

ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LOS COMPLEJOS DE MICHAELIS (MCCs)  
ENTRE EL MUTANTE A282V DE LIPASA B DE *Candida antarctica* Y EL  
(*R*, *S*)-PROPRANOLOL

ANDREA YULIETH GARZÓN SERRANO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
GRUPO DE BIOQUÍMICA TEÓRICA  
2015

ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LOS COMPLEJOS DE MICHAELIS (MCCs)  
ENTRE EL MUTANTE A282V DE LIPASA B DE *Candida antarctica* Y EL  
(R, S)-PROPRANOLOL

ANDREA YULIETH GARZÓN SERRANO

Trabajo de grado presentado para optar al título de Química

Director

Dr. MARKUS HANS OLIVER DOERR

Químico

Codirectora

Dra. MARTHA CECILIA DAZA ESPINOSA

Bióloga

Codirector

MSc. DANIEL IVÁN BARRERA VALDERRAMA

Químico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

GRUPO DE BIOQUÍMICA TEÓRICA

2015

*“Nacimos para ser Felices, no para ser Perfectos... El amanecer es la parte más bonita del día porque es cuando Dios te dice: levántate! Te regalo otra oportunidad de vivir y comenzar nuevamente de mi mano”.*

San Juan Pablo II

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme las provisiones durante mi caminar.

Todo lo que soy se lo debo a ustedes, son el núcleo de mi vida y la principal motivación de este trabajo. A mi guardián y ahora constelación favorita, papi estoy cumpliendo lo que te prometí. A mi ideal de vida, mami gracias por comprenderme y llenarte de fortaleza en mi ausencia. A mis hermanas por apoyarme en cualquier circunstancia. A mi sobrino, por la alegría que nos regalas cada día. A toda mi familia por abrazarnos cuando más lo necesitamos.

A los profesores Martha Daza y Markus Doerr por el tiempo dedicado, los conocimientos trascendidos y la confianza que depositaron en mí durante la realización del proyecto.

A Daniel Barrera por el empujón esencial y orientaciones aportadas en el tiempo que duró la investigación, quedaré en deuda por toda la paciencia ante mis inquietudes.

Los mejores perfumes vienen en tamaño pequeño y la calidad de los vinos aumenta con el tiempo... A mi pequeño grupo de amigos, Natalia, Johny y Andrés, por su amistad incondicional, con su patrocinio he vivido muy perfumada y con gran calidad estos años. ...En momentos presentimos, que solos nos encontramos, es allí donde aparecen, los que son más que hermanos... Andrés, gracias por ser mi bf.

A Lore, mi confidente en esta travesía, por escuchar y aconsejar mis locuras; doy gracias porque escogimos el mismo vagón en el tren. A mis compañeros de grupo de investigación por todas las enseñanzas, los momentos compartidos y sobre todo por ayudarme a quitar la capa de invisibilidad.

Finalmente, a todos los que comparten mi estilo de vida...“Intentad dejar este mundo en mejores condiciones a como lo encontrásteis” B.P.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	16
1. MARCO TEÓRICO .....	21
1.1. Quiralidad.....	21
1.2. Interacciones intermoleculares y puente de hidrógeno .....	21
1.3. Propranolol.....	22
1.4. Lipasas .....	23
1.5. Mecanismo catalítico .....	24
1.6. Acoplamiento molecular .....	26
1.7. Función de puntuación .....	29
2. METODOLOGÍA .....	31
2.1 Preparación de la acilenzima (acil-CalB) e introducción de la mutación Ala282 por Val282.....	31
2.2 Selección de las conformaciones representativas de la AcCalB_A282V a partir de 3 distancias interatómicas .....	31
2.3 Evaluación del efecto de la flexibilidad de la AcCalB_A282V sobre los MCCs.....	32
2.4 Simulación y criterios de selección de los MCCs entre la AcCalB_A282V y el ( <i>R, S</i> )-propranolol .....	33
2.5 Análisis de los MCCs entre la AcCalB_A282V y el ( <i>R, S</i> )-propranolol .....	34
2.6 Estudio de la quimioselectividad en la formación de MCCs entre la AcCalB_A282V y el ( <i>R,S</i> )-propranolol.....	35
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
3.1 Cambio estructural en el bolsillo de unión al ligando inducido por la mutación A282V en el sitio activo de AcCalB.....	36

3.2 Conformaciones representativas seleccionadas de AcCalB_A282V a partir de 3 distancias interatómicas .....	36
3.3 MCCs entre la AcCalB_A282V y el ( <i>R, S</i> )-propranolol.....	38
3.4 Comparación entre los MCCs obtenidos con la AcCalB_A282V y los MCCs reportados con AcCalB_silvestre <sup>8</sup> .....	45
3.5 Quimioselectividad en la formación de los MCCs entre la AcCalB_A282V y el ( <i>R, S</i> )-propranolol .....	47
4. CONCLUSIONES .....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	50
BIBLIOGRAFÍA .....	53
ANEXOS .....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Enantiómeros ( <i>R</i> ) y ( <i>S</i> ) del propranolol. ....	16
<i>Figura 2:</i> Mecanismo de reacciones catalizadas por lipasas. ....	17
<i>Figura 3:</i> Bolsillo de unión de la CalB con la tríada catalítica Asp187-His224-Ser105 orientado de izquierda a derecha. ....	24
<i>Figura 4:</i> Mecanismo de reacción de la acilación del ( <i>R, S</i> )-propranolol catalizada por la CalB <sup>32</sup> . Los puentes de hidrógeno se muestran en color rojo. ....	25
<i>Figura 5:</i> Formación de MCCs entre la CalB acetilada y el ( <i>R, S</i> )-propranolol en la etapa de desacilación de la enzima durante la reacción de desacilación. Las distancias interatómicas importantes en el proceso catalítico se muestran en color rojo. ....	26
<i>Figura 6:</i> Resumen de las fracciones de predicciones precisas para AutoDock y Vina. El límite de RMSD en 2Å es utilizado como criterio para una correcta predicción en la estructura acoplada. ....	29
<i>Figura 7:</i> Distancias interatómicas a', bc y f seleccionadas (color vinotinto). En color verde está la identificación de cada átomo que será usada en adelante. ....	32
<i>Figura 8:</i> Dimensiones de la caja de búsqueda para los enfoques rígido, flexible 1, flexible 2 (izq) y nflexible 2 (der). ....	33
<i>Figura 9:</i> Clasificación de los modos de unión del ( <i>R, S</i> )-propranolol en el sitio activo de la enzima. En la parte superior de la imagen se muestran las formas como el anillo naftilo se ubica hacia el bolsillo hidrofóbico de tamaño grande (Modo I). En la parte inferior de la imagen se muestran las formas como el anillo de naftilo se ubica hacia el bolsillo hidrofóbico de tamaño medio. ....	35
<i>Figura 10:</i> Mutación A282V del sitio activo de CalB. El residuo modificado se muestra en representación CPK <sup>47</sup> . Algunos residuos aminoacídicos apolares que interactúan con el sustrato se muestran en representación Surf <sup>47</sup> . A la izquierda CalB_silvestre y a la derecha CalB_A282V. ....	36
<i>Figura 11:</i> Superposición de conformaciones representativas de AcCalB_A282V. En la parte inferior de la imagen se muestra un acercamiento de los residuos aminoacídicos de la tríada catalítica y hueco oxianiónico. ....	38

<i>Figura 12:</i> Ejemplo de un MCCs con interacciones de contacto cercano mostradas en esferas de color gris (centro) y un puente de hidrógeno entre Sea105:OE...H40:Sub-O39:Sub mostradas en esferas de color blanco y rojo (izquierda).....	43
<i>Figura 13:</i> Ejemplo de un MCCs con interacciones de contacto cercano mostradas en esferas de color gris (centro) y un puente de hidrógeno entre los átomos Thr40:O...HN:Sub-N:Sub mostradas en esferas de color blanco y rojo (izquierda).....	43
<i>Figura 14:</i> Ejemplos de MCCs seleccionados en cada enfoque para el ( <i>R</i> )-propranolol (arriba) y el ( <i>S</i> )-propranolol (abajo).....	44
<i>Figura 15:</i> Modos de unión para los MCCs del enantiómero <i>R</i> acoplados a la AcCalB_A282V (RIG01) y a la AcCalB_silvestre (OR1 y OR4).....	47
<i>Figura 16.</i> MCCs para <i>N</i> -acilación entre AcCalB_A282V y el ( <i>S</i> )-propranolol, con un tratamiento rígido de la enzima.....	48

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<i>Esquema 1:</i> Fuerzas de van der Waals. Las moléculas que se muestran son ejemplos de las diferentes interacciones: en las interacciones dipolo-dipolo $\text{HCl}\cdots\text{HCl}$ , en la interacciones dipolo-dipolo inducido $\text{HCl}\cdots\text{Ar}$ , y en las interacciones dipolo inducido-dipolo inducido $\text{He}\cdots\text{He}$ . .....	22
<i>Esquema 2:</i> Categorías generales de algoritmos y funciones de puntuación utilizados en acoplamiento molecular. ....	27

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<i>Gráfica 1:</i> % de los MCCs entre la AcCalB_A282V y el ( <i>R</i> , <i>S</i> )-propranolol para cada enfoque utilizado. El primer criterio de selección se representa en color azul (distancia <i>b</i> y <i>c</i> < 4Å) y el segundo criterio de selección en color verde (RMSD entre 0Å a 0,5Å) .....	40
<i>Gráfica 2:</i> Población de los MCCs simulados con los enfoques rígido, flexible 1 y flexible 2. La población de MCCs para el enantiómero <i>R</i> se muestra en color amarillo y para el enantiómero <i>S</i> en color naranja. ....	41
<i>Gráfica 3:</i> Promedio de los valores de la energía libre de afinidad para la población de MCCs modelados con los enfoques rígido, flexible 1, flexible 2 y nflexible 2. Los valores para el enantiómero <i>R</i> se muestran en color amarillo y para el enantiómero <i>S</i> en color naranja. ....	42
<i>Gráfica 4:</i> Promedio de los valores de la energía libre de afinidad para los MCCs entre la AcCalB_silvestre y el ( <i>R</i> , <i>S</i> )-propranolol, y los MCCs con AcCalB_A282V que cumplen con dos criterios de selección (distancia <i>b</i> y <i>c</i> <4Å y RMSD entre 0Å a 0,5Å). Los valores para el enantiómero <i>R</i> se muestran en color amarillo y para el enantiómero <i>S</i> en color naranja. ....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1:</i> Distancias y ángulos para los puentes de hidrógeno de las conformaciones representativas A282V_01, A282V_02 y A282V_03 de la AcCalB_A282V. Igualmente se muestran para la conformación ACE03 de la AcCalB_silvestre. ....	37
<i>Tabla 2:</i> Complejos modelados por conformación representativa y sustrato acoplado. En paréntesis se especifica el modo de unión de los MCCs.....	39
<i>Tabla 3:</i> Población de los MCCs para cada criterio de selección (distancia b y c < 4Å y RMSD entre 0Å a 0,5Å) en los enfoques rígido, flexible 1 y flexible 2. En paréntesis se especifica el modo de unión (I) y (II) de los MCCs.....	39
<i>Tabla 4:</i> Promedio y desviación estándar de los valores de energía libre de afinidad para los MCCs.....	41
<i>Tabla 5:</i> Promedio y desviación estándar de los valores de energía libre de afinidad para los MCCs obtenidos con la AcCalB_A282V y los MCCs con la AcCalB_silvestre. Para la AcCalB_A282V solo se muestra la población de MCCs diferentes (RMSD entre 0Å a 0,5Å). Se presentan los MCCs modelados con un enfoque rígido para la enzima. Los modos de unión I y II se indican en paréntesis. ....	45
<i>Tabla 6:</i> MCCs entre la AcCalB_A282V y el (R, S)-propranolol obtenidos para la O-acilación y la N-acilación. ....	47
<i>Tabla 7:</i> Población, promedio y desviación estándar de los valores de energía libre de afinidad para los MCCs modelados con un enfoque rígido de la AcCalB_A282V. Se compara la quimioselectividad en la formación de MCCs. En paréntesis se encuentran los resultados para el cambio del tipo de átomo del Nitrógeno del propranolol (NA). ....	48

## RESUMEN

**TÍTULO:** ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LOS COMPLEJOS DE MICHAELIS (MCCs) ENTRE EL MUTANTE A282V DE LIPASA B DE *Candida antarctica* Y EL (R, S)-PROPRANOLOL\*

**AUTORA:** Andrea Yulieth Garzón Serrano \*\*

**PALABRAS CLAVES:** Lipasa B de *Candida antarctica*, Propranolol, Autodock Vina, acoplamiento molecular flexible

**DESCRIPCIÓN:** Experimentalmente en la resolución cinética del (R, S)-propranolol catalizada por la Lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) se ha logrado alcanzar una enantioselectividad menor de 70. Con el fin de comprender la enantioselectividad de la reacción, en el Grupo de Bioquímica Teórica de la UIS se está evaluando el efecto, *in silico*, de introducir mutaciones en el sitio activo de CalB, entre ellas la mutación Ala282Val (A282V). Mediante programas de acoplamiento molecular se exploran las formas como el sustrato interactúa con la enzima. Con esta simulación se logra conocer estructuralmente a los primeros complejos formados entre la enzima y el sustrato, conocidos como complejos de Michaelis (MCCs). Teniendo en cuenta la complejidad de la reacción de acilación catalizada por CalB, en este trabajo de grado se evalúa el efecto de emplear un tratamiento rígido y un tratamiento flexible de la CalB sobre los MCCs formados al introducir la mutación A282V. Se utilizó el programa Vina para modelar los MCCs entre la enzima mutante CalB\_A282V y el (R, S)-propranolol empleando dos enfoques diferentes de acoplamiento molecular: a) enzima rígida y sustrato flexible, y b) algunos residuos aminoacídicos del sitio activo de la enzima flexibles y sustrato flexible. Se tuvo en cuenta la población de MCCs, la energía libre de afinidad, los modos de unión del (R, S)-propranolol en el sitio activo de CalB y las interacciones no covalentes para evaluar el efecto de la mutación A282V. Los resultados indican que el acoplamiento molecular flexible permite una mayor población de MCCs, energía libre de afinidad más negativa y diferentes modos de unión de los MCCs entre CalB\_A282V y el (R, S)-propranolol con respecto al tratamiento de la enzima con un enfoque rígido. Lo anterior permite sugerir que al realizar acoplamientos moleculares la proteína sea tratada con un enfoque flexible.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directores: Markus Doerr, Martha Daza y Daniel Iván Barrera.

## ABSTRACT

**TITLE:** COMPUTATIONAL STUDY OF MICHAELIS COMPLEXES (MCCs) BETWEEN THE A282V MUTANT OF *Candida antarctica* LIPASE B AND (*R, S*)-PROPRANOLOL\*

**AUTHOR:** Andrea Yulieth Garzón Serrano\*\*

**KEYWORDS:** *Candida antarctica* lipase B, Propranolol, Autodock Vina flexible molecular docking

**DESCRIPTION:** Experimentally in the kinetic resolution of (*R, S*)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (CalB) an enantioselectivity lower than  $E=70$  has been achieved. Previous experimental and computational studies, which were performed in the Grupo de Bioquímica Teórica (UIS), suggest that mutations of the amino acid residues Ile189, Leu278, and Ala282 may improve the enantioselectivity of the enzyme. The present work is a first step in the computational study of the effect of the mutation Ala282Val. Using molecular docking the interactions between propranolol and the enzyme in the first stage of the reaction, the Michaelis complexes (MCCs), have been investigated. In these complexes the substrate has an orientation in the active site which is adequate for reaction. Several variants of the docking procedure have been tested, employing a completely rigid or partially flexible protein. The Autodock Vina program has been used. The populations of the MCCs, the free binding energy, the binding modes of (*R, S*)-propranolol in the active site of CalB and non-covalent interactions of the MCCs have been taken into account to evaluate the effect of the mutation A282V. The results indicate that employing flexible molecular docking larger populations of the MCCs, stronger binding and different binding modes of propranolol are obtained than with the rigid docking approach. These results suggest that it is preferable to allow some flexibility of the protein when doing molecular docking.

---

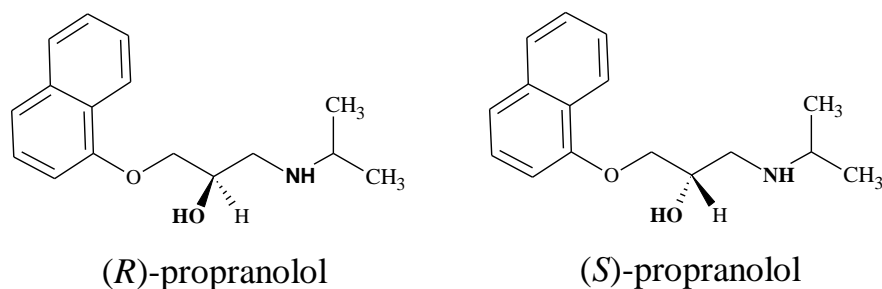
\* Bachelor Thesis

\*\*Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directores: Markus Doerr, Martha Daza y Daniel Iván Barrera.

## INTRODUCCIÓN

El propranolol (*Figura 1*) es un medicamento utilizado como agente bloqueador  $\beta$  adrenérgico <sup>1</sup>. La acción terapéutica es atribuida al enantiómero *S* mientras que el enantiómero *R* presenta efectos indeseados <sup>2</sup>, por lo que separar estos enantiómeros es de gran interés.

*Figura 1*: Enantiómeros (*R*) y (*S*) del propranolol.



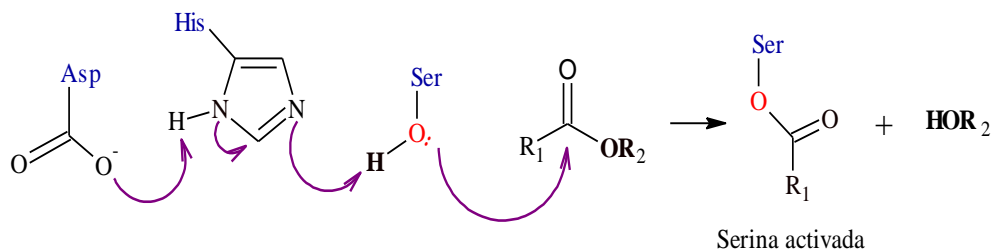
Una metodología adecuada para la preparación de fármacos enantioméricamente puros es la resolución cinética catalizada por lipasas, algunas de sus aplicaciones incluyen la resolución cinética de alcoholes, aminas, ésteres, entre otros <sup>3</sup>. La resolución cinética catalizada por lipasa es de interés para la industria debido a que mantienen su actividad en solventes orgánicos <sup>4</sup>.

El mecanismo catalítico de las lipasas presentado en la *Figura 2* consta de dos pasos: En el primero se necesita de un donador acilo para llevar a cabo la reacción de acilación de la enzima. Una vez acilada la enzima se transfiere el grupo acilo al sustrato de interés, de esta forma la enzima se regenera mediante la reacción de desacilación de la enzima. Los aminoácidos que conforman la triada catalítica de una lipasa son: Aspartato o Glutamato, Histidina y Serina. Su función se describe a continuación: los residuos aminoácidos Aspartato o Glutamato inducen un aumento en la basicidad de la Histidina, que a su tiempo realiza catálisis ácido/base (en la reacción de acilación la Histidina desprotonada abstrae el protón de la Serina y en desacilación la Histidina protonada devuelve el protón a la Serina). En la reacción de acilación la Serina de triada catalítica actúa como nucleófilo atacando el

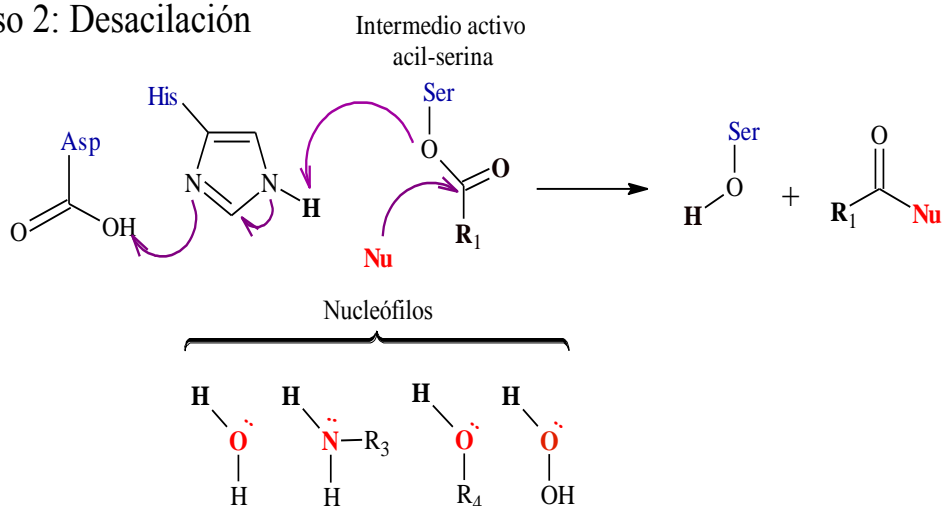
carbono electrodeficiente del donador acilo. En la reacción de desacilación el grupo nucleófilo del sustrato ataca el carbono electrodeficiente de la acil-serina.

Figura 2: Mecanismo de reacciones catalizadas por lipasas.

### Paso 1: Acilación



### Paso 2: Desacilación



Tomado de <sup>5</sup> con modificaciones hechas por la autora.

Lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) es una enzima conformada por 317 aminoácidos y su peso molecular es de 33kDa. CalB en solvente orgánico cataliza reacciones de esterificación y la enantioselectividad que muestra en sustratos con sustituyentes en el carbono quiral que presentan grandes diferencias en tamaño se explica por los impedimentos estéricos creados por los residuos aminoácidos que conforman el bolsillo de unión al ligando de CalB <sup>6</sup>. A pesar de que la CalB presenta alta enantioselectividad en reacciones de acilación sobre alcoholes secundarios no se evidencia lo mismo en la

acilación del (*R,S*)-propranolol <sup>7, 8</sup>. Una posibilidad para aumentar la enantioselectividad de esta reacción es la modificación genética de la enzima <sup>3</sup>.

Experimentalmente realizar mutaciones a la enzima es una práctica muy costosa debido a todas las posibles combinaciones entre aminoácidos que pueden ser cambiados <sup>9</sup>. El modelado molecular se ha convertido en una herramienta para la biocatálisis debido a que facilita el análisis a nivel molecular de las interacciones enzima-sustrato y las modificaciones en el sustrato, la enzima o las condiciones de reacción para cambiar la selectividad de la reacción <sup>10</sup>.

En el Grupo de Bioquímica Teórica de la UIS estudios computacionales realizados sobre la reacción de acilación del (*R,S*)-propranolol catalizada por la CalB <sup>8, 11</sup> demuestran que el grupo naftilo del propranolol se estabiliza con residuos aminoácidos hidrofóbicos del bolsillo de unión de la CalB mediante interacciones CH- $\pi$ . Basados en resultados de perturbación electrostática se supone que los residuos claves para la enantioselectividad de la reacción son Ile189, Ala282 y Leu278 <sup>11</sup>. Con el ánimo de mejorar la enantioselectividad de CalB y aumentar la comprensión de cómo esta enzima logra distinguir dos enantiómeros <sup>12</sup>, en la actualidad en el grupo de investigación se están diseñando mutantes *in silico* de CalB y por ello se espera que la mutación A282V (Ala282Val) permita modificar la enantioselectividad de la reacción.

Las reacciones catalizadas por enzimas se caracterizan por la unión del sustrato que ocurre en una cavidad de la enzima llamada sitio activo <sup>13</sup>. Para comprender este proceso catalítico, además de conocer la estructura de la enzima nativa, es indispensable describir de manera detallada las interacciones intermoleculares de los complejos enzima-sustrato, los intermediarios de la reacción y los productos de la reacción <sup>14, 15</sup>.

Un subconjunto de los complejos enzima-sustrato con una orientación del sustrato que facilita que la reacción ocurra se denomina complejos de Michaelis (MCCs). La importancia del modelado de los MCCs radica en que a partir de ellos procede la reacción de acilación o desacilación del (*R,S*)-propranolol catalizada por CalB <sup>8, 11</sup>. Para la simulación de los MCCs se usan programas que predicen el acoplamiento molecular entre la enzima y el sustrato, estos programas generan un conjunto de conformaciones de los

complejos mediante algoritmos de búsqueda. Además estos programas clasifican las conformaciones de acuerdo a su estabilidad a través de funciones de puntuación<sup>16,17</sup>.

Las investigaciones actuales en el diseño de fármacos se centran en la importancia de los cambios conformacionales y la forma en la que se controlan las reacciones enzimáticas. La rigidez en la enzima es un buen punto de partida explicando la complementariedad entre enzima y sustrato (teoría de llave-cerradura). Sin embargo al introducirse el concepto de enzima flexible (teoría del ajuste inducido) se hace evidente que la movilidad deba ser incluida en cálculos computacionales con programas sofisticados<sup>18</sup>.

Para la reacción de acilación de (*R, S*)-propranolol catalizada por la CalB se desconocen las diferencias o semejanzas entre el tratamiento rígido y el tratamiento flexible de la proteína durante el modelado de los MCCs. Es por ello que se espera aportar en la exploración de una metodología adecuada en el enfoque aplicado a la proteína en acoplamiento molecular futuro. Para lograr lo anterior, en el presente trabajo de grado para optar al título de Química se modelaron complejos de Michaelis (MCCs) entre la enzima mutante CalB\_A282V y el (*R, S*)-propranolol utilizando el programa de código abierto Vina. Se emplearon dos enfoques diferentes de acoplamiento molecular: a) enzima rígida y sustrato flexible, y b) algunos residuos aminoacídicos del sitio activo flexibles y sustrato flexible. Se analizaron la población, las formas en que el sustrato interactúa con el sitio activo, las interacciones no covalentes y la energía libre de afinidad para los MCCs modelados. Finalmente se compararon los resultados obtenidos con la CalB\_A282V con los reportados para la CalB\_silvestre<sup>8</sup>.

El contenido del presente libro está distribuido en cuatro secciones. En la primera se describen conceptos importantes que construyen la base del trabajo de investigación desarrollado. En la segunda se explica la metodología utilizada para modelar los MCCs. En la tercera parte se expone y discute los resultados obtenidos con la metodología desarrollada en este proyecto. Finalmente en la cuarta sección se presentan las conclusiones.

Este trabajo cuenta con tres apéndices en los que se provee la información complementaria para la metodología y el análisis de los resultados.

Parte de los resultados se presentaron en el III Congreso Colombiano de Biología Computacional y Bioinformática.:

- Andrea Yulieth Garzón Serrano, Daniel Iván Barrera, Martha C. Daza, Markus Doerr “Estudio computacional de los complejos de Michaelis (MCCs) entre el mutante A282V de lipasa B de *Candida antarctica* y el (R,S)-propranolol”. **III Congreso Colombiano de Biología Computacional y Bioinformática, Septiembre 16-18, Medellín, Colombia, 2015.**

También se presentaron en el encuentro científico de la Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander:

- Andrea Yulieth Garzón Serrano, Daniel Iván Barrera, Martha C. Daza, Markus Doerr “Efecto de la flexibilidad de la enzima CalB sobre los Complejos de Michaelis entre el mutante A282V y el (R, S)-propranolol”. **I Encuentro Científico de la Facultad de Ciencias, Noviembre 25-26, Bucaramanga, Colombia, 2015.**

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1. Quiralidad

La quiralidad desempeña un papel importante en las interacciones con sustancias bioactivas ya que a nivel molecular la asimetría domina los procesos biológicos: los receptores y las enzimas son quirales y, por lo tanto muestran enantioselectividad en su unión a sustratos como neurotransmisores, hormonas, fármacos, etc <sup>19</sup>. Cuando una molécula no es superponible con su imagen especular, debido a que en uno de sus átomos de carbono sus cuatro sustituyentes son diferentes, da origen a una clase de estereoisómeros conocidos como enantiómeros, estos presentan propiedades físicas y químicas idénticas, solo se diferencian en su actividad óptica <sup>20</sup>. Una mezcla con 50% de cada enantiómero se denomina mezcla racémica y es ópticamente inactiva, su separación (resolución) representa una tarea especial que debe ser abordada en forma muy particular.

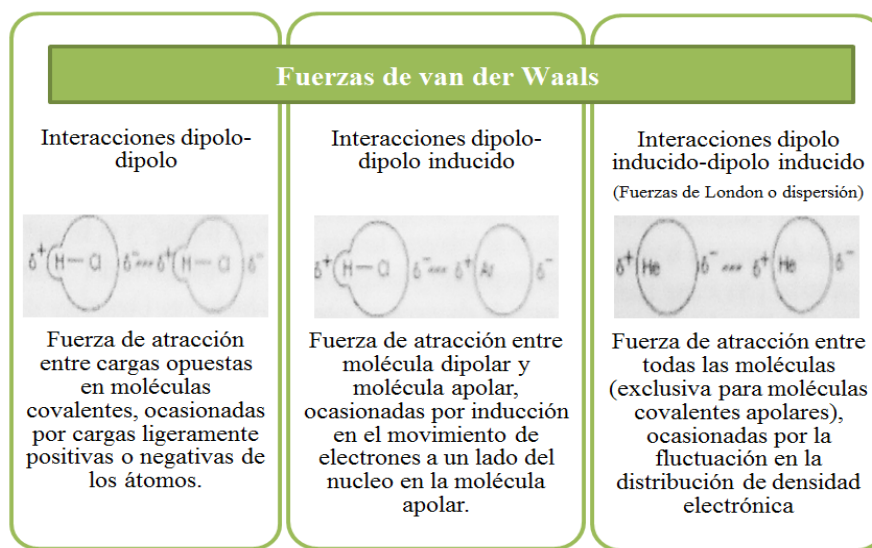
## 1.2. Interacciones intermoleculares y puente de hidrógeno

El estudio de las interacciones intermoleculares comienza al reconocer la presencia de fuerzas atractivas y repulsivas entre moléculas. Bajo determinadas ocasiones las interacciones intermoleculares dan lugar a la formación de nuevas moléculas por ruptura/formación de enlaces químicos y en otras se da la formación de complejos de van der Waals. En el *Esquema 1* se encuentran las interacciones interatómicas atractivas (interacciones entre dipolos permanentes, dipolos inducidos y dipolos permanentes/inducidos) que en conjunto se conocen como fuerzas de van der Waals <sup>21</sup>.

Adicionales a las fuerzas de van de Waals, existe una interacción muy fuerte y específica de ciertas moléculas: interacción puente de hidrógeno. Según la definición en el Goldbook de la IUPAC los puentes de hidrógeno “son una forma de asociación entre un átomo electronegativo y un átomo de hidrógeno unido a un segundo átomo relativamente electronegativo... son considerados como una interacción electrostática, pueden ser inter o intramoleculares y las energías asociadas son  $< 20 - 25\text{kJ/mol}$  ( $5 - 6 \text{ kcal/mol}$ )” <sup>22</sup>.

Un puente de hidrógeno suele representarse como  $X-H\cdots Y$  donde X es el átomo electronegativo unido al hidrógeno y Y el átomo con que el hidrógeno forma un puente, el cual debe cumplir con ser electronegativo y con tener disponible un par de electrones no enlazantes. Geométricamente se supone que el protón se ubica a lo largo del eje  $X\cdots Y$  formando un puente de hidrógeno lineal <sup>21</sup>.

*Esquema 1:* Fuerzas de van der Waals. Las moléculas que se muestran son ejemplos de las diferentes interacciones: en las interacciones dipolo-dipolo  $HCl\cdots HCl$ , en las interacciones dipolo-dipolo inducido  $HCl\cdots Ar$ , y en las interacciones dipolo inducido-dipolo inducido  $He\cdots He$ .



### 1.3. Propranolol

El propranolol ((*R*, *S*)-1-iso-propilamino-3-(1-naftoxi)-2-propanol) presenta un centro quiral dando origen a una pareja de enantiómeros; está constituido por un anillo naftilo y dos grupos nucleofílicos: el grupo hidroxilo y el grupo amino (*Figura 1*). Al poseer en su estructura química estos dos grupos se clasifica como un aminoalcohol, que son de gran valor e interés <sup>23</sup>. El propranolol es un fármaco que bloquea los receptores  $\beta$  adrenérgicos ( $\beta$ -bloqueador) <sup>24</sup>, actualmente es utilizado en el tratamiento de temblores, angina (dolor de pecho), hipertensión, problemas de ritmo cardíaco, y otras condiciones del corazón o del

sistema circulatorio. La mayoría de los agentes  $\beta$ -bloqueadores se venden en forma racémica, con el enantiómero (*S*) la actividad de bloqueo es más potente mientras que en algunos casos el enantiómero (*R*) muestra falta de actividad <sup>25</sup>, además es posiblemente el responsable de efectos secundarios como diabetes en personas hipertensivas <sup>26</sup> y broncoconstricción en pacientes asmáticos <sup>27</sup>.

## 1.4. Lipasas

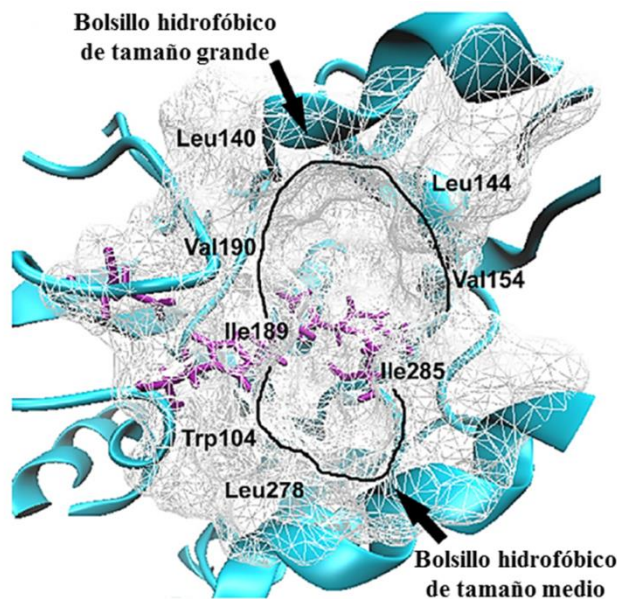
Las lipasas pertenecen a la familia de las triacilglicerol hidrolasas (EC 3.1.1.3), son enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos en medio acuoso y esterificación o transesterificación en solventes orgánicos. La estructura tridimensional de las lipasas presenta un núcleo de hojas plegadas  $\beta$  rodeado de hélices  $\alpha$ . Su plegamiento se clasifica como plegamiento  $\alpha/\beta$  <sup>28</sup>. En algunas lipasas se presenta un péptido que protege al sitio activo del medio y en interfaces lípido-agua permite la entrada del sustrato <sup>29</sup>.

### 1.4.1. Lipasa B de *Candida antártica*

La levadura *Candida antarctica* fue aislada originalmente en la Antártida y produce dos variantes de lipasa, lipasa A (CalA) y lipasa B (CalB) de *Candida antarctica*. Entre las lipasas más utilizadas se encuentra la CalB, está constituida por 317 aminoácidos y tiene un peso molecular de 33kDa. El sitio activo está conformado por los aminoácidos Ser105, His224 y Asp187 en la tríada catalítica, Thr40 y Gln106 en el hueco oxianiónico <sup>30</sup> y el bolsillo de unión al ligando (*Figura 3*) constituido por un bolsillo hidrofóbico de tamaño grande por encima de la tríada catalítica (Ile189, Val190, Val154, Leu140, Leu144, Asp134 y Gln157), y uno de tamaño medio por debajo de ella (Trp104 y Leu278-Ala287) <sup>11</sup>.

Cuando el anillo naftilo del propranolol se encuentra orientado hacia el bolsillo hidrofóbico de tamaño grande se considera que el propranolol interactúa con el sitio activo en modo de unión I. En los casos donde el anillo naftilo se ubica en el bolsillo hidrofóbico de tamaño medio, el sustrato ha interactuado con el sitio en una nueva forma: modo de unión II.

*Figura 3:* Bolsillo de unión de la CalB con la tríada catalítica Asp187-His224-Ser105 orientado de izquierda a derecha.



Tomado de referencia <sup>11</sup>.

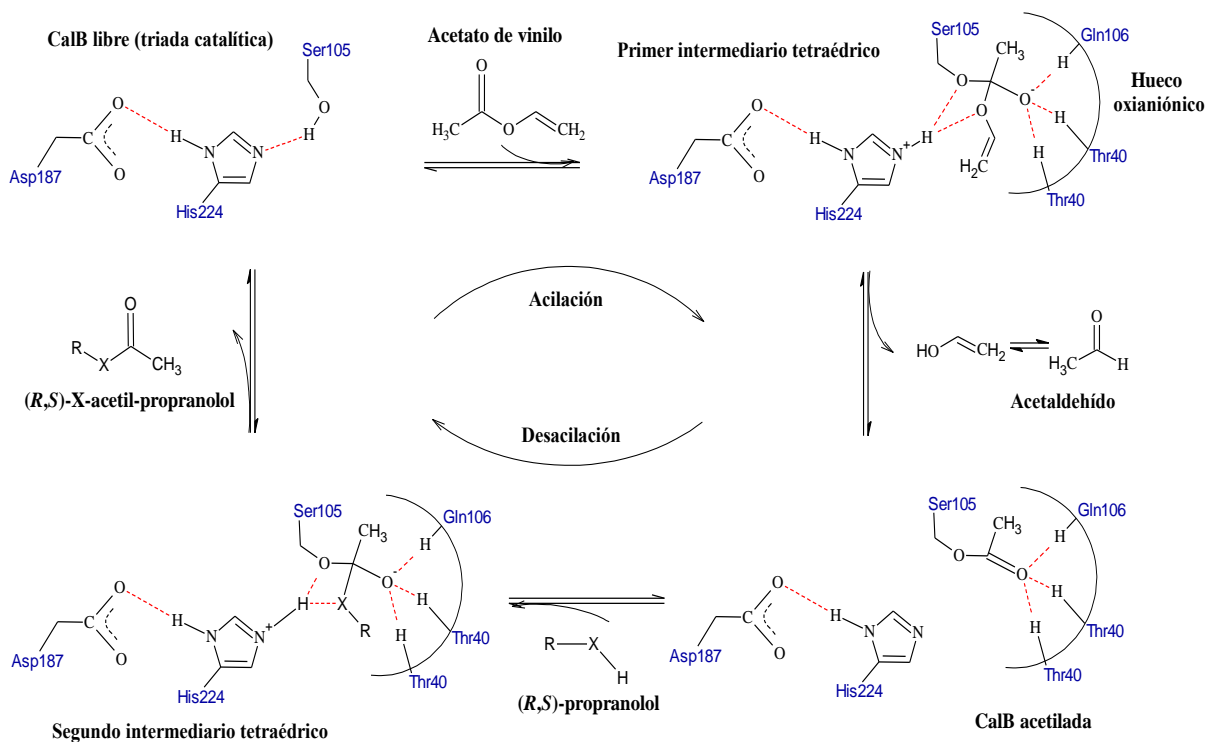
### 1.5. Mecanismo catalítico

Un conocimiento detallado del mecanismo de reacción enzimático es necesario para entender el origen de la especificidad de la enzima <sup>31</sup>. En la *Figura 4* se presenta el mecanismo de reacción de acilación catalizada por la CalB. El primer paso es la reacción de acilación de la Ser105 por parte del donador acilo, el acetato de vinilo en este estudio, formándose el primer intermediario tetraédrico acil-enzima.

La carga negativa del Oxígeno del primer intermediario tetraédrico es estabilizada mediante puentes de hidrógeno con residuos aminoácidos que conforman el hueco oxianiónico que se encuentra cerca a la tríada catalítica. Como producto de la reacción de acilación se produce CalB acetilada. La CalB acetilada forma MCCs con el (*R, S*)-propranolol comenzando de esta forma con la etapa de desacilación mediante el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo del sustrato al carbono electrodeficiente presente en la Ser105 de CalB

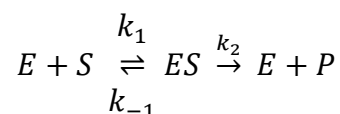
acetilada, originándose el segundo intermediario tetraédrico de la reacción. Finalmente se obtienen como productos de la reacción de desacilación el (*R, S*)-*O*-acetil-propranolol y la enzima regenerada (CalB). En estudios experimentales sobre la reacción de acilación del (*R, S*)-propranolol se reporta la quimioselectividad hacia la *O*-acilación del aminoalcohol <sup>8</sup>.

Figura 4: Mecanismo de reacción de la acilación del (*R, S*)-propranolol catalizada por la CalB <sup>32</sup>. Los puentes de hidrógeno se muestran en color rojo.



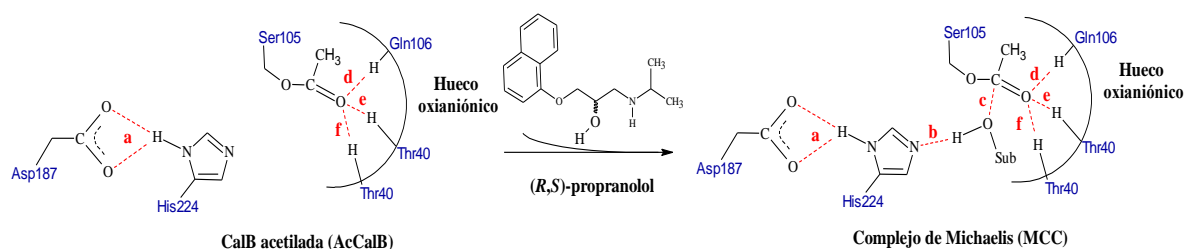
### 1.5.1. Complejos de Michaelis (MCCs)

Para la segunda etapa de la reacción (desacilación) en la Figura 5 se muestra la formación de los complejos de Michaelis (MCCs) entre la AcCalB y el (*R, S*)-propranolol. Estos complejos consisten en conformaciones enzima-sustrato en las que el sustrato es estabilizado en el sitio activo de la enzima. La estabilización se hace mediante interacciones no covalentes, entre ellas puentes de hidrógeno <sup>33</sup>. La formación de estos complejos es el primer paso en todas las reacciones catalizadas por enzimas, las cuales se pueden analizar teniendo en cuenta la ecuación general <sup>34</sup>:



Donde E: enzima, S: sustrato,  $k_1$ : constante de la velocidad de formación y  $k_{-1}$ : constante de disociación del complejo enzima-sustrato (ES),  $k_2$ : constante de la velocidad de conversión de la enzima (E) a producto (P). La velocidad inicial máxima de la reacción catalizada es alcanzada cuando la concentración del sustrato (S) permite la saturación de la E, obteniéndose un mayor % del complejo ES <sup>13</sup>.

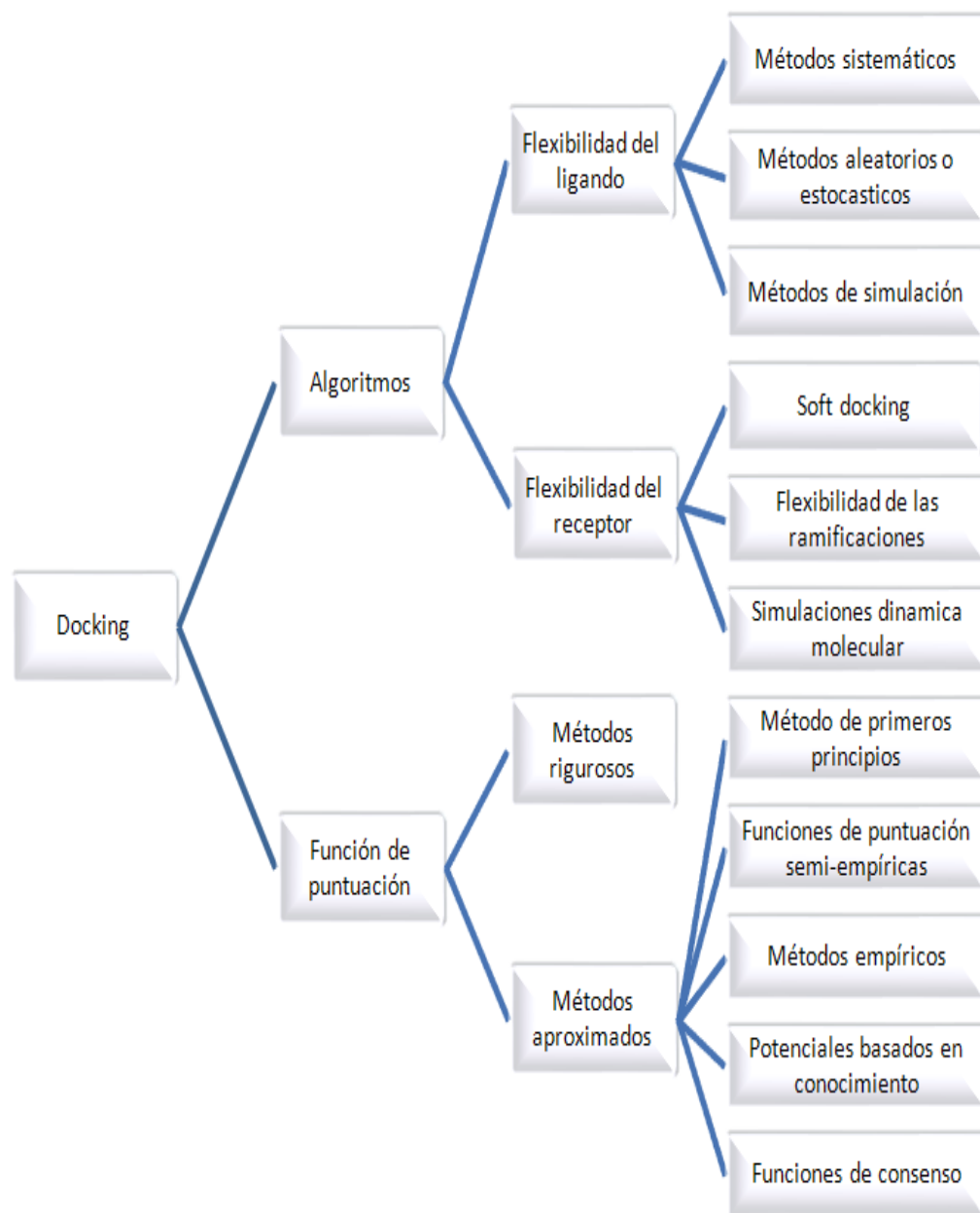
*Figura 5:* Formación de MCCs entre la CalB acetilada y el (R, S)-propranolol en la etapa de desacilación de la enzima durante la reacción de desacilación. Las distancias interatómicas importantes en el proceso catalítico se muestran en color rojo.



## 1.6. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (*docking*) es una técnica computacional empleada para evaluar la afinidad de unión no covalente de un ligando a un receptor obteniéndose posibles conformaciones del sustrato dentro del sitio de unión de la proteína <sup>35</sup>. Los protocolos de acoplamiento molecular son la combinación de una estrategia de búsqueda de complejos entre el receptor y el ligando mediante algoritmos y una función de puntuación (*scoring*) que se dividen en diferentes categorías mostradas en el *Esquema 2*. En general el procedimiento consiste en crear una pose (determinada posición y orientación del ligando en el sitio activo), puntuarla y compararla con las demás siendo aceptada o rechazada dependiendo de la puntuación que obtenga <sup>16</sup>.

Esquema 2: Categorías generales de algoritmos y funciones de puntuación utilizados en acoplamiento molecular.



Siguiendo la hipótesis del modelo llave-cerradura para estudiar las interacciones E-S, muchos métodos de acoplamiento tratan a la proteína de forma rígida (*docking* rígido). Sin embargo, la unión del ligando a la proteína es un proceso dinámico y no estático. Actualmente, es posible incluir la flexibilidad en la proteína (*docking* flexible)<sup>35</sup>.

El tratamiento de los cambios conformacionales de la proteína es un gran desafío ya que está relacionado con un incremento en el espacio conformacional que será muestreado y al costo computacional en el cálculo de la función de puntuación. Este enfoque no es factible para toda la proteína y es por ello que son seleccionados los grados de libertad de la proteína que sean relevantes en la unión al sitio activo <sup>36</sup>.

Existen un gran número de programas para realizar el acoplamiento molecular, sin embargo la familia AutoDock se caracteriza por ser de los pocos programas de acoplamiento disponibles gratuitamente para uso académico e industrial <sup>37</sup>. El interés en maximizar la exactitud de predicciones y reducir al mínimo el tiempo de computación genera nuevos programas, como Vina que emplea una función de puntuación más sencilla permitiendo una búsqueda mejor y resultados reproducibles para sistemas con más de 20 enlaces flexibles comparado con AutoDock 4.2 que genera estos resultados para ligandos con aproximadamente 10 enlaces flexibles <sup>38</sup>.

Con un conjunto de 190 complejos proteína-ligando de los que se conoce su estructura cristalográfica fueron comparadas las predicciones de acoplamiento que se obtienen en Vina y AutoDock 4.0.1 (*Figura 6*). Estas predicciones son significativamente mejoradas con Vina al calcular la desviación cuadrática media (RMSD) con respecto a los complejos reportados ( $RMSD \leq 2\text{\AA}$  para Vina) <sup>39</sup>

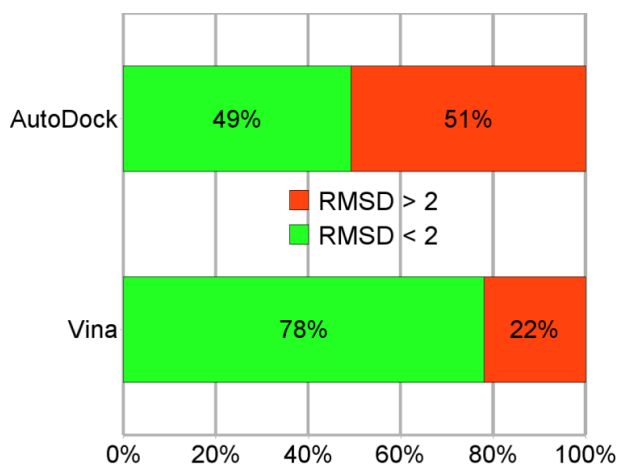
El RMSD se define como:

$$RMSD_{ab} = \max(RMSD'_{ab}, RMSD'_{ba}) \qquad RMSD'_{ab} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{ij} \min r^2_{ij}}$$

Para dos estructuras a y b de una molécula idéntica, la sumatoria es sobre todos los átomos pesados de la estructura a, el mínimo es sobre todos los átomos de la estructura b con el mismo tipo de átomo i en la estructura a.

AutoDock4 y Vina utilizan el mismo formato para los archivos de entrada. Las diferencias entre los dos programas se deben a que en Vina se realiza internamente el cálculo previo del mapa grid. Adicionalmente en Vina es completamente nuevo el código fuente, el algoritmo de búsqueda es iterado y la optimización de la función de puntuación está basada en el gradiente de la misma. Las interacciones que son consideradas en la función de puntuación se explican a continuación.

*Figura 6:* Resumen de las fracciones de predicciones precisas para AutoDock y Vina. El límite de RMSD en 2Å es utilizado como criterio para una correcta predicción en la estructura acoplada.



Tomado de referencia 39

## 1.7. Función de puntuación

Una función de puntuación es una función que se usa para calcular y puntuar las interacciones favorables (interacciones de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y electrostáticas) en la estabilización de los complejos entre la proteína y el ligando. Teniendo en cuenta el número de las interacciones entre ligando y receptor se evalúan las poses con campos de fuerza definidos para diferentes tipos de átomos<sup>35</sup>. La forma general funcional dependiente de la conformación en la función de puntuación de Vina está diseñada para trabajar con:

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij})$$

$$f_{t_i t_j}(r_{ij}) \equiv h_{t_i t_j}(d_{ij})$$

$$d_{ij} = r_{ij} - R_{t_i} - R_{t_j}$$

donde la sumatoria es sobre todo el par de átomos que se pueden mover relativamente a otro, excluyendo interacciones 1-4. Cada átomo  $i$  está asignado a un tipo  $t_i$  y se define un conjunto de funciones de interacciones  $f_{iij}$  de una distancia interatómica  $r_{ji}$ . Esta distancia corresponde a la distancia de superficie teniendo en cuenta los radios de Van der Waals  $R_r$ . En la función de puntuación de Vina  $h_{iij}$  es la suma ponderada de las interacciones estéricas idénticas para todos los pares de átomos, interacciones hidrofóbicas entre átomos hidrófobos y enlaces de hidrógeno cuando son aplicables.

El algoritmo de optimización (búsqueda) trata de encontrar el menor valor de  $c$ , este puede verse como la suma de la contribución intramolecular e intermolecular:

$$c = c_{inter} + c_{intra}$$

La energía libre de unión se calcula a partir de la conformación con el menor valor de scoring, se representa como 1:

$$s_1 = g(c_1 - c_{intra1}) = g(c_{inter1}) \qquad s_i = g(c_i - c_{intra})$$

donde  $g(c_{inter})$  es la función independiente de la conformación. Esta función tienen en cuenta el número de enlaces rotables de átomos pesados en el ligando. En la salida (output) del programa las otras conformaciones se calculan teniendo en cuenta el  $c_{intra}$  del mejor modo de unión.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Preparación de la acilenzima (acil-CalB) e introducción de la mutación Ala282 por Val282

A la estructura cristalina de la CalB (código PDB: 1TCA) se le removieron las dos unidades de N-acetil\_glucosamina (NAG) debido a que están ubicadas lejos del sitio activo. Se utilizó los programas PB2PQR<sup>40</sup> y PROPKA<sup>41, 42</sup> para realizar la protonación de CalB. Después, se cambió el grupo OH del residuo Ser105 por el grupo COCH<sub>3</sub> para obtener la acilenzima (AcCalB). Se realizó con un tratamiento de cuerpo rígido para la enzima el acoplamiento molecular entre el (*R*, *S*)-propranolol y la AcCalB. Se llevó a cabo una optimización para determinar posibles efectos en la estructura de la AcCalB debidos a la presencia del sustrato. La optimización fue realizada con un enfoque QM/MM (región QM para el sustrato con el método SCC-DFTB<sup>43 44</sup>, y región MM para AcCalB y aguas de cristalización con el programa CHARMM<sup>45</sup>). Los MCCs modelados con la estructura ACE03 se conservaron luego de la optimización<sup>8</sup>. Por estos resultados fue escogida la conformación ACE03 como blanco para realizar la modificación en el sitio activo de CalB de la cadena lateral de Ala282 (radical metil) por Val282 (radical isopropil).

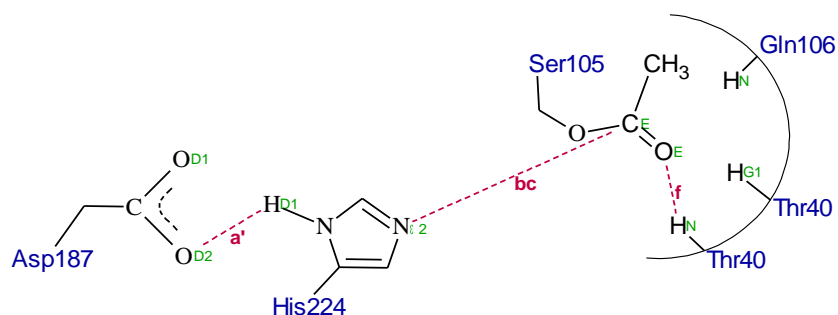
La mutación A282V en la AcCalB fue realizada por el estudiante de doctorado Daniel Barrera y la metodología que utilizó fue la siguiente<sup>46</sup>: Para realizar la modificación en el sitio activo usó el script para VMD<sup>47</sup> mutate\_res<sup>48</sup> (*Apéndice A.1*). Luego del cambio estructural en el bolsillo de unión, realizó una dinámica molecular para evaluar la estabilidad de la estructura secundaria del mutante AcCalB\_A282V, usando como criterio la RMSD. La dinámica molecular la llevó a cabo con el programa CHARMM<sup>45</sup>, en Tolueno explícito y con dos tiempos de simulación (2ns y 20ns) (*Apéndice A.2*).

### 2.2 Selección de las conformaciones representativas de la AcCalB\_A282V a partir de 3 distancias interatómicas

Se filtraron las conformaciones de la enzima que cumplieran con valores menores a 4Å en las distancias interatómicas que se muestran en la *Figura 5*. Se escogieron 3 distancias interatómicas (*Figura 7*) analizando su comportamiento en la trayectoria de dinámica

molecular de la AcCalB\_A282V (*Apéndice B.1*). Para seleccionar las 3 conformaciones representativas se estableció un rango entre promedio  $\pm$  desviación estándar de cada distancia escogida. Cada conformación representativa de la AcCalB\_A282V fue nombrada A282V\_01 (distancia f), A282V\_02 (distancia a') y A282V\_03 (distancia bc). Adicionalmente a la trayectoria de la dinámica molecular de AcCalB\_A282V se le realizó un análisis del solvente y aguas de cristalización, donde se encontraron 4 aguas de cristalización dentro del sitio activo de la enzima. Debido a que en el transcurso de la dinámica molecular de AcCalB\_A282V las aguas de cristalización encontradas se alejan del sitio activo (*Apéndice B.2*), estas fueron removidas en las conformaciones representativas de la AcCalB\_A282V.

*Figura 7:* Distancias interatómicas a', bc y f seleccionadas (color vinotinto). En color verde está la identificación de cada átomo que será usada en adelante.



### 2.3 Evaluación del efecto de la flexibilidad de la AcCalB\_A282V sobre los MCCs.

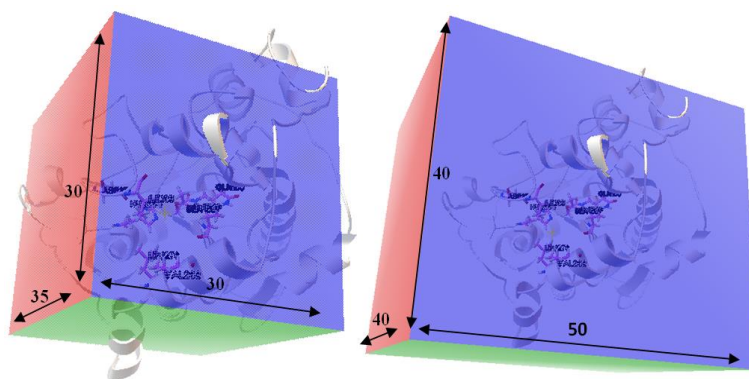
Se realizaron dos tratamientos para la AcCalB\_A282V: enzima rígida y algunos residuos aminoacídicos del sitio activo flexibles. Para este último enfoque se llevaron a cabo dos tipos de simulaciones. La primera fue nombrada flexible 1 y consideró flexibles a los aminoácidos de la triada catalítica y hueco oxianiónico Asp187 His224 Ser105 Thr40 Gln106. La segunda simulación fue nombrada flexible 2 y consideró, además de los residuos anteriormente nombrados (flexible 1), a los aminoácidos Ile189 Val282 Leu285. Los archivos de entrada de la AcCalB\_A282V fueron preparados en el programa AutoDockTools (ADT) <sup>49, 50</sup>.

## 2.4 Simulación y criterios de selección de los MCCs entre la AcCalB\_A282V y el (R, S)-propranolol

Utilizando el programa Vina<sup>39</sup> se modelaron los acoplamientos moleculares no covalentes para cada enantiómero del propranolol y la AcCalB\_A282V. En el modelado se emplearon dos enfoques para la proteína, en el primero fue considerada como un cuerpo rígido y en el segundo donde algunas cadenas laterales de residuos aminoacídicos del sitio activo fueron flexibles. Para dar confiabilidad a la hora de comparar los resultados obtenidos, los dos enfoques realizados se llevaron a cabo bajo los mismos parámetros de búsqueda. Los parámetros utilizados fueron: tamaño de la caja de búsqueda 30Åx30Åx35Å (*Figura 8*) con centro en el Nitrógeno épsilon de la His224, exhaustividad de 40 y 10 modos de unión en cada búsqueda. Se realizaron 25 repeticiones de cada búsqueda con diferentes valores del parámetro random seed number, asegurando de esta forma un muestreo conformacional confiable.

Para determinar el efecto en los resultados al cambiar las dimensiones de la caja y centro de la caja, se realizó adicionalmente un nuevo acoplamiento molecular denominado nflexible2. Este ensayo incluyó los mismos residuos que la simulación flexible 2. Se utilizó un tamaño de caja de 50Åx40Åx40Å (*Figura 8*) y un centro con coordenadas 3,500; 4,900; 4,000. Las nuevas coordenadas se encuentran cerca al lugar donde se ubica el propranolol para ser acetilado, entre los residuos aminoacídicos His224 y Ser105.

*Figura 8:* Dimensiones de la caja de búsqueda para los enfoques rígido, flexible 1, flexible 2 (izq) y nflexible 2 (der).



Al explorar si el tipo de átomos fue asignado correctamente por el programa AutoDockTools (ADT) <sup>49, 50</sup>, se observó que el nitrógeno del propranolol fue asignado como donador de puente de hidrógeno en todas las simulaciones anteriores. Para revisar si al considerar este átomo como aceptor de puente de hidrógeno se modifican los resultados anteriores, se realizó otro acoplamiento cambiando el tipo de átomo (de N a NA) utilizando los mismos parámetros de búsqueda empleados en el acoplamiento molecular con enfoque rígido.

Los MCCs fueron escogidos cumpliendo con el criterio de las distancias interatómicas  $b$  y  $c < 4\text{Å}$  <sup>8, 15, 51</sup>. Para analizar MCCs diferentes, se compararon las estructuras de las poses del sustrato con RMSD entre  $0\text{Å}$  a  $0,5\text{Å}$  y se realizaron grupos, de los cuales fue escogido una pose representativa. Se asignó una nomenclatura para estos MCCs, siendo RIG01-RIG08 para enfoque rígido y FLEX01-FLEX59 para enfoque flexible (*Apéndice C*).

## **2.5 Análisis de los MCCs entre la AcCalB\_A282V y el (*R*, *S*)-propranolol**

A los MCCs fue analizada la población y la energía libre de afinidad. Las interacciones no covalentes fueron analizadas en los MCCs diferentes (RMSD). Para examinar las formas en que el sustrato interactúa con el sitio activo, los MCCs diferentes (RIG01-RIG08 Y FLEX01-FLEX59) para cada enantiómero del propranolol se clasificaron de acuerdo a la ubicación del grupo naftilo dentro del bolsillo de unión al ligando: Modo I (el anillo de naftilo se acomoda en el bolsillo hidrofóbico grande) y Modo II (el anillo de naftilo se acomoda en el bolsillo hidrofóbico medio) <sup>8</sup> (*Figura 9*).

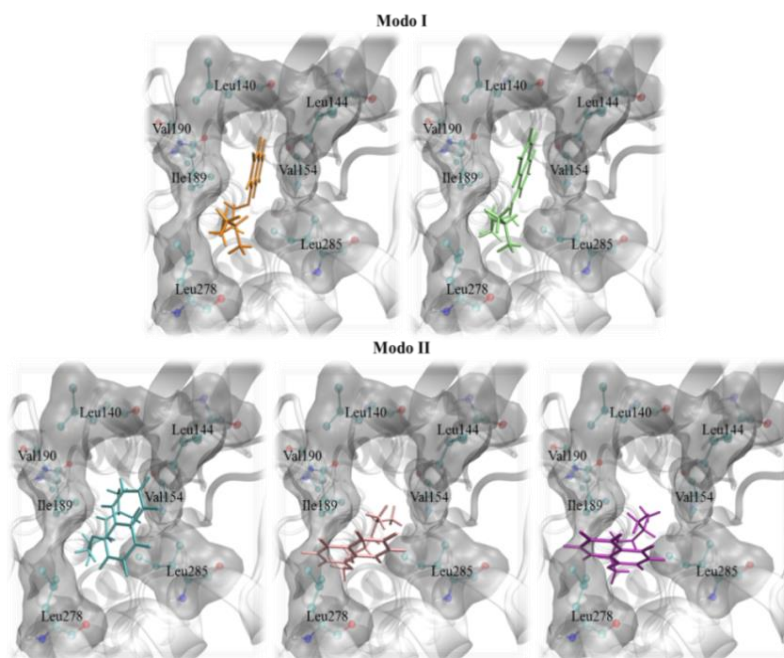
A partir de esta clasificación se eligió un representante para los nuevos grupos formados teniendo en cuenta la energía libre de afinidad más negativa y que los ángulos de las distancias intermoleculares fueran cercanos a los valores ideales ( $180^\circ$  para un puente de hidrógeno y  $98^\circ$  para un ataque nucleofílico). Adicional a la forma de ubicación en el bolsillo de unión, también se tuvo en cuenta el enfoque utilizado en el MCCs. En esta clasificación quedaron 12 MCCs para el (*R*)-propranolol y 8 MCCs para el (*S*)-propranolol.

Los MCCs entre AcCalB\_A282V y el (*R, S*)-propranolol fueron comparados con la AcCalB\_silvestre<sup>8</sup> en energía libre de afinidad y forma en que el sustrato interactúa con el sitio activo, evaluando de esta forma el efecto de la mutación A282V en el sitio activo de CalB sobre la formación de los MCCs con respecto a AcCalB\_silvestre.

## 2.6 Estudio de la quimioselectividad en la formación de MCCs entre la AcCalB\_A282V y el (*R,S*)-propranolol

Para evaluar si la mutación A282V en el sitio activo de CalB (AcCalB\_A282V) induce cambios en la quimioselectividad observada para la formación de los MCCs con la AcCalB\_silvestre, en los resultados simulados fueron medidas las distancias de los átomos Hsd224:NE2---H27:Sub (b') y Sea105:CE---N26:Sub (c'). Los criterios de selección y el análisis para los MCCs fueron los mismos mencionados en la sección 2.4 y 2.5.

*Figura 9:* Clasificación de los modos de unión del (*R, S*)-propranolol en el sitio activo de la enzima. En la parte superior de la imagen se muestran las formas como el anillo naftilo se ubica hacia el bolsillo hidrofóbico de tamaño grande (Modo I). En la parte inferior de la imagen se muestran las formas como el anillo de naftilo se ubica hacia el bolsillo hidrofóbico de tamaño medio.

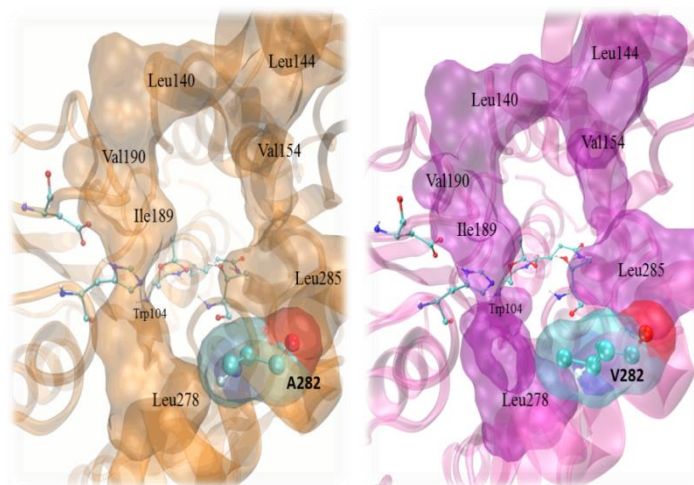


### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Cambio estructural en el bolsillo de unión al ligando inducido por la mutación A282V en el sitio activo de AcCalB

Los cambios estructurales en el bolsillo de unión de la CalB\_silvestre se observan en la *Figura 10*. La mutación A282V disminuye el espacio en el bolsillo hidrofóbico de tamaño medio del bolsillo de unión al ligando de CalB, ocasionado por el aumento de la cadena lateral del aminoácido cambiado (A282V).

*Figura 10*: Mutación A282V del sitio activo de CalB. El residuo modificado se muestra en representación CPK <sup>47</sup>. Algunos residuos aminoacídicos apolares que interactúan con el sustrato se muestran en representación Surf <sup>47</sup>. A la izquierda CalB\_silvestre y a la derecha CalB\_A282V.



#### 3.2 Conformaciones representativas seleccionadas de AcCalB\_A282V a partir de 3 distancias interatómicas

La evolución en el tiempo de la dinámica molecular de AcCalB\_A282V indica que la mutación no afectó la estructura terciaria y la secundaria. Las distancias interatómicas más

importantes para la catálisis de la CalB (*Figura 5*), durante la dinámica molecular de AcCalB\_A282V, se muestran en el *Apéndice B.1*. En este estudio fueron seleccionadas tres conformaciones representativas de la AcCalB\_A282V para modelar los MCCs. Las distancias y los ángulos de los puentes de hidrógeno de las conformaciones escogidas de la dinámica molecular de AcCalB\_A282V y la conformación ACE03 de la AcCalB\_silvestre se muestran en la *Tabla 1*. En la última columna se encuentra la distancia desde el nitrógeno épsilon de la His224 hasta el carbono carbonílico de Sea105 (bc) (*Figura 7*). La superposición de las tres conformaciones representativas de AcCalB\_A282V se ilustra en la *Figura 11*.

*Tabla 1:* Distancias y ángulos para los puentes de hidrógeno de las conformaciones representativas A282V\_01, A282V\_02 y A282V\_03 de la AcCalB\_A282V. Igualmente se muestran para la conformación ACE03 de la AcCalB\_silvestre.

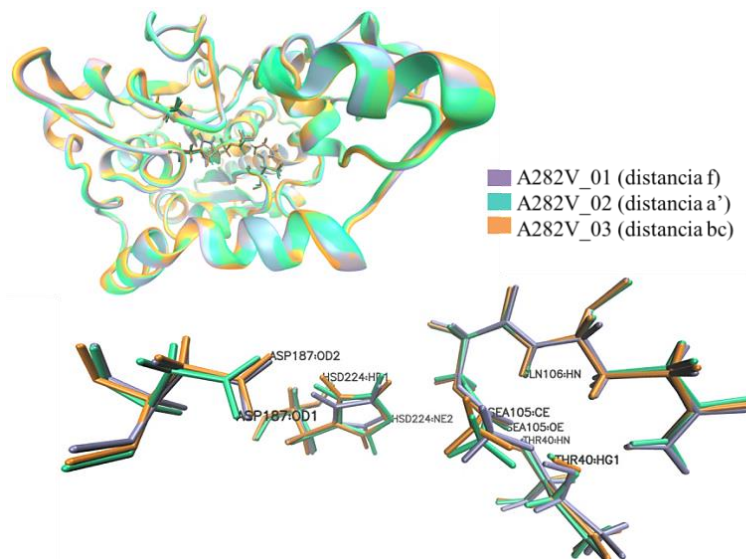
Conformación enzima	Distancia (Å)					
	a <sup>(1)</sup>	a' <sup>(2)</sup>	d <sup>(3)</sup>	e <sup>(4)</sup>	f <sup>(5)</sup>	bc <sup>(6)</sup>
ACE03 <sup>8</sup>	2,701(120,8)	1,918 (174,7)	2,065 (148,8)	1,894 (154,5)	2,044 (160,1)	3,821
A282V_01	2,267 (147,5)	1,935 (133,9)	2,066 (144,0)	1,770 (129,5)	2,030 (174,3)	4,138
A282V_02	2,944 (126,2)	2,198 (174,2)	2,169 (156,8)	1,719 (163,6)	1,740 (168,5)	3,677
A282V_03	2,766 (106,8)	1,929 (154,0)	1,957 (165,6)	1,931 (139,3)	2,202 (143,7)	3,819

<sup>(1)</sup> distancia (Asp187:OD1...Hsd224:HD1), <sup>(2)</sup> distancia a' (Asp187:OD2...Hsd224:HD1), <sup>(3)</sup> distancia d (Sea105:OE...Gln106:HN), <sup>(4)</sup> distancia e (Sea105:OE...Thr40:HG1), <sup>(5)</sup> distancia f (Sea105:OE...Thr40:HN), <sup>(6)</sup> distancia bc (Hsd224:NE...Sea105:CE).

Los puentes de hidrógeno importantes para el proceso catalítico de CalB en las conformaciones representativas seleccionadas son menores a 3Å, dando probabilidad a su formación ya que están dentro del rango en longitud (2,5Å a 4,0Å) característico de estas interacciones.

Se pueden esperar MCCs productivos con la conformación A282V\_03 por la similitud en los valores de la distancia a, a', e y bc (diferencias < 0,065Å) con la conformación ACE03, de la cual se reportaron MCCs productivos con la CalB\_silvestre<sup>32</sup>.

*Figura 11:* Superposición de conformaciones representativas de AcCalB\_A282V. En la parte inferior de la imagen se muestra un acercamiento de los residuos aminoacídicos de la triada catalítica y hueco oxianiónico



### 3.3 MCCs entre la AcCalB\_A282V y el (*R, S*)-propranolol

3.3.1 Muestreo conformacional de los MCCs entre la AcCalB\_A282V y el (*R, S*)-propranolol

En la *Tabla 2* se muestran los MCCs (distancia b y c < 4Å) en cada conformación y los que quedan al seleccionar una pose representativa en grupos con RMSD entre 0Å a 0,5Å.

Las columnas de la *Tabla 2* (Por sustrato y Por RMSD) correspondientes a criterios de selección de los MCCs se muestran para cada enfoque en la *Tabla 3* con su respectivo %. En general se observa que la población de los MCCs se reduce al considerar MCCs diferentes (RMSD entre 0Å a 0,5Å). Para analizar los MCCs es importante tener en cuenta ambos criterios de selección ya al tener en cuenta solo el criterio de distancias b y c < 4Å, muchos MCCs son estructuralmente semejantes. La clasificación por RMSD es de gran importancia ya que facilita el análisis de interacciones no covalentes y modos de unión en los MCCs.

Tabla 2: Complejos modelados por conformación representativa y sustrato acoplado. En paréntesis se especifica el modo de unión de los MCCs.

Acoplamiento	Sustrato	Conformación	Población simulada	Población de los MCCs		
				Por conformación	Por sustrato (modo)	Por RMSD (modo)
Enfoque rígido*	(R)-propranolol	A282V_01	250	0	14 (I)	4 (I)
		A282V_02	250	0		
		A282V_03	250	14 (I)		
	(S)-propranolol	A282V_01	250	18 (I)	38 (I)	4 (I)
		A282V_02	250	8 (I)		
		A282V_03	250	12 (I)		
Enfoque flexible 1**	(R)-propranolol	A282V_01	250	0	21 (I)	6 (I)
		A282V_02	250	5 (I)		
		A282V_03	250	16 (I)		
	(S)-propranolol	A282V_01	250	18 (I)	40 (I)	5 (I)
		A282V_02	250	6 (I)		
		A282V_03	250	16 (I)		
Enfoque flexible 2***	(R)-propranolol	A282V_01	250	2 (I) 3 (II)	45 (I)	11 (I)
		A282V_02	250	7 (I)		
		A282V_03	250	36 (I)		
	(S)-propranolol	A282V_01	250	25 (I) 5 (II)	62 (I)	9 (I)
		A282V_02	250	19 (I) 1 (II)		
		A282V_03	250	18 (I)		
Enfoque flexible 2***	(R)-propranolol	A282V_01	250	4 (I) 2 (II)	37 (I)	11 (I)
		A282V_02	250	9 (I)		
		A282V_03	250	24 (I) 1 (II)		
	(S)-propranolol	A282V_01	250	17 (I)	41 (I)	6 (I)
		A282V_02	250	11 (I) 1 (II)		
		A282V_03	250	13 (I) 1 (II)		

Flexibilidad en las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos: \* Ninguna \*\*Se consideran flexibles los residuos: Asp187 His224 Ser105 (triada catalítica) Thr40 Gln106 (hueco oxianiónico) y \*\*\* Se consideran flexibles los mismos residuos del enfoque flexible 1 más Ile189 Leu278 Val282.

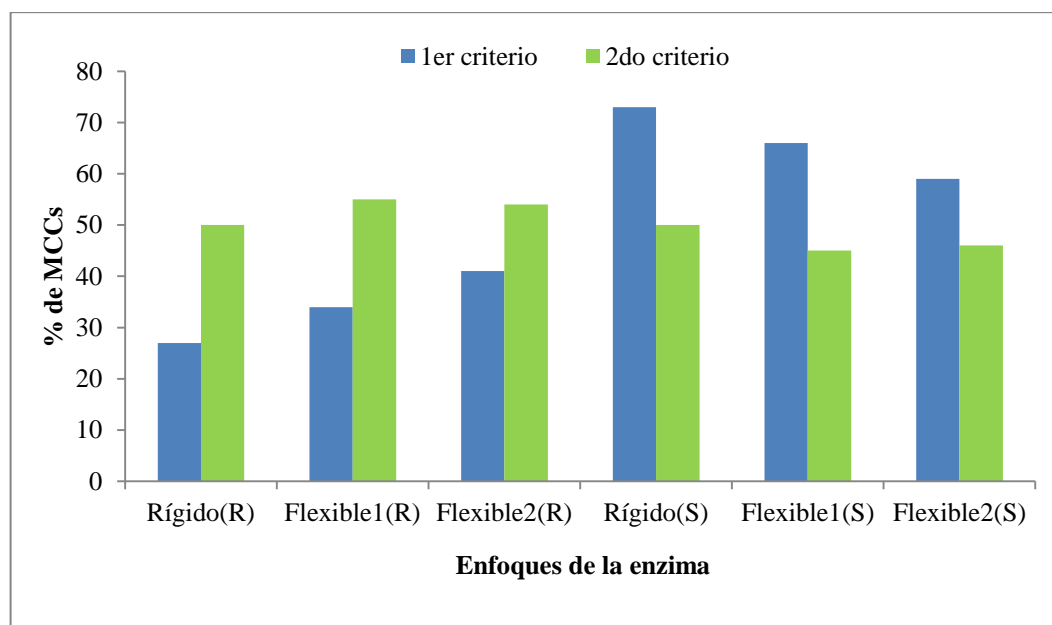
Tabla 3: Población de los MCCs para cada criterio de selección (distancia b y c < 4Å y RMSD entre 0Å a 0,5Å) en los enfoques rígido, flexible 1 y flexible 2. En paréntesis se especifica el modo de unión (I) y (II) de los MCCs.

Enfoque	Sustrato	Población de los MCCs			
		Distancia b y c < 4Å	%	RMSD	%
Rígido	(R)-propranolol	14 (I)	27	4 (I)	50
	(S)-propranolol	38 (I)	73	4 (I)	50
Flexible 1	(R)-propranolol	21 (I)	34	6 (I)	55
	(S)-propranolol	40 (I)	66	5 (I)	45
Flexible 2	(R)-propranolol	45 (I) 3 (II)	41	11 (I) 3 (II)	54
	(S)-propranolol	62 (I) 6 (II)	59	9 (I) 3 (II)	46

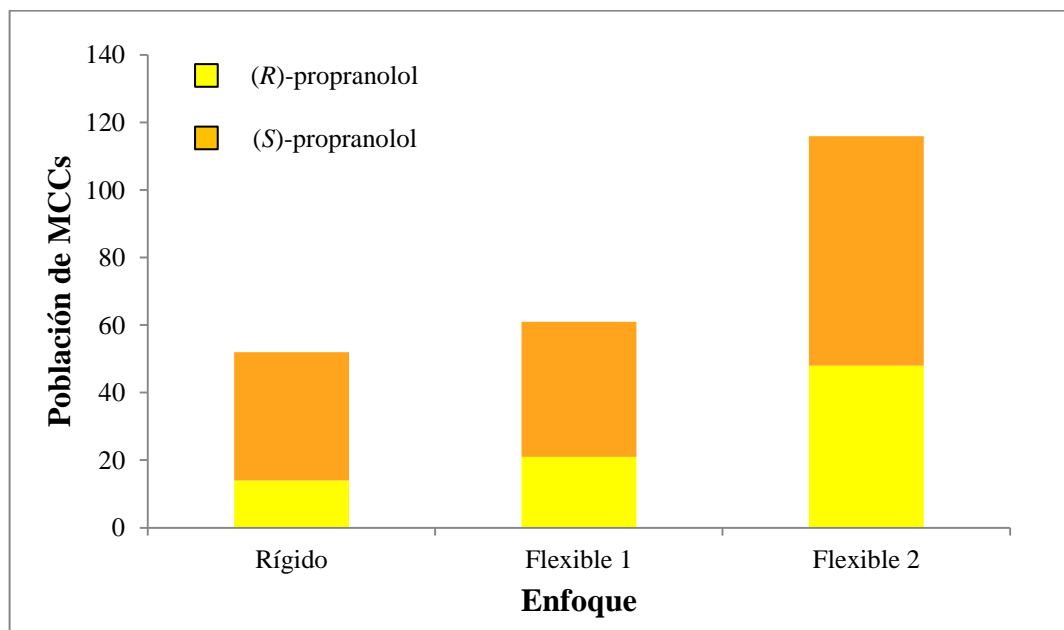
Al revisar los % de los MCCs (*Gráfica 1*) que cumple con el primer criterio (distancia b y c < 4Å) para cada enfoque, se ve favorecido en enantiómero S en la formación de MCCs. Teniendo en cuenta el segundo criterio de selección (RMSD entre 0Å a 0,5Å) no se observa una tendencia por un enantiómero en particular, demostrando de esta forma que no se puede evaluar la enantioselectividad de la reacción en la formación de los MCCs. La enantioselectividad se puede predecir con el estudio de los intermediarios tetraédricos, una aproximación al estado de transición de la acilación del propranolol.

Cuando se utiliza el enfoque flexible 2 para el modelamiento de los MCCs entre AcCalB\_A282V y el (R, S)-propranolol, la población de los MCCs aumenta en comparación con los enfoques rígido y flexible 1 (*Gráfica 2*). Entre los enfoques rígido y flexible 1 no se observaron diferencias en la población de los MCCs simulados. Por otro lado, en los enfoques rígido y flexible 1 la población de MCCs para el enantiómero S es mayor con respecto al enantiómero R. En el caso del enfoque flexible 2 la población de MCCs para ambos enantiómeros es muy similar.

*Gráfica 1:* % de los MCCs entre la AcCalB\_A282V y el (R, S)-propranolol para cada enfoque utilizado. El primer criterio de selección se representa en color azul (distancia b y c < 4Å) y el segundo criterio de selección en color verde (RMSD entre 0Å a 0,5Å)



Gráfica 2: Población de los MCCs simulados con los enfoques rígido, flexible 1 y flexible 2. La población de MCCs para el enantiómero *R* se muestra en color amarillo y para el enantiómero *S* en color naranja.



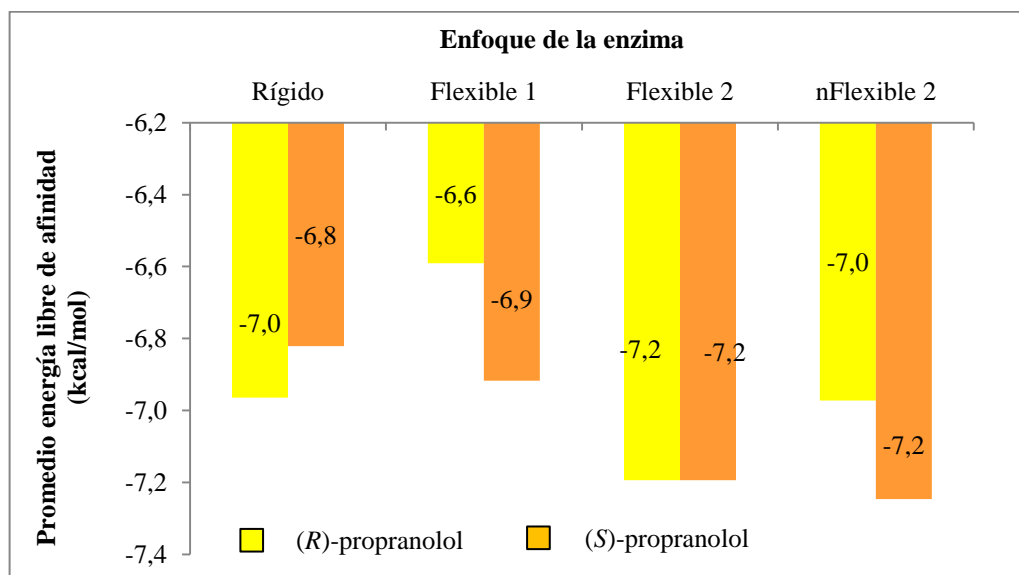
### 3.3.2 Energía libre de afinidad de los MCCs entre la AcCalB\_A282V y el (*R*, *S*)-propranolol

Los promedios de los valores de la energía libre de afinidad de los MCCs con los cuatro enfoques utilizados y para cada enantiómero del propranolol se muestran en la *Tabla 4*. Comparando los valores promedio de la energía libre de afinidad entre los dos enantiómeros, energéticamente no se observa una tendencia marcada en la formación de los MCCs (*Gráfica 3*).

*Tabla 4*: Promedio y desviación estándar de los valores de energía libre de afinidad para los MCCs.

Sustrato	Enfoque rígido	Enfoque flexible 1	Enfoque flexible 2
( <i>R</i> )-propranolol	-7,0 ±0,4	-6,6 ±0,4	-7,2 ±0,3
( <i>S</i> )-propranolol	-6,8 ±0,3	-6,9 ±0,3	-7,2 ±0,4

Gráfica 3: Promedio de los valores de la energía libre de afinidad para la población de MCCs modelados con los enfoques rígido, flexible 1, flexible 2 y nflexible 2. Los valores para el enantiómero *R* se muestran en color amarillo y para el enantiómero *S* en color naranja.



En cuanto a las diferencias en el promedio de los valores de la energía libre de afinidad entre los enfoques utilizados se encuentra que los MCCs obtenidos con el enfoque flexible 2 presenta valores más negativos que los obtenidos con el enfoque rígido y flexible 1.

### 3.3.3 Interacciones de contacto cercano y puentes de hidrógeno de los MCCs entre la AcCalB\_A282V y el (*R*, *S*)-propranolol

Se analizaron las interacciones de contacto cercano y puentes de hidrógeno entre el sustrato y la enzima utilizando AutodockTools (ADT)<sup>49, 50</sup>. Todos los MCCs analizados presentan interacciones de contacto cercano con el aminoácido Ile189. En algunos MCCs se forman un puente de hidrógeno entre el oxígeno carbonilo de la Ser105 acilada y el grupo hidroxilo del propranolol (Sea105:OE...H40:Sub-O39:Sub). Este puente de hidrógeno se presenta en más complejos con el enantiómero *R* que con *S* para los dos enfoques utilizados en el acoplamiento molecular (rígido y flexible). En muy pocos MCCs para el enfoque flexible 2 se observa en ambos enantiómeros un puente de hidrógeno entre el oxígeno del residuo aminoacídico Thr40 del hueco oxianiónico y el grupo amino del propranolol (Thr40:O...HN:Sub-N:Sub). En la Figura 12 y en la Figura 13 se muestran los puentes de hidrógeno explicados respectivamente.

Figura 12: Ejemplo de un MCCs con interacciones de contacto cercano mostradas en esferas de color gris (centro) y un puente de hidrógeno entre Sea105:OE...H40:Sub-O39:Sub mostradas en esferas de color blanco y rojo (izquierda).

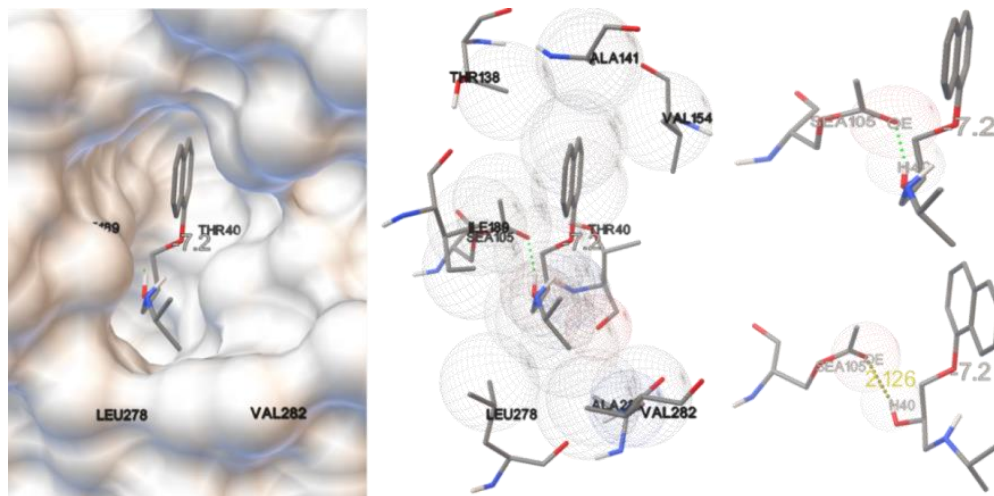
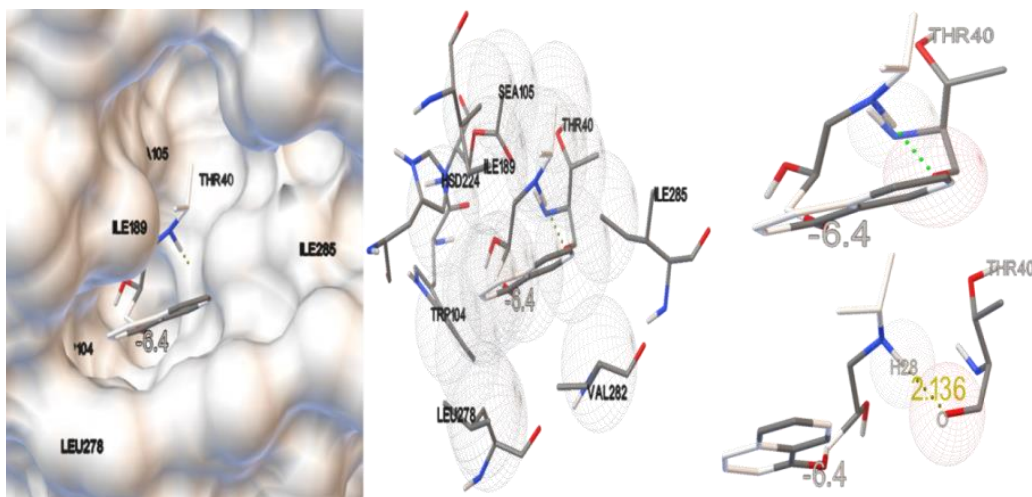


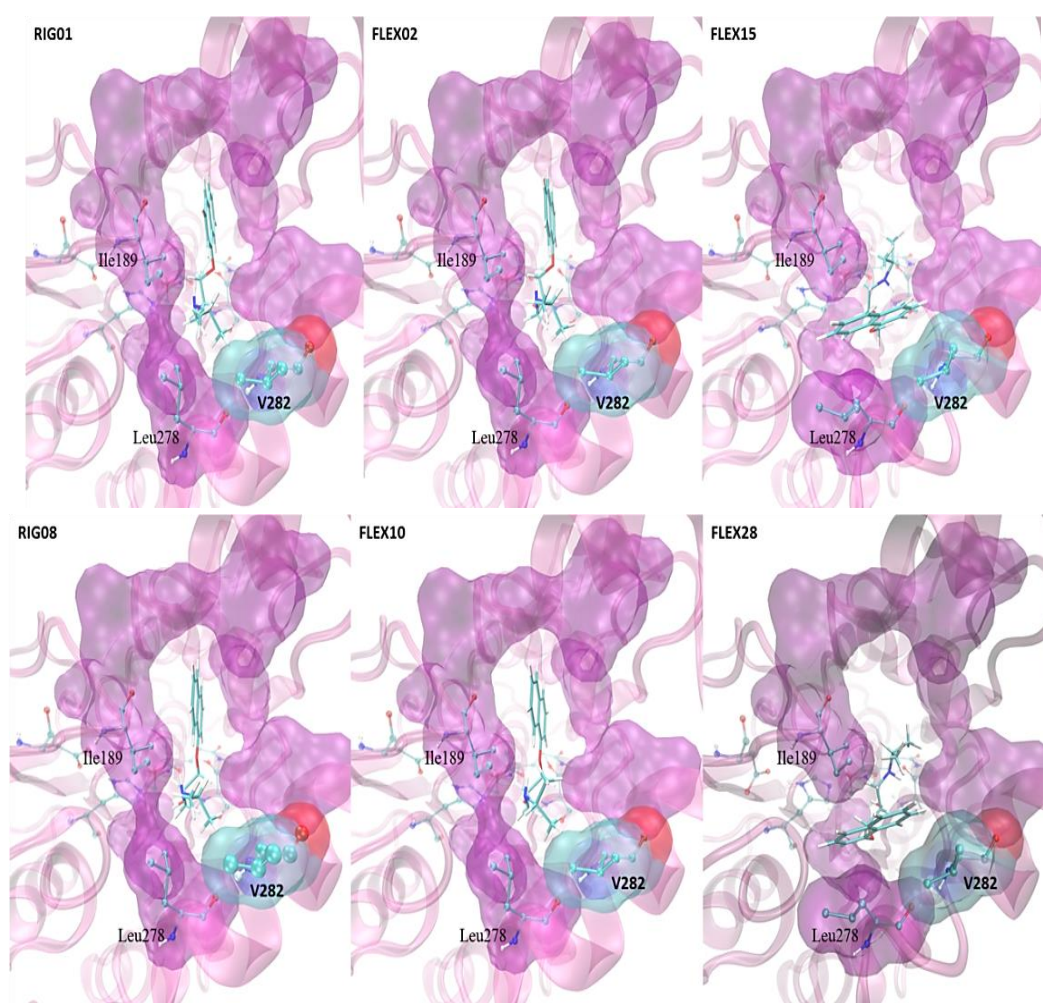
Figura 13: Ejemplo de un MCCs con interacciones de contacto cercano mostradas en esferas de color gris (centro) y un puente de hidrógeno entre los átomos Thr40:O...HN:Sub-N:Sub mostradas en esferas de color blanco y rojo (izquierda).



### 3.3.4 Modos de unión de los MCCs entre la AcCalB\_A282V y el (*R, S*)-propranolol

En la *Figura 14* se muestran ejemplos de las formas como interactúa el (*R, S*)-propranolol en el sitio activo de la AcCalB\_A282V para el enfoque rígido y los enfoques flexible en el tratamiento de la proteína. En el enfoque rígido (RIG01) y flexible 1 (FLEX02) se observa que el anillo naftilo se ubica en el bolsillo hidrofóbico de tamaño grande (modo de unión I). Esta tendencia se observó en todos MCCs para ambos enantiómeros (*Tabla 3*).

*Figura 14:* Ejemplos de MCCs seleccionados en cada enfoque para el (*R*)-propranolol (arriba) y el (*S*)-propranolol (abajo).



En el enfoque flexible 2 (FLEX15) se observa que al considerar 3 aminoácidos que conforman el bolsillo de unión, dentro de ellos la mutación A282V, el sustrato interactúa en

el sitio activo en dos formas (modo de unión I y modo de unión II). Dentro del modo de unión II se observa que el anillo naftilo se ubica en los límites entre el bolsillo hidrofóbico de tamaño medio y el bolsillo hidrofóbico de tamaño grande del sitio activo de la enzima.

### 3.4 Comparación entre los MCCs obtenidos con la AcCalB\_A282V y los MCCs reportados con AcCalB\_silvestre <sup>8</sup>

3.4.1 Energía libre de afinidad de los MCCs obtenidos con la AcCalB\_A282V y los MCCs reportados con AcCalB\_silvestre <sup>8</sup>.

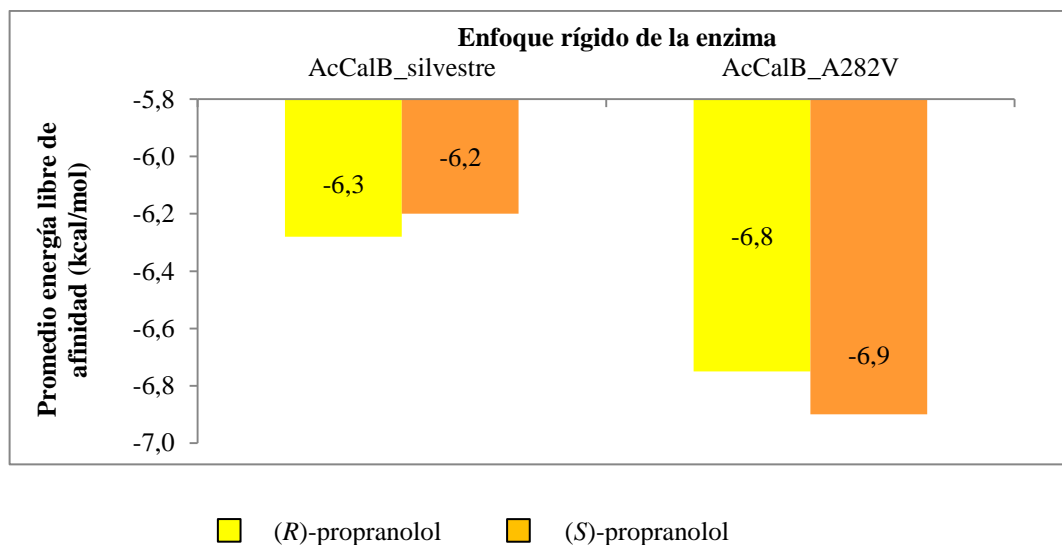
En la *Tabla 5* se presentan los promedios de los valores de la energía libre de afinidad para los MCCs modelados con la AcCalB\_A282V y los MCCs con la AcCalB\_silvestre <sup>8</sup>. La comparación del promedio de los valores de la energía libre de afinidad muestra que los MCCs obtenidos con la mutación A282V son más negativos para ambos enantiómeros que los reportados con la enzima silvestre (Gráfica 4). Estas diferencias puedan atribuirse a un muestreo conformacional más extenso y a un valor más alto en el parámetro de exhaustividad en las simulaciones realizadas con la AcCalB\_A282V. Otra posibilidad es que las diferencias en la energía libre de afinidad se deben a la mutación realizada en el sitio activo de AcCalB\_silvestre,

*Tabla 5:* Promedio y desviación estándar de los valores de energía libre de afinidad para los MCCs obtenidos con la AcCalB\_A282V y los MCCs con la AcCalB\_silvestre. Para la AcCalB\_A282V solo se muestra la población de MCCs diferentes (RMSD entre 0Å a 0,5Å). Se presentan los MCCs modelados con un enfoque rígido para la enzima. Los modos de unión I y II se indican en paréntesis.

Enzima	Sustrato	Promedio de afinidad (kcal/mol)	MCCs	Modos de unión
AcCalB_silvestre	(R)-propranolol	-6,3 ±0,4	5*	3 (I) 2 (II)
	(S)-propranolol	-6,2 ±0,6	4*	3 (I) 1 (II)
AcCalB_A282V	(R)-propranolol	-7,0 ±0,4	4**	4 (I)
	(S)-propranolol	-6,8 ±0,3	4**	4 (I)

\*MCCs modelados con AcCalB\_silvestre<sup>8</sup> y \*\*MCCs modelados con AcCalB\_A282V.

Gráfica 4: Promedio de los valores de la energía libre de afinidad para los MCCs entre la AcCalB\_silvestre y el (*R*, *S*)-propranolol, y los MCCs con AcCalB\_A282V que cumplen con dos criterios de selección (distancia b y c <4Å y RMSD entre 0Å a 0,5Å). Los valores para el enantiómero *R* se muestran en color amarillo y para el enantiómero *S* en color naranja.

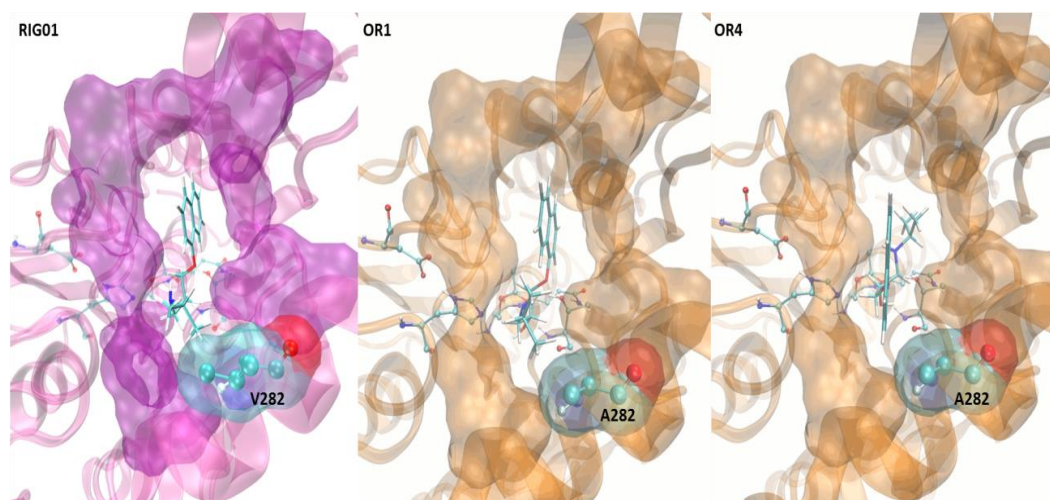


3.4.2 Modos de unión de los MCCs obtenidos con la AcCalB\_A282V y los MCCs reportados con AcCalB\_silvestre<sup>8</sup>

Los MCCs reportados con la AcCalB\_silvestre interactúan con su sitio activo en dos modos de unión como puede observarse en la *Tabla 5*. Para todos los MCCs obtenidos utilizando la AcCalB\_A282V solo se observa un único modo de unión (I), esto puede ser explicado por el aumento en el volumen de la cadena lateral del aminoácido cambiado (A282V) que sufre el bolsillo hidrofóbico de tamaño medio del sitio activo.

En la *Figura 15* se observan los MCCs para el enantiómero *R*, a la izquierda un MCCs obtenido con la AcCalB\_A282V (RIG01), en el centro un MCCs con la AcCalB\_silvestre (OR1). Los dos anteriores presentan el mismo modo de unión con el sitio activo de la enzima. El complejo OR4 interactúa en un modo diferente al encontrado con la AcCalB\_A282V. Lo anterior también ocurrió para el enantiómero *S*.

Figura 15: Modos de unión para los MCCs del enantiómero *R* acoplados a la AcCalB\_A282V (RIG01) y a la AcCalB\_silvestre (OR1 y OR4).



### 3.5 Quimioselectividad en la formación de los MCCs entre la AcCalB\_A282V y el (*R*, *S*)-propranolol

No se encontraron complejos con las distancias *b'* (Hsd224:NE2---H27:Sub) y *c'* (Sea105:CE---N26:Sub) menores a 4Å para el *R* o *S* propranolol (Tabla 6). Teniendo en cuenta que para la *O*-acilación se encontraron 52 MCCs se evidencia que la AcCalB\_A282V mantiene la quimioselectividad por el grupo hidroxilo reportada para la AcCalB\_silvestre.

Tabla 6: MCCs entre la AcCalB\_A282V y el (*R*, *S*)-propranolol obtenidos para la *O*-acilación y la *N*-acilación.

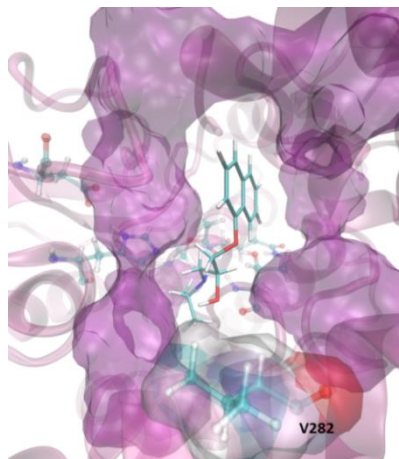
Sustrato	MCCs	
	<i>O</i> -acilación	<i>N</i> -acilación
( <i>R</i> )-propranolol	14	0
( <i>S</i> )-propranolol	38	0
Total	52	0

La población y energía libre de afinidad para los MCCs con el cambio en el tipo de átomo se encuentran en la *Tabla 7*. Los MCCs modelados para la *O*-acilación no muestran cambios en población de MCCs obtenida utilizando un enfoque rígido de la AcCalB\_A282V. Tampoco fueron encontrados cambios en la energía libre de afinidad, ni en su forma de interactuar con el sitio activo de la enzima. Solo se observó la formación de 3 MCCs para la *N*-acilación con el enantiómero *S* (*Figura 16*).

*Tabla 7*: Población, promedio y desviación estándar de los valores de energía libre de afinidad para los MCCs modelados con un enfoque rígido de la AcCalB\_A282V. Se compara la quimioselectividad en la formación de MCCs. En paréntesis se encuentran los resultados para el cambio del tipo de átomo del Nitrógeno del propranolol (NA).

Sustrato	Enfoque rígido con CalB_A282V			
	<i>O</i> -acilación		<i>N</i> -acilación	
	MCCs	Promedio de afinidad (kcal/mol)	MCCs	Promedio de afinidad (kcal/mol)
( <i>R</i> )-propranolol	14 (16)	-7,0 ±0,4 (-7,1)	0 (0)	0 (0)
( <i>S</i> )-propranolol	38 (38)	-6,8 ±0,3 (-6,8)	0 (3)	0 (-6,8)

*Figura 16*. MCCs para *N*-acilación entre AcCalB\_A282V y el (*S*)-propranolol, con un tratamiento rígido de la enzima.



La quimioselectividad no se ve afectada por el cambio en el tipo de átomo del nitrógeno del propranolol. En la simulación realizada con tipo de átomo NA para el nitrógeno, se obtuvieron 54 MCCs para la *O*-acilación y en la *N*-acilación se obtuvieron 3 MCCs.

## 4. CONCLUSIONES

La flexibilidad en los aminoácidos de la triada catalítica (Asp187 Ser105 His224) y hueco oxianiónico (Thr40 Gln106) no altera la población de complejos, modos de unión y energía libre de afinidad de los MCCs con respecto al enfoque rígido. Con estos resultados se confirma la estabilidad en las interacciones no covalentes entre el sustrato y los residuos aminoacídicos responsables del proceso catalítico.

La población, modos de unión y energía libre de afinidad de los MCCs son mayores con respecto al enfoque rígido al considerar flexibles las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos Ile189, Leu278 y Val282. Posiblemente al considerar flexibilidad en un número mayor de aminoácidos que conforman el bolsillo de unión sean encontrados nuevas formas en las que el sustrato interactúe con el sitio activo.

Utilizando un enfoque rígido para la enzima, en los MCCs entre la AcCalB\_A282V y el (*R, S*)-propranolol el anillo naftilo se ubica en modo de unión I. Al realizar la mutación que incrementó el impedimento estérico en la parte baja del bolsillo de unión al ligando, el sustrato se encuentra impedido para poderse acomodar en el modo de unión II.

Al modificar las dimensiones de la caja de búsqueda no se observan efectos en la población, modos de unión y energía libre de afinidad para el enfoque flexible 2. La quimioselectividad en la formación de los MCCs entre CalB y el (*R, S*)-propranolol no se ve modificada por la mutación A282V ni por el cambio en el tipo de átomo para el nitrógeno del sustrato.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y aportando en la búsqueda de una metodología adecuada en el enfoque aplicado a la proteína para acoplamiento molecular, se aconseja tener en cuenta los grados de libertad de la proteína relevantes en la unión al sitio activo, siendo coherentes de esta forma con la teoría que explica la interacción entre la enzima y el sustrato.

## REFERENCIAS

1. Goodman & Gilman's *the pharmacological basis of therapeutics*. (McGraw-Hill, 2006).
2. Stoschitzky K, Lindner W, & Zernig G. Racemic beta-blockers - fixed combinations of different drugs. *J Clin Bas Cardiol* **1**, 15–19 (1998).
3. Naik, S. *et al.* Lipases for use in industrial biocatalysis: Specificity of selected structural groups of lipases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **65**, 18–23 (2010).
4. Hæffner, F., Norin, T. & Hult, K. Molecular Modeling of the Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Transesterification Reactions. *Biophys. J.* **74**, 1251–1262 (1998).
5. Ghanem, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* **63**, 1721–1754 (2007).
6. Uppenberg, J. *et al.* Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry (Mosc.)* **34**, 16838–16851 (1995).
7. Barbosa, O., Ariza, C., Ortiz, C. & Torres, R. Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B). *New Biotechnol.* **27**, 844–850 (2010).
8. Escorcia, A. M., Molina, D., Daza, M. C. & Doerr, M. Acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B: An experimental and computational study. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **98**, 21–29 (2013).
9. Reetz, M. T. Laboratory evolution of stereoselective enzymes as a means to expand the toolbox of organic chemists. *Tetrahedron* **68**, 7530–7548 (2012).
10. José María Sánchez Montero. Metodologías de Modelado Molecular en Biocatálisis para la explicación racional de resultados. *FarmaIndustrial* (2011).
11. Escorcia, A. M., Daza, M. C. & Doerr, M. Computational study of the enantioselectivity of the O-acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **108**, 21–31 (2014).
12. Marton, Z. *et al.* Mutations in the stereospecificity pocket and at the entrance of the active site of *Candida antarctica* lipase B enhancing enzyme enantioselectivity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **65**, 11–17 (2010).
13. Nelson, D. L., Cox, M. M., Cuchillo, C. & Lehninger, A. L. *Lehninger principios de bioquímica*. (Omega, 2005).
14. Fersht, A. *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. (W.H. Freeman, 1999).
15. Ferrari, F. *et al.* Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of *Candida antarctica* lipase B in peptide acylation reactions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **101**, 122–132 (2014).
16. Aguirre Valderrama, A. Estudio mecanocuántico, docking y dinámica molecular de tioazúcares como inhibidores de la proteína fucosidasa algoritmos para el análisis conformacional y programa para el cálculo de constantes de acoplamiento vecinales (CAL3JHH). (Editorial de la Universidad de Granada, 2009).

17. Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M. & Cui, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **7**, 146–157 (2011).
18. Koshland, D. E. The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 2375–2378 (1995).
19. Raviña Rubira, E. *Medicamentos: un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos*. (Universidade de Santiago de Compostela, 2008).
20. Luis Lafuente, S. V., Burguete Azcárate, M. I. & Altava Benito, B. *Introducción a la química orgánica*. (Universitat Jaume I, 1997).
21. Daza, Martha C, Dobado, Jose A & Villaveces, Jose L. Caracterización de interacciones intermoleculares en complejos extremadamente débiles de van der Waals y con enlace de hidrógeno. El problema del error de superposición de bases. (Universidad Nacional de Colombia, 2002).
22. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology: Gold Book*. (IUPAC, 2009). at <<http://goldbook.iupac.org>>
23. Leiro Rodríguez, V. Determinación de la configuración absoluta de aminoalcoholes por RMN. (Servizo de Pulicacións e Intercambio Científico, Universidade de Santiago de Santiago de Compostela, 2008).
24. Camps García, P., Vázquez Cruz, S., Escolano Mirón, C., Universitat de Barcelona & Departament de Farmacologia i Química Terapèutica. *Química farmacéutica I*. (Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona, 2009).
25. Zelazczyk, D. & Kieć-Kononowicz, K. Biocatalytic approaches to optically active beta-blockers. *Curr. Med. Chem.* **14**, 53–65 (2007).
26. Propranolol or hydrochlorothiazide alone for the initial treatment of hypertension. IV. Effect on plasma glucose and glucose tolerance. Veterans Administration Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents. *Hypertension* **7**, 1008–1016 (1985).
27. Patakas, D., Argiropoulou, V., Louridas, G. & Tsara, V. Beta-blockers in bronchial asthma: effect of propranolol and pindolol on large and small airways. *Thorax* **38**, 108–112 (1983).
28. Ema, T. Mechanism of Enantioselectivity of Lipases and Other Synthetically Useful Hydrolases. *Curr. Org. Chem.* **8**, 1009–1025 (2004).
29. Magnusson, A., Kungliga tekniska högskolan & Institutionen för bioteknologi. Rational redesign of *Candida antarctica* lipase B. (2005).
30. Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S. & Jones, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **2**, 293–308 (1994).
31. Hedstrom, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* **102**, 4501–4524 (2002).
32. Escorcía, A. Enantioselective and Chemoselective Acylation of (R,S)-Propranolol Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B: A Theoretical and Experimental Approach. (Universidad Industrial de Santander, 2015).
33. *Computer Simulation of Biomolecular Systems*. (Springer Netherlands, 1997). at <<http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-1120-3>>
34. Johnson, K. A. & Goody, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry (Mosc.)* **50**, 8264–8269 (2011).

35. Yuriev, E., Agostino, M. & Ramsland, P. A. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. *J. Mol. Recognit.* **24**, 149–164 (2011).
36. Kokh, D. B., Wade, R. C. & Wenzel, W. Receptor flexibility in small-molecule docking calculations. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **1**, 298–314 (2011).
37. Chang, M. W., Ayeni, C., Breuer, S. & Torbett, B. E. Virtual Screening for HIV Protease Inhibitors: A Comparison of AutoDock 4 and Vina. *PLoS ONE* **5**, e11955 (2010).
38. Garrett M. Morris, David S. Goodsell, Michael E. Pique, William ‘Lindy’ Lindstrom, Ruth Huey, Stefano & Forli, William E. Hart, Scott Halliday, Rik Belew and Arthur J. Olson. User Guide AutoDock Version 4.2. Updated for version 4.2.5. Automated Docking of Flexible Ligands to Flexible Receptors. (2012).
39. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* NA–NA (2009). doi:10.1002/jcc.21334
40. Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A. & Baker, N. A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **32**, W665–W667 (2004).
41. Søndergaard, C. R., Olsson, M. H. M., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of p  $K_a$  Values. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 2284–2295 (2011).
42. Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical p  $K_a$  Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 525–537 (2011).
43. Cui, Q., Elstner, M., Kaxiras, E., Frauenheim, T. & Karplus, M. A QM/MM Implementation of the Self-Consistent Charge Density Functional Tight Binding (SCC-DFTB) Method. *J. Phys. Chem. B* **105**, 569–585 (2001).
44. Pu, J., Gao, J. & Truhlar, D. G. Combining Self-Consistent-Charge Density-Functional Tight-Binding (SCC-DFTB) with Molecular Mechanics by the Generalized Hybrid Orbital (GHO) Method. *J. Phys. Chem. A* **108**, 5454–5463 (2004).
45. Brooks, B. R. *et al.* CHARMM: The biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* **30**, 1545–1614 (2009).
46. Daniel Barrera. Comunicación personal. (2015).
47. William Humphrey, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
48. mutate\_res. at  
<[http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/script\\_library/scripts/mutate\\_res/](http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/script_library/scripts/mutate_res/)>
49. Sanner, M. F. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* **17**, 57–61 (1999).
50. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
51. Oger, C. *et al.* Lipase-Catalyzed Regioselective Monoacetylation of Unsymmetrical 1,5-Primary Diols. *J. Org. Chem.* **75**, 1892–1897 (2010).

## BIBLIOGRAFÍA

AGUIRRE VALDERRAMA, A. Estudio mecanocuántico, docking y dinámica molecular de tioazúcares como inhibidores de la proteína fucosidasa algoritmos para el análisis conformacional y programa para el cálculo de constantes de acoplamientos vecinales (CAL3JHH). (Editorial de la Universidad de Granada, 2009).

BARBOSA, O. *et al.* Kinetic resolution of (R/S)-propranolol (1-isopropylamino-3-(1-naphthoxy)-2-propanolol) catalyzed by immobilized preparations of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B). *New Biotechnol.* 27, 844–850 (2010).

BARRERA VALDERRAMA, D. Comunicación personal. (2015).

BROOKS, B. R. *et al.* CHARMM: The biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* 30, 1545–1614 (2009).

CAMPS GARCÍA, P. *et al.* Universitat de Barcelona & Departament de Farmacologia i Química Terapèutica. Química farmacéutica I. (Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona, 2009).

CHANG, M. *et al.* Virtual Screening for HIV Protease Inhibitors: A Comparison of AutoDock 4 and Vina. *PLoS ONE* 5, e11955 (2010).

Computer Simulation of Biomolecular Systems. (Springer Netherlands, 1997). at <<http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-1120-3>>

CUI, Q. *et al.* A QM/MM Implementation of the Self-Consistent Charge Density Functional Tight Binding (SCC-DFTB) Method. *J. Phys. Chem. B* 105, 569–585 (2001).

DAZA, M. *et al.* Caracterización de interacciones intermoleculares en complejos extremadamente débiles de van der Waals y con enlace de hidrógeno. El problema del error de superposición de bases. (Universidad Nacional de Colombia, 2002).

DOLINSKY, T. *et al.* PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* 32, W665–W667 (2004).

EMA, T. Mechanism of Enantioselectivity of Lipases and Other Synthetically Useful Hydrolases. *Curr. Org. Chem.* 8, 1009–1025 (2004).

ESCORCIA, A. Enantioselective and Chemoselective Acylation of (R,S)-Propranolol Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B: A Theoretical and Experimental Approach. (Universidad Industrial de Santander, 2015).

ESCORCIA, A. *et al.* Acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B: An experimental and computational study. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 98, 21–29 (2013).

ESCORCIA, A. *et al.* Computational study of the enantioselectivity of the O-acetylation of (R,S)-propranolol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 108, 21–31 (2014).

FERRARI, F. *et al.* Molecular rules for chemo- and regio-selectivity of *Candida antarctica* lipase B in peptide acylation reactions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 101, 122–132 (2014).

FERSHT, A. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. (W.H. Freeman, 1999).

GARRETT M, M. *et al.* User Guide AutoDock Version 4.2. Updated for version 4.2.5. Automated Docking of Flexible Ligands to Flexible Receptors. (2012).

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* 63, 1721–1754 (2007).

GOODMAN & GILMAN'S the pharmacological basis of therapeutics. (McGraw-Hill, 2006).

HÄFFNER, F. *et al.* Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Transesterification Reactions. *Biophys. J.* 74, 1251–1262 (1998).

HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* 102, 4501–4524 (2002).

HUMPHREY, W. *et al.* VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38 (1996).

IUPAC Compendium of Chemical Terminology: Gold Book. (IUPAC, 2009). at <<http://goldbook.iupac.org>>

JOHNSON, K. A. & GOODY, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry (Mosc.)* 50, 8264–8269 (2011).

KOKH, D. B. *et al.* Receptor flexibility in small-molecule docking calculations. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 1, 298–314 (2011).

KOSHLAND, D. E. The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2375–2378 (1995).

LEIRO RODRÍGUEZ, V. Determinación de la configuración absoluta de aminoalcoholes por RMN. (Servizo de Pulicacións e Intercambio Científico, Universidade de Santiago de Santiago de Compostela, 2008).

LUIS LAFUENTE, S. V. *et al.* Introducción a la química orgánica. (Universitat Jaume I, 1997).

MAGNUSSON, A., Kungliga tekniska högskolan & Institutionen för bioteknologi. Rational redesign of *Candida antarctica* lipase B. (2005).

MARTON, Z. *et al.* Mutations in the stereospecificity pocket and at the entrance of the active site of *Candida antarctica* lipase B enhancing enzyme enantioselectivity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 65, 11–17 (2010).

MENG, X.-Y. *et al.* Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 7, 146–157 (2011).

MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 30, 2785–2791 (2009).

mutate\_res. at <[http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/script\\_library/scripts/mutate\\_res/](http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/script_library/scripts/mutate_res/)>

NAIK, S. *et al.* Lipases for use in industrial biocatalysis: Specificity of selected structural groups of lipases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 65, 18–23 (2010).

NELSON, D. L. *et al.*. *Lehninger principios de bioquímica.* (Omega, 2005).

OGER, C. *et al.* Lipase-Catalyzed Regioselective Monoacetylation of Unsymmetrical 1,5-Primary Diols. *J. Org. Chem.* 75, 1892–1897 (2010).

OLSSON, M. H. M. *et al.* PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical p K<sub>a</sub> Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* 7, 525–537 (2011).

PATAKAS, D. *et al.* Beta-blockers in bronchial asthma: effect of propranolol and pindolol on large and small airways. *Thorax* 38, 108–112 (1983).

PU, J. *et al.* Combining Self-Consistent-Charge Density-Functional Tight-Binding (SCC-DFTB) with Molecular Mechanics by the Generalized Hybrid Orbital (GHO) Method. *J. Phys. Chem. A* 108, 5454–5463 (2004).

RAMIREZ, E & TALMERS, F. Propranolol or hydrochlorothiazide alone for the initial treatment of hypertension. IV. Effect on plasma glucose and glucose tolerance. Veterans Administration Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents. *Hypertension* 7, 1008–1016 (1985).

RAVIÑA RUBIRA, E. *Medicamentos: un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos.* (Universidade de Santiago de Compostela, 2008).

REETZ, M. T. Laboratory evolution of stereoselective enzymes as a means to expand the toolbox of organic chemists. *Tetrahedron* 68, 7530–7548 (2012).

SÁNCHEZ MONTERO, J. *Metodologías de Modelado Molecular en Biocatálisis para la explicación racional de resultados.* Farmaindustrial (2011).

SANNER, M. F. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* 17, 57–61 (1999).

SØNDERGAARD, C. *et al.* Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of p K a Values. *J. Chem. Theory Comput.* 7, 2284–2295 (2011).

STOSCHITZKY, K. *et al.* Racemic beta-blockers - fixed combinations of different drugs. *J Clin Bas Cardiol* 1, 15–19 (1998).

TROTT, O. & OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* NA–NA (2009). doi:10.1002/jcc.21334

UPPENBERG, J. *et al.* Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 16838–16851 (1995).

UPPENBERG, J. *et al.* The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2, 293–308 (1994).

YURIEV, E. *et al.* Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. *J. Mol. Recognit.* 24, 149–164 (2011).

ZELASZCZYK, D. & KIEĆ-KONONOWICZ, K. Biocatalytic approaches to optically active beta-blockers. *Curr. Med. Chem.* 14, 53–65 (2007).

## **ANEXOS**

## Apéndice A

A.1. Cambio estructural de las cadenas laterales de Ala282 por Val282. El cambio de las cadenas laterales A282 por V282 se realizó utilizando el siguiente script <sup>48</sup>:

```
# John M. Robinson, M.D., Ph.D.
# mailto: johnmrobinson@mac.com
# website: http://homepage.mac.com/johnmrobinson

package require psfgen

proc mutate_res {pos mut prot} {
# in pdb file $prot.pdb, mutate the residue at position $pos to a
# residue of type $mut
#set pos 282
#set mut VAL
#set prot tnc

set file_in $prot.pdb
set file_tmp $prot.temp.pdb
set file_out_pdb $prot.mut.pdb
set file_out_psf $prot.mut.psf

set str "all and not (resid $pos and sidechain)"
mol new tnc.pdb type pdb
set sel [atomselect top $str]
$sel writepdb $file_tmp

resetpsf
package require psfgen
topology top_all27_prot_lipid.inp
pdbalias residue HIS HSE
pdbalias atom ILE CD1 CD
segment P {
  pdb $file_tmp
  mutate $pos $mut}
  coordpdb $file_tmp P
  guesscoord
  writepdb $file_out_pdb
  writepsf $file_out_psf
  mol delete top
  mol new $file_out_pdb type pdb
}
```

## A.2. Configuración usada para llevar a cabo la simulación de dinámica molecular (DM) de AcCalB\_A282V.

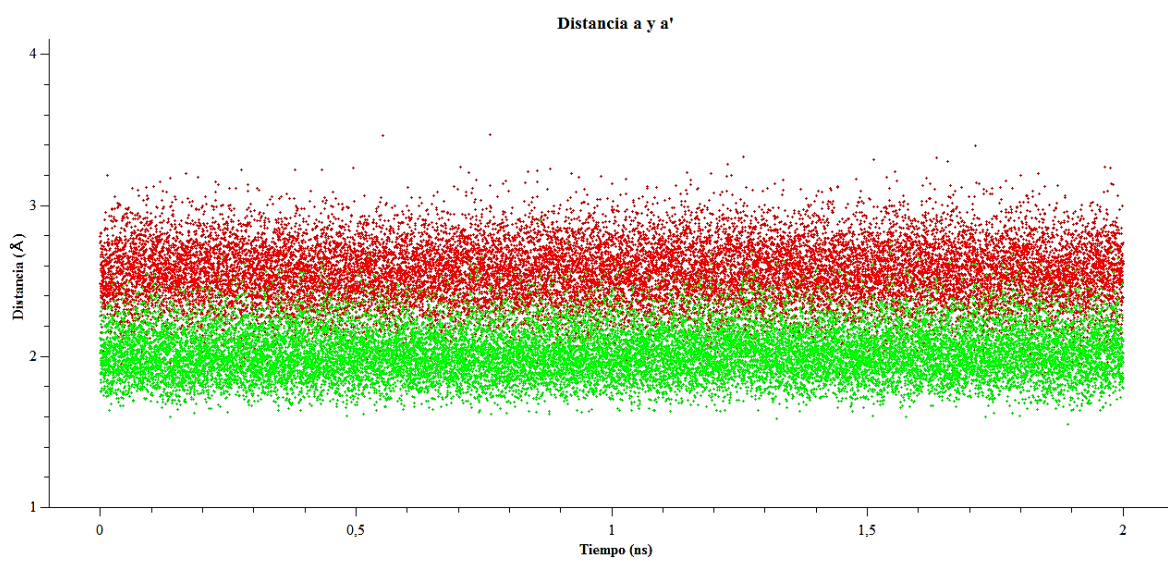
Las posiciones de todos los átomos de Hidrógeno en la CalB\_A282V fueron optimizados realizando una minimización de energía (SD) de 500 pasos manteniendo todas las coordenadas atómicas fijas. En este y todos los pasos siguientes todas las distancias que involucran átomos de Hidrógeno fueron limitados por el comando SHAKE. A continuación, una esfera que contiene 4454 moléculas de tolueno en un radio de 40Å (tomadas de una simulación de equilibración de tolueno bajo condiciones periódicas de contorno) se superponen sobre el sistema enzimático centrado en el carbono alfa de la serina acetilada (SEA: CA). Todas las moléculas de tolueno añadidas cuyos átomos de hidrógeno no estaban dentro de 2.8Å de cualquier átomo distinto al Hidrógeno existente se eliminaron. Esta esfera de solvente cubrió toda la enzima. Todos los residuos dentro de 30 Å de la SEA:CA fueron definidos como la región activa y aquellos por fuera de esta región se mantuvieron fijos durante las simulaciones de DM. Además, para mantener la forma esférica y para evitar la evaporación del solvente en las simulaciones de DM, moléculas de aguas cristalinas y de tolueno fueron restringidas por un potencial cuártico esférico desde 0 hasta 38,5 Å (parámetros de FUERZA = 0,2, P1 = 2,25, y DROFF = 38,5). A partir de entonces las moléculas de las aguas cristalinas y de tolueno dentro de la esfera fueron de geometría optimizada, realizando los primeros 250 pasos de SD, seguido de 250 pasos de minimización Newton-Raphson de base adaptada (ABNR), manteniendo todos los demás átomos fijos. Se realizaron dos minimizaciones más de 250 pasos cada uno (SD y ABNR), la optimización de la región activa con las moléculas de agua y tolueno. El calentamiento del sistema se realizó a partir de la 50 K hasta 300K, elevando la temperatura 10 K por cada 100 pasos de la DM. El algoritmo de Verlet se utilizó con un paso de tiempo de 1 fs. Este procedimiento de solvatación se repitió 12 veces, y en los dos últimos ciclos el número de pasos que se utilizan en la DM se aumentó a 30000. Durante el procedimiento de solvatación, las restricciones posicionales armónicas se aplicaron a los átomos de la proteína en la región activa, que se redujeron sucesivamente en cada una de las iteraciones. Por último, se eliminaron todas las restricciones y una simulación de DM de 2ns fue llevada a cabo para completar la preparación de CalB\_A282V.

La información sobre la configuración usada para llevar a cabo la simulación de DM de AcCalB\_A282V fue tomada de la información complementaria de <sup>8</sup>.

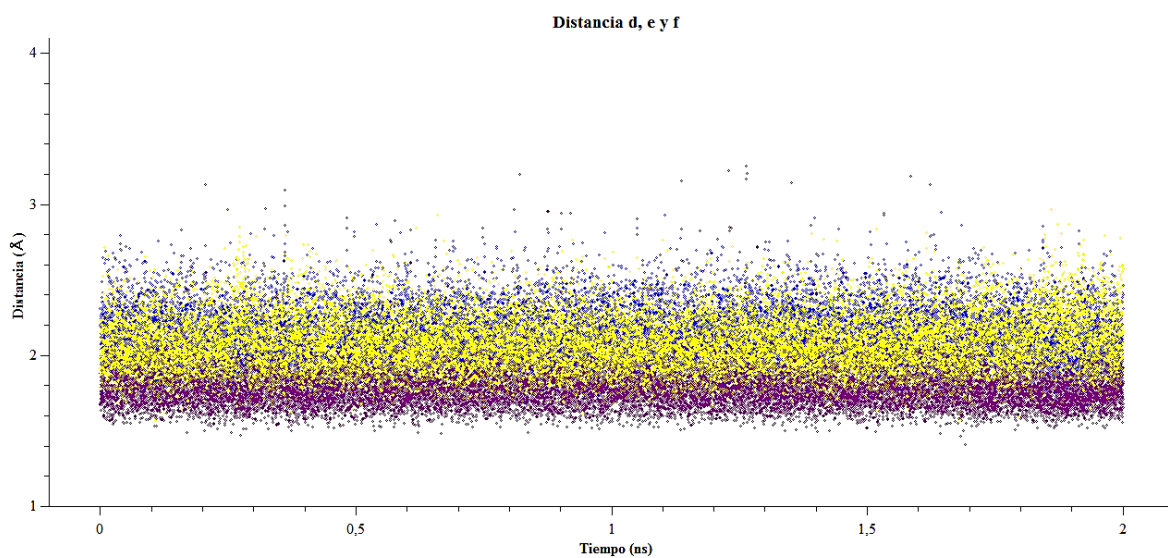
## Apéndice B

B.1. Valores de las distancias interatómicas en el transcurso de la dinámica molecular 2ns de AcCaB\_A282V

*Figura B. 1:* Distancia interatómica a (color rojo) y a' (color verde).



*Figura B. 2:* Distancia interatómica d (color azul), e (color morado) y f (color amarillo).





## Apéndice C

### C.1. Ejemplo de Input utilizado y Output obtenido de Vina

La nomenclatura utilizada para los archivos que contienen los conformeros encontrados fue la siguiente:

Característica	Nomenclatura
Enfoque	rig= docking rígido    flex= docking flexible
Conformación representativa	1= frame 09395    2= frame 11970    3= frame 17075
Sustrato	r= (R)-propranolol    s= (S)-propranolol
Residuos aminoacídicos con cadenas laterales flexibles:	1= Asp187 His224 Ser105 Thr40 Gln106 2= Asp187 His224 Ser105 Thr40 Gln106 Ile189 Leu278 Val282

#### Input:

```
--receptor 3_sin_solv_xwat.pdbqt --ligand r_pro_opt.pdbqt
--center_x 3.891 --center_y 2.416 --center_z 1.684
--size_x 30 --size_y 30 --size_z 35
--exhaustiveness 40 --num_modes 10
--log log_rig3r_01.txt --out out_rig3r_01.pdbqt
```

#### Output (log.txt):

```
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 32 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1084386290
Performing search ... done.
Refining results ... done.
```

```
mode |  affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----
   1 |    -7.2 |    0.000 |    0.000
   2 |    -7.0 |    1.937 |    5.223
   3 |    -6.9 |    1.524 |    3.596
   4 |    -6.9 |    2.188 |    6.317
   5 |    -6.4 |    0.515 |    2.489
   6 |    -6.3 |    1.899 |    5.885
   7 |    -6.3 |    3.147 |    6.117
   8 |    -6.3 |    2.704 |    6.391
   9 |    -6.2 |    2.253 |    3.826
  10 |    -6.1 |    2.243 |    5.380
```

```
Writing output ... done.
```

C.2. MCCs diferentes entre la AcCalB\_A282V y el (*R*, *S*)-propranolol

Tabla C.1: MCCs diferentes para el enfoque rígido de los grupos con RMSD entre 0Å a 0,5Å.

Enfoque empleado	Sustrato	MCCs RMSD		Afinidad (kcal/mol)	Modo unión
		Archivo	Nombre		
Rígido	<i>(R)</i> -propranolol	rig3r_01_06	RIG01	-6,4	I
		rig3r_03_01	RIG02	-7,2	I
		rig3r_08_01	RIG03	-7,2	I
		rig3r_19_05	RIG04	-6,2	I
	<i>(S)</i> -propranolol	rig1s_21_01	RIG05	-6,6	I
		rig2s_20_05	RIG06	-6,6	I
		rig3s_02_01	RIG07	-7,2	I
		rig3s_25_01	RIG08	-7,2	I

Tabla C.2: MCCs representativos por la ubicación en el sitio activo para el enfoque rígido. En la tabla se muestran las distancias interatómicas importantes en el proceso catalítico.

MCCs	Afinidad (kcal/mol)	Distancia (Å)						
		a	a'	b	c	d	e	f
RIG01	-6,4			3,201 (128,6)	3,444 (62,3)			
RIG02	-7,2	2,766 (106,8)	1,929 (154,0)	3,656 (89,1)	3,441 (62,7)	1,957 (165,6)	1,931 (139,3)	2,202 (143,7)
RIG08	-7,2			2,996 (129,2)	3,453 (63,7)			

Tabla C.3: MCCs diferentes para el enfoque flexible 1 de los grupos con RMSD entre 0Å a 0,5Å.

Enfoque empleado	Sustrato	MCCs RMSD		Afinidad (kcal/mol)	Modo unión
		Archivo	Nombre		
Flexible 1	<i>(R)</i> -propranolol	flex2r1_02_07	FLEX01	-6,0	I
		flex3r1_01_01	FLEX02	-7,1	I
		flex3r1_07_01	FLEX03	-7,2	I
		flex3r1_18_06	FLEX04	-6,1	I
		flex3r1_22_02	FLEX05	-6,8	I
		flex3r1_23_07	FLEX06	-6,1	I
	<i>(S)</i> -propranolol	flex1s1_23_01	FLEX07	-6,7	I
		flex2s1_24_03	FLEX08	-6,4	I
		flex3s1_02_01	FLEX09	-7,2	I
		flex3s1_14_01	FLEX10	-7,3	I
		flex3s1_21_01	FLEX11	-7,2	I

Tabla C.4: MCCs representativos por la ubicación en el sitio activo para el enfoque flexible 1. En la tabla se muestran las distancias interatómicas importantes en el proceso catalítico.

MCCs	Afinidad (kcal/mol)	Distancia (Å)						
		a	a'	b	c	d	e	f
FLEX02	-7,1	2,859 (103,0)	2,088 (148,9)	3,010 (137,1)	3,497 (58,7)	2,084 (165,5)	3,216 (112,0)	2,189 (147,0)
FLEX06	-6,1	2,830 (105,6)	2,121 (149,9)	3,607 (59,2)	3,775 (47,8)	3,010 (165,8)	3,867 (38,1)	1,879 (173,7)
FLEX10	-7,3	2,812 (105,9)	2,115 (150,0)	3,283 (109,5)	3,382 (62,9)	2,066 (166,6)	2,502 (67,9)	1,975 (136,5)

Tabla C.5: MCCs diferentes para el enfoque flexible 2 de los grupos con RMSD entre 0Å a 0,5Å.

Enfoque empleado	Sustrato	MCCs RMSD		Afinidad (kcal/mol)	Modo unión
		Archivo	Nombre		
Flexible 2	(R)-propranolol	flex1r2_13_08	FLEX12	-6,6	I
		flex1r2_16_10	FLEX13	-7,1	II
		flex1r2_17_09	FLEX14	-7,2	II
		flex1r2_19_07	FLEX15	-7,5	II
		flex1r2_20_09	FLEX16	-6,2	I
		flex2r2_10_05	FLEX17	-6,9	I
		flex3r2_04_01	FLEX18	-7,4	I
		flex3r2_05_02	FLEX19	-7,3	I
		flex3r2_08_01	FLEX20	-7,5	I
		flex3r2_10_01	FLEX21	-7,4	I
		flex3r2_12_01	FLEX22	-7,5	I
		flex3r2_16_03	FLEX23	-7,2	I
		flex3r2_19_03	FLEX24	-7,2	I
		flex3r2_24_03	FLEX25	-7,2	I
		(S)-propranolol	flex1s2_09_05	FLEX26	-6,7
	flex1s2_10_06		FLEX27	-6,4	II
	flex1s2_19_05		FLEX28	-6,7	II
	flex2s2_07_08		FLEX29	-6,6	I
	flex2s2_11_03		FLEX30	-7,6	I
	flex2s2_24_03		FLEX31	-7,6	I
	flex3s2_05_02		FLEX32	-7,8	I
	flex3s2_05_05		FLEX33	-7,0	I
	flex3s2_06_05		FLEX34	-7,2	I
	flex3s2_08_02		FLEX35	-7,9	I
	flex3s2_15_06		FLEX36	-6,5	I
	flex3s2_25_05		FLEX37	-7,3	I

Tabla C.6: MCCs representativos por la ubicación en el sitio activo para el enfoque flexible 2. En la tabla se muestran las distancias interatómicas importantes en el proceso catalítico.

MCCs	Afinidad kcal/mol	Distancia (Å)						
		a	a'	b	c	d	e	f
FLEX14	-7,2	1,989 (156,0)	2,733 (104,6)	3,939 (77,6)	3,467 (59,4)	2,215 (138,0)	2,216 (107,9)	2,288 (172,9)
FLEX15	-7,5	1,824 (161,8)	2,549 (106,5)	3,796 (93,0)	3,593 (49,3)	2,453 (146,1)	3,101 (57,9)	2,085 (168,7)
FLEX21	-7,4	2,828 (104,6)	2,115 (149,4)	3,557 (91,9)	3,524 (59,8)	2,064 (165,2)	2,530 (88,8)	2,204 (146,5)
FLEX25	-7,2	2,865 (105,6)	2,170 (148,7)	2,683 (118,2)	3,376 (63,8)	2,106 (165,9)	3,424 (38,0)	2,175 (147,5)
FLEX28	-6,7	3,115 (156,9)	2,102 (153,8)	3,869 (139,3)	3,331 (53,2)	2,304 (138,5)	1,793 (148,1)	2,308 (172,2)
FLEX32	-7,8	2,810 (104,4)	2,069 (150,2)	3,339 (111,8)	3,466 (59,3)	2,089 (166,4)	2,163 (111,7)	2,157 (147,1)
FLEX37	-7,3	2,837 (104,2)	2,091 (149,5)	3,330 (110,1)	3,618 (54,1)	2,258 (168,3)	1,911 (136,9)	2,063 (151,7)

Tabla C.7: MCCs diferentes para el enfoque nflexible 2 de los grupos con RMSD entre 0Å a 0,5Å.

Enfoque empleado	Sustrato	MCCs RMSD		Afinidad (kcal/mol)	Modo unión
		Archivo	Nombre		
nFlexible 2	(R)-propranolol	nflex1r2_04_10	FLEX38	-6,2	I
		nflex1r2_14_09	FLEX39	-5,9	II
		nflex1r2_18_06	FLEX40	-6,4	II
		nflex2r2_08_05	FLEX41	-6,8	I
		nflex2r2_13_04	FLEX42	-7,0	I
		nflex2r2_16_05	FLEX43	-6,8	I
		nflex3r2_02_01	FLEX44	-7,5	I
		nflex3r2_06_01	FLEX45	-7,4	I
		nflex3r2_12_02	FLEX46	-7,3	I
		nflex3r2_13_04	FLEX47	-6,8	I
		nflex3r2_14_04	FLEX48	-7,0	I
		nflex3r2_16_04	FLEX49	-6,9	I
		nflex3r2_18_04	FLEX50	-6,9	I
		nflex3r2_21_10	FLEX51	-6,1	II
	(S)-propranolol	nflex1s2_01_06	FLEX52	-6,5	I
		nflex2s2_09_02	FLEX53	-7,4	I
		nflex2s2_11_08	FLEX54	-6,8	II
		nflex2s2_18_03	FLEX55	-7,4	I
		nflex3s2_04_02	FLEX56	-7,8	I
		nflex3s2_08_02	FLEX57	-7,8	I
		nflex3s2_09_10	FLEX58	-5,9	II
nflex3s2_23_01	FLEX59	-7,9	I		

Tabla C.8: MCCs representativos por la ubicación en el sitio activo para el enfoque rígidamente flexible 2. En la tabla se muestran las distancias interatómicas importantes en el proceso catalítico.

MCCs	Afinidad kcal/mol	Distancia (Å)						
		a	a'	b	c	d	e	f
FLEX39	-5,9	2,915 (99,4)	2,065 (149,4)	3,145 (77,9)	3,485 (50,2)	2,894 (153,2)	3,890 (22,8)	2,051 (152,4)
FLEX40	-6,4	2,916 (96,8)	1,991 (147,4)	3,326 (125,6)	3,581 (40,0)	2,686 (148,4)	3,349 (113,8)	2,111 (161,5)
FLEX45	-7,4	2,783 (105,8)	2,089 (150,5)	3,087 (127,5)	3,542 (58,7)	2,091 (165,7)	2,116 (115,1)	2,181 (147,1)
FLEX46	-7,3	2,875 (105,5)	2,230 (147,1)	3,684 (65,5)	3,444 (60,6)	2,129 (166,6)	1,895 (135,4)	2,145 (148,1)
FLEX52	-6,5	3,179 (154,7)	2,073 (157,2)	3,908 (122,6)	3,338 (58,0)	2,236 (136,7)	2,695 (79,6)	2,346 (172,6)
FLEX54	-6,8	2,239 (160,7)	2,325 (124,3)	3,368 (130,9)	3,581 (49,3)	2,386 (149,5)	1,746 (160,0)	2,032 (168,1)
FLEX57	-7,8	2,755 (106,0)	2,054 (151,4)	3,119 (127,5)	3,457 (59,4)	2,106 (166,7)	3,320 (120,0)	2,145 (147,5)

Tabla C.9: Complejos reportados con la AcCalB\_silvestre utilizando la estructura ACE03 y (*R*, *S*)-propranolol: OR1, OR4, OR6, OR7 y OR8 para el enantiómero *R*, en donde OR4 y OR6 presentan modo de unión II. Para el enantiómero *S*: OS1, OS3, OS4 y OS6 en donde solo OS4 presenta modo de unión II.

MCCs	Afinidad (kcal/mol)	Distancia (Å)						
		a	a'	b	c	d	e	f
OR1	-7,0			2,956 (106,7)	3,540 (61,9)			
OR4	-6,3			4,322 (18,9)	3,349 (61,2)			
OR6	-6,1			5,983 (118,6)	4,045 (70,5)			
OR7	-6,0			3,996 (95,6)	5,401 (68,1)			
OR8	-6,0	2,701 (120,8)	1,918 (174,7)	4,022 (88,7)	5,746 (85,8)	2,065 (148,8)	1,894 (154,5)	2,044 (160,1)
OS1	-7,1			2,876 (95,6)	3,465 (66,1)			
OS3	-6,0			4,480 (132,6)	5,982 (65,5)			
OS4	-6,0			2,790 (142,6)	3,315 (59,8)			
OS6	-5,7			2,685 (115,0)	3,841 (66,2)			