

Diseño computacional de catalizadores biológicos

Sergio Martí, Vicente Moliner*, Juan Andrés, Maite Roca, Violeta López-Canut, Estanislao Silla, Iñaki Tuñón*, Juan Bertrán

Resumen: Las enzimas son una fuente de inspiración para el diseño de nuevos catalizadores con usos industriales que puedan funcionar en condiciones suaves de presión, temperatura y disolventes. El estado de transición de la reacción que se pretende catalizar, es la pieza clave para comprender cómo las enzimas son capaces de acelerar las reacciones. A partir de esta información se pueden proponer estructuras proteicas, o posibles mutaciones en el centro activo de proteínas, conduciendo a la síntesis de nuevos biocatalizadores. En este artículo presentamos los avances en este campo, clasificados en función del material de partida: anticuerpos catalíticos, enzimas modificadas y enzimas diseñadas *de novo*.

Palabras clave: Biocatalizadores, diseño racional, estado de transición, enzimas, química computacional.

Abstract: Enzymes are a source of inspiration for the design of new and powerful industrial catalysts able to work, in principle, in mild conditions of pressure, temperature and solvents. The Transition State of the reaction is the keystone to understand how enzymes are able to speed up reactions. This information can be then employed to design protein structures or successful mutations in the active site of proteins leading to the synthesis of new biocatalysts. In this paper we show advances in this field, classified according to the starting material: catalytic antibodies, modified enzymes and enzymes designed *de novo*.

Keywords: Biocatalysts, rational design, transition state, enzymes, computational chemistry.

Introducción

La naturaleza es una continua fuente de inspiración para los científicos y en especial para los químicos. En particular, las reacciones químicas, tal y como ocurren en los seres vivos, pueden servir de guía para mejorar los procesos industriales. Así, los seres vivos utilizan sus propios catalizadores, las enzimas, para que las reacciones químicas tengan lugar en escalas de tiempo compatibles con la vida.¹ Las enzimas son proteínas capaces de acelerar las reacciones químicas en varios órdenes de magnitud (en algunos casos las constantes de velocidad

umentan sus valores en factores del orden de 10^{20} con respecto a la reacción no catalizada, en igualdad de condiciones). Un ejemplo de la importancia de las enzimas nos la proporciona la hidrólisis de enlaces fósforo-oxígeno en los fosfoésteres. Estos enlaces son fundamentales para el almacenamiento de energía (en la transformación de ADP en ATP) o en la formación de largas cadenas de ácidos nucleicos (ADN y ARN) esenciales para la transmisión del código genético. Sin embargo la rotura de estos enlaces en condiciones suaves de temperatura, presión y pH es extraordinariamente lenta por lo que los seres vivos han desarrollado un conjunto de enzimas capaces de romper estos enlaces cuando lo requieren.²

La comprensión del mecanismo de acción de las enzimas, un objetivo que se persigue desde una perspectiva química multidisciplinar, debe permitir establecer las bases para el diseño de nuevos catalizadores que puedan utilizarse en la industria. Las enzimas se usan actualmente en la producción de alimentos, textiles, productos químicos y farmacéuticos e incluso de biocombustibles.³ El diseño de nuevos catalizadores biológicos podría expandir su aplicación a virtualmente cualquier proceso de síntesis química. Estos catalizadores de origen biológico podrían ser, en principio, más selectivos y eficientes que los catalizadores utilizados hasta la fecha. Además, por su propia naturaleza, estos nuevos catalizadores podrían trabajar en disolución acuosa y condiciones suaves, lo que supondría un indudable ahorro económico y una gran ventaja medioambiental. Como veremos en este artículo, en los últimos años ya se han dado los primeros pasos en este sentido, sentando las bases de lo que en el futuro puede ser un procedimiento para el diseño de catalizadores de origen biológico.

El artículo lo hemos estructurado de la siguiente manera: primero presentaremos los avances fundamentales que se han producido en los últimos años en este campo, haciendo hincapié en las principales estrategias para el diseño de catalizadores biológicos y clasificando éstas según el origen de la proteína empleada para obtener el catalizador, distinguiendo entre anticuerpos (apartado 3), enzimas modificadas (apartado 4) y aquellas estrategias que



S. Martí¹

V. Moliner¹

J. Andrés¹

M. Roca²



V. López-Canut²

E. Silla²

I. Tuñón²

J. Bertrán³

¹ Departament de Química Física i Analítica; Universitat Jaume I, 12071 Castellón (Spain).

² Departament de Química Física, Universitat de València, 46100 Burjassot, (Spain).

³ Departament de Química; Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Spain).

C-e: ignacio.tunon@uv.es, moliner@qfa.uji.es

Recibido: 13/10/2010. Aceptado: 13/12/2010.

no utilizan una estructura proteica previa; enzimas *de novo* (apartado 5). Por último, terminamos con un apartado de conclusiones y perspectivas de futuro (apartado 6).

Estrategias de diseño de catalizadores biológicos

A pesar de que existen diferentes moléculas de origen biológico capaces de catalizar reacciones químicas: aminoácidos, ARN o incluso algunos carbohidratos, los catalizadores biológicos por excelencia son las enzimas, proteínas que han evolucionado a lo largo de millones de años para catalizar transformaciones químicas en los seres vivos. En los últimos años se ha publicado un gran número de trabajos sobre la catálisis enzimática que han permitido establecer las bases por las cuales estas sustancias son capaces de acelerar las reacciones químicas con respecto a los procesos equivalentes en ausencia de las mismas. Aunque se han propuesto diversas hipótesis para explicar esta actividad catalítica,⁴ el consenso parece haberse alcanzado alrededor de la idea básica de Linus Pauling⁵ sobre el acoplamiento entre la enzima y el sustrato. Más concretamente, la enzima está diseñada para estabilizar la conformación del sustrato en el estado de transición, alcanzando entonces el complejo activado enzima sustrato ($E \cdot S^\ddagger$) una energía respecto a los reactivos ($E \cdot S$) menor que la que tendría el mismo estado de transición en ausencia de la enzima (S^\ddagger). Esta estabilización relativa del estado de transición se alcanza, básicamente, a través de interacciones electrostáticas y de enlace de hidrógeno que se establecen entre la proteína y el sustrato. El origen de la catálisis estaría en la diferente naturaleza de las interacciones establecidas en el seno de la enzima y en ausencia de ésta, es decir en disolución acuosa. Mientras el entorno enzimático, gracias a las estructura tridimensional de la proteína alcanzada a partir del plegado de su secuencia, está diseñada para estabilizar una cierta distribución de cargas, en disolución acuosa, esa estabilización sólo puede alcanzarse después de reorientar adecuadamente las moléculas de agua, tal y como se muestra esquemáticamente en la Figura 1. Este hecho parece dar cuenta de la mayor parte de la diferencia entre las energías libres de activación de la reacción catalizada y no catalizada en aquellos casos que han podido ser estudiados detalladamente.⁶ Es necesario señalar que también se han sugerido otros factores que podrían con-

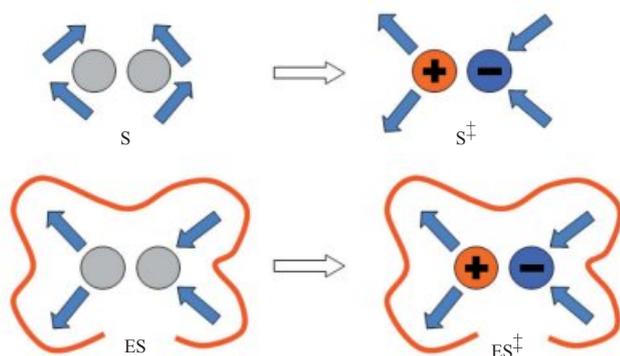


Figura 1. El centro activo de las enzimas (debajo) está diseñado para estabilizar el estado de transición de la reacción, mientras que en disolución las moléculas de agua (arriba) tienen que reorganizarse siguiendo los cambios producidos durante la reacción.

tribuir a la eficacia catalítica de las enzimas, tales como los efectos dinámicos y el efecto túnel. En el primer caso se ha propuesto que frecuencias semi-rápidas del entorno del centro activo podrían tener un papel crucial en el proceso catalítico⁷ aunque estudios sistemáticos del efecto dinámico del resto de grados de libertad sobre la coordenada de reacción muestran que se trata de un efecto cuantitativamente poco importante.⁸ En el segundo caso, se ha propuesto que la probabilidad de reacción por túnel jugaría un papel importante en ciertos procesos enzimáticos de transferencia de hidrógeno. Sin embargo, otros autores señalan que la contribución neta de éstos y otros efectos a la catálisis sería secundaria.⁹

La idea básica que ha servido de guía en el proceso de diseño dirigido de catalizadores biológicos es la de la complementariedad entre la estructura del centro activo de la enzima y la distribución de cargas del sustrato en el estado de transición. Obviamente, debido al limitado conocimiento que puede adquirirse del estado de transición por técnicas experimentales, este proceso de diseño se apoya en la utilización de técnicas de simulación que, haciendo uso del creciente desarrollo de las capacidades de cálculo y representación gráfica, permiten guiar eficientemente este diseño. Por otra parte, el éxito en el diseño de nuevos catalizadores se convertiría a su vez en la prueba fundamental de la bondad de esta hipótesis sobre el funcionamiento de las enzimas.

El conocimiento sobre el estado de transición de la reacción podría servir para diseñar una proteína *de novo* o, más frecuentemente, para diseñar los cambios que hay que introducir en una determinada estructura proteica para que ésta catalice la reacción deseada. En este caso hablaríamos de un proceso de *diseño racional*.¹⁰ En el mismo, una estructura de partida se modifica mediante un proceso de mutaciones dirigidas con el objetivo de aumentar su especificidad respecto del estado de transición. Normalmente este proceso se realiza guiado únicamente por la estructura cristalográfica y el conocimiento que se tenga del mecanismo de reacción. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las estructuras cristalizadas corresponden a especies estables, con un tiempo de vida media suficientemente largo. Ni la estructura del sustrato, ni la conformación de la enzima que aparecen en dichas estructuras tienen por qué corresponderse con las estructuras que aparecen durante el transcurso de una reacción química. De hecho, las estructuras obtenidas por rayos-X representan un promedio de la posición de las moléculas dispuestas en una celda cristalina periódica que puede resultar diferente de las estructuras obtenidas mediante RMN, las cuales representan un promedio sobre las moléculas orientadas en disolución.¹¹ Además, la falta de un conocimiento completo de la relación entre secuencia, estructura y actividad, así como la sensibilidad de la actividad catalítica a pequeñas perturbaciones estructurales convierte el rediseño enzimático en una tarea extremadamente difícil. En este proceso, el conocimiento *in silico* de las características geométricas y electrónicas del estado de transición de una determinada reacción química puede servir como una mejor guía para el diseño de un entorno proteico. Además, es posible introducir *in silico* las mutaciones seleccionadas y comprobar sus posibles efectos. Así tendríamos el *diseño racional asistido por ordenador*. Las técnicas de la química teórica y computacional pueden ser una herramienta fundamental en la mejora de la

capacidad catalítica de los anticuerpos. Por un lado proporcionan el conocimiento necesario sobre las características del estado de transición de la reacción objeto de estudio y por otro lado permiten estudiar las consecuencias de la modificación de dicho entorno sobre el perfil energético de la reacción. Es fundamental tener en cuenta que la descripción de este estado de transición debe de realizarse teniendo en cuenta los efectos que el entorno proteico pueden tener sobre el sustrato. Efectivamente, un entorno formado por residuos más o menos polares puede modificar significativamente la posición, distribución electrónica y energía del estado de transición con respecto al encontrado en fase gas. Aún más, es posible que determinados mecanismos de reacción sólo sean viables en presencia de dicho entorno. La introducción del efecto del centro activo sobre el subsistema reactivo puede estudiarse empleando básicamente dos estrategias distintas. La primera se basa en la selección de un pequeño número de residuos que estableciendo una interacción directa sobre el sistema reactivo pueden modificar sus propiedades.¹² Este sistema reducido se describe con las técnicas de la química cuántica, explorando la superficie de energía potencial del sistema y caracterizando el estado de transición. Eventualmente este tipo de técnicas suelen requerir la introducción de restricciones geométricas que simulen el resto de la estructura proteica no considerada en el cálculo. Alternativamente, la segunda estrategia parte de la división del complejo proteína-sustrato en dos subsistemas: uno descrito mediante la mecánica cuántica (QM, de sus siglas en inglés) y que comprendería todos aquellos átomos susceptibles de sufrir una considerable reorganización electrónica y que participan en la ruptura/formación de enlaces químicos de la reacción catalizada y otro descrito mediante la mecánica molecular (MM) y que influye sobre el anterior a través de términos energéticos de interacción electrostática y de van der Waals.¹³ Estos métodos suelen nombrarse como QM/MM y han sido ampliamente utilizados para investigar procesos reactivos en entornos proteicos y/o acuosos.⁶ Además pueden acoplarse a estrategias para la exploración del espacio configuracional del sistema completo (sustrato y enzima) tales como la dinámica molecular o los métodos Monte Carlo.

Este proceso de diseño contrasta con la otra técnica utilizada para modificar enzimas: la *evolución dirigida*.¹⁴ En este caso mutaciones al azar y procesos de recombinación se utilizan para generar nuevas enzimas. A continuación, aquellas variantes que cumplen la función deseada se identifican por un proceso de cribado o de selección (supervivencia de los organismos que contienen la variante deseada). En este caso, el desafío consiste en reducir la escala de tiempo requerida en la selección natural a unos pocos meses o semanas iterando el procedimiento.

Lógicamente ambas estrategias pueden ser combinadas dado que, mientras que el *diseño racional* suele implicar mutaciones de unos pocos residuos en las cercanías del centro activo, la *evolución dirigida*, por su carácter aleatorio, implica normalmente mutaciones en lugares de la proteína lejanas al centro activo. Además, puesto que el proceso de selección necesita de una cierta actividad mínima de partida, puede utilizarse el diseño racional seguido de un proceso de evolución dirigida para obtener enzimas más eficaces, específicas o incluso resistentes a condiciones más severas de pH o temperatura.

Anticuerpos Catalíticos

El sistema inmunológico de los seres vivos es capaz de producir defensas para eliminar sustancias ajenas, conocidas como antígenos o como haptenos si se introducen unidas a una proteína transportadora. Estas defensas son los anticuerpos, proteínas capaces de reconocer una enorme variedad de sustancias. Esta diversidad tiene su origen en la capacidad de recombinación de las secuencias de ADN responsables de codificar los componentes que constituyen los anticuerpos.¹⁵ Los anticuerpos se seleccionan a partir de su afinidad por el hapteno: a partir de un anticuerpo inicial, se desarrolla un proceso de maduración que aumenta la afinidad por el hapteno mediante mutaciones somáticas introducidas en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Las proteínas inmuno-globulinas son los anticuerpos más abundantes y están formadas por dos cadenas idénticas ligeras y dos cadenas pesadas unidas mediante puentes disulfuro. Tanto las cadenas ligeras como las pesadas constan de un dominio constante y un dominio variable, en el que pueden aparecer las mutaciones que aumenten la afinidad por el antígeno objetivo.¹⁵

La piedra angular de la catálisis enzimática, tal y como explicábamos anteriormente, es la estabilización relativa del estado de transición de la reacción a catalizar. Esta idea básica puede utilizarse para generar posibles catalizadores biológicos aprovechando la capacidad del sistema inmune de generar anticuerpos con afinidad hacia casi cualquier antígeno que pueda imaginarse. Así, el paso clave es la síntesis de una molécula estable que se parezca lo más posible al estado de transición de la reacción que quiere catalizarse, desde el punto de vista electrónico y/o geométrico. Esta molécula estable es conocida como análogo del estado de transición (TSA en sus siglas en inglés) y el conocimiento de las características del estado de transición puede provenir de técnicas experimentales (como efectos cinéticos isotópicos) o computacionales (localización de puntos de silla sobre la superficie de energía potencial). El TSA se puede utilizar entonces como hapteno, generándose anticuerpos con afinidad por esta molécula e, hipotéticamente, por el verdadero TS de la reacción (véase la Figura 2).¹⁵

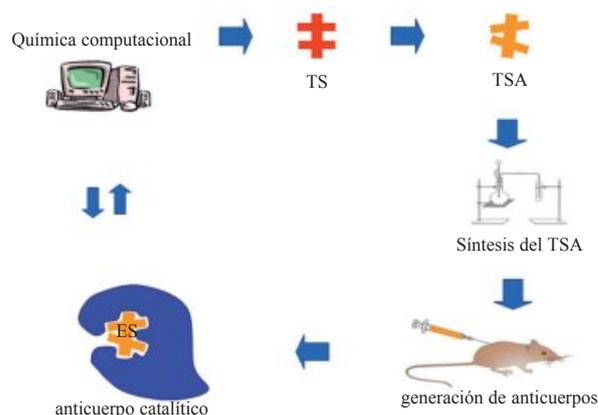


Figura 2. Los anticuerpos catalíticos se pueden obtener activando el sistema inmune contra moléculas parecidas al estado de transición de la reacción. Este proceso puede mejorarse con el conocimiento computacional de las características del estado de transición.

Esta técnica se ha utilizado para generar un gran número de anticuerpos catalíticos para diferentes reacciones químicas incluyendo procesos de hidrólisis, cicloadiciones, procesos redox, formación y/o rotura de enlaces carbono-carbono, etc. Una característica interesante de algunos de estos anticuerpos es su capacidad de catalizar más de una reacción. Esta capacidad, denominada promiscuidad, no es exclusiva de los anticuerpos y también la presentan las enzimas naturales, tal y como veremos más adelante. Así un anticuerpo con características de aldolasa cataliza también reacciones de condensación aldehído-aldehído, cetona-cetona y cetona-aldehído.¹⁶ Otro ejemplo es el anticuerpo catalítico 21D8, desarrollado inicialmente como catalizador de reacciones de descarboxilación y que también presenta capacidad hidrolítica.¹⁷

A pesar de los esfuerzos realizados hasta la fecha, el poder catalítico de los anticuerpos nunca ha alcanzado los valores propios de las enzimas (10^6 versus 10^{20} de poder catalítico máximo, respectivamente). Esta modesta eficiencia parece consecuencia de dos factores intrínsecos a su diseño: el uso de un estado de transición imperfecto como molde y el hecho de que la diversidad estructural con la que se construyen los anticuerpos es mucho más reducida que la usada por las enzimas, lo que da lugar a limitaciones en cuanto a las posibilidades de diseño.¹⁷ Además la estructura de los anticuerpos no suele ser adecuada para su uso en procesos industriales debido a su menor estabilidad y mayor coste de producción. Ante estas limitaciones se han propuesto diversas estrategias para mejorar la eficiencia catalítica de los anticuerpos. Obviamente una de ellas es usar mejores haptenos; TSA más parecidos al estado de transición desde el punto de vista estructural y electrónico. Otra posibilidad es el empleo del diseño racional, mediante la introducción de mutaciones en el centro activo dirigidas haciendo uso del conocimiento de la estructura de rayos X o de simulaciones teóricas del proceso de reacción introduciendo el efecto del entorno creado por el anticuerpo.

Un ejemplo de este tipo de catalizadores y de las posibilidades del diseño computacional nos lo proporciona la reacción de transformación de corismato en pefenato, una reacción 1,3-sigmatrópica que en la naturaleza viene catalizada por enzimas conocidas como *Corismato Mutasas* (CMs).¹⁸ Un anticuerpo con propiedades catalíticas frente a esta reacción, el 1F7,¹⁹ se desarrolló utilizando como hapteno una molécula estable similar al sustrato en la conformación alcanzada en el estado de transición (véase la Figura 3). Mientras que las enzimas naturales son capaces de disminuir la barrera de energía libre en más de 9 kcal·mol⁻¹ a 298K²⁰ con respecto a la reacción no catalizada, el anticuerpo 1F7 muestra una modesta capacidad catalítica disminuyendo la barrera de energía libre en aproximadamente 1,8 kcal·mol⁻¹.¹⁹

El perfil de energía libre de la reacción puede obtenerse en términos del Potencial de Fuerza Media (PMF, en sus siglas en inglés) mediante simulaciones QM/MM guiadas mediante una coordenada de reacción seleccionada. En el caso de la conversión de corismato en pefenato ésta puede ser la combinación antisimétrica de las distancias que definen el enlace que se rompe (C-O) y el enlace que se forma (C-C). Mediante este tipo de simulaciones reproducimos los perfiles correspondientes a la reacción no catalizada en disolución acuosa y a la reacción catalizada por dos CMs de dos organismos diferentes: *Bacillus subtilis* CM y (*BsCM*) *Escherichia coli* CM (*EcCM*)

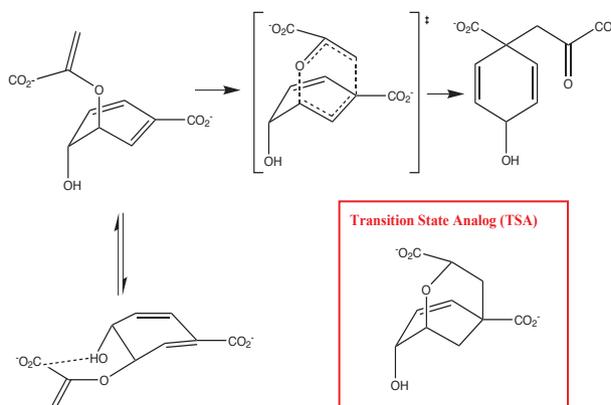


Figura 3. La reacción de transformación de corismato en pefenato implica un cambio conformacional del sustrato y una reacción pericíclica. En el recuadro se muestra el TSA utilizado para generar anticuerpos catalíticos para esta reacción.¹⁹

que se muestran en la Figura 4. Nuestras simulaciones, utilizando el hamiltoniano semiempírico AM1²¹ y los campos de fuerzas clásicos OPLS²² y TIP3P,²³ mostraban una reducción de la barrera de energía libre de alrededor de 8 kcal·mol⁻¹ al comparar la reacción en medio acuoso con la reacción en medio enzimático.²⁴ Este resultado está en buen acuerdo con resultados experimentales, lo que permite concluir que la metodología QM/MM es capaz de reproducir la capacidad catalítica de las enzimas. Las estructuras obtenidas a lo largo de los perfiles de energía libre pueden utilizarse para obtener información detallada de la reacción y de las interacciones puestas en juego entre la proteína y el sustrato en los diferentes estados de reactivos (complejo de Michaelis) y de transición. Estos y otros estudios computacionales han demostrado que las enzimas catalizan esta reacción mediante la estabilización preferencial de la distribución de cargas del estado de transición, principalmente la carga negativa que se desarrolla sobre el átomo de oxígeno que rompe su enlace con un carbono y la aproximación de las dos cargas negativas de los grupos carboxilatos que viene favorecida por una red de enlaces de hidrógeno.^{6c, 6d, 6f, 25} Estas interacciones puestas en

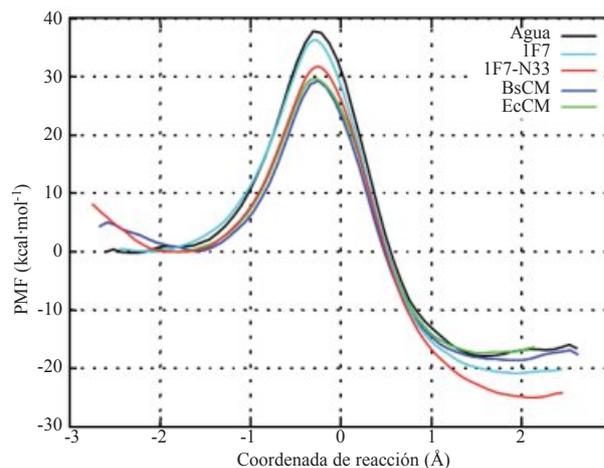


Figura 4. Perfiles de energía libre AM1/OPLS obtenidos para la transformación de corismato en pefenato en diferentes entornos.

juego en el centro activo de la enzima no sólo estabilizan el estado de transición sino que también desplazan el preequilibrio conformacional del corismato entre formas no reactivas y reactivas (véase la Figura 3) favoreciendo la población de las últimas. De esta forma es posible dar una explicación unificada a las dos teorías principales que se habían planteado sobre la acción enzimática: estabilización del estado de transición o desestabilización de los reactivos. En realidad ambos efectos son como *dos caras de la misma moneda* que tiene su origen en una estructura enzimática desarrollada para optimizar las interacciones con el estado de transición.⁴

Una vez mostrada la validez de la metodología QM/MM para reproducir las características de la reacción de transformación del corismato en pefenato catalizada por enzimas *CMs* y en disolución acuosa, la aplicamos también al análisis de la reacción en el centro activo de 1F7. Nuestro PMF (Figura 4) muestra una disminución de la barrera de energía libre de 2,9 kcal·mol⁻¹ respecto a la reacción no catalizada, en razonable acuerdo con la disminución observada experimentalmente.²⁴ Al analizar las estructuras del estado de transición de la reacción en el anticuerpo observamos que las interacciones de enlaces de hidrógeno establecidas entre los grupos carboxilato del sustrato y la proteína no eran tan intensas como en las enzimas naturales, impidiendo que la repulsión entre estos grupos sea apantallada tan eficazmente como ocurre en *BsCM* y *EcCM*. Este resultado sugiere que el centro activo de la enzima es capaz de acomodar mejor al sustrato que el anticuerpo catalítico. Es interesante destacar que esta conclusión se obtuvo del análisis de las estructuras del estado de transición obtenidas de simulaciones QM/MM. Efectivamente, el patrón de interacciones que puede observarse en este caso no tiene porque coincidir con las observadas a partir de la estructura de rayos-X del hapteno en el interior del anticuerpo. El hapteno no es idéntico al estado de transición ni desde el punto de vista electrónico ni geométrico. Así, por ejemplo, el residuo AsnH33 del anticuerpo presenta una orientación considerablemente diferente en el complejo con el estado de transición y con el TSA. En este último caso el grupo amino establece un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo del inhibidor, mientras que en el caso del estado de transición se observan impedimentos estéricos entre este residuo y átomos de hidrógeno del sustrato que impiden un posicionamiento óptimo del mismo en el centro activo del anticuerpo, dificultando el establecimiento de interacciones de enlace de hidrógeno con residuos que se sitúan en la parte interna de la cavidad (AsnH35 y AsnH50, véase la Figura 5). En base a estas observaciones propusimos una mutación del residuo AsnH33 por uno de menor tamaño (serina) de forma que el mutante 1F7 -N33S debería permitir una mayor penetración del sustrato en su cavidad y por lo tanto una interacción más intensa con los residuos del centro activo lo que provocaría una mayor estabilización del estado de transición de la reacción. Efectivamente, la mutación de la AsnH33 a SerH33 genera más espacio en la cavidad, permitiendo la rotación del sustrato y el establecimiento de interacciones más fuertes entre uno de los grupos carboxilatos con AsnH35 y AsnH50. Este reposicionamiento se refleja también en una disminución de la interacción del sustrato con las moléculas de agua que aparecen en la parte externa de la cavidad. La obtención del perfil de energía libre para la reacción en el mutante (Figura 5)

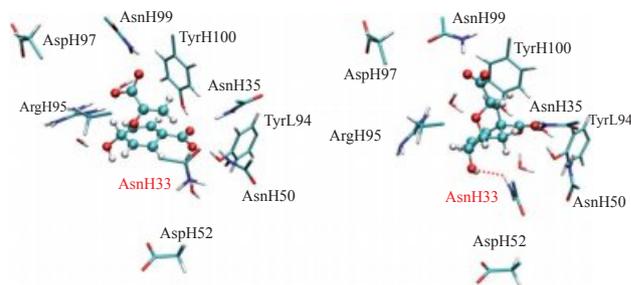


Figura 5. Geometrías del centro activo del anticuerpo 1F7 conteniendo el estado de transición de la reacción (obtenido mediante simulaciones computacionales) y un estado de transición análogo (obtenido a partir de difracción de rayos X) a la derecha.

muestra que efectivamente ésta transcurre con una barrera 4,5 kcal·mol⁻¹ menor que en el anticuerpo catalítico original. Esta disminución implicaría un aumento de la constante de velocidad en un factor de $\sim 10^3$, a temperatura ambiente, con respecto al 1F7.²⁴

Diseño de Enzimas Modificadas

Las enzimas se definen normalmente como un catalizador muy selectivo capaz de acelerar una reacción concreta sobre un sustrato concreto y dar un determinado producto. Sin embargo, se ha demostrado que algunas enzimas son promiscuas en cuanto a su actividad, es decir pueden aceptar diferentes sustratos y catalizar reacciones secundarias, diferentes a la principal.²⁶ Esta actividad secundaria o promiscua ofrece una posibilidad para la evolución enzimática, ya que una duplicación del gen podría ser el origen de un proceso de evolución adaptativa durante la cual se mejorase la actividad secundaria de la enzima.^{26b, 26g} De hecho, en la naturaleza pueden aparecer nuevas actividades enzimáticas en un periodo relativamente corto de unos pocos años o incluso meses, como respuesta, por ejemplo, a la introducción en un determinado ecosistema de un nuevo compuesto sintético.^{26e} Mientras que la actividad principal de una enzima, para la cual ha sufrido un largo periodo de evolución, presenta una importante resistencia frente a las mutaciones, la actividad secundaria exhibe una importante plasticidad, es decir, puede ser fácilmente mejorada mediante la introducción de una o unas pocas mutaciones.^{26b, 26g} En cualquier caso es necesario recordar que la optimización de una función enzimática de una proteína puede tener consecuencias sobre la estabilidad de su estructura. Efectivamente, el diseño de un centro activo complementario con una cierta distribución de cargas correspondientes al estado de transición puede dar lugar a una tensión importante entre los residuos que los forman. Esta tensión disminuiría la estabilidad de la estructura global, dando lugar a una correlación inversa entre función y estabilidad.²⁷

Un ejemplo de enzima promiscua es la Isocorismato Piruvato Liasa (IPL) de *Pseudomonas aeruginosa* (*PchB*) evolucionada para catalizar la transformación de isocorismato en piruvato y salicilato (ver Figura 6).²⁸ El salicilato es esencial para la síntesis de sideróforos, moléculas de bajo peso molecular capaces de secuestrar hierro del organismo huésped para ser utilizado en el metabolismo de la bacteria.²⁹ Para esta reacción enzimática se ha propuesto recientemente

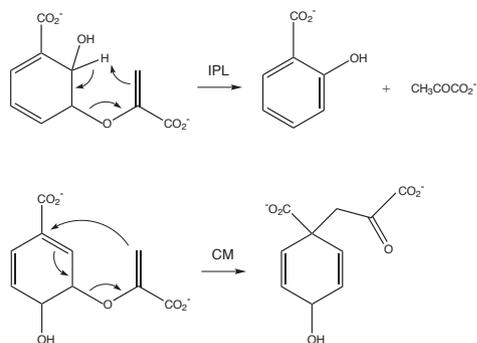


Figura 6. Actividades catalíticas principal (IPL) y promiscua (CM) de la enzima *PchB*.

un mecanismo de reacción pericíclico,³⁰ que resulta común en la síntesis orgánica pero que raramente se ha sugerido en catálisis enzimática. La naturaleza del mecanismo de reacción la confirmamos mediante simulaciones QM/MM con las que fuimos capaces de reproducir el efecto catalítico y la magnitud de las barreras de energía libre.³¹ Efectivamente pudimos comprobar cómo la transferencia protónica entre átomos de carbono y la rotura heterolítica del enlace C-O ocurren de forma simultánea aunque asíncrona.³¹ Los cálculos AM1/OPLS mostraron una disminución de la barrera de energía libre de 8,0 kcal·mol⁻¹ respecto a la reacción no catalizada, en casi perfecto acuerdo con el valor experimental (8,5 kcal·mol⁻¹).^{28b, 32} Teniendo en cuenta el mecanismo por el que transcurre la actividad principal de la *PchB* no resulta completamente sorprendente que esta enzima sea capaz de presentar actividad promiscua catalizando secundariamente la transformación de corismato a pufenato, reacción que tiene lugar también mediante un mecanismo pericíclico con rotura del mismo enlace C-O (véase la Figura 6). Nuestras simulaciones QM/MM (AM1/OPLS) predijeron un efecto catalítico mucho menor cuando actúa como CM, con una disminución de la barrera de energía libre de 2,3 kcal·mol⁻¹ respecto a la reacción no catalizada.³³ Lógicamente la presión evolutiva que ha sufrido la enzima *PchB* no la ha optimizado para favorecer el proceso de formación de un enlace C-C, necesario en la transformación de corismato a pufenato. El análisis de las dinámicas moleculares muestran que efectivamente, la distancia C-C entre los átomos que deben formar un nuevo enlace en el corismato es significativamente mayor cuando este sustrato se encuentra en el centro activo de la *PchB* que cuando se sitúan en el centro activo de enzimas con actividad principal de CMs (*EcCM* y *BsCM*).³³ Basándonos en la comparación entre las estructuras del estado de transición obtenidas para la transformación de corismato en pufenato en el seno de las CMs naturales y de la *PchB* propusimos una mutación que permitiese obtener un centro activo más preparado para favorecer dicha reacción. En concreto se propuso la mutación de una alanina (Ala38) por un residuo más voluminoso (isoleucina) debido a que en la posición equivalente en la *EcCM* aparece una valina. Un residuo más voluminoso en dicha posición debe favorecer la aproximación entre los átomos de carbono que deben formar enlace durante la actividad CM. La mutante propuesta (*PchB*-A38I) muestra un perfil de energía libre con una barrera sensiblemente inferior (4,4 kcal·mol⁻¹) a

la mostrada por la enzima *PchB*, siendo sólo 2,0 kcal·mol⁻¹ mayor que las barreras asociadas a las enzimas *BsCM* y *EcCM*. Este resultado teórico viene avalado por el resultado experimental obtenido por Mayo y colaboradores³⁴ que mostraron que la mutación equivalente en la enzima *EcCM* (Val35Ile) es capaz de aumentar la constante de velocidad de la reacción por un factor 1,5, mientras que la mutación de la Val35 por Ala (el residuo que se encuentra en esta posición en la *PchB*) reduce la constante de velocidad en un factor de 2. Por tanto, una hipotética mutación Ala35Ile en la *EcCM* generaría un aumento de velocidad en un factor de alrededor de 3; un efecto en concordancia con nuestra predicción en la *PchB*.

Así pues, nuestras simulaciones muestran que es posible diseñar mutaciones dirigidas que aumenten la actividad secundaria de una enzima basándonos en la información detallada obtenida sobre la reacción química empleando las técnicas de la química teórica y computacional. Por otra parte, comprobamos que la actividad principal de la enzima *PchB* (IPL) es mucho más robusta frente a las mutaciones. Así, en nuestras simulaciones, la mutante *PchB*-A38I también muestra una mayor constante de velocidad para su actividad principal, aunque la disminución obtenida para la barrera de energía libre es significativamente menor que la observada para la actividad secundaria.³¹

La promiscuidad catalítica de las enzimas, además de proporcionar una vía para la obtención de nuevos catalizadores, proporciona también una oportunidad para entender el origen de la especialización de diferentes enzimas de una misma familia y las vías que la evolución ha encontrado para favorecer esta especialización. Un ejemplo lo proporciona la superfamilia de enzimas Fosfatasa Alcalinas (*AP* en sus siglas en inglés). Esta familia cataliza la hidrólisis de monoésteres de fosfato, diésteres de fosfato, monoésteres de sulfato y fosfitos entre otros compuestos.³⁵ Las enzimas de la familia, están especializadas en un sustrato en particular pero presentan actividad promiscua con otros sustratos. Esta actividad secundaria podría dar lugar, mediante la introducción de mutaciones, a una ventaja selectiva para el organismo, permitiendo que la selección natural optimizara nuevas enzimas de la familia, dando lugar a un proceso de divergencia desde un antecesor común. Así, la enzima Fosfatasa Alcalina (que da nombre a la familia) cataliza preferentemente la hidrólisis de fosfomonoésteres pero muestra actividad secundaria catalizando la hidrólisis de fosfodiésteres. Por su parte la enzima Nucleótido Pirofosfatasa Fosfodiesterasa (*NPP* en sus siglas inglesas) cataliza preferentemente la hidrólisis de fosfodiésteres pero muestra actividad promiscua frente a fosfomonoésteres. La relación estructural entre ambas enzimas es evidente comparando sus centros activos. Tal y como se observa en la Figura 7 ambas contienen dos iones Zn²⁺ en el centro activo con el mismo tipo de coordinación (aspartatos e histidinas), un nucleófilo (una serina desprotonada en la *AP* y una treonina desprotonada en la *NPP*). La diferencia principal es la aparición de más residuos cargados positivamente (Lys328 y Arg166) en el centro activo de la *AP* así como la cercanía de un ion Mg²⁺.

La similitud estructural entre las enzimas *AP* y *NPP* ha planteado la cuestión de la relación entre estructura y acti-

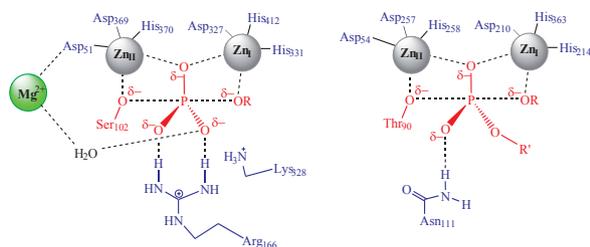


Figura 7. Representación esquemática de los centros activos de las enzimas *AP* (izquierda) y *NPP* (derecha).

vidad en la familia, cómo se ha producido la evolución y si los cambios en la actividad principal son o no reversibles mediante una o unas pocas mutaciones. En principio es posible imaginar dos escenarios distintos para la evolución enzimática. En el primero de ellos la enzima evolucionaría para adaptarse a distintos mecanismos de reacción. Mientras que los fosfomonoésteres suelen seguir un mecanismo disociativo en su hidrólisis, los fosfodiésteres prefieren un mecanismo más asociativo, por lo que las mutaciones tendrían como finalidad ajustarse a las características de un estado de transición más expandido en el caso de los fosfomonoésteres y más compacto en el de los fosfodiésteres, tal y como se puede observar en la Figura 8. En el segundo escenario la familia enzimática evoluciona manteniendo un mismo tipo de mecanismo de reacción, creando un entorno adaptado a cada sustrato pero con un estado de transición similar.³⁶ La interpretación de datos experimentales (provenientes de efectos cinéticos isotópicos o relaciones lineales de energía libre) no es sencilla debido a la participación de hasta cuatro estados de referencia en la hidrólisis de los compuestos de fósforo (como se observa en la Figura 8) por lo que es necesario la realización de simulaciones teóricas que permitan establecer el mecanismo por el que transcurre la actividad enzimática proporcionando así una referencia sobre la forma en que se pudo producir la divergencia de actividad en esta familia.³⁷

Los resultados de nuestros estudios QM/MM, utilizando un hamiltoniano AM1 ampliado con orbitales *d* para el fósforo³⁸ y los campos de fuerzas OPLS y TIP3P, son compatibles con un escenario evolutivo en el que el mecanismo de reacción se mantiene inalterado en la familia *AP*. Efectivamente, los fosfomonoésteres sufren procesos de hidrólisis siguiendo mecanismos de tipo disociativo tanto

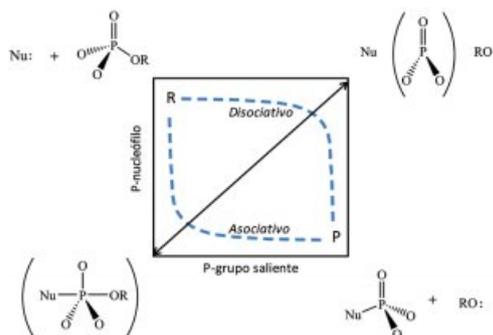


Figura 8. Posibles mecanismos para la hidrólisis de fosfoésteres en función de las distancias entre el fósforo y el grupo saliente/nucleófilo.

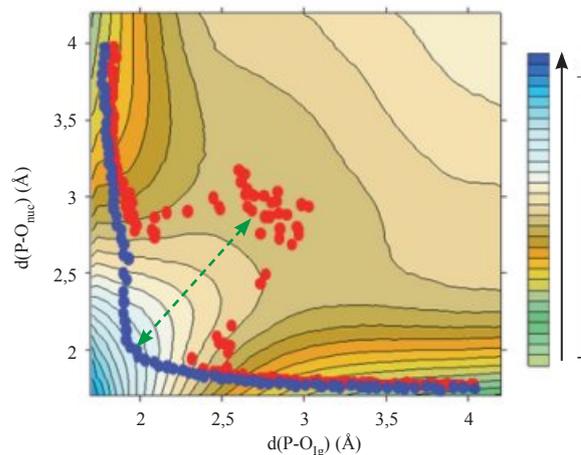


Figura 9. Representación de los valores de las distancias entre el fósforo y el nucleófilo y grupo saliente obtenidas durante la simulación de la hidrólisis básica del fosfodiéster metil-*p*-nitrofenilfosfato en medio acuoso (azul) y enzimático (rojo). Los valores se han representado sobre la superficie de energía libre enzimática que muestra claramente que el mecanismo asociativo transcurriría por regiones de mayor energía. La flecha verde indica la diferencia entre ambos estados de transición.

en disolución acuosa como en el seno de la enzima *AP*. Sin embargo los diésteres reaccionan mediante mecanismos diferentes en disolución y en el seno de la *NPP*. Mientras que en el primer caso siguen mecanismos asociativos, mostrando distancias cortas del fósforo al nucleófilo y al grupo saliente, simultáneamente, en el centro activo de la *NPP* aparecen estructuras con distancias sustancialmente mayores entre el fósforo y esos dos grupos, tal y como se observa en la Figura 9. Este cambio de mecanismo se explica por la preferencia del centro activo por estructuras con una mayor separación entre los centros de carga negativas, tanto del nucleófilo como del grupo saliente.³⁶ Así, estos resultados sugieren que la evolución divergente de la familia se realizó manteniendo la preferencia por un mismo tipo de mecanismo, disociativo en este caso, y la selección de sustrato se basaría entonces en las interacciones establecidas con el grupo fosfato, siendo diferentes en el caso de mono y diéster.³⁶ El desafío actual es ser capaces de revertir el proceso transformando la *NPP* en una monoesterasa más eficaz y la *AP* en una mejor diesterasa. En ese sentido, mutaciones realizadas recientemente muestran que la eliminación del ion Mg^{2+} del centro activo de la *AP* mejora su actividad diesterasa al favorecer el acomodamiento del grupo alquilo adicional.³⁹

Diseño de novo de Enzimas

En principio, el diseño *de novo* implicaría la resolución del problema secuencia-estructura-función en las proteínas. Es decir, conseguir predecir la estructura tridimensional de una secuencia particular y cuál será la función que desempeñará. En ese caso sería posible llevar a cabo el diseño de proteínas desde cero.⁴⁰ Pero aún estamos lejos de ese objetivo, excepto para polipéptidos de menor tamaño. Por eso, utilizaremos el término *de novo* para designar al proceso de diseño de la introducción de una función enzimática sobre una estructura preexistente que previamente no era capaz de desempeñarla.

En los últimos años se ha puesto a punto una estrategia para el diseño de catalizadores biológicos que parte del estudio del estado de transición de la reacción utilizando métodos *ab initio*. Se localiza y caracteriza el estado de transición en fase gas de la reacción objeto de estudio y a continuación se añaden grupos funcionales en el modelo con el intento de estabilizar el estado de transición. Estos grupos funcionales intentan mimetizar el efecto que determinados residuos podrían tener en un entorno enzimático. Una vez obtenido un modelo truncado de centro activo se procede a injertarlo en una determinada estructura proteica modificando la correspondiente secuencia. Así, Röthlisberger et al. han conseguido desarrollar un nuevo catalizador enzimático para la reacción de eliminación de Kemp, para la cual no se conoce ninguna enzima natural.⁴¹ La reacción requiere la desprotonación de un átomo de carbono, por lo que el modelo truncado en fase gas requiere la presencia de una base en las cercanías de dicho átomo. En concreto, se utilizó la cadena lateral de un aspartato o glutamato, el grupo carboxilato, o bien una diada catalítica formada por histidina y aspartato. Una vez definido el modelo truncado del estado de transición en fase gas se procedió a la búsqueda de estructuras proteicas capaces de acomodarlo, mediante el empleo del algoritmo Rosetta.⁴² En este algoritmo, para cada estructura proteica candidata se optimiza la posición y orientación del estado de transición, considerado rígido en este proceso, y de los aminoácidos que formen el modelo truncado utilizando un campo de fuerzas clásico (MM). A continuación se rediseñan los residuos más cercanos para maximizar la interacción con el estado de transición y la estabilidad del centro activo. Durante el proceso el esqueleto de la proteína se considera fijo y solamente se permite la flexibilidad de las cadenas laterales. La validez del algoritmo de diseño se validó comprobando que las estructuras cristalográficas de las proteínas así diseñadas se superponían casi perfectamente con las predichas por el método computacional. Las nuevas enzimas mostraron una constante de velocidad máxima del orden de 10^5 veces mayor que para la reacción sin catalizar. Posteriormente, un proceso de evolución dirigida permitió incrementar esta actividad hasta alcanzar una constante del orden de 10^6 veces mayor.⁴³ Una estrategia muy similar fue utilizada por Jian et al. para diseñar enzimas con actividad retro-aldol.⁴⁴ En este caso el diseño venía complicado por el hecho de que la reacción tiene lugar en varias etapas químicas. El máximo aumento alcanzado para la constante de velocidad fue en este caso del orden de 10^4 .

Más recientemente se ha empleado la metodología computacional Rosetta para diseñar enzimas con capacidad de acelerar una reacción Diels-Alder.⁴⁵ En este caso el diseño estuvo dirigido a optimizar el solapamiento entre los orbitales del dieno y dienófilo. En este sentido, sobre el estado de transición en fase gas de la reacción elegida (véase la Figura 10) se añadió un aceptor de enlace de hidrógeno que interactuase con el dieno (un grupo hidroxilo) y aumentase así la energía de su HOMO y un aceptor de enlace de hidrógeno (un grupo carbonilo) que disminuyese la energía del LUMO del dienófilo. Las coordenadas obtenidas mediante cálculos mecanocuánticos para el modelo de centro activo truncado se utilizaron como punto de partida para el proce-

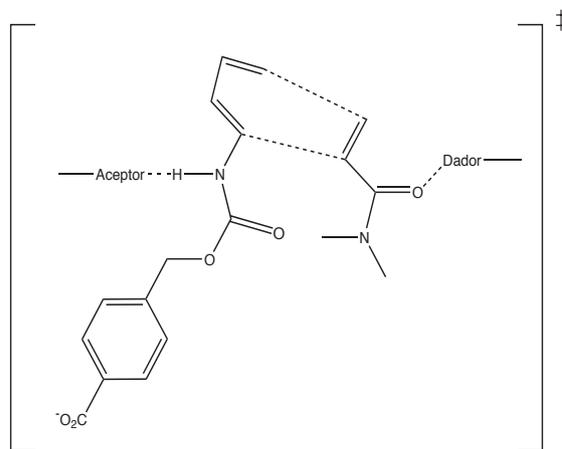


Figura 10. Estado de transición de la reacción Diels-Alder elegida para el diseño de una nueva enzima.

so de búsqueda, optimización y rediseño de una estructura proteica adecuada para acomodar este estado de transición. De un total de 84 proteínas diseñadas 2 mostraron actividad como Diels-Alderasas. Posteriormente, la introducción de mutaciones en los residuos cercanos al centro activo permitió mejorar la eficacia catalítica en un factor 20 aproximadamente sobre el diseño original.

Conclusiones y Perspectivas de Futuro

El diseño de catalizadores biológicos asistido por ordenador está empezando a ser una realidad tangible. Las técnicas proporcionadas por la química teórica y computacional, esencialmente la caracterización de estados de transición y la consideración de las interacciones que se ponen en juego en medios tan complejos como los medios proteicos, permiten abordar la tarea de diseñar catalizadores altamente específicos que sean capaces de trabajar en condiciones suaves de pH, presión, temperatura, disolvente... Es decir, permiten abrir la puerta a uno de los sueños de la industria química y sobre todo de aquella industria que pretende ser sostenible y compatible con la conservación del medio ambiente.

En este artículo hemos mostrado las capacidades de dos estrategias diferentes para el diseño de nuevos catalizadores biológicos. Una de ellas se basa en la optimización de interacciones sobre un estado de transición obtenido en fase gas y el cribado de estructuras capaces de acomodarlo. La principal fortaleza de esta estrategia se basa en la capacidad de examinar un gran número de estructuras candidatas utilizando para ello campos de fuerza clásicos. Las limitaciones provienen de la naturaleza del estado de transición, obtenido en fase gas y descrito como rígido con un campo de fuerzas clásico durante el proceso de cribado de estructuras y de la no consideración de la flexibilidad del esqueleto proteico y su dinámica durante el proceso de optimización de las estructuras seleccionadas. Tal y como se ha señalado recientemente en un análisis computacional del funcionamiento de las enzimas diseñadas para catalizar la eliminación de Kemp, el uso de modelos en fase gas del estado de transición impide tener en cuenta correctamente

la preorganización del centro activo.⁴⁶ La otra estrategia computacional se basa en la obtención de perfiles de energía libre, mediante técnicas QM/MM, que permiten analizar las propiedades del estado de transición en el entorno en el que tiene lugar la reacción e incluyendo la dinámica del sistema completo. El mayor coste computacional impide aplicar este procedimiento a un número elevado de estructuras candidatas por lo que la búsqueda de mutaciones que mejoren la actividad tiene que estar dirigida por el conocimiento de la reacción. Las estrategias futuras de diseño de catalizadores deberían ser capaces de incluir el efecto de la flexibilidad y dinámica del entorno sobre el estado de transición en un protocolo eficaz de predicción de secuencias.

Aunque las capacidades catalíticas alcanzadas hasta el momento en el diseño computacional son bastante modestas comparadas con las alcanzadas por las enzimas naturales, es de esperar que la mejora de los procedimientos y de la comprensión del fenómeno de la catálisis enzimática permita ir mejorando los resultados obtenidos. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que las estrategias descritas de diseño computacional se aplican únicamente a la etapa química y muy frecuentemente únicamente a la más lenta si ésta consta de varias subetapas. No es extraño encontrar ejemplos en los que la etapa limitante en procesos de catálisis enzimática sea la formación del complejo enzima-sustrato o la liberación del producto desde el centro activo. La modelización de estas etapas es todavía un desafío no completamente resuelto ya que es necesario considerar que en muchas ocasiones la formación del complejo o la liberación del sustrato implican importantes cambios conformacionales en la proteína. Evidentemente la simulación de estos cambios requiere la necesaria consideración de la flexibilidad del esqueleto proteico por lo que los tiempos de simulación requeridos pueden ser muy grandes.

Otros aspectos fundamentales de la catálisis biológica que no son directamente considerados en los protocolos de diseño computacional presentados en este artículo son la estabilidad de la estructura proteínica frente a cambios en el pH, temperatura o disolvente. Estos aspectos resultan claves para el desarrollo de catalizadores que puedan ser usados en la industria y tal y como hemos expuesto, muchas veces existe una correlación inversa entre actividad y estabilidad que debe ser considerada para que el diseño tenga aplicación práctica.

Obviamente, el desarrollo de las capacidades informáticas debe permitir mejorar los aspectos más discutibles de las técnicas actuales, tales y como la exploración del espacio configuracional y el nivel de tratamiento del subsistema cuántico. La mejora en estos aspectos, junto a la consideración de las limitaciones antes reseñadas, debe ir permitiendo obtener una gran cantidad de información microscópica que no sólo ayude a entender en toda su complejidad el fenómeno de la catálisis enzimática sino que también sirva para una guía cada vez más eficaz en el desarrollo de nuevos catalizadores. No parece improbable imaginar una futura industria química donde para cada proceso pueda desarrollarse un catalizador específico capaz de trabajar en condiciones suaves y por lo tanto compatibles con la conservación del medio ambiente y de los recursos naturales.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado con la financiación aportada por el *Ministerio de Ciencia e Innovación*, proyecto CTQ2009-14541-C02, por la Generalitat Valenciana, *Prometeo/2009/053*, y por el proyecto Universitat Jaume I-Bancaixa P1·1B2008-38. V. L-C y M. R. agradecen al Ministerio Ciencia e Innovación una beca predoctoral y un contrato ‘Juan de la Cierva’, respectivamente. V. Moliner agradece al *Ministerio de Educación* el proyecto PR2009-0539. Los autores agradecen la asistencia computacional proporcionada por el Servei d’Informàtica de la Universitat de València en el supercomputador ‘Tirant’, que forma parte de la Red Española de Supercomputación, y al Servei d’Informàtica de la Universitat Jaume I.

Bibliografía

1. R. Wolfenden, M. J. Snider, *Accounts of Chemical Research* **2001**, *34*, 938–945.
2. a) C. Lad, N. H. Williams, R. Wolfenden, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 5607–5610. b) F. H. Westheimer, *Science* **1987**, *235*, 1173–1178. c) W. W. Cleland, A. C. Hengge, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3252–3278.
3. W. Aehle, *Enzymes in Industry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2007**.
4. S. Martí, M. Roca, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, J. Bertrán, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 98–107.
5. L. Pauling, *Chemical and Engineering News* **1946**, *24*, 1375–1377.
6. a) A. Soriano, E. Silla, I. Tuñón, M. F. Ruiz-Lopez, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1946–1957. b) M. Roca, S. Martí, J. Andrés, V. Moliner, I. Tuñón, J. Bertrán, I. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7726–7737. c) S. Martí, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, J. Bertrán, M. J. Field, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1709–1712. d) M. Strajbl, A. Shurki, M. Kato, A. Warshel, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10228–10237. e) K. Nam, X. Prat-Resina, M. Garcia-Viloca, L. S. Devi-Kesavan, J. L. Gao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1369–1376. f) B. Szeferczyk, F. Claeysens, A. J. Mulholland, W. A. Sokalski, *Int. J. Quantum Chem.* **2007**, *107*, 2274–2285.
7. S. D. Schwartz, V. L. Schramm, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 552–559.
8. J. J. Ruiz-Pernía, I. Tuñón, V. Moliner, J. T. Hynes, M. Roca, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7477–7488.
9. M. H. M. Olsson, W. W. Parson, A. Warshel, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1737–1756.
10. K. L. Morley, R. J. Kazlauskas, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 231–237.
11. A. T. Brunger, *Nature Structural Biology* **1997**, *4*, 862–865.
12. a) F. Himo, P. E. M. Siegbahn, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10280–10289. b) S. L. Chen, V. Pelmenschikov, M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9912–9913. c) K. H. Hopmann, B. M. Hallberg, F. Himo, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14339–14347.
13. a) A. Warshel, M. Levitt, *Journal of Molecular Biology* **1976**, *103*, 227–249. b) N. Reuter, A. Dejaegere, B. Maigret, M. Karplus, *Journal of Physical Chemistry A* **2000**, *104*, 1720–1735. c) J. L. Gao, D. G. Truhlar, *Annual Review of Physical Chemistry* **2002**, *53*, 467–505. d) M. J. Field, *A practical introduction to the simulation of molecular systems*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1999**. e) P. Kollman, *Chemical Reviews* **1993**, *93*, 2395–2417. f) A. J. Turner, V. Moliner, I. H. Williams, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 1323–1331. g) S. Martí, V. Moliner, I. Tuñón, *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1*, 1008–1016.
14. F. H. Arnold, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 125–131.

15. *Catalytic Antibodies*, ed. E. Keinan, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2005**.
16. D. Hilvert, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 751–793.
17. A. C. Backes, K. Hotta, D. Hilvert, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 1167–1174.
18. E. Haslam, *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*, John Wiley & Sons: New York, **1993**.
19. a) D. Hilvert, K. D. Nared, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5593–5594. b) D. Hilvert, S. H. Carpenter, K. D. Nared, M. T. M. Auditor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 4953–4955.
20. a) P. R. Andrews, G. D. Smith, I. G. Young, *Biochemistry* **1973**, *12*, 3492–3498. b) P. Kast, M. Asif-Ullah, D. Hilvert, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2691–2694.
21. M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 3902–3909.
22. a) W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1657–1666. b) J. Pranata, S. G. Wierschke, W. L. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2810–2819.
23. W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *Journal of Chemical Physics* **1983**, *79*, 926–935.
24. S. Martí, J. Andrés, E. Silla, V. Moliner, I. Tuñón, J. Bertrán, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 286–290.
25. S. Martí, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, J. Bertrán, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 311–319.
26. a) M. D. Toscano, K. J. Woycechowsky, D. Hilvert, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 3212–3236. b) P. J. O'Brien, D. Herschlag, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R91–R105. c) S. D. Copley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 265–272. d) A. Aharoni, L. Gaidukov, O. Khersonsky, S. M. Gould, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 73–76. e) O. Khersonsky, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 498–508. f) J. G. Zalatan, D. Herschlag, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1293–1303. g) I. Nobeli, A. D. Favia, J. M. Thornton, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 157–167.
27. a) B. M. Beadle, B. K. Shoichet, *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 285–296. b) R. A. Nagatani, A. Gonzalez, B. K. Shoichet, L. S. Brinen, P. C. Babbitt, *Biochemistry* **2007**, *46*, 6688–6695. c) G. Cheng, B. Qian, R. Samudrala, D. Baker, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5861–5867.
28. a) J. Zaitseva, J. P. Lu, K. L. Olechowski, A. L. Lamb, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 33441–33449. b) C. Gaille, P. Kast, D. Haas, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 21768–21775.
29. O. Kerbarh, D. Y. Chirgadzé, T. L. Blundell, C. Abell, *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 524–534.
30. a) M. S. DeClue, K. K. Baldrige, D. E. Kunzler, P. Kast, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15002–15003. b) D. Kunzler, S. Sasso, M. Gamper, D. Hilvert, P. Kast, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32827–32834.
31. S. Martí, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, J. Bertrán, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16156–16161.
32. M. S. DeClue, K. K. Baldrige, P. Kast, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2043–2051.
33. S. Martí, J. Andrés, V. Moliner, E. Silla, I. Tuñón, J. Bertrán, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2894–2895.
34. J. K. Lassila, J. R. Keefe, P. Kast, S. L. Mayo, *Biochemistry* **2007**, *46*, 6883–6891.
35. a) I. Catrina, P. J. O'Brien, J. Purcell, I. Nikolic-Hughes, J. G. Zalatan, A. C. Hengge, D. Herschlag, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 5760–5765. b) I. Nikolic-Hughes, D. C. Rees, D. Herschlag, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11814–11819. c) K. C. Yang, W. W. Metcalf, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 7919–7924. d) P. J. O'Brien, D. Herschlag, *Biochemistry* **2001**, *40*, 5691–5699. e) J. G. Zalatan, I. Catrina, R. Mitchell, P. K. Grzyska, P. J. O'Brien, D. Herschlag, A. C. Hengge, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 9789–9798.
36. V. López-Canut, M. Roca, J. Bertrán, V. Moliner, I. Tuñón, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6955–6963.
37. M. Klahn, E. Rosta, A. Warshel, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 15310–15323.
38. K. Nam, Q. Cui, J. Gao, D. M. York, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2007**, *3*, 486–504.
39. J. G. Zalatan, T. D. Fenn, D. Herschlag, *Journal of Molecular Biology* **2008**, *384*, 1174–1189.
40. W. F. DeGrado, C. M. Summa, V. Pavone, F. Nastro, A. Lombardi, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 779–819.
41. D. Röthlisberger, O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik, D. Baker, *Nature* **2008**, *453*, 190–195.
42. A. Zanghellini, L. Jiang, A. M. Wollacott, G. Cheng, J. Meiler, E. A. Althoff, D. Röthlisberger, D. Baker, *Protein Sci.* **2006**, *15*, 2785–2794.
43. O. Khersonsky, D. Röthlisberger, O. Dym, S. Albeck, C. J. Jackson, D. Baker, D. S. Tawfik, *J. Mol. Biol.* **2010**, *396*, 1025–1042.
44. L. Jiang, E. A. Althoff, F. R. Clemente, L. Doyle, D. Röthlisberger, A. Zanghellini, J. L. Gallaher, J. L. Betker, F. Tanaka, C. F. Barbas, D. Hilvert, K. N. Houk, B. L. Stoddard, D. Baker, *Science* **2008**, *319*, 1387–1391.
45. J. B. Siegel, A. Zanghellini, H. M. Lovick, G. Kiss, A. R. Lambert, J. L. S. Clair, J. L. Gallaher, D. Hilvert, M. H. Gelb, B. L. Stoddard, K. N. Houk, F. E. Michael, D. Baker, *Science* **2010**, *329*, 309–313.
46. M. P. Frushicheva, J. Cao, Z. T. Chu, A. Warshel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 16869–16874.



EUROanalysis 16
European Conference on Analytical Chemistry
Challenges in Modern Analytical Chemistry
Belgrade, Serbia - Congress Center SAVA - 11-15 September 2011