

Celebrem el Premi Nobel de Química 2018. Evolució dirigida: de Charles R. Darwin a Frances H. Arnold

Celebrating the Nobel Prize in Chemistry 2018. Directed evolution: from Charles R. Darwin to Frances H. Arnold

Pere Clapés

Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC)

Resum: Frances H. Arnold fou guardonada amb el Premi Nobel de Química de l'any 2018 per la seva recerca pionera en l'evolució dirigida d'enzims, basada en el concepte darwinian de l'evolució o selecció natural, en què cada petita variació que experimenta un ésser viu determinat, si és útil, es preserva (se selecciona). Els enzims són productes evolutius —no de disseny— que, mitjançant el procés de selecció natural, els organismes més ben adaptats tenen en la seva maquinària biològica per catalitzar de manera molt efectiva les reaccions metabòliques amb vista a la supervivència. El concepte *selecció natural* portat al laboratori a nivell molecular per a un enzim concret, de manera accelerada i dirigida (amb una pressió evolutiva definida per l'investigador), per adaptar-ne les propietats catalítiques a les necessitats sintètiques dels químics, és el que s'anomena *evolució dirigida d'enzims*. En aquest article es revisen el concepte i les metodologies per dur a terme l'evolució dirigida d'enzims, i es comenten els principals treballs d'investigació amb aplicacions a la química orgànica sintètica de la premi Nobel Frances H. Arnold.

Paraules clau: Biocatàlisi, evolució dirigida, Frances H. Arnold, Premi Nobel de Química 2018.

Abstract: *One half of this year's Nobel Prize in Chemistry has been awarded to Frances H. Arnold for her pioneering investigations of the directed evolution of enzymes, which are proteins that catalyze chemical reactions. The directed evolution of enzymes is based on the Darwinian concept of natural selection, by which each slight variation, if useful, is preserved. Enzymes are the products of evolution, not of design, and by natural selection the best adapted organisms contain the most updated and optimized enzyme repertoires to effectively catalyze the metabolic reactions essential for their survival. The concept of natural selection taken to the laboratory on molecular level for a specific enzyme – with an evolutionary pressure defined by the researcher – in order to adapt its catalytic properties to given synthetic needs, is what is called directed evolution of enzymes. In this paper, the concept and methodologies of directed evolution are reviewed, as well as the main research work with applications in synthetic organic chemistry of the Nobel laureate Frances H. Arnold.*

Keywords: *Biocatalysis, directed evolution, Frances H. Arnold, Nobel Prize in Chemistry 2018.*

Introducció

El Premi Nobel de Química de l'any 2018 fou concedit a tres investigadors: Frances H. Arnold, George P. Smith i Sir Gregory P. Winter (figura 1). El premi es repartí entre Frances H. Arnold (50 %), d'una banda, i George P. Smith (25 %) i Sir Gregory P. Winter (25 %), de l'altra. L'Acadèmia sueca va reconèixer Frances H. Arnold per la seva recerca en l'evolució dirigida d'enzims, i George P. Smith i Sir Gregory P. Winter, per l'expressió de pèptids i anticossos a la superfície externa d'un bacteriòfag (o fag). Dels tres guardonats, les investi-

gacions de la professora Arnold són les que tenen més importància i transcendència en el camp de la química orgànica sintètica, i, per tant, són les que descriuré en el present article.



FIGURA 1. Els tres investigadors guardonats amb el Premi Nobel de Química de l'any 2018. Pàgina web *The Nobel Prize*.

Correspondència: Pere Clapés

Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC)

C. de Jordi Girona, 18-26. 08034 Barcelona

Tel.: +34 934 006 127. Fax: +34 932 045 904

A/e: pere.clapes@iqac.csic.es

Frances H. Arnold nasqué l'any 1956 a Pittsburgh (PA, EUA). Es doctorà per la Universitat de Berkeley (CA, EUA) i actualment ocupa la càtedra Linus Pauling de bioenginyeria i bioquímica a l'Institut de Tecnologia de Califòrnia (Caltech, Pasadena, CA, EUA). La recerca en l'evolució dirigida d'enzims, que inicià a la dècada dels vuitanta del segle passat, li ve motivada per les extraordinàries propietats d'efectivitat i selectivitat dels enzims com a catalitzadors en les reaccions que es donen a la natura (per exemple, la fabricació de sucre a partir de CO_2) i que són font d'inspiració i admiració constants per als investigadors en química orgànica sintètica [1-6]. En aquest punt, cal tenir present que els processos bioquímics que s'observen en els éssers vius són el resultat de milions d'anys d'evolució; per tant, no estan adaptats a les transformacions químiques que interessin, les quals han estat inventades pels químics amb l'objectiu de satisfer les necessitats de la societat [1]. Per això, hi ha qui els considera massa selectius i poc útils per a la indústria química, amb l'argument que tenen una eficiència baixa en substrats que no són els naturals, o que només poden catalitzar un nombre petit de reaccions diferents. També, que presenten un ventall molt limitat de substrats que poden transformar i que, en condicions industrials, l'estabilitat és baixa. La premi Nobel i d'altres investigadors en aquest camp han demostrat que, contràriament a aquest pensament, els enzims poden catalitzar una quantitat enorme de reaccions útils per als investigadors en química sintètica, tant al laboratori com a la indústria, i que, a més, han estat capaços de portar l'evolució darwiniana al laboratori per adaptar-los a les nostres necessitats sintètiques [7-11, 12, 13].

L'evolució dirigida d'enzims es basa en el concepte darwinianà, demostrat de manera brillant i inequívoca en el seu llibre *On the origin of species* [14], de l'evolució o selecció natural, en què cada variació petita que experimenta un ésser viu determinat, si és útil, es preserva (se selecciona) (figura 2).

En l'entorn ambiental, qualsevol fenomen que redueixi el procés reproductiu (de rèplica) exerceix una pressió evolutiva que preservarà els individus amb variacions en el seu metabolisme que s'adaptin millor al canvi (selecció natural). Per tant, la trajectòria evolutiva seguida durant milions d'anys ha anat acumulant moltes variacions petites —però útils— que permeten l'adaptació reeixida al medi i, sobretot, el manteniment de l'espècie. Evidentment, aquestes variacions es troben també en els enzims corresponents, responsables de les reaccions que s'esdevenen en els éssers vius. Per tant, és molt important tenir present que els enzims són productes evolutius, no pas dissenyats, i, mitjançant aquest procés evolutiu, alguns d'ells estan adaptats per catalitzar un procés determinat. Tanmateix, tenen la capacitat de tolerar substrats diferents o de catalitzar reaccions distintes.

Aquest concepte de selecció natural portat al laboratori a nivell molecular, de manera accelerada i dirigida (amb una pressió evolutiva definida per l'investigador), i amb l'objectiu d'adaptar les propietats catalítiques dels enzims a les necessitats sintètiques dels químics, és el que s'anomena *evolució dirigida d'enzims*.

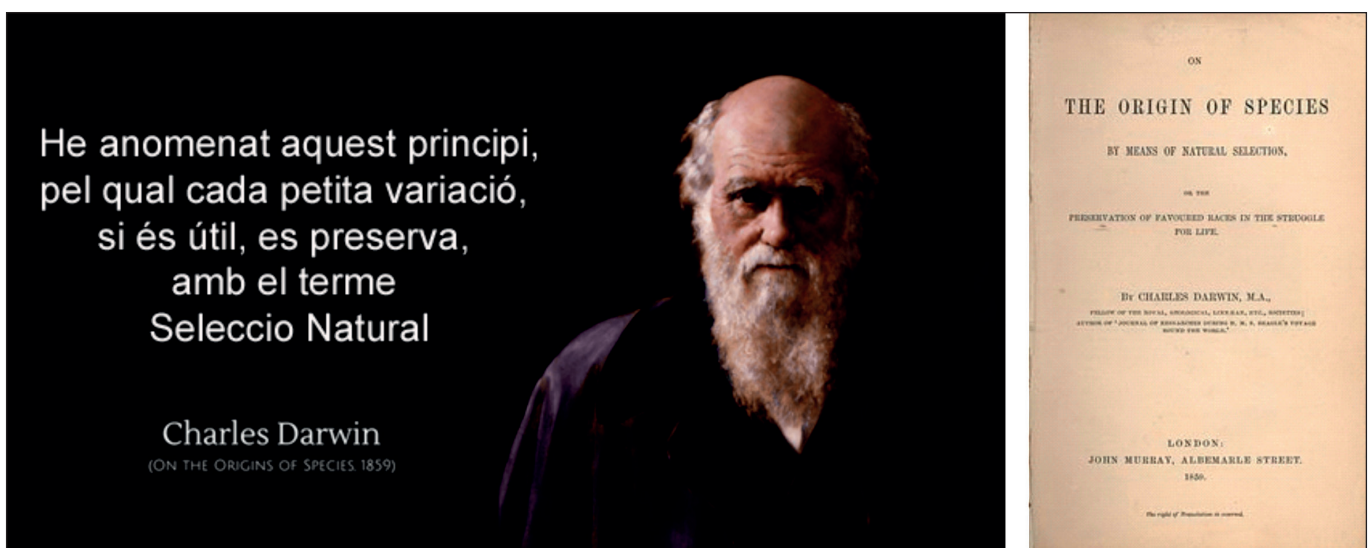


FIGURA 2. El principi de selecció natural de Charles Darwin. Modificat de Wikipedia.

Abans, però, d'entrar en aspectes concrets de l'evolució dirigida d'enzims, cal remarcar el fet que aquest procés es duu a terme a nivell molecular. Charles Darwin va descriure i interpretar de manera inequívoca l'evolució de les espècies a nivell macroscòpic, a partir de l'observació de les diferències entre individus d'una mateixa espècie, i és possible que intuís el nivell molecular, però amb els coneixements científics i les eines experimentals del seu temps era difícil demostrar-ho. El descobriment de l'estructura del DNA i la importància que té en la transferència de la informació genètica de la matèria viva n'ha permès la demostració (figura 3) [15, 16].

Aquesta descoberta ha estat una de les més importants del segle xx i, a partir d'aquest esdeveniment, s'han produït el naixement i els avenços posteriors de la biologia i la genètica moleculars [17]. Just després de conèixer l'estructura del DNA, seguien altres investigacions que revelaren i desentrellaren

tot el mecanisme de la biosíntesi proteica, des de la rèplica del DNA i els enzims necessaris per fer-ho efectiu fins al codi genètic —els triplets de bases nitrogenades formen l'estructura del DNA i en codifiquen els aminoàcids; cada triplet és una combinació de quatre bases: adenina (A), guanina (G), citosina (C) i timina (T) [18, 19]. S'introduïren també el concepte *gen* —la unitat física i funcional bàsica de l'herència genètica, que conté les instruccions per a la síntesi de proteïnes i, com a tals, dels enzims—; el paper de l'RNA —constituït per quatre bases: adenina, guanina, citosina i uracil (U)—; l'estructura i funció dels plasmidis; o la reacció en cadena de la polimerasa [20] (PCR, *polymerase chain reaction*), de la qual s'obté un gran nombre de còpies d'un fragment de DNA específic (per exemple, d'un gen) a partir d'una quantitat mínima, que, entre d'altres, han possibilitat avenços en els camps de la biologia, la medicina i, fins i tot, la química a partir de la segona meitat del segle xx.

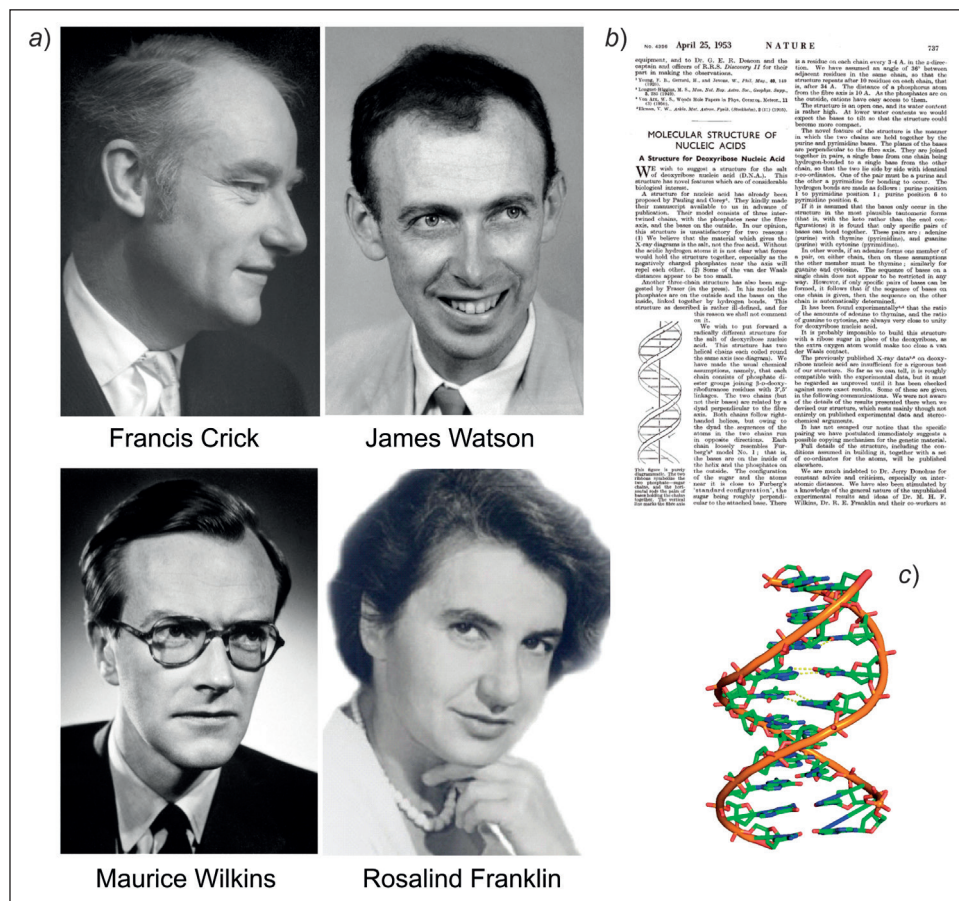


FIGURA 3. a) Els protagonistes del descobriment de l'estructura del DNA: Francis H. C. Crick, James D. Watson, Maurice H. F. Wilkins i Rosalind Franklin. Els tres primers van rebre el Premi Nobel de Fisiologia i Medicina l'any 1962, pels seus descobriments referents a l'estructura dels àcids nucleics i la seva rellevància en la transferència d'informació a la matèria viva. Reproduït de *Wikipedia*. b) Primera plana de l'article de J. Watson i F. Crick a la revista *Nature* [15]. c) Estructura del DNA (PDB: 5VXQ) emprant el programa Pymol (versió 1.7.6.0, Schodinger LLC). Elaboració pròpia.

A partir de tota aquesta recerca del DNA i de les tècniques que n'han derivat, sorgeix l'evolució dirigida d'enzims. Des del punt de vista teòric, aquest procés consta de quatre etapes (figura 4): 1) selecció del gen que codifica l'enzim d'interès (del qual volem dirigir les propietats cap a un altre objectiu catalític); provocació de mutacions en aquest gen, ja sigui de manera aleatòria —mutagènesi aleatòria— o bé dirigida cap a residus d'aminoàcid concrets —mutagènesi dirigida—, i construcció d'una genoteca en què cadascun d'ells contindrà una o més mutacions en la seva seqüència de bases; 2) expressió dels gens per produir les variants de l'enzim d'interès, de manera que s'obté una col·lecció d'enzims la seqüència d'aminoàcids dels quals serà lleugerament distinta —enzims homò-

legs—; 3) cribratge d'aquesta col·lecció d'enzims dirigida cap a la reacció objectiu (en aquest punt, hi intervé la selecció: els enzims que donin un resultat positiu se seleccionen, i els negatius es descarten), i 4) amb els seleccionats, si les seves propietats no són del tot satisfactòries, retorn a la primera etapa: provocació de noves mutacions en els gens que els codifiquen, realització una altra vegada de l'expressió, cribratge de les variants i selecció dels positius.

A la pràctica del laboratori, hi ha dues tècniques per generar diversitat a la genoteca: la barreja de DNA (*DNA shuffling*) i la còpia PCR amb error induït (*error prone PCR*) (figura 5).

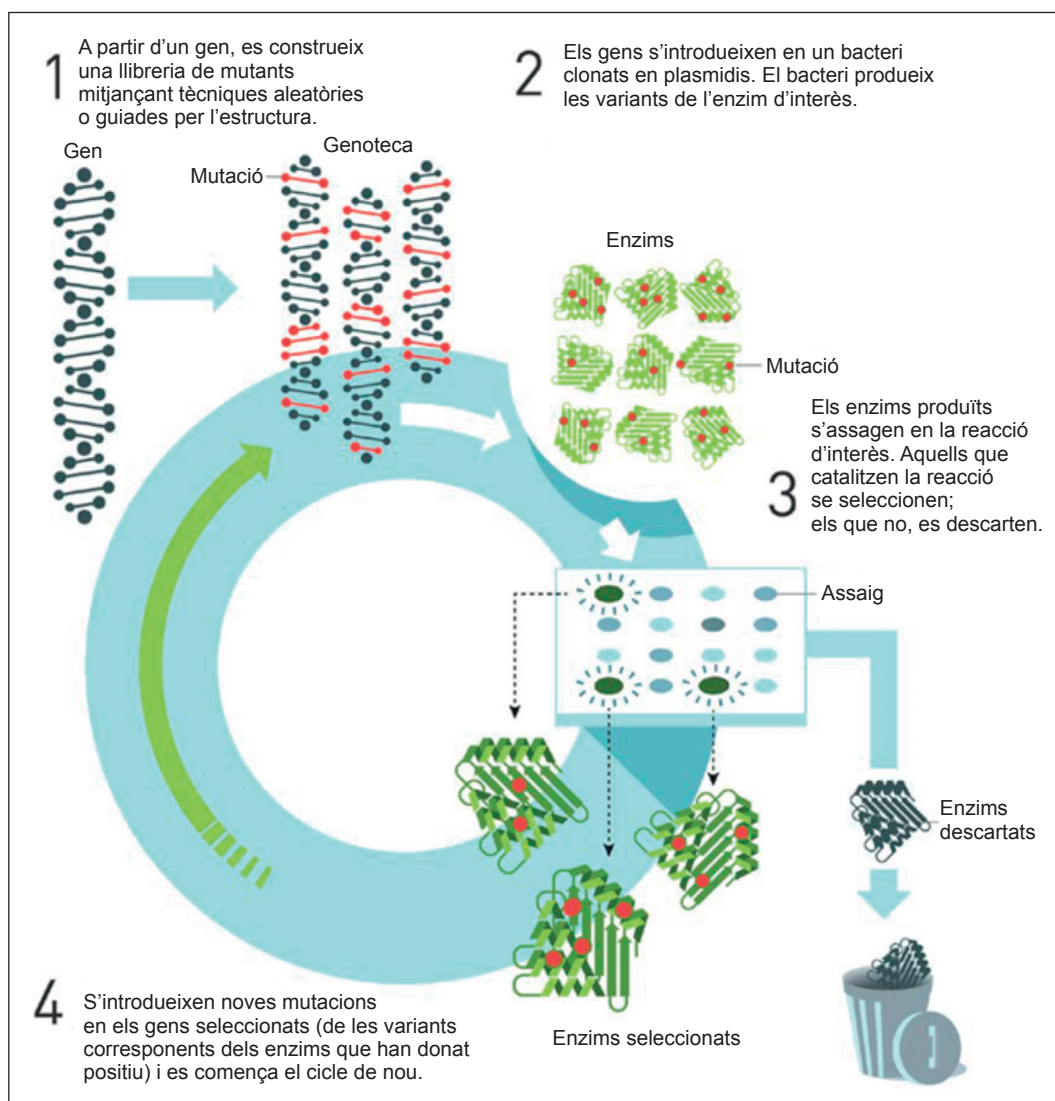


FIGURA 4. Esquema general del procés per dur a terme l'evolució dirigida d'enzims. Elaborat a partir del dibuix original del document *Scientific background on the Nobel Prize in Chemistry 2018: Directed evolution of enzymes and binding proteins*, de la Royal Swedish Academy of Sciences (3 octubre 2018).

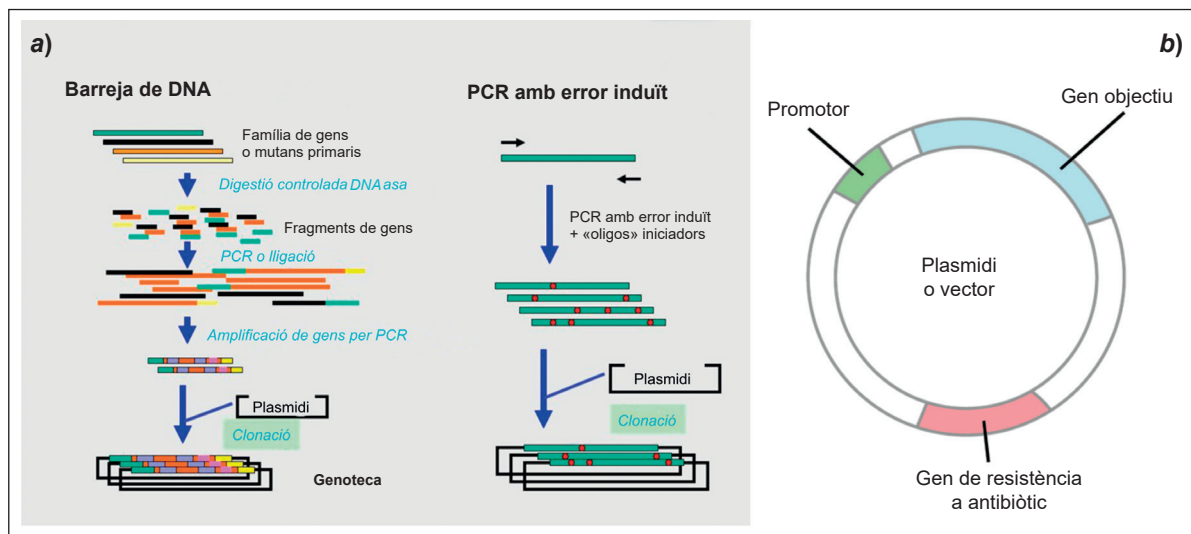


FIGURA 5. a) Tècniques més emprades per generar la genoteca: la barreja de DNA i la còpia PCR amb error induït. A continuació, els gens que expressen l'enzim d'interès es van clonant en un plasmidi o vector. b) Els plasmidis o vectors són molècules de DNA circular de mida reduïda que s'expressen independentment del DNA genòmic dels cromosomes i solen ser dissenyats pels investigadors per a l'expressió heteròloga de proteïnes. Els elements principals són el promotor que dirigeix l'expressió del gen, el gen que codifica l'enzim d'interès i el gen que confereix resistència a un antibiòtic determinat. En un medi de cultiu que contingui l'antibiòtic, només sobreviuran i es desenvoluparan les colònies que comprenen el plasmidi; el vector passarà de pares a fills i produiran l'enzim. Elaborat a partir del dibuix original de la pàgina web <https://slideplayer.fr/slide/6301439/>.

En la primera, s'efectua una digestió controlada del DNA d'una família de gens que expressen enzims homòlegs i, a continuació, s'ajunten o bé mitjançant la reacció de PCR o bé per lligació dels fragments per obtenir els gens complets. La tècnica de l'error induït es basa en la reacció de la PCR, en què, en cada cicle de còpia, s'indueixen una o diverses mutacions en els gens. Això s'aconsegueix duent a terme la PCR en unes condicions específiques i utilitzant una polimerasa amb una fidelitat de còpia baixa; és a dir, que produeix errors en la seqüència de bases del gen en qüestió quan en fa les rèpliques corresponents. El nombre de mutacions depèn dels cicles de PCR que es realitzen, entre altres variables del sistema de reacció, sobre les quals es pot actuar (ions, pH, etc.).

Ambdues tècniques són molt potents i generen una gran diversitat, però cal disposar d'una eina de cribratge d'alt rendiment (*high-throughput screening*, HTS), que sigui molt efectiva i ràpida, a causa del gran nombre de variants de l'enzim homòlegs que cal assajar. Es tracta d'una de les limitacions que presenta l'evolució dirigida. Així, s'ha de cercar una reacció similar a la d'interès però en què l'anàlisi sigui senzilla i ràpida, típicament, per mitjà de tècniques espectroscòpiques (absorció ultraviolada o fluorescència). Tanmateix, això no sempre és possible i es corre el risc d'haver de fer el cribratge, alternativament, d'una que sigui poc propera a la d'interès i obtenir com a resultat una activitat insatisfactòria.

Els investigadors han d'esmerçar-se a desenvolupar reaccions de cribratge eficaces (amb una sensibilitat elevada), eficients (de quantificació ràpida) i representatives de l'activitat que es vol aconseguir. D'altra banda, s'han desenvolupat metodologies de generació de mutants que produeixen menys clons i, per tant, menys variants de l'enzim que cal cribrar, de manera que es poden emprar reaccions més properes al resultat que es busca, encara que això comporti una disminució de l'eficiència de la reacció de cribratge [21].

En aquest sentit, el coneixement de l'estructura de raigs X de l'enzim i del seu mecanisme catalític, amb l'ajut de models computacionals, permet una aproximació més racional per identificar els aminoàcids de l'entorn del centre actiu, i seleccionar els que caldria substituir per aconseguir l'activitat objectiu (figura 6) [21-23].

Les dues tècniques més emprades són la mutagènesi dirigida de lloc, en què se substitueix un aminoàcid per un altre, i la mutagènesi dirigida de saturació de lloc, en què se substitueix una posició per tots (vint aminoàcids) o una selecció limitada d'aminoàcids (depenent del grau de degeneració del triplet de bases corresponent que codifica l'aminoàcid) [24]. Aquesta aproximació es pot complementar amb les tècniques aleatòries descrites amb anterioritat, un cop l'enzim hagi adquirit un cert grau de l'activitat objectiu. El nombre de variants que es poden

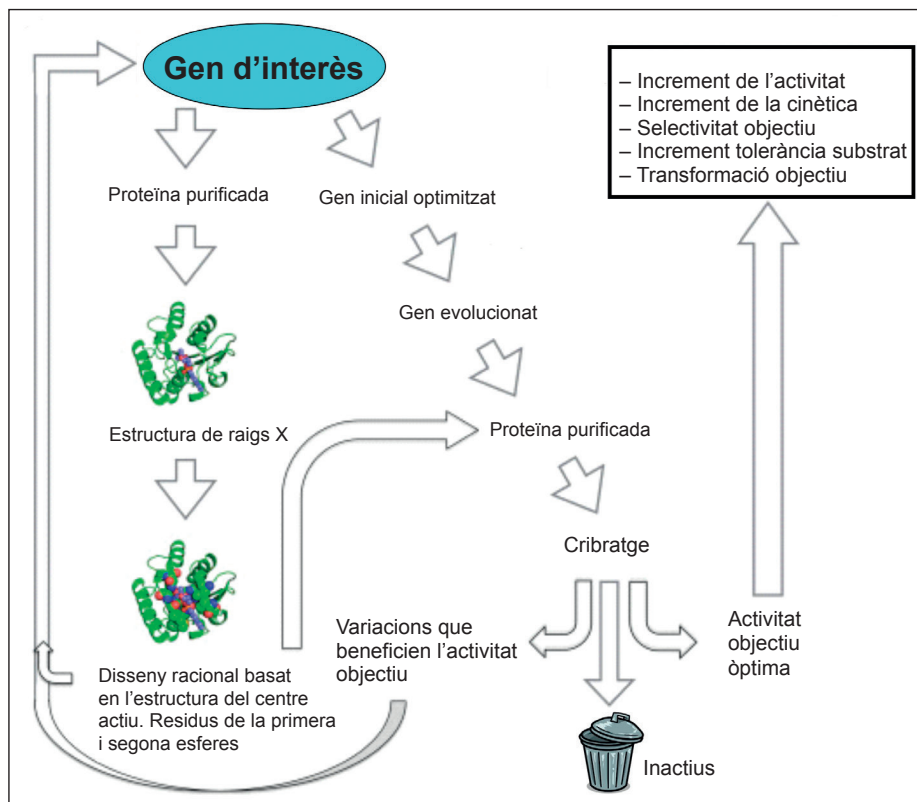


FIGURA 6. Procés per a una aproximació més racional a l'evolució dirigida d'enzims. A partir de l'estructura de raigs X de la proteïna, cal identificar els aminoàcids de la primera o segona esferes de l'entorn del centre actiu, i seleccionar-ne els que potencialment caldria substituir per aconseguir l'activitat objectiu. Elaboració pròpia.

obtenir de la substitució d'aminoàcids per d'altres que siguin més potencialment adients, dins la primera esfera del centre actiu, dependrà de quantes i de quines combinacions es programin. A manera d'exemple, si es vol substituir un sol aminoàcid pels vint possibles canònics, el nombre de variants que haurem de cribrar per estar segurs, en un 95 % de confiança, que no ens mancarà cap aminoàcid dels vint serà de 190. Si en lloc d'un aminoàcid, són tres amb totes les combinacions possibles entre ells, el nombre a cribrar s'eleva a 785312, i si són cinc, 3216643034, nombres absolutament poc factibles per a l'assaig, fins i tot amb un mètode massiu. El criteri químic ens pot guiar a l'hora de triar els aminoàcids, i així descartarem els que podem apreciar menys òptims per mitjà d'efectes electrònics o estèrics. Per exemple, si imaginem que en una posició determinada, aminoàcids de tipus neutre apolars —com l'alani-na, la isoleucina, la leucina, la metionina, la valina, la glicina o la prolina— són els més adients, aleshores les variants a cribrar per a la substitució de cinc residus (amb un 95 % de fiabilitat) amb totes les combinacions possibles seria de 3066, un nombre molt més assequible fins i tot amb un assaig menys eficient, però més representatiu de la reacció objectiu.

Com es pot deduir, és molt difícil donar unes directrius concretes, i cada cas requereix una anàlisi acurada. L'elecció del mètode dependrà de si som lluny o a prop de l'activitat objectiu. Crear una activitat completament nova en un enzim és una tasca molt difícil. L'evolució (dirigida o no) no és adequada en problemes que requereixin un nombre d'esdeveniments múltiples, simultanis i de probabilitat baixa [25-28]. Els llocs actius dels enzims estan configurats d'una manera molt precisa i, per tant, per als investigadors és difícil conèixer com es pot crear una activitat acumulant mutacions, l'una rere l'altra. Així doncs, cal buscar un enzim que comparteixi elements del seu mecanisme o maquinari, des d'on permeti construir la nova activitat objectiu [28].

En aquest aspecte, la natura també ens ajuda gràcies a l'enorme diversitat que conté [25-27]. El concepte *promiscuïtat catalítica* d'un enzim es refereix a la propietat que presenta per catalitzar tant la reacció —que hem identificat com a natural— com d'altres que impliquen diversos grups funcionals i que transcorren per diferents estats de transició o intermedis reactius (figura 7) [25, 29-31].

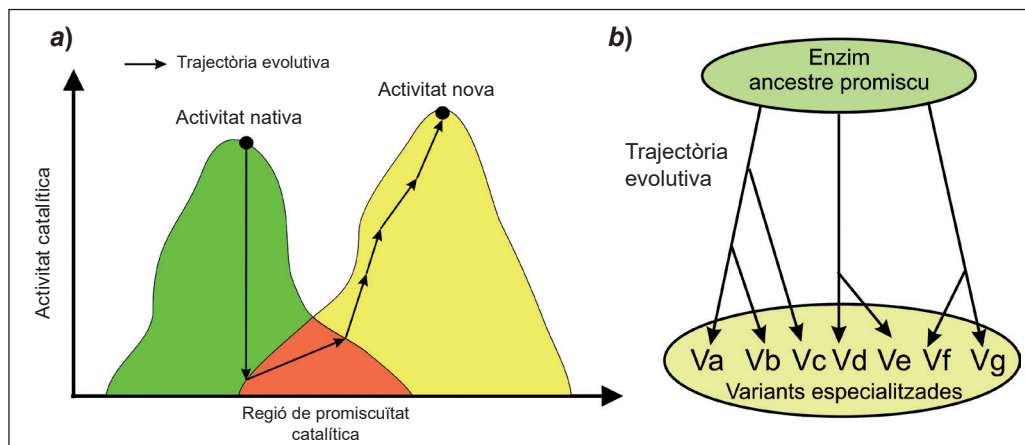


FIGURA 7. a) Relació entre l'activitat promiscua d'un enzim i l'evolució d'una activitat nova. b) Activitat divergent d'un enzim ancestre, amb un grau elevat de promiscuïtat catalítica cap a variants més especialitzades. Un enzim concret pot catalitzar més d'una reacció. Una població d'individus determinada pot contenir diverses variants d'aquest enzim, quan es produeix algun canvi de nutrients, entre d'altres, i sobreviuran els que estiguin més ben adaptats, és a dir, els que tinguin una variant de l'enzim suficientment activa per treure'n un avantatge metabòlic, reproductiu, etc. Elaboració a partir de [25].

A més, hi ha molts enzims, d'organismes diferents o fins i tot dins d'una mateixa espècie, que tenen una homologia de seqüència prou baixa i que catalitzen la mateixa reacció, evidentment, amb eficiències distintes [32-35]. En aquest sentit, diversos investigadors han proposat que els enzims primitius (suposats ancestres dels que es troben en l'actualitat), probablement, es caracteritzaven per tolerar un espectre ampli de substrats i de reaccions, i, a partir d'ells, l'evolució els anava tornejant per fer-los cada cop més específics [36, 37]. De totes maneres, els enzims que existeixen en el present, forjats al llarg de milions d'anys d'evolució, no són pas tan selectius com hom podria pensar, i una immensa quantitat d'ells poden catalitzar diferents transformacions químiques en els seus centres actius. Tant la diversitat en termes d'homologia de seqüència com la promiscuïtat catalítica dels enzims són vitals des del punt de vista evolutiu, perquè són la plataforma per a l'evolució de noves funcions per selecció natural [38, 39]. Així, es preservaran les petites mutacions que, per a una reacció metabòlica determinada, siguin beneficioses per a la supervivència, o en les quals la promiscuïtat catalítica resultant permeti dur a terme una reacció que sigui vital. Les altres no s'expressaran, en alguns casos, o, simplement, s'extingiran. Aquesta diversitat és el que ens permet triar l'enzim òptim segons la nova activitat objectiu.

Un cop identificat l'enzim adequat, el més adient és un procés conservatiu consistent a acumular poques mutacions que beneficiïn l'activitat objectiu, mitjançant cicles limitats de mutagènesi aleatòria o de saturació de lloc, amb el cribratge corresponent de les variants [28].

De fet, aquest procés també es dona a la natura; n'és un exemple molt significatiu l'atrazina (figura 8). L'atrazina (6-clo-ro- N^2, N^4 -diètil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) és un herbicida molt potent introduït a finals de la dècada dels cinquanta i trobat, inicialment, molt poc biodegradable. Des del 1993 s'observa, però, la degradació ràpida d'aquest producte en microorganismes del sòl de l'espècie *Pseudomonas* gràcies a l'atrazina-clorhidrolasa [25, 40]. Aquest enzim catalitza la hidròlisi de l'enllaç carboni-clor i transforma l'atrazina en 6-hidroxi- N^2, N^4 -diètil-1,3,5-triazina-2,4-diamina, molt menys contaminant i més biodegradable. L'atrazina-clorhidrolasa (AtzA) té un 98 % d'homologia amb la melamina-desaminasa (TriA) —tan sols nou dels 475 aminoàcids que formen l'estructura primària de la proteïna són diferents—, enzim també de *Pseudomonas* i que catalitza la hidròlisi de l'enllaç C-N de la melamina (2,4,6-triamino-1,3,5-triazina) i la transforma en la 4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-ol [40, 41]. Les estructures de l'atrazina i la melamina són molt semblants; totes dues contenen el nucli de triazina. Aquest grau d'homologia tan elevat i el fet que l'enzim s'hagi trobat en una espècie bacteriana comuna, suggereixen que l'AtzA ha evolucionat de la TriA o ambdós d'un mateix ancestre similar a la TriA, i permeten a la població de bacteris que contenen l'AtzA (o la variant de la TriA amb activitat davant l'atrazina) obtenir un avantatge superior, respecte a les altres, de sobreviure i perpetuar-se, ja que poden usar l'atrazina sintètica com a font de nitrogen.⁴²

Emprant la metodologia semiracional mitjançant models computacionals d'homologia en el centre actiu de la TriA i

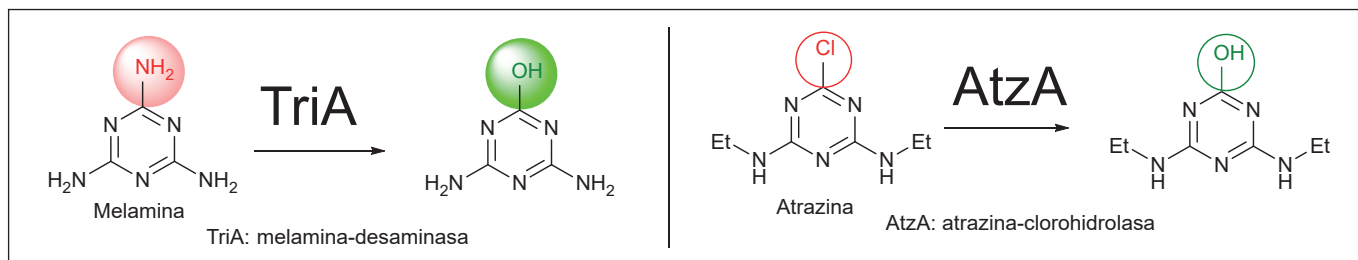


FIGURA 8. Transformacions químiques dutes a terme en la melamina i l'atrazina, catalitzades per la melamina-desaminasa i l'atrazina-clorohidrolasa, respectivament. Elaboració pròpia.

mutagènesi dirigida de saturació sobre cinc residus, i limitant el nombre d'aminoàcids substituïts, els investigadors han pogut demostrar que únicament dues mutacions són suficients per convertir la TriA en AtzA (substitució de la Cys 331 per Ser, i de l'Asp 328 per Asn, feta sobre la TriA) [43, 44]. L'enzim AtzA natiu presenta nou mutacions, respecte a la TriA, davant les dues que els investigadors han pogut esbrinar, per mitjà d'un procés més de redisseny racional, que són necessàries per convertir la TriA en AtzA. En aquest punt, ens adonem que l'evolució és tot al contrari que el disseny; és un procés en què els canvis, si són beneficiosos, es preserven i s'acumulen, durant tot el trajecte evolutiu. Aquest exemple, i d'altres reportats a la literatura [45-47] il·lustren la connexió existent entre activitats enzimàtiques distintes, i això ha permès conèixer les mutacions més importants que han estat les responsables de canviar-ne l'activitat funcional [25].

Aquest coneixement ha ajudat moltíssim els investigadors del camp a endinsar-nos en un terreny fins fa poc inexplorat, i crear biocatalitzadors (enzims) que duen a terme reaccions que no han estat encara trobades a la natura. Frances H. Arnold ha

estat pionera en aquesta disciplina científica, entre d'altres destacats investigadors, que, amb exemples rellevants, han demostrat que el concepte i aplicació pràctica de l'evolució dirigida ha permès crear famílies de biocatalitzadors noves amb activitats fins ara inèdites.

Exemples pràctics obtinguts per Frances H. Arnold [48] en destaquen la ciclopropanació d'olefines, mitjançant transferència de carbè entre l'estirè i el diazoacetat d'etil, catalitzada per metalloproteïnes obtingudes amb un programa d'evolució dirigida i mutagènesi puntual a partir de la metalloproteïna natural citocrom P450 de *Bacillus megaterium* (P450_{Bam}) o la mateixa hemoglobina (figura 9) [49, 50].

La reacció transcorre a través d'un complex de ferro hipervalent carbenoide generat al centre actiu de l'enzim i instal·lat en el grup hemo. L'evolució dirigida genera variants del citocrom P450, o hemoglobina, amb una regió i estereoselectivitat elevades [49]. Aquesta metodologia s'utilitza per a la síntesi d'un precursor quiral de ticagrelor (Brilinta®, AstraZeneca) (figura 10), que prevé l'agregació plaquetària després d'un episodi trombòtic.

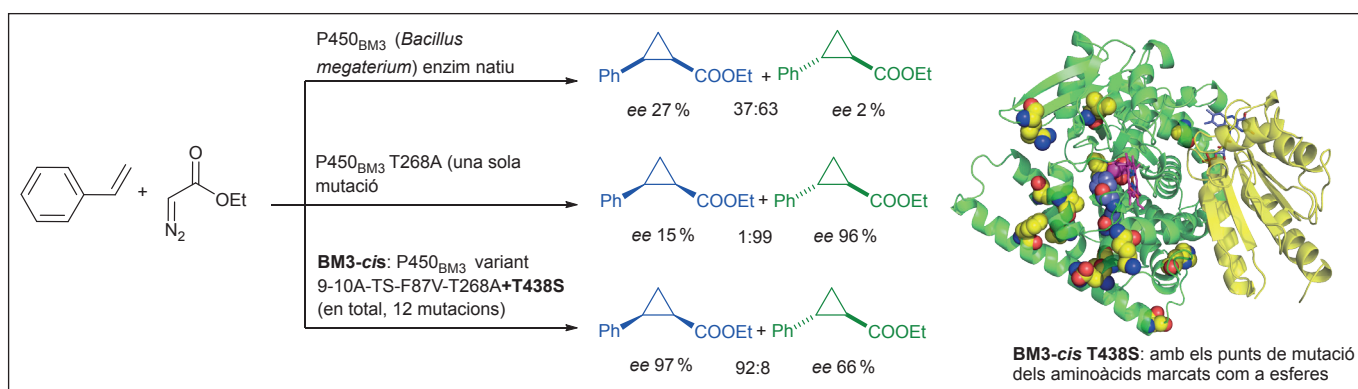


FIGURA 9. Ciclopropanació d'olefines, mitjançant transferència de carbè entre l'estirè i el diazoacetat d'etil, catalitzada per una variant (BM3-cis T438S) del citocrom P450 de *Bacillus megaterium*. S'ha utilitzat nomenclatura d'una sola lletra dels aminoàcids: A, Ala; E, Glu; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; Y, Tyr. Elaboració pròpia.

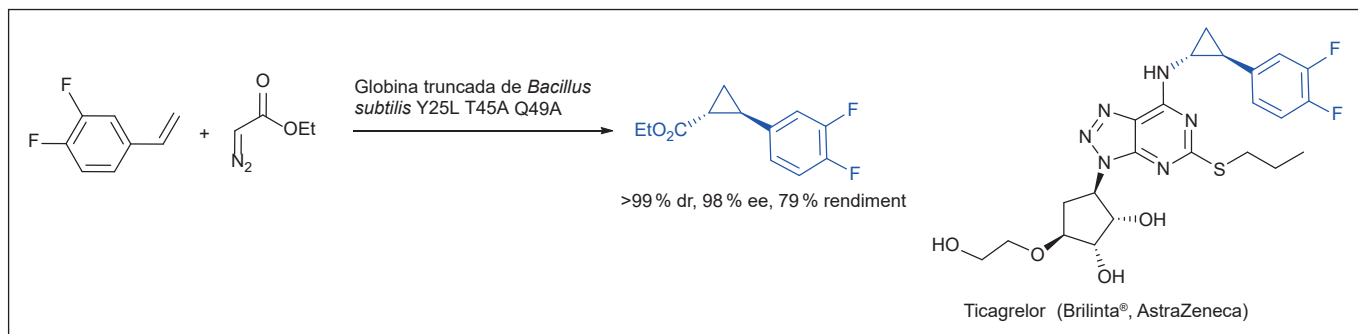


FIGURA 10. Síntesi d'un precursor quiral de ticagrelor (Brilinta®, AstraZeneca) emprant una variant de la globina truncada de *Bacillus subtilis* amb les mutacions Y25L T45A Q49A. Elaboració pròpia.

Un segon exemple fou l'evolució dirigida del citocrom c de *Rhodothermus marinus* (citocrom c_{Rhm}) per a la formació d'enllaços de carboni-silici i carboni-bor (figures 11a i 11b) [51, 52]. En aquest cas, l'objectiu de l'evolució era augmentar l'activitat i l'estereoselectivitat del citocrom c_{Rhm} mitjançant mutagènesi puntual per saturació de residus clau del centre actiu al voltant del grup prostètic hemo, i fer-lo útil per als propòsits sintètics.

Altres exemples són la utilització de variants del citocrom P450 del rodobacteri *Labrenzia aggregata* (P450_{LA1}) per a oxigenacions anti-Markovnikov (figura 12a) [53]; la síntesi de derivats i anàlegs del triptòfan mitjançant la subunitat beta de la triptòfan-sintasa (Trp β_{PyrT}) de *Pyrococcus furiosus* (figura 12b) [54-56]; la imidació de sulfurs (figura 13a) i la formació d'aziridines a partir d'olefines emprant novament variants del citocrom P450 de *Bacillus megaterium* (figura 13b) [57, 58];

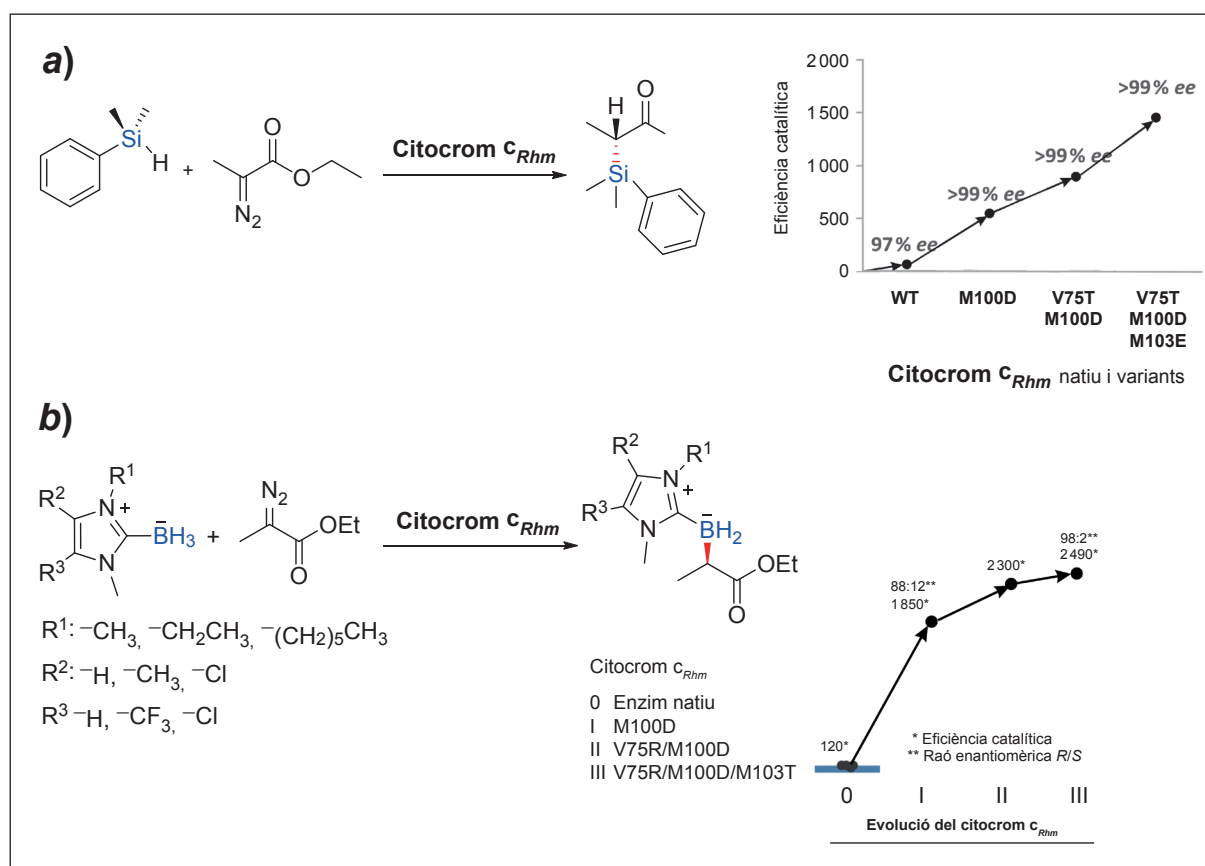


FIGURA 11. a) Evolució dirigida del citocrom c de *Rhodothermus marinus* (citocrom c_{Rhm}) per a la formació d'enllaços de carboni-silici i b) de carboni-bor. Es representa l'evolució de les diferents variants fins a arribar al punt desitjat d'activitat i enantioselectivitat. Figures modificades a partir de [51] i [52].

la síntesi d'amines quirals mitjançant aminació intermolecular d'enllaços C–H emprant transferència estereoselectiva de nitrens activats (Fe^{IV} -nitrenoide) pel grup hemo del citocrom P411 (figura 13c) [59, 60] o la nitració aromàtica directa i regioselectiva catalitzada pel citocrom P450 TxtE de *Streptomyces scabies* (P450TxtE_{Sts}) (figura 14). Aquesta variant de les proteïnes P450 combina l'òxid nítric –normalment, un inhibidor de cofactors hemo– amb oxigen molecular per generar un possible intermediari de tipus peroxinitrit fèrric que es desproporciona i forma 4-nitro-L-triptòfan [61, 62].

Finalment, l'alteració de les propietats catalítiques d'un enzim és difícil, ja que canvis petits en l'estructura i en les propietats químiques dels aminoàcids que el configuren poden tenir efectes dramàtics en la catàlisi. Predir que un canvi d'un aminoàcid o seqüència específica d'aminoàcids generarà una activitat determinada és un repte molt ambiciós que, ara per ara, no té cap resposta concreta. Com a investigadors, ens

falta informació més detallada i una comprensió precisa de tots els aspectes del mecanisme i, desafortunadament, pel que fa a la funció dels enzims, els detalls són molt importants. Les tècniques per alterar-ne la funció són variades, com ja s'ha esmentat, i sempre des de l'assaig i error. Per sort, el nombre d'èxits obtinguts avala l'interès enorme que suscita i les possibilitats il·limitades que ofereixen els biocatalitzadors per dur a terme transformacions químiques selectives amb una eficàcia elevada i que siguin acceptables i sostenibles des del punt de vista mediambiental. En aquest àmbit, els químics podem variar la manera de fer la química i canviar-ne així la percepció poc positiva que en té la societat. Parafraçant Frances H. Arnold, als químics, avui, en lloc d'investigar què fan els enzims a la natura, ens pertoca esbrinar quines reaccions són capaços de catalitzar. Les eines per optimitzar-ne l'activitat i altres propietats catalítiques hi són; les limitacions, les anirem superant tal com hem fet per arribar fins on som.

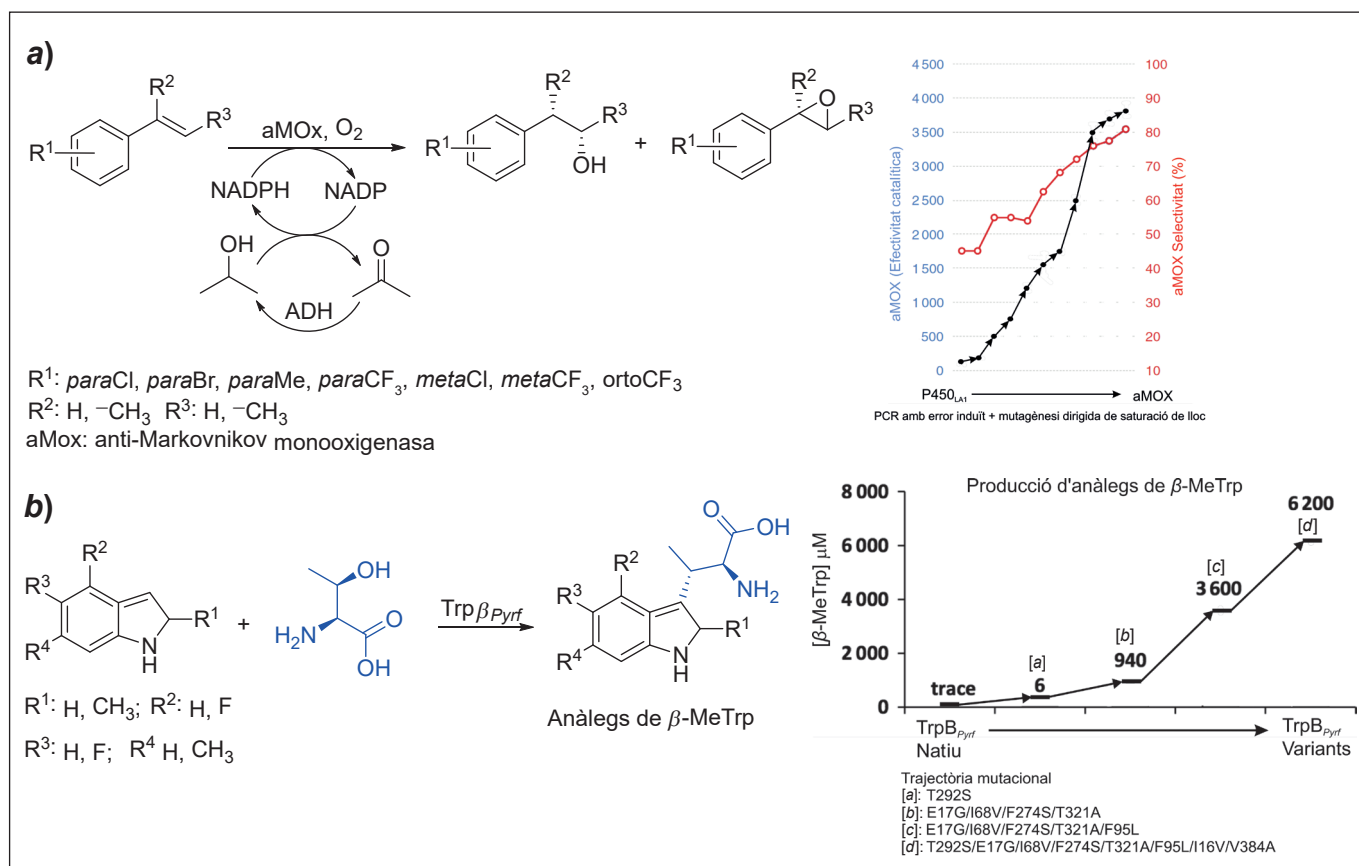


FIGURA 12. a) Utilització de variants del citocrom P450 del rodobacteri *Labrenzia aggregata* (P450LA1) per a oxigenacions anti-Markovnikov, i b) síntesi de derivats i anàlegs del triptòfan mitjançant la subunitat beta de la triptòfan-sintasa ($\text{Trp}\beta_{\text{pyrr}}$) de *Pyrococcus furiosus*. Figures modificades a partir de [53] i [54–56].

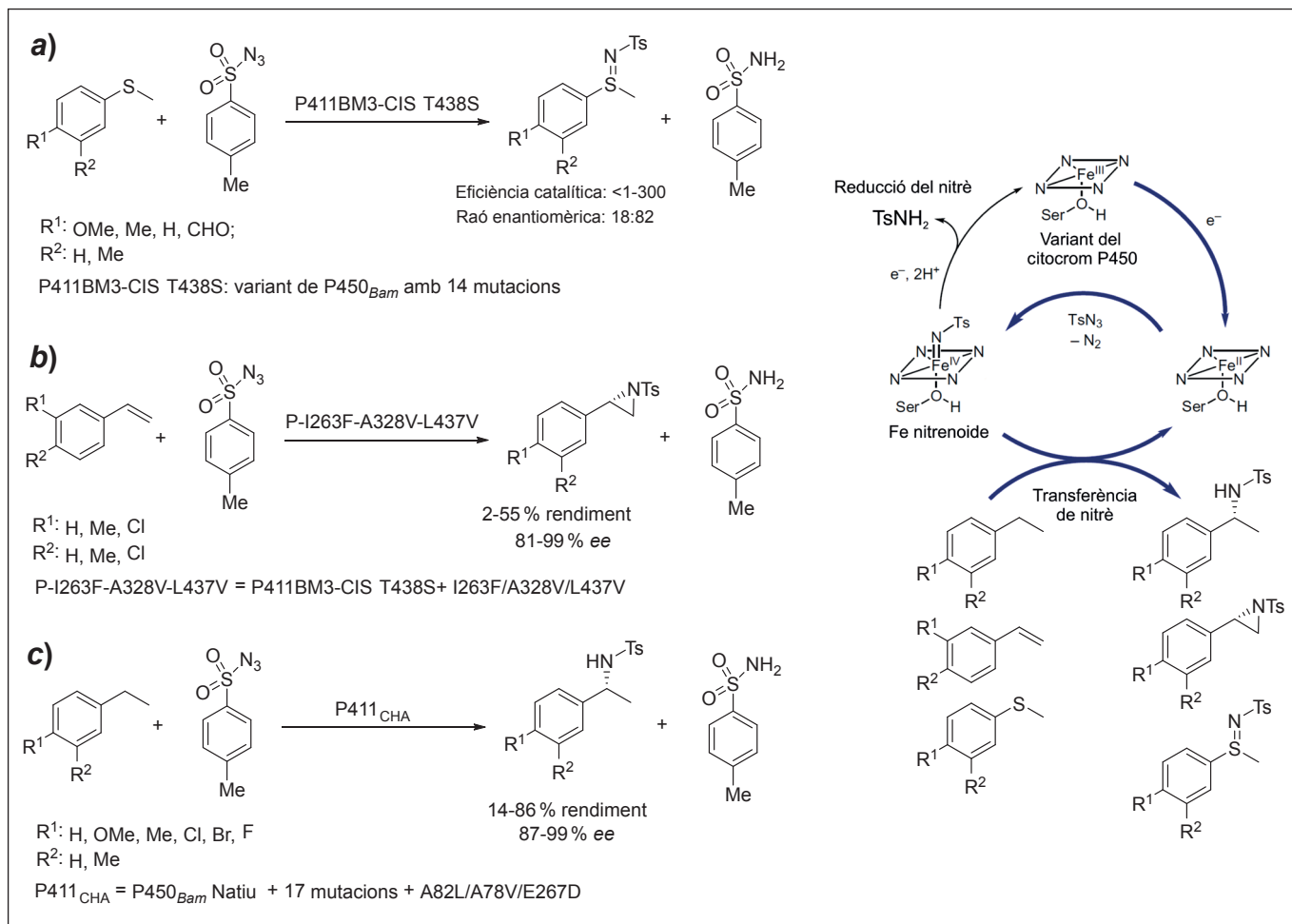


FIGURA 13. a) Imidació de sulfurs, b) formació d'aziridines a partir d'olefines emprant novament variants del citocrom P450 de *Bacillus megaterium* i c) síntesi d'amines quirals, mitjançant l'aminació intermolecular d'enllaços C-H, usant transferència estereoselectiva de nitrens activats (FeIV-nitrenoide) pel grup hemo del citocrom P411. Figures modificades a partir de [59].

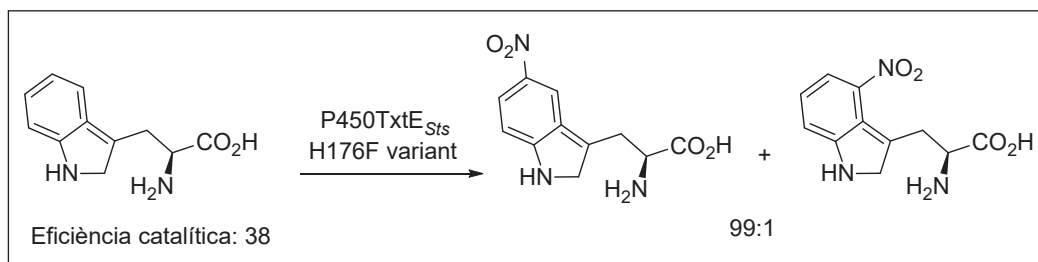


FIGURA 14. Nitració aromàtica directa i regioselectiva catalitzada pel citocrom P450 TxE de *Streptomyces scabies* (P450TxE_{S1s}). Elaboració pròpia.

Referències

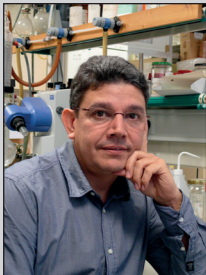
- [1] ARNOLD, F. H. «When blind is better: protein design by evolution». *Nat. Biotechnol.*, 16 (1998), p. 617-618.
- [2] ARNOLD, F. H. «Design by directed evolution». *Account. Chem. Res.*, 31 (1998), p. 125-131.
- [3] ARNOLD, F. H. «Enzyme engineering reaches the boiling

point». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (1998), p. 2035-2036.

- [4] KUCHNER, O.; ARNOLD, F. H. «Directed evolution of enzyme catalysts». *Trends Biotech.*, 15 (1997), p. 523-530.
- [5] MOORE, J. C.; ARNOLD, F. H. «Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents». *Nat. Biotechnol.*, 14 (1996), p. 458-467.

- [6] YOU, L.; ARNOLD, F. H. «Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide». *Protein Eng.*, 9 (1994), p. 77–83.
- [7] PETROUNIA, I. P.; ARNOLD, F. H. «Designed evolution of enzymatic properties». *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11 (2000), p. 325–330.
- [8] BUCHHOLZ, F.; ANGRAND, P.-O.; STEWART, A. F. «Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis». *Nat. Biotechnol.*, 16 (1998), p. 657–662.
- [9] KUMAMARU, T.; SUENAGA, H.; MITSUOKA, M.; WATANABE, T.; FURUKAWA, K. «Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase». *Nat. Biotechnol.*, 16 (1998), p. 663–666.
- [10] TAWFIK, D. S.; GRIFFITHS, A. D. «Man-made cell-like compartments for molecular evolution». *Nat. Biotechnol.*, 16 (1998), p. 652–656.
- [11] REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SCHIMOSSEK, K.; JAEGER, K.-E.; LIEBETON, K. «Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by in vitro evolution». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 36 (1997), p. 2830–2832.
- [12] TRUDEAU, D. L.; TAWFIK, D. S. «Protein engineers turned evolutionists—the quest for the optimal starting point». *Curr. Opin. Biotechnol.*, 60 (2019), p. 46–52.
- [13] FREY, R.; HAYASHI, T.; BULLER, R. M. «Directed evolution of carbon–hydrogen bond activating enzymes». *Curr. Opin. Biotechnol.*, 60 (2019), p. 29–38.
- [14] DARWIN, C. *On the origin of species*. Londres: Routledge, 2004. [1a ed. 1859]
- [15] WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. «Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid». *Nature*, 171 (1953), p. 737–738.
- [16] FRANKLIN, R. E.; GOSLING, R. G. «Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate». *Nature*, 172 (1953), p. 156–157.
- [17] JUDSON, H. F. *The eighth day of creation*. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1979. 550 p.
- [18] CRICK, F.; BARNETT, L.; BRENNER, S.; WATTS-TOBIN, R. J. «General nature of the genetic code for proteins». *Nature*, 192 (1961), p. 1227–1232.
- [19] CRICK, F. *What mad pursuit*. Nova York: Basic Books, 2008.
- [20] RABINOW, P. *Making PCR: A story of biotechnology*. Chicago: University of Chicago Press, 2011.
- [21] PACKER, M. S.; LIU, D. R. «Methods for the directed evolution of proteins». *Nat. Rev. Genet.*, 16 (2015), p. 379.
- [22] REETZ, M. T. «What are the limitations of enzymes in synthetic organic chemistry?». *Chem. Rec.*, 16 (2016), p. 2449–2459.
- [23] LI, G.; REETZ, M. T. «Learning lessons from directed evolution of stereoselective enzymes». *Org. Chem. Front.*, 3 (2016), p. 1350–1358.
- [24] REETZ, M. T.; PRASAD, S.; CARBALLEIRA, J. D.; GUMULYA, Y.; BOCOLLA, M. «Iterative saturation mutagenesis accelerates laboratory evolution of enzyme stereoselectivity: rigorous comparison with traditional methods». *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010), p. 9144–9152.
- [25] RENATA, H.; WANG, Z. J.; ARNOLD, F. H. «Expanding the enzyme universe: accessing non-natural reactions by mechanism-guided directed evolution». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54 (2015), p. 3351–3367.
- [26] TRACEWELL, C. A.; ARNOLD, F. H. «Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time». *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13 (2009), p. 3–9.
- [27] ROMERO, P. A.; ARNOLD, F. H. «Exploring protein fitness landscapes by directed evolution». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10 (2009), p. 866.
- [28] ARNOLD, F. H. «Directed evolution: bringing new chemistry to life». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57 (2018), p. 4143–4148.
- [29] O'BRIEN, P. J.; HERSCHLAG, D. «Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities». *Chem. Biol.*, 6 (1999), p. R91–R105.
- [30] JIA, B.; CHEONG, G.-W.; ZHANG, S. «Multifunctional enzymes in archaea: promiscuity and moonlight». *Extremophiles*, 17 (2013), p. 193–203.
- [31] KHERSONSKY, O.; TAWFIK, D. S. «Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective». *Annu. Rev. Biochem.*, 79 (2010), p. 471–505.
- [32] BORNESCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. «Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43 (2004), p. 6032–6040.
- [33] SEEBECK, F. P.; HILVERT, D. «Conversion of a PLP-dependent racemase into an aldolase by a single active site mutation». *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003), p. 10158–10159.
- [34] LAMBLE, H. J.; HEYER, N. I.; BULL, S. D.; HOUGH, D. W.; DANSON, M. J. «Metabolic pathway promiscuity in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* revealed by studies on glucose dehydrogenase and 2-keto-3-deoxygluconate aldolase». *J. Biol. Chem.*, 278 (2003), p. 34066–34072.
- [35] HERNÁNDEZ, K.; SZEKRENYI, A.; CLAPÉS, P. «Nucleophile promiscuity of natural and engineered aldolases». *ChemBioChem*, 19 (2018), p. 1353–1358.
- [36] MERKL, R.; STERNER, R. «Reconstruction of ancestral enzymes». *Perspectives in Science*, 9 (2016), p. 17–23.
- [37] DEVAMANI, T.; RAUWERDINK, A. M.; LUNZER, M.; JONES, B. J.; MOONEY, J. L.; TAN, M. A. O.; ZHANG, Z.-J.; XU, J.-H.; DEAN, A. M.; KAZLAUSKAS,

- R. J. «Catalytic promiscuity of ancestral esterases and hydroxynitrile lyases». *J. Am. Chem. Soc.*, 138 (2016), p. 1046–1056.
- [38] KHERSONSKY, O.; ROODVELDT, C.; TAWFIK, D. S. «Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects». *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10 (2006), p. 498–508.
- [39] NEWTON, M. S.; ARCUS, V. L.; PATRICK, W. M. «Rapid bursts and slow declines: on the possible evolutionary trajectories of enzymes». *J. R. Soc. Interface*, 12 (2015).
- [40] SEFFERNICK, J. L.; WACKETT, L. P. «Rapid evolution of bacterial catabolic enzymes: a case study with atrazine chlorohydrolase». *Biochemistry*, 40 (2001), p. 12747–12753.
- [41] SEFFERNICK, J. L.; SOUZA, M. L. de; SADOWSKY, M. J.; WACKETT, L. P. «Melamine deaminase and atrazine chlorohydrolase: 98 percent identical but functionally different». *J. Bacteriol.*, 183 (2001), p. 2405.
- [42] UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N.; SCOTT, C.; MARTIN-LAURENT, F. «Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment». *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96 (2012), p. 1175–1189.
- [43] SCOTT, C.; JACKSON, C. J.; COPPIN, C. W.; MOURANT, R. G.; HILTON, M. E.; SUTHERLAND, T. D.; RUSSELL, R. J.; OAKESHOTT, J. G. «Catalytic improvement and evolution of atrazine chlorohydrolase». *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (2009), p. 2184.
- [44] NOOR, S.; TAYLOR, M. C.; RUSSELL, R. J.; JERMIIN, L. S.; JACKSON, C. J.; OAKESHOTT, J. G.; SCOTT, C. «Intramolecular epistasis and the evolution of a new enzymatic function». *PLOS ONE*, 7 (2012), p. e39822.
- [45] SEIBERT, C. M.; RAUSHEL, F. M. «Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily». *Biochemistry*, 44 (2005), p. 6383–6391.
- [46] AFRIAT-JURNOU, L.; JACKSON, C. J.; TAWFIK, D. S. «Reconstructing a missing link in the evolution of a recently diverged phosphotriesterase by active-site loop remodeling». *Biochemistry*, 51 (2012), p. 6047–6055.
- [47] MEIER, M. M.; RAJENDRAN, C.; MALISI, C.; FOX, N. G.; XU, C.; SCHLEE, S.; BARONDEAU, D. P.; HÖCKER, B.; STERNER, R.; RAUSHEL, F. M. «Molecular engineering of organophosphate hydrolysis activity from a weak promiscuous lactonase template». *J. Am. Chem. Soc.*, 135 (2013), p. 11670–11677.
- [48] HAMMER, S. C.; KNIGHT, A. M.; ARNOLD, F. H. «Design and evolution of enzymes for non-natural chemistry». *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, 7 (2017), p. 23–30.
- [49] COELHO, P. S.; BRUSTAD, E. M.; KANNAN, A.; ARNOLD, F. H. «Olefin cyclopropanation via carbene transfer catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes». *Science*, 339 (2013), p. 307–310.
- [50] BRANDENBERG, O. F.; FASAN, R.; ARNOLD, F. H. «Exploiting and engineering hemoproteins for abiological carbene and nitrene transfer reactions». *Curr. Opin. Biotechnol.*, 47 (2017), p. 102–111.
- [51] KAN, S. B. J.; LEWIS, R. D.; CHEN, K.; ARNOLD, F. H. «Directed evolution of cytochrome c for carbon–silicon bond formation: bringing silicon to life». *Science*, 354 (2016), p. 1048.
- [52] KAN, S. B. J.; HUANG, X.; GUMULYA, Y.; CHEN, K.; ARNOLD, F. H. «Genetically programmed chiral organoborane synthesis». *Nature*, 552 (2017), p. 132.
- [53] HAMMER, S. C.; KUBIK, G.; WATKINS, E.; HUANG, S.; MINGES, H.; ARNOLD, F. H. «Anti-Markovnikov alkene oxidation by metal-oxo-mediated enzyme catalysis». *Science*, 358 (2017), p. 215.
- [54] BULLER, A. R.; BRINKMANN-CHEN, S.; ROMNEY, D. K.; HERGER, M.; MURCIANO-CALLES, J.; ARNOLD, F. H. «Directed evolution of the tryptophan synthase β -subunit for stand-alone function recapitulates allosteric activation». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112 (2015), p. 14599.
- [55] ROMNEY, D. K.; MURCIANO-CALLES, J.; WEHRMÜLLER, J. E.; ARNOLD, F. H. «Unlocking reactivity of Trp β : a general biocatalytic platform for synthesis of tryptophan analogues». *J. Am. Chem. Soc.*, 139 (2017), p. 10769–10776.
- [56] HERGER, M.; VAN ROYE, P.; ROMNEY, D. K.; BRINKMANN-CHEN, S.; BULLER, A. R.; ARNOLD, F. H. «Synthesis of β -branched tryptophan analogues using an engineered subunit of tryptophan synthase». *J. Am. Chem. Soc.*, 138 (2016), p. 8388–8391.
- [57] FARWELL, C. C.; MCINTOSH, J. A.; HYSTER, T. K.; WANG, Z. J.; ARNOLD, F. H. «Enantioselective imidation of sulfides via enzyme-catalyzed intermolecular nitrogen-atom transfer». *J. Am. Chem. Soc.*, 136 (2014), p. 8766–8771.
- [58] FARWELL, C. C.; ZHANG, R. K.; MCINTOSH, J. A.; HYSTER, T. K.; ARNOLD, F. H. «Enantioselective enzyme-catalyzed aziridination enabled by active-site evolution of a cytochrome P450». *ACS Cent. Sci.*, 1 (2015), p. 89–93.
- [59] PRIER, C. K.; ZHANG, R. K.; BULLER, A. R.; BRINKMANN-CHEN, S.; ARNOLD, F. H. «Enantioselective, intermolecular benzylic C–H amination catalysed by an engineered iron-haem enzyme». *Nat. Chem.*, 9 (2017), p. 629.
- [60] PRIER, C. K.; HYSTER, T. K.; FARWELL, C. C.; HUANG, A.; ARNOLD, F. H. «Asymmetric enzymatic synthesis of allylic amines: a sigmatropic rearrangement strategy». *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55 (2016), p. 4711–4715.
- [61] DODANI, S. C.; CAHN, J. K. B.; HEINISCH, T.; BRINKMANN-CHEN, S.; MCINTOSH, J. A.; ARNOLD, F. H. «Structural, functional, and spectroscopic characterization of the substrate scope of the novel nitrating cytochrome P450 TxtE». *ChemBioChem*, 15 (2014), p. 2259–2267.
- [62] DODANI, S. C.; KISS, G.; CAHN, J. K. B.; SU, Y.; PANDE, V. S.; ARNOLD, F. H. «Discovery of a regioselectivity switch in nitrating P450s guided by molecular dynamics simulations and Markov models». *Nat. Chem.*, 8 (2016), p. 419.



P. Clapés

Pere Clapés és llicenciat en química per la Universitat de Barcelona i doctor en química per la mateixa universitat (1988). Després d'una etapa postdoctoral al Center for Chemistry and Chemical Engineering a la Universitat de Lund (Suècia), el 1993 comença la carrera científica independent a l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), on actualment és professor d'investigació. Ha publicat més de cent cinquanta articles d'investigació, incloent-hi patents en el camp de la biocatàlisi. La seva línia de recerca s'emmarca dins la investigació de carbolligases per a la formació asimètrica d'enllaços carboni-carboni, la descoberta de biocatalitzadors nous i llur optimització mitjançant tècniques d'enginyeria de proteïnes.