

Disseny de metal·lopèptids: la combinació de computació i experiments per arribar a la racionalització

Metallopeptide design: Combining computing and experiments for rationalization

Laura Martínez-Castro,^{1,2} Soraya Learte-Aymami,² Miriam Condeminas,^{3,4} Pau Martín-Malparida,³ Carmen González-González,² Sandra Baúlde,² José R. Couceiro,² María J. Macías,^{3,5} José L. Mascareñas,² M. Eugenio Vázquez² i Jean-Didier Maréchal¹

¹ Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Departament de Química. Grup de recerca Insilichem

² Universitat de Santiago de Compostel·la. Departament de Química Orgànica. Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CiQUS)

³ Barcelona Institute of Science and Technology (BIST). Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona)

⁴ Universitat Pompeu Fabra (UPF). Departament de Medicina i Ciències de la Vida (MELIS)

⁵ Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA)

Resum: Els metal·lopèptids són seqüències d'aminoàcids curtes combinades amb un centre metàl·lic de forma que reuneixen les capacitats catalítiques de l'ió amb la selectivitat i la compatibilitat biològica de la biomolècula. Tot i que s'han aplicat en camps com la biomedicina, encara presenten alguns reptes en relació amb el seu ús, com ara l'assoliment d'un disseny racional o la millora de l'estabilitat en el medi cel·lular. Aquest treball descriu un protocol computacional integral combinat amb la síntesi i la caracterització experimental per aconseguir el disseny d'un sistema catalític que uneixi la versatilitat del Pd(II) com a centre metàl·lic amb l'estabilitat del domini WW.

Paraules clau: Metal·lopèptid, disseny racional, química computacional, síntesi en fase sòlida de pèptids (SPPS).

Abstract: Metallopeptides are short amino acid sequences with a metallic center, combining the catalytic capacity of the ion with the selectivity and biological compatibility of the biomolecule. Although they have been applied in such fields as biomedicine, their use still poses some challenges, e.g. achieving their rational design or the improvement of their stability in the cellular medium. This article presents an integrative computational protocol combined with synthesis and experimental characterization to design a catalytic system joining the versatility of the Pd(II) metal ion with the stability of the WW domain as biological scaffold.

Keywords: Metallopeptide, rational design, computational chemistry, solid-phase peptide synthesis (SPPS).

Introducció

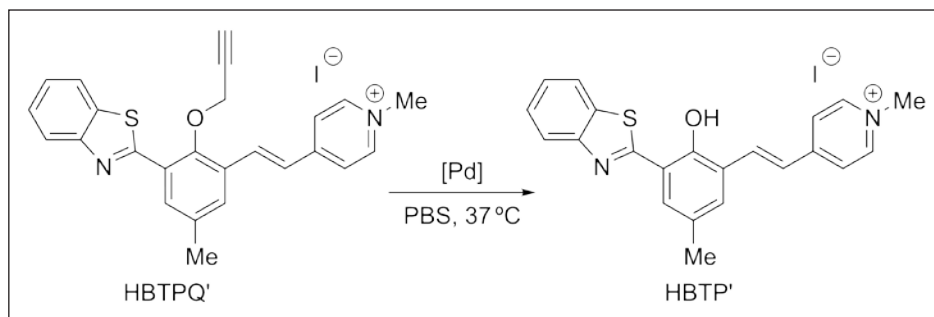
Els metal·lopèptids són biomolècules que combinen la reactivitat d'un ió metàl·lic amb l'estructura d'una seqüència curta d'aminoàcids i obtenen així la capacitat de catalitzar reaccions químiques en condicions biològiques [1, 2]. D'aquesta manera, es pot aconseguir una funcionalitat semblant a la dels enzims, però en sistemes més senzills, controlables i modificables, ja que les reaccions accessibles són molt variades depenent del metall. Concretament, els metalls de transició generen molt d'interès, sobretot el pal·ladi, per la seva aplicabilitat en la síntesi

orgànica [3, 4]. En conseqüència, aquests sistemes poden ser molt interessants en camps com la biomedicina o la indústria química, tot i que encara hi ha reptes per solucionar a l'hora de fer-los servir a l'interior de la cèl·lula [5, 6].

Un dels problemes que cal resoldre té a veure amb la bioortogonalitat, que és la capacitat de dur a terme reaccions químiques en un entorn biològic sense interferir amb altres transformacions que puguin tenir lloc a la vegada, i que s'ha de poder garantir [7, 8]. Adicionalment, la gran quantitat d'espècies químiques presents a la cèl·lula també pot interferir amb la reactivitat del nostre sistema i inactivar-lo [9, 10].

Per això, entre els aspectes de desenvolupament més recents trobem el disseny racional d'aquests metal·lopèptids, amb l'objectiu d'optimitzar-ne la selectivitat i l'activitat. En aquest sentit, és important entendre també quins factors són clau en relació amb el comportament d'un sistema determinat en un

Correspondència: Jean-Didier Maréchal
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Departament de Química. Grup de recerca Insilichem
Edifici C. Facultat de Ciències. 08193 Cerdanyola del Vallès
Tel.: + 34 935 814 936
A/e: jeandidier.marechal@uab.cat



ESQUEMA 1. Reacció de despropargilació de la sonda fluorogènica HBTP', catalitzada per complexos de Pd(II). Imatge reproduïda de S. LEARTE-AYMAMI *et al.*, «De novo engineering of Pd-metalloproteins and their use as intracellular catalysts», *JACS Au*, 4 (7) (2024), sota una llicència Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

entorn concret. Una de les eines que ens permet accedir a aquest tipus d'informació és la modelització molecular mitjançant computació. Depenent del nivell teòric emprat, podem simular i entendre els sistemes des de perspectives centrades en la reactivitat o en l'estructura, i així dirigir i/o simplificar experiments o interpretar resultats [11, 12].

En aquest treball s'ha partit d'investigacions recents del grup de M. Eugenio Vázquez i José L. Mascareñas [13], mitjançant les quals han trobat un metal·lopèptid el·líptic mantingut per la unió d'un ió de pal·ladi a dos residus d'histidina que pot catalitzar una reacció de despropargilació d'una sonda fluorogènica en cèl·lules (esquema 1). Malauradament, aquest experiment no és factible si la incubació del metal·lopèptid és prèvia a la de la sonda, la qual cosa possiblement indica la inactivació del catalitzador en el medi cel·lular. Busquem poder aplicar el disseny racional guiat per computació per trobar un sistema més estable i que ens permeti accedir a aquesta

transformació dins d'un entorn biològic com és la cèl·lula (figura 1).

La nova infraestructura biològica seleccionada per a aquest treball ha estat el domini WW, una seqüència de trenta-tres aminoàcids amb una configuració coneguda molt estable de triple cadena β que apareix en moltes proteïnes de forma natural [14, 15]. Aquest pèptid curt, compacte i estable és un model ben conegut en estudis d'enginyeria proteica; a més, presenta una cara còncava d'interès en què el centre catalític pot tenir un ambient més controlat i protegit un cop entri a la cèl·lula.

Resultats

Disseny i predicció

Per al disseny del metal·lopèptid basat en el domini WW, es va partir d'una seqüència prototípica desenvolupada pel grup de Maria J. Macias (PDB 1E0M) [16] a la qual es van afegir una sèrie de canvis per tal de fer-la més accessible sintèticament. Així, es va obtenir el pèptid de referència, anomenat WWO, sense cap mena de residu que pogués interaccionar amb metalls (figura 2a).

Per definir els mutants amb les histidines coordinants, es va dur a terme un estudi amb el programa BioMetAll [17]. BioMetAll és una eina desenvolupada pel grup de Jean-Didier Maréchal que prediu llocs d'unió de metalls en pèptids i en proteïnes, basada únicament en elements estructurals, a diferència del que succeeix en programes més comuns, que parteixen de la seqüència. Entre d'altres funcionalitats, permet

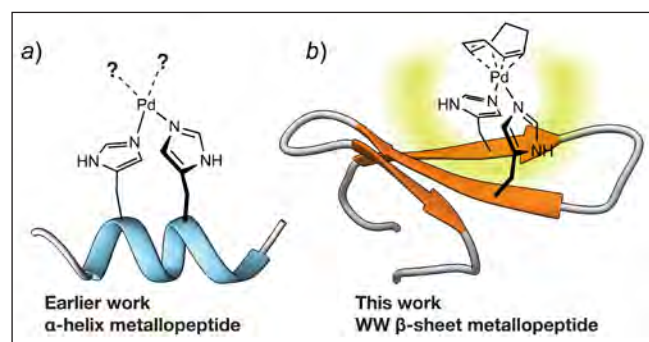


FIGURA 1. Context del treball: metal·lopèptids amb residus d'histidina per coordinació de pal·ladi en treballs anteriors (a) i en aquest treball (b). Imatges reproduïdes de S. LEARTE-AYMAMI *et al.*, «De novo engineering of Pd-metalloproteins and their use as intracellular catalysts», *JACS Au*, 4 (7) (2024), sota una llicència Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

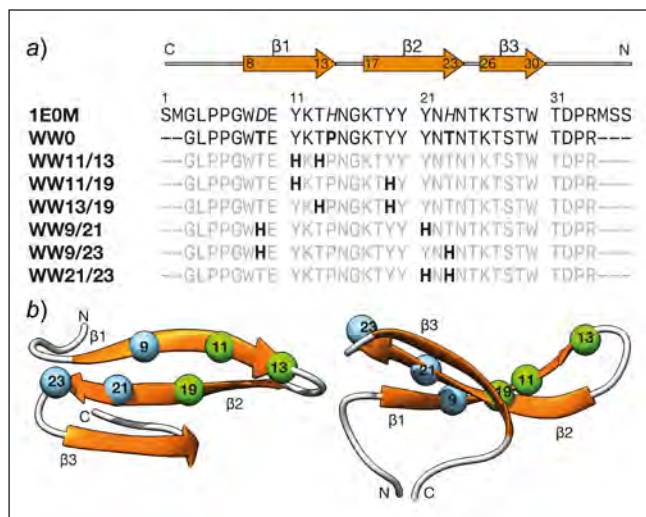


FIGURA 2. a) Seqüències del WW, amb el peptid de partida 1EOM i els mutants dissenyats. Les histidines (His) coordinants estan representades en negreta. Els noms dels peptidus s'han triat segons la posició de les His mutades. b) Vista superior (a l'esquerra) i lateral (a la dreta) del peptid de partida 1EOM, amb les posicions d'introducció de les His assenyalades. Les millors, segons BioMetAll, són les indicades en verd. La numeració correspon a l'estructura del PDB 1EOM. Imatges reproduïdes de S. LEARTE-AYMAMI *et al.*, «De novo engineering of Pd-metalloproteins and their use as intracellular catalysts», *JACS Au*, 4 (7) (2024), sota una llicència Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

identificar quines posicions en l'estructura poden ser òptimes per mutar-les a residus coordinants d'interès.

En aquest cas, es van comparar les millors posicions de mutació per a un total de dotze estructures de WW diferents; s'hi inclogueren quatre estructures del PDB (1EOM, 1EON, 1EOL i 1ZR7) i captures dels dos clústers més representatius d'una dinàmica molecular (MD, de *molecular dynamics*) curta dels sistemes 1EOM, 1EON, 1ZR7 i del peptid de referència, WWO.

El programa identifica diverses posicions en una àrea propera al gir entre la primera i la segona fibra β , així com alguns residus a la part central del peptid. Per tal de provar la validesa del programa, se seleccionen tres mutants amb combinacions d'histidines en posicions trobades per BioMetAll i tres amb combinacions en el costat contrari, de manera que en total s'obtenen sis mutants a part del peptid de referència, WWO (figura 2).

Es van modelitzar els mutants nous i, un altre cop amb BioMetAll, es van avaluar els nous llocs de coordinació creats. Es van trobar dues àrees principals de coordinació per a algunes

seqüències, una amb les histidines introduïdes i una altra amb diferents residus no desitjats, fet que ens va permetre filtrar mutants que podrien ser menys efectius. Així, els millors candidats són les seqüències WW13/19 i WW21/23.

Per comprovar la viabilitat d'aquests mutants, es va preparar una MD clàssica per a cadascun a fi de relaxar les seqüències noves, després d'un estudi d'acoblament, coordinant l'ió de Pd(II) a diferents fotogrames trets de les dinàmiques per tal de garantir que la coordinació fos possible [18, 19, 20].

Síntesi, coordinació i catàlisi

La síntesi dels peptidus segueix el protocol estàndard de síntesi en fase sòlida (SPPS, de *solid-phase peptide synthesis*) assistida per microones amb l'estratègia Fmoc/tBu [21, 22]. Després es purifiquen amb cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC, de *high-resolution liquid chromatography*) de fase inversa i es confirma la seva identitat per HPLC acoblada amb espectrometria de masses amb ionització per electroesprai (HPLC-MS(ESI)).

La coordinació amb el metall es realitza amb el complex Pd(COD)Cl₂ en aigua amb una relació 1:1 durant una hora i s'analitzen els resultats amb HPLC-MS(ESI).

El peptid de referència, WWO, no va mostrar cap senyal nou que indiqués formació d'un complex amb Pd, però la resta de mutants amb dues His sí. El peptid de control amb una sola His (WW19) tampoc no es va coordinar amb el metall, la qual cosa indicava la necessitat de coordinació bidentada.

Per avaluar l'activitat catalítica dels metal·lopeptidus *in vitro*, es van preparar un altre cop els metal·lopeptidus i es van incubar amb la sonda propargilada, que té una emissió de fluorescència molt baixa, durant vint-i-quatre hores de reacció a 37 °C. La quantificació del producte despropargilat —i ara sí, fluorescent— per HPLC-MS(ESI) va indicar que els mutants WW13/19 i WW21/23 són els que tenen més activitat catalítica, dada que coincideix amb les prediccions computacionals (figura 3). Atès que, dels dos, el WW13/19 mostrava una activitat lleugerament superior i una estructura més interessant, ja que tenia les mutacions en fibres diferents, es van continuar els experiments amb aquest mutant exclusiva-

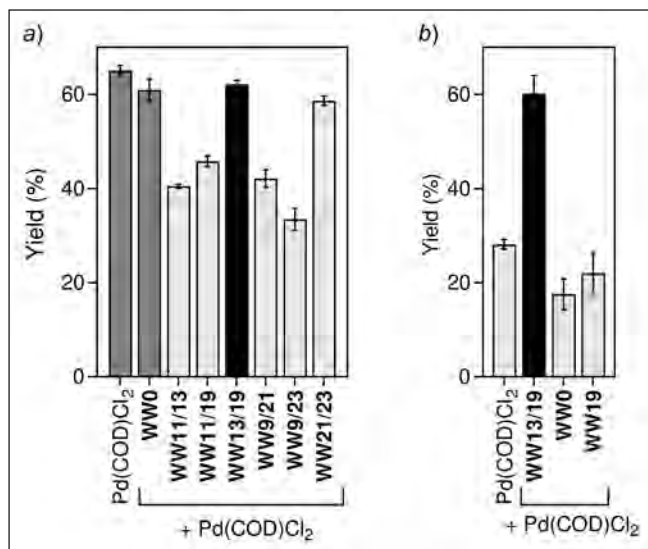


FIGURA 3. Catàlisi *in vitro* dels pèptids WW. a) Incubació durant 1 h de 200 μM de sonda amb solucions 20 μM de cada pèptid, amb Pd(COD)Cl₂ 1:1. En gris fosc, els controls amb Pd(COD)Cl₂ i amb el pèptid de referència, WW0. b) Es mostra el mateix experiment, però centrifugat amb filtres Amicon de 3 kDa per eliminar l'excés de Pd(COD)Cl₂ lliure. Imatges reproduïdes de S. LEARTE-AYMAMÍ *et al.*, «De novo engineering of Pd-metalloproteins and their use as intracellular catalysts», *JACS Au*, 4 (7) (2024), sota una llicència Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Internalització i activitat catalítica a la cèl·lula

Per a l'estudi d'internalització a la cèl·lula dels sistemes, es va sintetitzar el pèptid WW13/19 etiquetat amb tetrametilrodamina (TMR), un marcador estàndard en el seguiment per microscòpia fluorescent [23]. Els experiments es van fer en cèl·lules HeLa, incubant durant 1 h tant el pèptid com el metal·lopectid. Observant les cèl·lules incubades amb microscòpia i després quantificant la internalització per citometria cel·lular, es va comprovar la presència dels dos sistemes a dins la cèl·lula. A més, el WW13/19[Pd(II)] va mostrar una millor integració que el pèptid sense metall (figura 4a).

Un cop al medi intracel·lular, es va comprovar la capacitat catalítica del pal·ladopèptid incubant cèl·lules HeLa primerament amb la sonda protegida i després amb WW13/19[Pd(II)]. Aquest experiment es va repetir també invertint l'ordre d'incubació. En ambdós casos, el seguiment de l'emissió de fluorescència del producte despropargilat va indicar que la catàlisi havia tingut lloc. És important mencionar que ni el WW0 ni el control amb una sola His WW19 no van mostrar cap formació de sonda despropargilada al medi cel·lular. D'altra banda, es va poder calcular que el nombre de recanvi (TON, de

turnover number) del sistema és 9, la qual cosa confirma l'activitat amb diversos cicles catalítics del pal·ladopèptid (figura 4b i 4c) [24, 25].

Anàlisi estructural

Per tal de caracteritzar l'estructura exacta del metal·lopectid es van dur a terme experiments i càlculs diversos.

Primerament, es van realitzar estudis de dicromisme circular (CD, de *circular dichroism*) de tots els pèptids sense pal·ladi i amb pal·ladi per identificar canvis en l'estructura després de la coordinació del metall. Per altra banda, es van portar a terme estudis de ressonància magnètica nuclear (NMR, de *nuclear magnetic resonance*) de protó dels pèptids WW0 i WW13/19 sense metall i amb metall a fi de caracteritzar la coordinació i identificar l'estructura corresponent.

L'experiment de CD per al WW0 va mostrar senyals característics del plegament de tipus triple filament β [26], així com per a la resta de mutants sense coordinar, però en alguns casos va haver-hi modificacions en l'espectre del pal·ladopèptid, la qual cosa suggereix que el plegament inicial no era complet o estable sense l'ió metàl·lic.

Els espectres de NMR de WW0 van mostrar bona dispersió dels pics. Això indicava una estructura estable amb un plegament definit, que es va mantenir en afegir-hi el Pd(COD)Cl₂ sense produir cap canvi, fet que mostrava que no hi ha coordinació amb el pèptid de referència. Pel que fa al WW13/19, no va presentar gaire dispersió dels pics, la qual cosa indicava que és un pèptid sense estructura definida, si bé amb el complex de pal·ladi es va recuperar la dispersió, fet que implica que el plegament és dependent del metall (figura 5).

Per entendre la coordinació exacta del metall amb les histidines, es van realitzar optimitzacions DFT [27] de les diverses possibilitats segons quin N de la histidina estigués interaccionant amb el pal·ladi i es va trobar una diferència energètica inferior a 2 kcal entre les alternatives (figura 6b). Això indica que les geometries podrien variar sense gaire cost energètic.

Es va efectuar un estudi amb dinàmiques moleculars accelerades (GaMD, de *Gaussian accelerated molecular dynamics*)

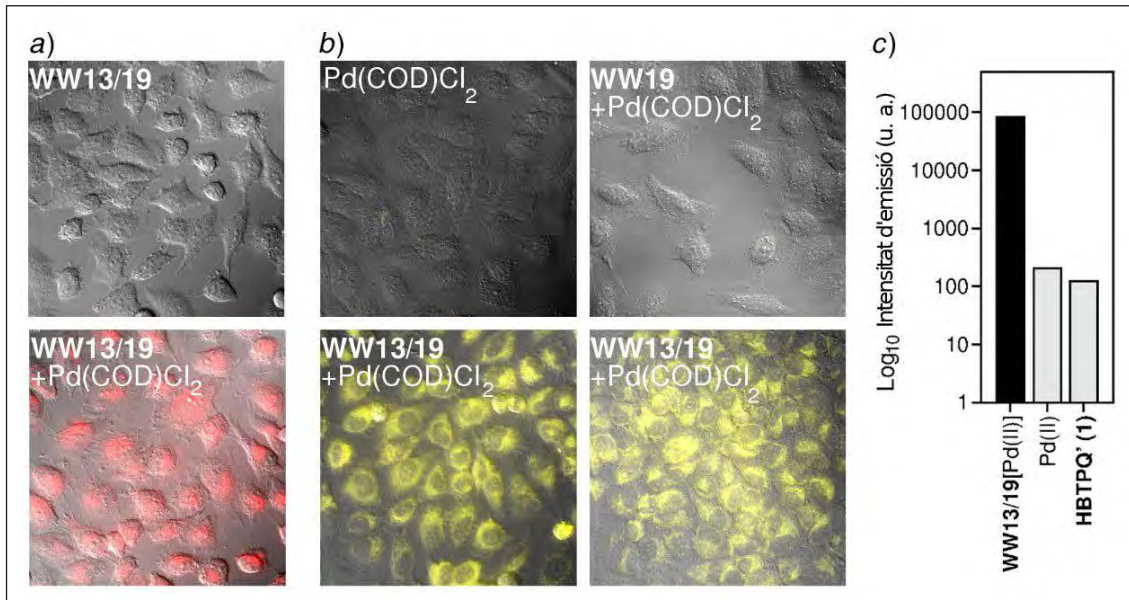


FIGURA 4. Internalització i catàlisi *in cellula*. a) Microscòpia fluorescent de cèl·lules HeLa amb solucions 5 μM dels pèptids WW13/19 (a dalt) i WW13/19[Pd(II)] (a baix). b) Microscòpia fluorescent de cèl·lules HeLa incubades amb 50 μM de sonda durant 30 min i rentades amb PBS, incubades durant 1 h amb: Pd(COD)Cl₂ (part superior esquerra), tots dos Pd(COD)Cl₂ amb el pèptid de control WW19 (part superior dreta) i WW13/19[Pd(II)] (part inferior esquerra); a la part inferior dreta, l'experiment s'ha realitzat inversament, incubant les cèl·lules primer amb WW13/19[Pd(II)] i després amb la sonda. Per a tots els casos, intensitat d'emissió mesurada a 635 nm per irradiació a 330 nm. c) Quantificació de l'emissió intracel·lular de la sonda despropargilada. Imatges reproduïdes de S. LEARTE-AYMAMI *et al.*, «De novo engineering of Pd-metalloproteins and their use as intracellular catalysts», *JACS Au*, 4 (7) (2024), sota una llicència Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

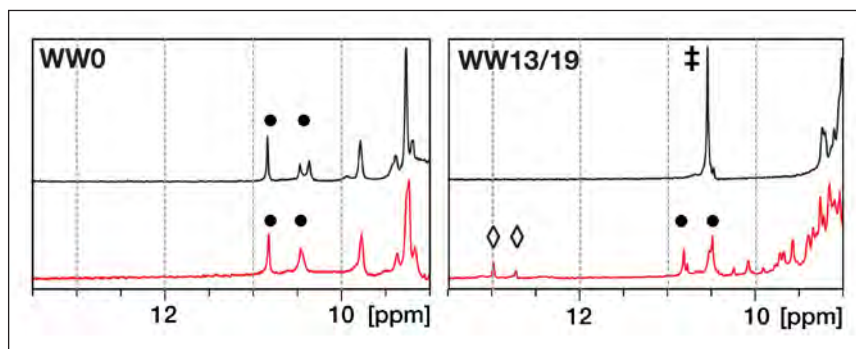


FIGURA 5. A l'esquerra, espectre ¹H NMR del pèptid de referència WW0 (negre) i el mateix després d'afegir-hi Pd(COD)Cl₂ (vermell). A la dreta, la mateixa representació per al pèptid WW13/19. Es pot veure que el pèptid WW13/19 lliure es troba gairebé sense plegament (negre) i només té una ressonància per al grup indol (assenyalat amb la creu doble). L'addició del metall (vermell) induïx el plegament típic de WW, amb dues ressonàncies corresponents als triptòfans (punts negres). A més, apareixen senyals a ~13 ppm deguts als protons H_δ dels residus d'histidina (diamants). Imatges reproduïdes de S. LEARTE-AYMAMI *et al.*, «De novo engineering of Pd-metalloproteins and their use as intracellular catalysts», *JACS Au*, 4 (7) (2024), sota una llicència Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

[28] per tal de reflectir l'exploració de l'espai conformational accessible per als sistemes, reproduint el comportament observat als espectres de NMR: el pèptid WW0 va mantenir l'estructura de triple fibra β , mentre que el WW13/19 la va perdre i, en afegir el metall en el WW13/19[Pd(II)], es va mantenir una alternança entre

la doble i triple fibra β característica també dels dominis naturals (figura 6a). Aquesta conducta de menor rigidesa estructural que presenta el pèptid sense metall podria estar relacionada amb el fet que la internalització a la cèl·lula sigui molt més favorable per al pal·ladopèptid, que té una estructura definida.

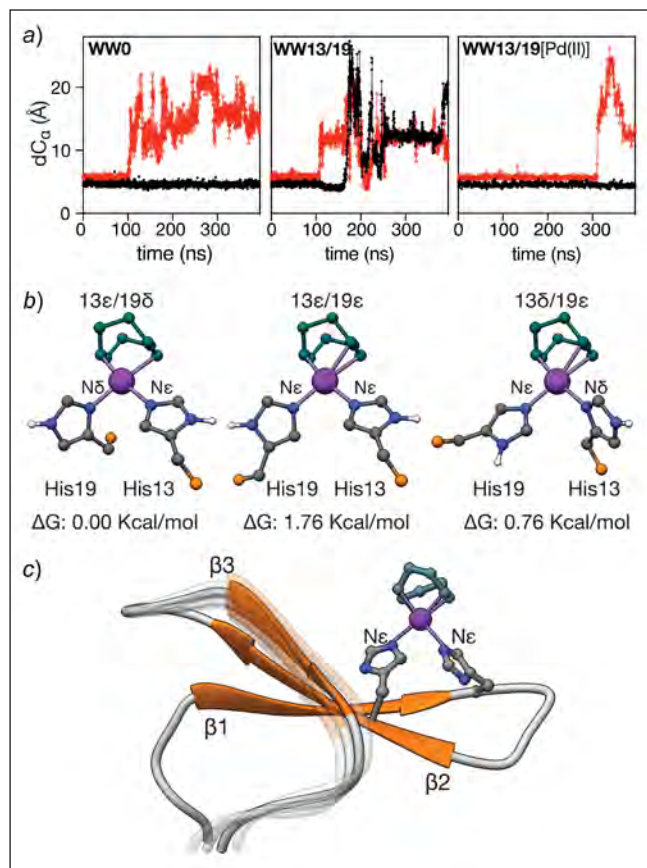


FIGURA 6. a) Evolució de la distància entre fibres β durant les trajectòries de GaMD per als sistemes WW0, WW13/19 i WW13/19[Pd(II)]. Distàncies mesurades entre el C α del residu central de cadascuna de les fibres: Glu8-Tyr18 (negre) i Tyr18-Ser26 (vermell). El WW13/19 presenta més flexibilitat i perd l'estructura al llarg de la simulació, mentre que el metal·lopeptid manté les dues primeres cadenes fixes i la tercera molt estable. b) Formes de coordinació representades amb nivell DFT i les seves energies de Gibbs relatives per al complex Pd(His)₂COD. c) Model del metal·lopeptid WW13/19[Pd(II)] resultant de la combinació d'experiments i models. Imatges reproduïdes de S. LEARTE-AYMAMI *et al.*, «De novo engineering of Pd-metalloproteins and their use as intracellular catalysts», *JACS Au*, 4 (7) (2024), sota una llicència Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Conclusions

Amb aquest treball s'ha aconseguit dissenyar un metal·lopeptid funcional per a la catàlisi de reaccions de despropargiació a dins de cèl·lules. S'ha de tenir en compte l'avantatge de la síntesi del sistema, ja que el muntatge *in vivo* de metal·loenzims procedents de proteïnes expressades pot ser molt complex. La sinergia entre experiments i estudis teòrics ha estat crucial tant en el disseny com en la caracterització del sistema, i ha permès tenir-ne un coneixement més detallat. A més, proporciona una prova de concepte per a un protocol de treball en diferents sistemes que inclouen metalls.

Referències i altres fonts

- [1] HYSTER, T. K.; WARD, T. R. «Genetic optimization of metalloenzymes: Enhancing enzymes for non-natural reactions». DOI: 10.1002/anie.201508816. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 55 (2016), p. 7344-7357.
- [2] CHOI, T. S.; TEZCAN, F. A. «Overcoming universal restrictions on metal selectivity by protein design». *Nature* (2022). DOI: 10.1038/s41586-022-04469-8.
- [3] WITTEWITZ, M.; MARKEL, U.; SCHIFFELS, J.; OKUDA, J.; SAUER, D. F.; SCHWANEBERG, U. «Engineering and emerging applications of artificial metalloenzymes with whole cells». *Nature Catalysis*, 4 (2021), p. 814-827. DOI: 10.1038/s41929-021-00673-3.
- [4] KOBAYASHI, Y.; MURATA, K.; HARADA, A.; YAMAGUCHI, H. «A palladium-catalyst stabilized in the chiral environment of a monoclonal antibody in water». *Chem. Comm.*, 56 (2020), p. 1605-1607. DOI: 10.1039/c9cc08756g.
- [5] DAVIS, H. J.; WARD, T. R. «Artificial metalloenzymes: Challenges and opportunities». *ACS Cent. Sci.*, 5 (2019), p. 1120-1136. DOI: 10.1021/acscentsci.9b00397.
- [6] LIANG, A. D.; SERRANO-PLANA, J.; PETERSON, R. L.; WARD, T. R. «Artificial metalloenzymes based on the biotin-streptavidin technology: Enzymatic cascades and directed evolution». *Acc. Chem. Res.*, 52 (2019), p. 585-595. DOI: 10.1021/acs.accounts.8b00618.
- [7] SEOANE, A.; MASCAREÑAS, J. L. «Exporting homogeneous transition metal catalysts to biological habitats». *European J. Org. Chem.*, 32 (2022). DOI:10.1002/ejoc.202200118.
- [8] LI, Y.; FU, H. «Bioorthogonal ligations and cleavages in chemical biology». *ChemistryOpen*, 9 (2020), p. 835-853. DOI: 10.1002/ejoc.202200118.
- [9] LI, J.; YU, J.; ZHAO, J.; WANG, J.; ZHENG, S.; LIN, S.; CHEN, L.; YANG, M.; JIA, S.; ZHANG, X.; CHEN, P. R. «Palladium-triggered deprotection chemistry for protein activation in living cells». *Nat. Chem.*, 6 (2014), p. 352-361. DOI: 10.1038/nchem.1887.
- [10] MILLER, M. A.; ASKEVOLD, B.; MIKULA, H.; KOHLER, R. H.; PIROVICH, D.; WEISSELER, R. «Nano-palladium is a cellular catalyst for *in vivo* chemistry». *Nat. Comm.*, 8 (2017), p. 15906. DOI: 10.1038/ncomms15906.
- [11] ALONSO-COTCHICO, L.; RODRÍGUEZ-GUERRA, J.; LLEDÓS, A.; MARÉCHAL, J. D. «Molecular modeling for artificial metalloenzyme design and optimization». *Acc. Chem. Res.*, 53 (2020), p. 896-905. DOI: 10.1021/acs.accounts.0c00031.
- [12] CHRISTOFFEL, F.; IGARETA, N. V.; PELLIZZONI, M. M.; TIESSLER-SALA, L.; LOZHKIN, B.; SPIESS, D. C.; LLEDÓS, A.; MARÉCHAL, J. D.; PETERSON, R. L.; WARD, T. R. «Design and evolution of chimeric streptavidin

- for protein-enabled dual gold catalysis». *Nat. Cat.*, 4 (2021), p. 643–653. DOI: 10.1038/s41929-021-00651-9.
- [13] LEARTE-AYMAMÍ, S.; VIDAL, C.; GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ, A.; MASCAREÑAS, J. L. «Intracellular reactions promoted by bis(histidine) miniproteins stapled using palladium(II) complexes». *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 59 (2020), p. 9149–9154. DOI: 10.1002/anie.202002032.
- [14] JÄGER, M.; NGUYEN, H.; CRANE, J. C.; KELLY, J. W.; GRUEBELE, M. «The folding mechanism of a beta-sheet: The WW domain». *J. Mol. Biol.*, 311 (2001), p. 373–393. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4873.
- [15] RUSS, W. P.; LOWERY, D. M.; MISHRA, P.; YAFFE, M. B.; RANGANATHAN, R. «Natural-like function in artificial WW domains». *Nature*, 437 (2005), p. 579–583. DOI: 10.1038/nature03990.
- [16] MACIAS, M. J.; GERVAIS, V.; CIVERA, C.; OSCHKINAT, H. «Structural analysis of WW domains and design of a WW prototype». *Nat. Struct. Biol.*, 7 (2000), p. 375–379. DOI: 10.1038/75144.
- [17] SÁNCHEZ-APARICIO, J. E.; TIESSLER-SALA, L.; VELASCO-CARNEROS, L.; ROLDÁN-MARTÍN, L.; SCIORTINO, G.; MARÉCHAL, J. D. «BioMetAll: Identifying metal-binding sites in proteins from backbone preorganization». *J. Chem. Inf. Model.*, 61 (2021), p. 311–323. DOI: 10.1021/acs.jcim.0c00827.
- [18] CASE, D. A.; AKTULGA, H. M.; BELFON, K.; BEN-SHALOM, I. Y.; BERRYMAN, J. T.; BROZELL, S. R.; CERUTTI, D. S.; CHEATHAM, T. E.; CISNEROS, G. A.; CRUZEIRO, V. W. D.; DARDEN, T. A.; FOROUZESH, N.; GHAZIMIRSAEED, M.; GIAMBAŞU, G.; GIESE, T.; GILSON, M. K.; GOHLKE, H.; GOETZ, A. W.; HARRIS, J.; HUANG, Z.; IZADI, S.; IZMAILOV, S. A.; KASAVAJHALA, K.; KAYMAK, M. C.; KOVALENKO, A.; KURTZMAN, T.; LEE, T. S.; LI, P.; LI, Z.; LIN, C.; LIU, J.; LUCHKO, T.; LUO, R.; MACHADO, M.; MANATHUNGA, M.; MERZ, K. M.; MIAO, Y.; MIKHAILOVSKII, O.; MONARD, G.; NGUYEN, H.; O'HEARN, K. A.; ONUFRIEV, A.; PAN, F.; PANTANO, S.; RAHNAMEH, A.; ROE, D. R.; ROITBERG, A.; SAGUI, C.; SCHOTT-VERDUGO, S.; SHAJAN, A.; SHEN, J.; SIMMERLING, C. L.; SKRYNNIKOV, N. R.; SMITH, J.; SWAILS, J.; WALKER, R. C.; WANG, J.; WANG, J.; WU, X.; WU, Y.; XIONG, Y.; XUE, Y.; YORK, D. M.; ZHAO, C.; ZHU, Q.; KOLLMAN, P. A. *Amber 2018*. San Francisco: University of California, 2018.
- [19] MAIER, J. A.; MARTINEZ, C.; KASAVAJHALA, K.; WICKSTROM, L.; HAUSER, K. E.; SIMMERLING, C. «Ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from Ff99SB». *J. Chem. Theory Comput.*, 11 (2015), p. 3696–3713. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00255.
- [20] JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. «Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking». *J. Mol. Biol.*, 267 (1997), p. 727–748. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0897.
- [21] COIN, I.; BEYERMANN, M.; BIENERT, M. «Solid-phase peptide synthesis: From standard procedures to the synthesis of difficult sequences». *Nat. Protoc.*, 2 (2007), p. 3247–3256. DOI: 10.1038/nprot.2007.454.
- [22] VANIER, G. S. «Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis based on the Fmoc protecting group strategy (CEM)». *Methods. Mol. Biol.*, 1047 (2013), p. 235–249. DOI: 10.1007/978-1-62703-544-6_17.
- [23] MEADOWS, D. L.; SHAFER, J. S.; SCHULTZ, J. S. «Determining the extent of labeling for tetramethylrhodamine protein conjugates». *J. Immunol. Methods*, 143 (1991), p. 263–272. DOI: 10.1016/0022-1759(91)90051-g.
- [24] MARTÍNEZ-CALVO, M.; COUCEIRO, J. R.; DESTITO, P.; RODRÍGUEZ, J.; MOSQUERA, J.; MASCAREÑAS, J. L. «Intracellular deprotection reactions mediated by palladium complexes equipped with designed phosphine ligands». *ACS Catal.*, 8 (2018), p. 6055–6061. DOI: 10.1021/acscatal.8b01606.
- [25] BLIGAARD, T. R.; BULLOCK, M.; CAMPBELL, C. T.; CHEN, J. G.; GATES, B. C.; GORTE, R. J.; JONES, C. W.; JONES, W. D.; KITCHIN, J. R.; SCOTT, S. L. «Toward benchmarking in catalysis science: Best practices, challenges, and opportunities». *ACS Catal.*, 6 (2016), p. 2590–2602. DOI: 10.1021/acscatal.6b00183.
- [26] KOEPEL, E. K.; PETRASSI, H. M.; SUDOL, M.; KELLY, J. W. «WW: An isolated three-stranded antiparallel beta-sheet domain that unfolds and refolds reversibly; evidence for a structured hydrophobic cluster in urea and GdnHCl and a disordered thermal unfolded state». *Protein Sci.*, 8 (1999), p. 841–853. DOI: 10.1110/ps.8.4.841.
- [27] FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G. *Gaussian 16 Rev. B.01*. Wallingford, CT, 2016.
- [28] MIAO, Y.; FEHER, V. A.; MCCAMMON, J. A. «Gaussian accelerated molecular dynamics: Unconstrained enhanced sampling and free energy calculation». *J. Chem. Theory Comput.*, 11 (2015), p. 3584–3595. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00436.



L. Martínez-Castro



S. Learte-Aymami



M. Condeminas



P. Martín-Malparida



C. González-González



S. Baúlde



J. R. Couceiro



M. J. Macias



J. L. Mascareñas



M. E. Vázquez



J.-D. Maréchal

Laura Martínez-Castro és graduada en química per la Universitat de Santiago de Compostel·la. Actualment desenvolupa els estudis de doctorat en química computacional i estructural al grup Insilichem de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Soraya Learte-Aymami és doctora en química per la Universitat de Santiago de Compostel·la. Actualment treballa a Janssen Pharmaceutical com a intermediària en ciències mèdiques.

Miriam Condeminas és graduada en química per la Universitat de Barcelona. Actualment desenvolupa el doctorat al grup Caracterització Estructural i Acoblament Macromolecular de l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona).

Pau Martín-Malparida és doctor en biotecnologia i actualment és assistent d'investigació al grup Caracterització Estructural i Acoblament Macromolecular de l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona).

Carmen González-González és graduada en química per la Universitat de Santiago de Compostel·la. Actualment desenvolupa els estudis de doctorat en química al grup ChemBioUSC del Centro Singular de Investigación en Química Biològica e Materials Moleculares (CiQUS) de la Universitat de Santiago de Compostel·la.

Sandra Baúlde és graduada en química per la Universitat de Santiago de Compostel·la i actualment desenvolupa el doctorat al grup NanoSelf del Centro Interdisciplinar de Química e Biología de A Coruña.

José R. Couceiro és doctor per la Universitat de Salamanca en microbiologia i genètica. Després de tres estades de postdoctorat, ha format la seva empresa Arnigal Cultivos.

Maria J. Macias és doctora en química per la Universitat de Salamanca. Actualment és investigadora ICREA a l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona), on lidera el grup Caracterització Estructural i Acoblament Macromolecular.

José L. Mascareñas és doctor en química per la Universitat de Santiago de Compostel·la. Actualment és catedràtic a la mateixa universitat i director científic del Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CiQUS), on dirigeix el grup MetBioCat.

M. Eugenio Vázquez és doctor en química per la Universitat de Santiago de Compostel·la. Actualment és professor al Departament de Química Orgànica de la mateixa universitat, on lidera el grup de recerca ChemBioUSC del Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CiQUS).

Jean-Didier Maréchal és doctor en química bioorgànica i computacional per la Universitat Autònoma de Barcelona. Actualment és professor catedràtic i dirigeix el grup de recerca Insilichem a la mateixa universitat.