicados al estudio de materiales microporosos, 41(2), 85–98.
- [43] Leach, Andrew R. Molecular modelling principles and applications. Segunda edición. 2001. ISBN 0-582-38210-6. 773 p.
- [44] Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. & Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22; 195-201.
- [45] The UniProt Consortium (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase *Nucleic Acids Res.* 45: D158-D169.
- [46] Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-3402.
- [47] Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A. & Soding, J. (2012) HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat Methods*, 9, 173-175.

- [48] Arturo, E. C., Gupta, K., Héroux, A., Stith, L., Cross, P. J., Parker, E. J., & Loll, P. J. (2016). First structure of full-length mammalian phenylalanine hydroxylase reveals the architecture of an autoinhibited tetramer, 113(9).
- [49] Benkert, P., Biasini, M. & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27, 343-350.
- [50] Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B. A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J. & Bryant, S.H. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4; 44(D1):D1202-13. Epub 2015 Sep 22 [PubMed PMID: 26400175].
- [51] Berman, H., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig I., Shindyalov I. & Bourne, P. E. (2000). "The Protein Data Bank". *Nucleic Acids Res*, 28, 235-242.
- [52] GaussView, Version 5, Dennington, R., Keith, T. A.; Millam, J. M. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2016.
- [53] Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [54] Huey, R., Morris, G. M., & Forli, S. (2012). Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial. The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory 10550 N. Torrey Pines Rd. La Jolla, California 92037-1000 USA.

- [55] AutoDock Vina. Vina Video Tutorial [en línea]. <http://vina.scripps.edu/tutorial.html>. Citado en septiembre de 2017.
- [56] Goodsell, D. S. & Olson, A. J. (1990), Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing Proteins: Structure, Function and Genetics, 8: 195-202.
- [57] Liu, X., Wu, J., Wang, J., Liu, X., Zhao, S., Li, Z. & Gao, G. (2009). WebLab: a data-centric, knowledge-sharing bioinformatic platform. Nucleic Acids Research, 37(Web Server issue), W33–W39.
- [58] L. Mayo, S., Barry D., O. and A. Goddard, W. (1990). DREIDING: a generic force field for molecular simulations. The Journal of Physical Chemistry 1990 94 (26), 8897-8909.
- [59] Van Der Spoel, D., Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, et al. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. J. Comput. Chem. 26: 1701–1718.
- [60] van Gunsteren, W. F., Billeter, S. R., Eising, A. A., Hunenberger, P. H., Krüger, P., et al. (1996). Biomolecular Simulation: The GROMOS96 manual and userguide. Hochschverlag AG ander ETH Zürich, Zürich, Switzerland.
- [61] Berendsen H., J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F. & Hermans, J. (1981). Interaction models for water in relation to protein hydration. In Intermolecular Forces (Pullman, B, ed.): 331–342.
- [62] Berendsen H., J. C., Postma J., P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola A. & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. J Chem Phys 81: 3684–3690.
- [63] Barker, J.A. & Watts, R.O. (1973). "Monte Carlo studies of the dielectric properties of water-like models". Molecular Physics.26 (3): 789–792. Bibcode: 1973MolPh...26...789B.
- [64] Watts, R.O. (1974). "Monte Carlo studies of liquid water". Molecular Physics. 28 (4): 1069–1083. Bibcode: 1974MolPh..28.1069W.
- [65] Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). VMD – Visual Molecular Dynamics. Journal of Molecular Graphics 14: 33–38
- [66] Schrödinger, L. (2009). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.2.1

## Anexos.

Anexo 1. Algoritmos de muestro, características e implementación en softwares de *docking molecular*. Fuente: Xuan-Yu y col. (2012).

<b>Algoritmos</b>	<b>Características</b>	<b>Implementación en softwares</b>
Algoritmos de coincidencia ( <i>Matching algorithms</i> )	Basados en la geometría, son útiles para filtrado virtual (VS) y enriquecimiento de compuestos activos de grandes librerías debido a su alta velocidad.	DOCK, FLOG, LibDOCK y SANDOCK.
Construcción incremental ( <i>Incremental construction</i> )	Basados en fragmentos y <i>docking</i> incremental.	DOCK 4.0, FlexX, Hammerhead, SLIDE y eHiTS.
Monte Carlo	Búsqueda estocástica.	AutoDock, ICM, QXP y Affinity.
Genéticos	Búsqueda estocástica.	AutoDock, GOLD, DIVALI y DARWIN.
Simulaciones de dinámica molecular	Mayor refinamiento después de <i>docking</i> .	AMBER, CHARMM, GROMACS, etc.

Anexo 2. Recopilación de estructuras cristalizadas de la enzima fenilalanina hidroxilasa desde el *Protein Data Bank* (PDB). Fuente: Elaboración propia basada en Marie, G., & Harris, E. (2014).

<b>Entrada PDB</b>	<b>Organismo</b>	<b>Método de resolución</b>	<b>Resolución (Å)</b>	<b>Dominios</b>	<b>Ligandos</b>	<b>Fecha de liberación</b>
<b>5DEN</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	Difracción de rayos X	2.9	Regulatorio, catalítico, oligomerización	Fe <sup>3+</sup>	Febrero, 2016
<b>4ANP</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	2.11	Regulatorio, catalítico	Fe <sup>3+</sup> , 3QI	Abril, 2012
<b>1TDW</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	2.1	Catalítico	Fe <sup>3+</sup>	Noviembre, 2004
<b>1TG2</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	2.2	Catalítico	Fe <sup>3+</sup> , qBH2	Noviembre, 2004
<b>1KW0</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	2.5	Catalítico	Fe <sup>2+</sup> , BH4, TIH	Enero, 2003
<b>1MMK</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	2.0	Catalítico	Fe <sup>2+</sup> , BH4, TIH, SO4	Septiembre 2003
<b>1MMT</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	2.0	Catalítico	Fe <sup>2+</sup> , BH4, NLE, SO4	Septiembre 2003
<b>1J8T</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	1.7	Catalítico	Fe <sup>2+</sup>	Mayo, 2002
<b>1J8U</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	1.5	Catalítico	Fe <sup>2+</sup> , BH4	Mayo, 2002
<b>1LRM</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	2.1	Catalítico	Fe <sup>3+</sup> , qBH2	Junio, 2002
<b>1DMW</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	2.0	Catalítico	Fe <sup>3+</sup> , qBH2	Marzo, 2000

<b>1PAH</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	2.0	Catalítico	Fe <sup>3+</sup>	Enero, 1999
<b>1PHZ</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	Difracción de rayos X	2.2	Regulatorio, catalítico	Fe <sup>3+</sup>	Abril, 1999
<b>2PHM</b>	<i>Rattus norvegicus</i>	Difracción de rayos X	2.6	Regulatorio, catalítico	Fe <sup>3+</sup>	Abril, 1999
<b>3PAH</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	2.0	Catalítico	Fe <sup>3+</sup> , XDE	Abril, 1999
<b>4PAH</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	2.0	Catalítico	Fe <sup>3+</sup> , LNR	Abril, 1999
<b>5PAH</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	2.1	Catalítico	Fe <sup>3+</sup> , LDP	Abril, , 1999
<b>6PAH</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	2.15	Catalítico	Fe <sup>3+</sup> , DAH	Abril, 1999
<b>2PAH</b>	<i>Homo sapiens</i>	Difracción de rayos X	3.1	Catalítico, oligomerización	Fe <sup>3+</sup>	Octubre, 1999

Anexo 3. Resumen de características para las variantes de PheOH humana estudiadas.  
Fuente: Elaboración propia basada en Erlandsen, H. y col. (2002) y Trunzo, R. y col. (2016).

<b>Mutación</b>	<b>Otras mutaciones descritas en la misma posición</b>	<b>Contactos estructurales/comentarios</b>	<b>Fenotipo Metabólico</b>
<b>F39L</b>	Ninguna	Se encuentra dentro del parche hidrofóbico localizado en el dominio de regulación N-terminal. La sustitución por un residuo de Leucina (L) puede cambiar la estructura del parche y desestabilizar al dominio completo.	Desde fenilcetonuria moderada a clásica.
<b>G46S</b>	Ninguna	Se encuentra dentro del parche hidrofóbico localizado en el dominio de regulación N-terminal. La sustitución por un residuo de Serina se relaciona con la pérdida de la activación dependiente de fenilalanina.	Fenilcetonuria moderada a clásica
<b>I65T</b>	Ninguna	Se encuentra dentro del parche hidrofóbico localizado en el dominio de regulación N-terminal. La sustitución por un residuo Treonina puede distorsionar el empaquetamiento del parche hidrofóbico.	Desde fenilcetonuria moderada a clásica
<b>L249P</b>	L249F	Es un residuo de enlace para BH4 y está localizado en el loop C $\alpha$ 6/C $\beta$ 1. La sustitución por un residuo de Prolina puede afectar la formación de la estructura secundaria de PheOH e impedir el enlace del cofactor BH4.	Desde fenilcetonuria moderada a clásica
<b>R261P</b>	R261Q	Se encuentra en el loop C $\sigma$ 6/C $\beta$ 2. Interactúa con Q <sub>304</sub> y T <sub>238</sub> a través de enlaces por puente de hidrógeno. Una sustitución puede romper estos enlaces, desestabilizar la estructura secundaria en el sitio activo y potencialmente interferir en la formación dímero/tetrámero,	Desde fenilcetonuria moderada a clásica
<b>R270K</b>	Ninguna	Está localizado al lado del canal que lleva al sitio activo. Una sustitución puede afectar la actividad catalítica de la enzima y, simultáneamente, puede ser responsable de cambios estructurales que podría afectar la estabilidad en general.	Desde fenilcetonuria moderada a clásica.