

La importància de les eines computacionals en el disseny d'enzims d'interès industrial

The importance of computational tools in the design of enzymes of industrial interest

Adrián Romero-Rivera, Miguel Ángel María-Solano i Sílvia Osuna
Universitat de Girona. Institut de Química Computacional i Catàlisi (IQCC) i Departament de Química

Resum: El camp del disseny d'enzims té com a principal objectiu el desenvolupament d'enzims modificats per tal d'accelerar noves reaccions o d'acceptar substrats no naturals. Tot i els avenços en el camp, encara no s'ha assolit el disseny rutinari d'enzims. L'evolució dirigida (DE) és una de les estratègies més poderoses que existeixen, però el seu alt cost i el fet de ser una estratègia no racional en limita l'aplicació. La comprensió de com l'evolució dirigida és capaç d'obtenir variants altament actives és crucial per al futur desenvolupament de protocols computacionals robusts capaços de predir amb precisió quins canvis d'aminoàcids són necessaris per a tenir alta activitat enzimàtica. En aquest treball, es demostra la importància dels mètodes computacionals, en particular, els basats en simulacions de dinàmica molecular, per a elucidar l'efecte de mutacions al centre actiu i a posicions llunyanes en l'activitat i selectivitat enzimàtica.

Paraules clau: Biocatàlisi, disseny d'enzims, simulacions de dinàmica molecular.

Abstract: *The enzyme design field pursues the development of new modified enzyme variants to target new synthetically useful reactions and/or substrates. Although many advances have been made, the routine design of enzymes has not yet been achieved. Directed evolution (DE) is one of the most powerful strategies that exist to that end but its high cost and the fact that it is not rational limit its application. The understanding of how DE is able to provide highly active variants is crucial to the future development of robust computational protocols capable of accurately predicting which amino acid changes are required for high enzymatic activity. In this paper, we show the important role of computational methods, in particular molecular dynamics (MD) simulations, for elucidating the effect of distal and active site mutations that lead to enhanced enzymatic activity and selectivity.*

Keywords: *Biocatalysis, enzyme design, molecular dynamics simulations.*

Introducció

Els enzims són els catalitzadors més eficients que es coneixen a la Terra ja que són capaços d'accelerar les reaccions químiques en molts ordres de magnitud i fer que la vida tal com la coneixem sigui possible. Aquest increment de la velocitat de reacció ve donat per la seva capacitat de disminuir les barreres d'activació dels processos, i aconseguir que aquests es puguin portar a terme a temperatura i pressions baixes. Els enzims són també els catalitzadors més específics i selectius, cosa que porta a una reducció del nombre de passos de purificació, ja que proporcionen el producte desitjat amb un elevat rendiment. A més, són biodegradables, i no tòxics. Tots aquests avantatges fan que les rutes catalitzades per enzims siguin una alternati-

va atractiva per a les indústries, ja que permeten reduir costos de fabricació utilitzant processos atractius des d'un punt de vista mediambiental [1].

Tot i els grans avantatges que comporta la biocatàlisi, l'ús d'enzims a la indústria és encara força limitat. Els principals problemes que en limiten l'aplicació són els següents: 1) a les condicions desitjades de temperatura, pH i solvent, els enzims naturals no són estables, 2) hi ha molts processos que no presenten un enzim natural capaç de catalitzar la reacció desitjada, i 3) si existeix l'enzim a la natura, aquest no ha estat optimitzat per al substrat d'interès. Tot i que s'han determinat molts factors clau que contribueixen a la catàlisi enzimàtica [2], encara no es té un coneixement prou precís sobre com els enzims són capaços d'accelerar les reaccions químiques, cosa que fa que l'alteració de l'activitat enzimàtica per a adaptar-la a les reaccions d'interès industrial sigui un gran repte per a la (bio)química.

Totes les tècniques que s'han descrit per al disseny d'enzims, ja siguin experimentals o computacionals, estan basades en

Correspondència: Sílvia Osuna
Universitat de Girona. Institut de Química Computacional i Catàlisi (IQCC) i Departament de Química
C. de Maria Aurèlia Capmany, 69. 17003 Girona
Tel.: +34 664 284 535
A/e: silvia.osuna@udg.edu

els passos següents: 1) selecció dels punts de mutació, 2) introducció de les mutacions, i 3) avaluació de l'estabilitat, l'afinitat i l'activitat dels nous enzims (variants) generats. En funció del grau d'implicació dels càlculs computacionals i assajos experimentals al procés, es parla de tres estratègies principals: disseny d'enzims racional, semiracional o no racional. En un extrem trobem el disseny racional, que limita el procés a un nombre reduït de variants predites majoritàriament mitjançant eines computacionals. El disseny semiracional combina la generació d'una sèrie de variants predites mitjançant càlculs, però després aplica tècniques d'evolució dirigida (en anglès *directed evolution*, *DE*) al laboratori per a millorar-ne l'activitat. Amb aquesta estratègia semiracional, s'han generat múltiples enzims per a un rang de reaccions d'interès força ampli [3]. A l'altre extrem trobem l'evolució no racional, que es basa en la generació al laboratori d'un elevat nombre de variants amb mutacions aleatòries (figura 1).

El descobriment de mètodes de biologia molecular que modifiquen els enzims simulant l'evolució darwiniana al laboratori va revolucionar el camp del disseny d'enzims. Aquesta estratègia anomenada evolució dirigida (DE) [1, 4] inicialment es basava en cicles de mutacions aleatòries, seguits de tècniques

de selecció de les variants més estables, actives i selectives. Des de llavors, s'han introduït molts canvis al procés que inclouen des de l'ús d'eines computacionals i bioinformàtiques, tècniques d'anàlisi de seqüències, fins a sofisticats mètodes de selecció i identificació de les mutacions beneficioses [5].

Així doncs, la DE ha esdevingut el mètode més potent per a la producció de nous enzims per a qualsevol procés. Mitjançant aquesta estratègia, s'han dissenyat enzims per a la producció d'intermediaris quirals de medicaments com l'atorvastatina (Lipitor®), o transaminases per a la producció del medicament Januvia®, entre moltes altres [6]. Tot i així, la tècnica DE presenta uns clars desavantatges: 1) un elevat cost associat, ja que requereix la generació i avaluació d'activitats de milers/milions de variants al laboratori, i 2) el desconeixement de les principals causes de l'augment d'eficiència induït per les mutacions aleatòries. És a dir, amb la DE es destinen molts recursos a optimitzar un enzim per a un determinat procés, però no s'obté nou coneixement aplicable a noves reaccions i/o biocatalitzadors. En aquesta línia, s'estan duent a terme molts estudis que tenen com a principal finalitat estudiar mitjançant càlculs computacionals les variants generades amb evolució dirigida per tal de racionalitzar l'efecte de les mutacions [7].

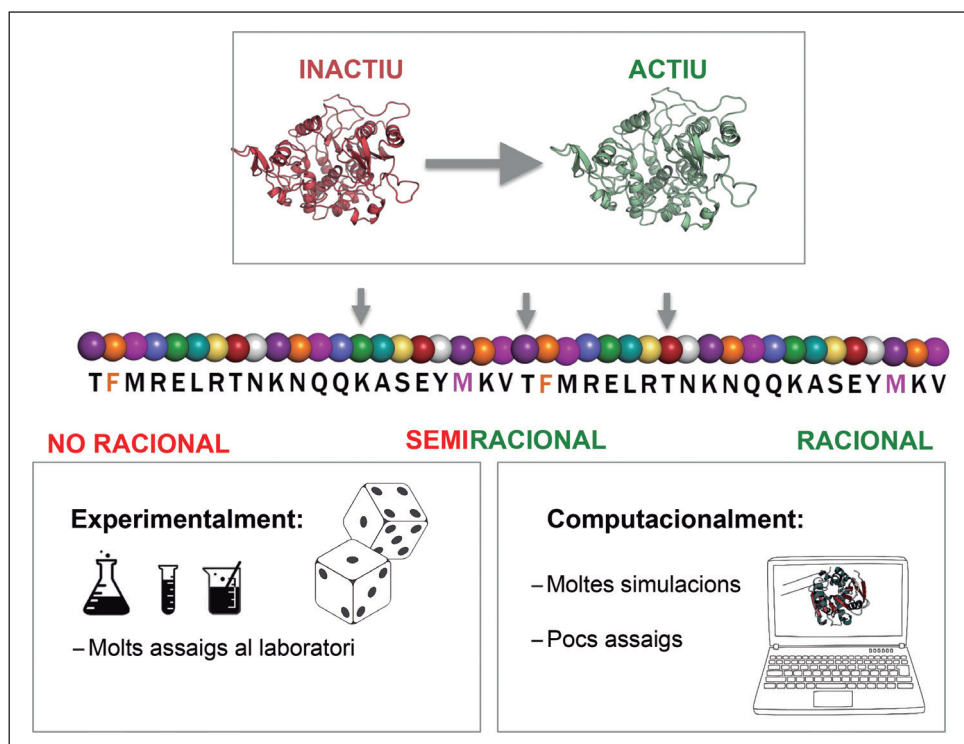


FIGURA 1. Representació de les dues principals vies per al disseny d'enzims, mitjançant eines computacionals per al disseny racional, tècniques experimentals pel disseny no racional, o combinacions d'ambdós per a donar lloc al disseny semiracional.

En aquest article, es presentaran una sèrie d'estudis realitzats per nosaltres que mostren com les eines computacionals existents, en especial les simulacions de dinàmica molecular, són capaces de determinar l'efecte de les mutacions introduïdes mitjançant DE. El principal objectiu és determinar quines són les regles d'evolució de la tècnica experimental per a desenvolupar una nova estratègia computacional que permeti dissenyar enzims de manera ràpida i eficient.

Eines computacionals per al disseny d'enzims

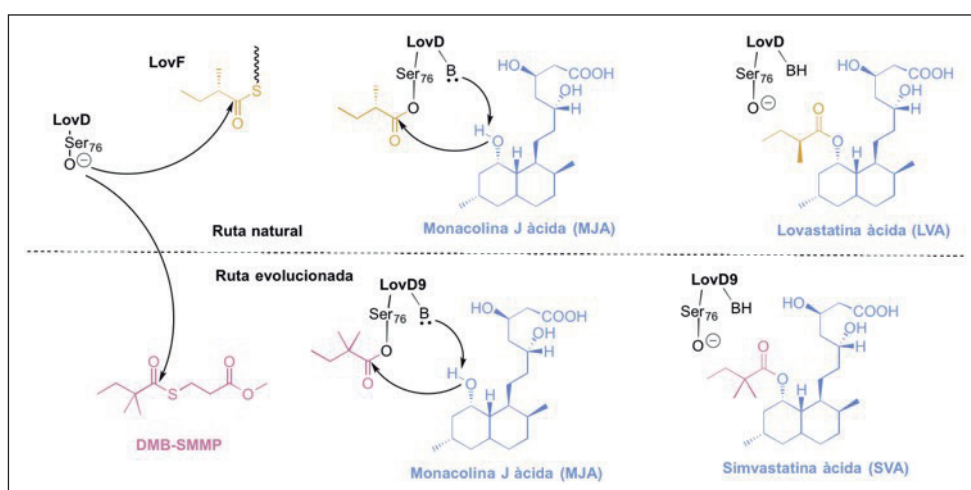
Per a determinar i entendre quin és l'efecte de les mutacions introduïdes en l'activitat catalítica dels enzims, existeixen diferents eines computacionals. Aquestes eines ofereixen la possibilitat d'analitzar a nivell atòmic com una determinada mutació modifica la químic-, regio-, o estereoselectivitat, ja que permeten estudiar, per exemple, la interacció del substrat amb el centre actiu de l'enzim al llarg del temps i així analitzar els efectes de les mutacions realitzades en la dinàmica conformacional de l'enzim. Aquestes tècniques computacionals difereixen en el nivell de resolució usat per a descriure les interaccions que es donen a la proteïna, i en com exploren l'espai conformacional de l'enzim [8].

Les estratègies actuals es poden classificar en: 1) aquelles que tenen com a principal objectiu estudiar el mecanisme de reacció enzimàtic mitjançant mecànica quàntica (QM) o tècniques híbrides de mecànica quàntica/mecànica molecular (QM/MM),

i 2) aquelles que pretenen estudiar la dinàmica conformacional de l'enzim, com les simulacions de dinàmica molecular o de Monte Carlo. Cada estratègia presenta les seves pròpies limitacions, però la combinació d'elles permet analitzar, en gran detall, l'efecte de les mutacions introduïdes via DE [7b, 9].

Estudi de l'enzim aciltransferasa LovD

En un estudi realitzat per alguns de nosaltres, es van realitzar simulacions de dinàmica molecular (MD) de l'escala de microsegons a la màquina ANTON per tal de racionalitzar l'augment de l'activitat catalítica d'uns enzims generats al laboratori amb DE per a la síntesi del medicament per a tractar el colesterol simvastatina [10]. L'enzim natural estudiat anomenat LovD és una aciltransferasa encarregada de transferir el grup α -metilbutirat a la posició C8 del compost monacolina J àcida (MJA) per a donar el medicament lovastatina (vegeu l'esquema 1). A la ruta natural, l'enzim LovD rep el grup acil en la posició 176 mitjançant la interacció amb el domini ACP d'una altra proteïna, la LovF. Un cop la serina 176 ha rebut el grup acil, aquest es transfereix a la posició C8 del MJA. Donat que lovastatina i simvastatina difereixen en només un grup metil a la posició alfa del carbonil (vegeu l'esquema 1), es va aplicar DE per tal de desenvolupar una variant de la LovD per a la fabricació industrial del medicament d'interès. Aquesta nova variant generada, la LovD9, és capaç de reaccionar amb el donador d'acil α -dimetilbutiril-S-metilmercaptopropionat que ja presenta el grup acil adequat per a la formació del producte



ESQUEMA 1. Mecanisme de la ruta natural per a l'enzim aciltransferasa LovD i l'evolució LovD9 que no requereix la interacció amb la proteïna LovF.

desitjat, i per tant, les mutacions introduïdes han abolit la dependència de l'enzim respecte de LovF.

Per tal d'entendre l'efecte de les mutacions sobre l'activitat enzimàtica, es van obtenir les estructures de raigs X d'algunes de les variants. La comparació de les estructures cristal·logràfiques no permetia entendre la diferència d'activitat entre variants, ja que els aminoàcids involucrats en la catàlisi, és a dir els residus catalítics Ser176, Tir188 i Lis79, presentaven la mateixa disposició. De la mateixa manera que els cristalls no proporcionaven informació rellevant, la realització de simulacions d'MD curtes (d'uns 100 ns) no mostraven diferències significatives. No obstant això, les simulacions d'MD realitzades amb la màquina ANTON a l'escala dels microsegons van permetre determinar les principals raons de la diferència d'activitat. Tal com s'observa a la figura 2, l'anàlisi de la dinàmica conformacional de l'enzim natural mostra com, en absència de la LovF, la LovD no és capaç de posicionar els residus catalítics en la conformació requerida per a la catàlisi, és a dir, la

triada Ser-Tir-Lis mai està ben posicionada per a poder portar a terme la reacció d'acilació. La introducció d'una sola mutació situada a uns 15 Å del centre catalític permet que la triada catalítica estigui ben posicionada un 30 % del temps de simulació. Aquest percentatge de temps en la bona conformació per a la catàlisi augmenta al llarg del procés d'evolució dirigida, i assoleix gairebé un 100 % en el cas de les variants més actives LovD6 i LovD9. És interessant fer notar que les simulacions d'MD de l'enzim natural LovD en presència del domini ACP de la LovF indiquen que els residus catalítics Ser-Tir-Lis estan ben posicionats per a donar lloc a la reacció d'acilació.

Els percentatges de temps en la bona conformació per a la catàlisi obtinguts mitjançant les simulacions d'MD correlacionen amb els valors de la constant catalítica (k_{cat}) de les variants. Les simulacions d'MD a l'escala de microsegons mostren doncs com les mutacions introduïdes al llarg de l'evolució estableixen de forma progressiva els estats conformacionals en què la triada catalítica està ben posicionada per a dur a terme

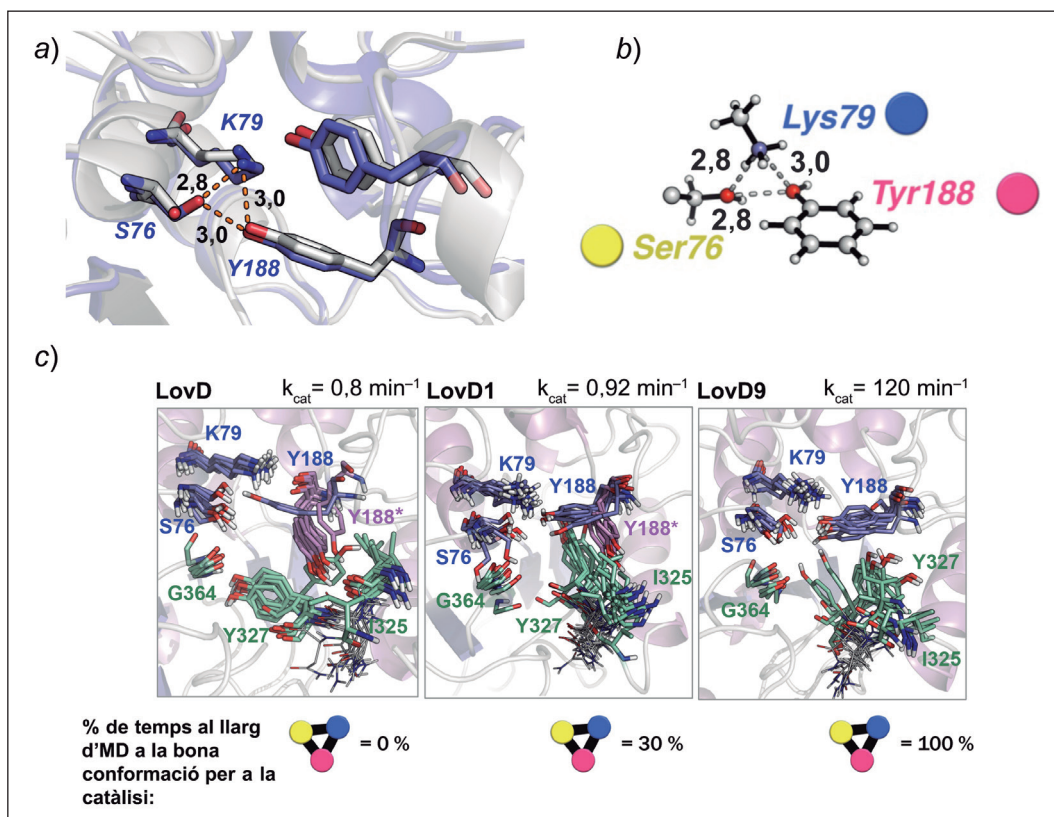


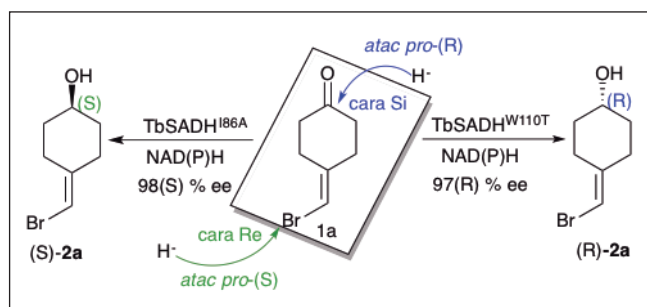
FIGURA 2. a) Sobreposició de les estructures cristal·logràfiques disponibles per a l'enzim natural LovD85 i la variant LovD6 (codis PDB: 3HL9, 4LCL). b) Estructura optimitzada amb mecànica quàntica de la triada catalítica formada per la serina 76 (de color groc), la tirosina 188 (rosa) i la lisina 88 (en blau). c) Sobreposició de deu conformacions explorades al llarg de les simulacions d'MD a l'escala de microsegons per a l'enzim natural, LovD1, que conté una mutació a més de 15 Å del centre actiu, i la variant més activa, LovD9. També es mostren els percentatges de temps en la bona conformació per a la catàlisi, així com la constant catalítica (en min^{-1}) de les variants.

la reacció. Gràcies a la realització d'aquestes simulacions es va poder determinar quin era l'efecte de les mutacions introduïdes al llarg del procés d'evolució dirigida, fins i tot en aquells casos en què els canvis d'aminoàcids tenien lloc en posicions llunyanes del centre actiu de l'enzim.

Estudi de l'enzim alcohol-deshidrogenasa

La reducció asimètrica de cetones proquirals als alcohols corresponents es pot aconseguir fent servir catalitzadors, basats en metalls de transició [11], però també mitjançant enzims com ara alcohol-deshidrogenases (ADH). S'han publicat molts estudis que demostren la importància de les ADH en la síntesi asimètrica donada la seva alta termoestabilitat i la seva capacitat d'operar en solvents orgànics amb gran eficiència i selectivitat [12].

L'ADH catalitza la reducció reversible de cetones proquirals als alcohols respectius. Necessiten la presència del cofactor NAD(P)H, que allibera el hidrur *pro*-(R) normalment a la cara Re de la cetona i produeix així l'alcohol-(S) corresponent. L'estereoselectivitat de les ADH per a la formació d'alcohols-(S) prové de la forma del centre actiu d'aquests enzims, que normalment presenten dues butxaques: una capaç d'acceptar substituents voluminosos, i una altra més petita a on es posiciona el substituent menys voluminos del carbonil de la cetona (vegeu l'esquema 2) [13]. Donat que les ADH accepten un rang de substrats bastant limitat, i que generalment s'obté l'alcohol-(S), és molt interessant generar noves ADH per a la síntesi asimètrica d'alcohols quirals d'interès industrial. Per a aconseguir aquest objectiu, s'ha aplicat evolució dirigida i tècniques de mutagènesi específica racional. Reetz i els seus col·laboradors van desenvolupar una estratègia potent per a reduir el nombre de possibles variants per a generar una llibreria de variants «intelligent» [14]. Aquesta estratègia es va fer servir a



ESQUEMA 2. Representació dels dos possibles atacs que donen els alcohols (S) i (R).

una ADH dependent de zinc de *Thermoanaerobacter brockii* (TbSADH) per a la reducció asimètrica de tetrahidrofura-3-ona per a formar l'alcohol-(S), important per a la síntesi dels inhibidors del VIH amprenavir i fosamprenavir. També van modificar el mateix TbSADH per a la reducció asimètrica de cetones proquirals de tipus 4-alquilidenclohexanona amb formació dels corresponents alcohols (R) o (S). Van observar que una simple mutació en les variants TbSADH^{W110T} i TbSADH^{I86A} era suficient per a obtenir l'(R)-alcohol i l'(S)-alcohol, respectivament, amb grans conversions i selectivitat. S'ha vist que els residus W110 i I86 són claus per a l'enantioselectivitat en la majoria d'ADH en *Thermoanaerobacter ethanolicus* (TeSADH) [12].

Els exemples anteriors mostren com l'evolució dels enzims al laboratori és capaç de millorar l'activitat enzimàtica i revertir l'enantioselectivitat en les ADH. Complementant estudis experimentals, els mètodes computacionals es poden fer servir per a racionalitzar l'activitat i l'estereoselectivitat d'enzims naturals modificats al laboratori. En aquest estudi vam avaluar l'efecte de les mutacions W110T i I86A en el centre actiu de l'enzim TbSADH, enzim que és dependent de zinc, a través de simulacions d'MD i posteriorment fent servir POVME [15] i NCIplot [16] per a analitzar les butxaques del centre actiu i les interaccions que es produeixen amb el substrat [17]. Hem pogut demostrar que introduint aquestes mutacions es produeixen uns canvis en l'estructura del centre actiu, els quals provoquen un efecte en les interaccions amb els substrats que determinen l'estereoselectivitat de les variants mutades de TbSADH.

Les simulacions d'MD indiquen que la pobra selectivitat de l'enzim natural TbSADH és a causa del possible posicionament del substrat en les orientacions *pro*-(R) i *pro*-(S). La conformació *pro*-(R) està més afavorida per les fortes interaccions no covalents que es produeixen entre el substrat i el centre actiu de l'enzim. La variant TbSADH^{W110T} presenta un ampli centre actiu, especialment la butxaca gran d'unió, cosa que dona llibertat al substrat per a explorar la conformació *pro*-(R) amb bones distàncies catalítiques per a la transferència d'hidrur (<4,5 Å). A la conformació *pro*-(R), es donen interaccions C—H...π entre l'anell del ciclohexà i els residus del centre actiu (H59, Y267). En introduir la treonina a la posició 110 es permet la formació d'un pont d'hidrogen entre el grup hidroxil d'aquesta i el bromur del substrat (figura 3, W110T *pro*-(R)).

La variant TbSADH^{I86A} mostra un comportament diferent que revela una gran preorganització del centre actiu per a la con-

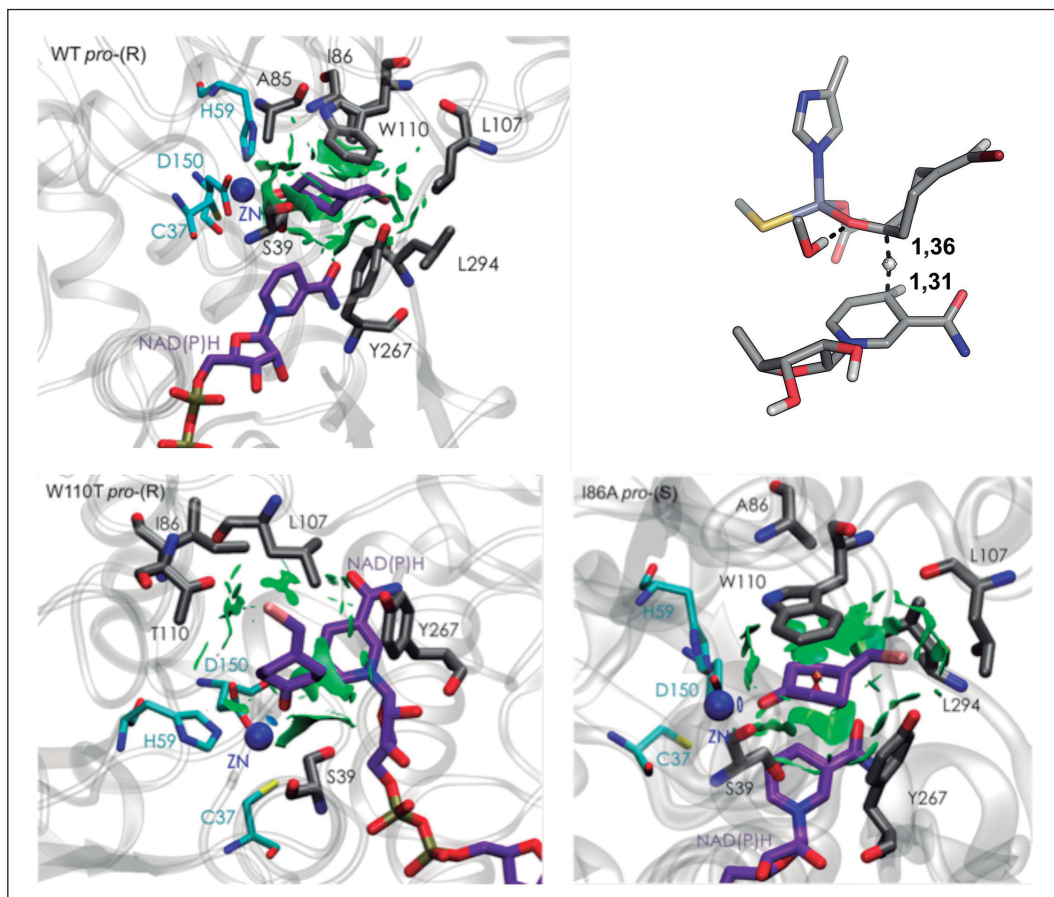


FIGURA 3. Representació de les interaccions no covalents febles més importants que es donen entre el substrat i el centre actiu de l'enzim a la conformació, responsables de la enantioselectivitat del procés. Representació de l'estructura optimitzada amb mecànica quàntica (B3LYP/6-31G(d)) de l'estat de transició per a la transferència d'hidrur.

formació *pro*-(S) amb distàncies catalítiques eficients (<4,5 Å). En canviar la isoleucina a valina en la posició 86, es produeix un increment de la butxaca petita d'unió que indueix una conformació nova a la cadena lateral del residu W110, optimitzada per a maximitzar les interaccions C–H... π amb l'anell ciclohexà del substrat i l'indole de la posició 110 (figura 3, I86A *pro*-(S)). La combinació de simulacions d'MD, amb càlculs de mecànica quàntica i l'anàlisi amb POVME i NCIPLOT, permet una racionalització de l'efecte de les dues mutacions en el centre actiu per a l'enantioselectivitat en l'enzim TbSADH.

Conclusions

L'evolució dirigida ha esdevingut una de les estratègies més potents per al disseny d'enzims a la carta. Tot i els avantatges que proporciona, l'evolució d'enzims amb aquesta tècnica ex-

perimental és un procés car i llarg, ja que no és racional i cal fer moltes proves al laboratori per a finalment aconseguir un enzim amb una elevada activitat. Clarament aquests inconvenients estan limitant el procés d'obtenció d'enzims per a fins industrials.

Si fóssim capaços de predir quins canvis són necessaris per a obtenir l'enzim d'interès, caldrien moltes menys proves al laboratori i, per tant, es reduiria de forma substancial el temps i els costos de generació del catalitzador desitjat. En aquest sentit les eines computacionals són de gran utilitat, però tot i el gran potencial que ofereixen encara no són prou acurades i eficients per a predir amb precisió quins canvis d'aminoàcids són necessaris per a tenir activitats altes. En aquest context, doncs, s'estan destinant molts esforços a estudiar com opera la tècnica d'evolució dirigida i obtenir així quines són les regles de mutació per a incorporar-les als protocols existents de disseny d'enzims.

En aquest article s'han mostrat dos estudis diferents, ambdós basats en simulacions de dinàmica molecular acoblades a càlculs de mecànica quàntica i eines bioinformàtiques, que permeten determinar l'efecte de les mutacions introduïdes en l'activitat i selectivitat del procés. Tots aquests treballs són de gran utilitat per a aconseguir el repte de l'evolució racional d'enzims de forma rutinària per a qualsevol reacció/substrat d'interès industrial.

Agraïments

A. R. R. dona les gràcies a la Generalitat de Catalunya per la beca de doctorat (2015-FI-B-00165); M. A. M. S. dona les gràcies al MINECO per la beca de doctorat (BES-2015-074964); S. O. dona les gràcies al MINECO pel projecte CTQ2014-59212-P, posició Ramón y Cajal (RYC-2014-16846), a la Comunitat Europea pel projecte CIG ((PCIG14-GA-2013-630978) i el finançament de l'European Research Council (ERC) sota el programa de recerca i innovació Horizon 2020 de la Unió Europea (ERC-2015-StG-679001). Donem les gràcies també pels recursos computacionals i l'assistència proporcionada pel Barcelona Supercomputing Center – Centro Nacional de Supercomputación.

Referències

- [1] BORNSCHEUER, U. T.; HUISMAN, G. W.; KAZLAUSKAS, R. J.; LUTZ, S.; MOORE, J. C.; ROBINS, K. «Engineering the third wave of biocatalysis». *Nature*, vol. 485, núm. 7397 (2012), p. 185-194.
- [2] a) BENKOVIC, S. J.; HAMMES-SCHIFFER, S. «A perspective on enzyme catalysis». *Science*, vol. 301, núm. 5637 (2003), p. 1196-1202; b) GARCIA-VILOCA, M.; GAO, J.; KARPLUS, M.; TRUHLAR, D. G. «How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations». *Science*, vol. 303, núm. 5655 (2004), p. 186-195.
- [3] a) ALTHOFF, E. A.; WANG, L.; JIANG, L.; GIGER, L.; LASSILA, J. K.; WANG, Z.; SMITH, M.; HARI, S.; KAST, P.; HERSCHLAG, D.; HILVERT D.; BAKER, D. «Robust design and optimization of retroaldol enzymes». *Prot. Sci.*, vol. 21, núm. 5 (2012), p. 717-726; b) GARRABOU, X.; BECK, T.; HILVERT, D. «A promiscuous de novo retroaldolase catalyzes asymmetric Michael additions via Schiff base intermediates». *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 54, núm. 19 (2015), p. 5609-5612; c) JIANG, L.; ALTHOFF, E. A.; CLEMENTE, F. R.; DOYLE, L.; RÖTHLISBERGER, D.; ZANGHELLINI, A.; GALLAHER, J. L.; BETKER, J. L.; TANAKA, F.; BARBAS III, C. F.; HILVERT, D.; HOUK, K. N.; STODDARD, B. L.; BAKER, D. «De novo computational design of retro-aldol enzymes». *Science*, vol. 319, núm. 5868 (2008), p. 1387-1391.
- [4] a) LUTZ, S.; BORNSCHEUER, U. T. (ed.). *Protein engineering handbook*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, p. I-XLI; b) PACKER, M. S.; LIU, D. R. «Methods for the directed evolution of proteins». *Nat. Rev. Genet.*, vol. 16, núm. 7 (2015), p. 379-394.
- [5] a) KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. «Finding better protein engineering strategies». *Nature Chem. Biol.*, vol. 5, núm. 8 (2009), p. 526-529; b) XIAO, H.; BAO, Z.; ZHAO, H. «High throughput screening and selection methods for directed enzyme evolution». *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 54, núm. 16 (2015), p. 4011-4020; c) FOX, R. J.; DAVIS, S. C.; MUNDORFF, E. C.; NEWMAN, L. M.; GAVRILOVIC, V.; MA, S. K.; CHUNG, L. M.; CHING, C.; TAM, S.; MULEY, S.; GRATE, J.; GRUBER, J.; WHITMAN, J. C.; SHELDON, R. A.; HUISMAN, G. W. «Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution». *Nat. Biotech.*, vol. 25, núm. 3 (2007), p. 338-344.
- [6] a) BREUER, M.; DITRICH, K.; HABICHER, T.; HAUER, B.; KESSELER, M.; STÜRMER, R.; ZELINSKI, T. «Industrial methods for the production of optically active intermediates». *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 43, núm. 7 (2004), p. 788-824; b) Panke, S.; Wubolts, M. «Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates». *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 9, núm. 2 (2005), p. 188-194; c) SAVILE, C. K.; JANEY, J. M.; MUNDORFF, E. C.; MOORE, J. C.; TAM, S.; JARVIS, W. R.; COLBECK, J. C.; KREBBER, A.; FLEITZ, F. J.; BRANDS, J.; DEVINE, P. N.; HUISMAN, G. W.; HUGHES, G. J. «Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture». *Science*, vol. 329, núm. 5989 (2010), p. 305-309; d) PAVLIDIS, I. V.; WEISS, M. S.; GENZ, M.; SPURR, P.; HANLON, S. P.; WIRZ, B.; IDING, H.; BORNSCHEUER, U. T. «Identification of (S)-selective transaminases for the asymmetric synthesis of bulky chiral amines». *Nat. Chem.*, vol. 8, núm. 11 (2016), p. 1076-1082.
- [7] a) WEDGE, D. C.; ROWE, W.; KELL, D. B.; KNOWLES, J. «In silico modelling of directed evolution: implications for experimental design and stepwise evolution». *J. Theor. Biol.*, vol. 257, núm. 4 (2009), p. 131-141; b) ROMERO-RIVERA, A.; GARCÍA-BORRÁS, M.; OSUNA, S. «Computational tools for the evaluation of laboratory-engineered biocatalysts». *Chem. Commun.*, vol. 53, núm. 2 (2017), p. 284-297.
- [8] OROZCO, M. «A theoretical view of protein dynamics». *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, núm. 8 (2014), p. 5051-5066.
- [9] OSUNA, S.; JIMÉNEZ-OSÉS, G.; NOEY, E. L.; HOUK, K. N. «Molecular dynamics explorations of active site structure in designed and

evolved enzymes». *Acc. Chem. Res.*, vol. 48, núm. 4 (2015), p. 1080-1089.

[10] JIMÉNEZ-OSÉS, G.; OSUNA, S.; GAO, X.; SAWAYA, M. R.; GILSON, L.; COLLIER, S. J.; HUISMAN, G. W.; YEATES, T. O.; TANG, Y; HOUK, K. N. «The role of distant mutations and allosteric regulation on LovD active site dynamics». *Nat. Chem. Biol.*, vol. 10, núm. 6 (2014), p. 431-436.

[11] MORRIS, R. H. «Asymmetric hydrogenation, transfer hydrogenation and hydrosilylation of ketones catalyzed by iron complexes». *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, núm. 8 (2009), p. 2282-2291.

[12] a) MUSA, M. M.; ZIEGELMANN-FJELD, K. I.; VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G.; PHILLIPS, R. S. «Xerogel-encapsulated W110A secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* performs asymmetric reduction of hydrophobic ketones in organic solvents». *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 46, núm. 17 (2007), p. 3091-3094; b) MUSA, M. M.; ZIEGELMANN-FJELD, K. I.; VIEILLE, C.; PHILLIPS, R. S. «Activity and selectivity of W110A secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* in organic solvents and ionic liquids: mono- and biphasic media». *Org. Biomol. Chem.*, vol. 6, núm. 5 (2008), p. 887-892.

[13] PRELOG, V. «Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections». *Pure Appl. Chem.*, vol. 9, núm. 1 (1964), p. 119-130.

[14] SUN, Z.; LONSDALE, R.; ILIE, A.; LI, G.; ZHOU, J.; REETZ, M. T. «Catalytic asymmetric reduction of difficult-to-reduce ketones: triple-code saturation mutagenesis of an alcohol dehydrogenase». *ACS Catal.*, vol. 6, núm. 3 (2016), p. 1598-1605.

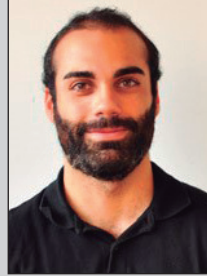
[15] DURRANT, J. D.; VOTAPKA, L.; SØRENSEN, J.; AMARO, R. E. «POVME 2.0: an enhanced tool for determining pocket shape and volume characteristics». *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 10, núm. 11 (2014), p. 5047-5056.

[16] a) CONTRERAS-GARCÍA, J.; JOHNSON, E. R.; KEINAN, S.; CHAUDRET, R.; PIQUEMAL, J.-P.; BERATAN, D. N.; YANG, W. «NCIPLLOT: a program for plotting noncovalent interaction regions». *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 7, núm. 3 (2011), p. 625-632; b) JOHNSON, E. R.; KEINAN, S.; MORI-SÁNCHEZ, P.; CONTRERAS-GARCÍA, J.; COHEN, A. J.; YANG, W. «Revealing noncovalent interactions». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, núm. 18 (2010), p. 6498-6506.

[17] MARIA-SOLANO, M. A.; ROMERO-RIVERA, A.; OSUNA, S. «Exploring the reversal of enantioselectivity on a zinc-dependent alcohol dehydrogenase». *Org. Biomol. Chem.*, vol. 15, núm. 19 (2017), p. 4122-4129.



S. Osuna



A. Romero-Rivera



M. Á. Maria-Solano

Sílvia Osuna és doctora en química per la Universitat de Girona (UdG, 2010). Actualment és investigadora Ramón y Cajal a l'Institut de Química Computacional i Catàlisi (IQCC) de la UdG, i ha obtingut recentment un projecte ERC-StG per a desenvolupar un nou protocol computacional per al disseny d'enzims.

Adrián Romero-Rivera és graduat en química per la Universitat de Girona (UdG, 2013). Va acabar els estudis del Master's in Advanced Catalysis and Molecular Modeling (MACMOM, UdG) el 2014. Actualment està fent el doctorat a l'IQCC sota la supervisió del professor Marcel Swart i la doctora Sílvia Osuna.

Miguel Ángel Maria-Solano és graduat en bioquímica per la Universitat de Múrcia (UM, 2014). Va acabar els estudis de màster en biologia molecular i biotecnologia el 2015. Actualment està fent el doctorat a l'Institut de Química Computacional i Catàlisi (IQCC) de la Universitat de Girona treballant en l'estudi computacional del disseny d'enzims supervisat pel professor Marcel Swart i la doctora Sílvia Osuna.