



EL PREMIO NOBEL DE QUÍMICA 2018: EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE ENZIMAS Y ANTICUERPOS

Resumen

El Premio Nobel de Química 2018, fue otorgado a tres investigadores independientes que de alguna u otra manera a lo largo de su trayectoria contribuyeron a imitar el proceso de evolución natural para manipular genes que codifican la secuencia de proteínas con el fin de modificar su función.

Palabras clave: Premio Nobel 2018, evolución dirigida, biocatálisis, anticuerpos.

THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2018: DIRECTED EVOLUTION OF ENZYMES AND ANTIBODIES

Abstract

The 2018 Nobel Prize in Chemistry was awarded to three independent researchers, who along their academic career contributed in different ways to imitate the process of natural evolution to manipulate genes coding for protein sequences with the aim to modify their function.

Keywords: Nobel prize 2018, directed evolution, biocatalysts, antibodies.

Autor¹: Gloria Saab Rincón

¹ Investigador Titular. Jefe del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, UNAM Cuernavaca, Morelos, México.
*Autor para correspondencia: gsaab@ibt.unam.mx



EL PREMIO NOBEL DE QUÍMICA 2018: EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE ENZIMAS Y ANTICUERPOS

Antes de profundizar en cuál fue la contribución de cada uno de estos visionarios, es importante definir qué es la evolución de proteínas y cómo ocurre en la Naturaleza. Los genes son las secuencias de DNA que codifican para las proteínas, las cuales llevan a cabo gran parte de las funciones en los organismos vivos. Dentro de un organismo, estas proteínas se encuentran funcionando de manera orquestada con el resto de las moléculas en la célula para mantener todas las funciones que permiten la vida. Para su función, una proteína debe tener una estructura terciaria específica que coloca a los aminoácidos capaces de catalizar una reacción (en el caso de las enzimas) en la posición y orientación correcta para interactuar con el sustrato. En su interior, las proteínas se encuentran perfectamente empaçadas. Cada aminoácido interactúa con otros como piezas de lego que embonan perfectamente minimizando el espacio libre. Cualquier cambio de aminoácido puede provocar cambios en esta estructura. El movimiento de apenas décimas de Armstrong en un residuo catalítico puede provocar la pérdida total de la actividad de la proteína. En casos extremos también puede provocar la desestabilización de la estructura al grado de que ni siquiera se logre plegar a su estructura tridimensional.

Dentro de los organismos vivos podemos reconocer proteínas que llevan a cabo la misma función a pesar de tener diferentes secuencias. El reconocimiento de la conservación de algunas regiones en la secuencia de aminoácidos, especialmente los que son relevantes para su función o su estabilidad, nos lleva a inferir que estas proteínas tienen un ancestro común que fue divergiendo para dar lugar a las proteínas que se encuentran hoy en día en cada organismo. A las proteínas que llevan a cabo la misma función y que tienen cierto grado de identidad en su secuencia se les denomina ortólogas. En el DNA, que es la molécula en la que se encuentra codificada la secuencia que va a dar origen a cada proteína, pueden llegar a haber "mutaciones", es decir que cada vez que se separan las cadenas de la doble hélice del DNA para replicarse (copiarse), pueden ocurrir errores en los que se acaba sustituyendo una base de nucleótido por otra, dando lugar a que se genere una secuencia de proteínas con cambios de aminoácidos. En la naturaleza estas mutaciones ocurren con una baja frecuencia y de manera aleatoria. Aquellas mutaciones que proporcionen una ventaja al organismo o que al menos no resulten nocivas para su funcionamiento, son mantenidas en las siguientes réplicas del DNA. Es este proceso de generación de variabilidad y selección lo que da lugar a la evolución de las especies. Una proteína dentro de su contexto biológico se ha seleccionado para funcionar a cierta temperatura, en el caso específico de las enzimas también existe una selección para trabajar a cierta velocidad; incluso pueden haberse seleccionado mecanismos de regulación estructural, para que dependiendo del ambiente la enzima cambie de conformación, siendo menos o más activa, ya que para la subsistencia del organismo tiene que haber un equilibrio metabólico.

Frances Arnold, Instituto Tecnológico de California

Quisiera mencionar que tuve la oportunidad de realizar una estancia Sabática en el laboratorio de Frances de 2006 a 2007, tiempo en el que un gran esfuerzo del laboratorio



se dedicaba a tratar de modificar enzimas para la producción de biocombustibles; específicamente se quería producir metanol a partir de metano, una reacción tan energéticamente desfavorable, que no fue posible lograr el objetivo; sin embargo, en este intento se desarrollaron muchas técnicas novedosas para generar variabilidad en la secuencia del DNA. En sus inicios la generación de variabilidad consistía principalmente en replicar la cadena de DNA, bajo condiciones en que la enzima encargada de hacer la copia del DNA (DNA polimerasa) cometiera errores e hiciera sustituciones de nucleótidos con una frecuencia mayor a la que ocurre naturalmente. Como se mencionó anteriormente, si algunas sustituciones ocurren en un residuo importante para la actividad o estabilidad de la proteína, el resultado será una proteína que ya no es útil. Esto conlleva a que se requiera de una tasa de mutación baja, ya que si ocurren varias mutaciones a la vez en un gen, podría dar lugar a que una mutación benéfica para el objetivo buscado, quedara enmascarada por una mutación nociva o deletérea. La consecuencia de una estrategia como esta, es que se generan una cantidad enorme de genes, muchos de los cuales ni siquiera han sido modificados, y a partir de ellos hay que identificar los pocos que codifiquen para una proteína "mejorada", como ha sido puntualizado por Cohen y colaboradores, es el reto de encontrar la una en un millón (Cohen et al., 2001). La búsqueda de variantes hacia alguna actividad específica lleva implícito el desarrollo de métodos que permitan evaluar esta actividad en un formato que no requiera mucha manipulación, que sea económico y cuya detección sea simple, de manera que se puedan evaluar miles de variantes en unos cuantos días. Este proceso de generación de variabilidad y selección se repite durante varios ciclos. Posteriormente, las variantes mejoradas con respecto al atributo buscado durante la selección, son recombinadas en un proceso que imita la recombinación sexual, en el que las células hijas portan caracteres de ambos padres. De igual manera, los DNAs que codifican para proteínas mejoradas se mezclan para que en su réplica se recombinen las mutaciones presentes en los genes parentales. Lo que en la Naturaleza ocurre en millones de años, en el laboratorio de la Dra. Frances Arnold se reproducía en unos cuantos meses. En el desarrollo de técnicas para realizar esta recombinación hubo grandes aportaciones tanto del grupo de Frances Arnold como de Peem Stemmer quien fundó varias compañías biotecnológicas y que, de no haber fallecido en 2013, seguramente hubiera compartido esta presea con Frances Arnold.

Hasta ahora, sólo nos hemos referido a la generación de mutantes puntuales, sin embargo, en la naturaleza las diferencias no sólo implican cambios discretos de aminoácidos, sino que las proteínas ortólogas pueden tener tamaños diferentes, implicando que durante la evolución ha habido inserciones o deleciones de fragmentos de DNA. Implementar este tipo de cambios en genes manipulados en el laboratorio, sin alterar su estabilidad y/o su función es mucho más complicado. Tomando esto en consideración y que la recombinación es más conservadora que la mutagénesis azarosa, la Dra. Frances Arnold y su grupo de trabajo desarrollaron algoritmos computacionales que toman en cuenta la estructura de las proteínas para identificar los puntos en los que se pudieran realizar recombinaciones entre los genes que codifican para proteínas ortólogas sin provocar grandes perturbaciones en la estabilidad de la proteína y con ellos se desarrolló una metodología para formar genes quiméricos, llamada SCHEMA (Meyer et al., 2003; Voigt et al., 2002). La recombinación de los fragmentos de DNA así identificados, generan una gran cantidad de proteínas nuevas, de diferentes tamaños, pero, sobre todo, con un alto porcentaje de proteínas plegadas de manera correcta, por

lo que el esfuerzo de búsqueda de variantes activas se reduce considerablemente. La exploración de actividades novedosas en las bibliotecas generadas ha permitido identificar algunas capaces de catalizar reacciones que no existen en la naturaleza y que pueden producir compuestos de interés industrial (Li et al., 2007), entre ellos biocombustibles y fármacos. Un logro todavía más aventurado fue expandir el repertorio de reacciones catalizadas enzimáticamente para formar enlaces no existentes en moléculas biológicas como enlace Si-C (Kan et al., 2016), y compuestos organoborados (Kan et al., 2017).

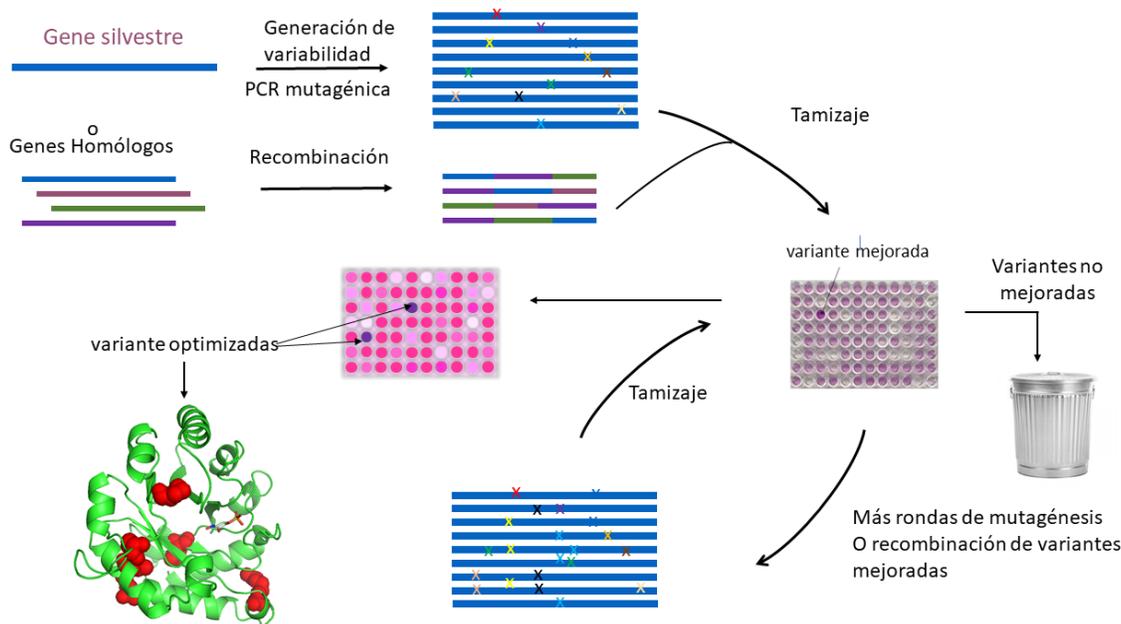


Figura 1. Proceso de Evolución dirigida de una proteína mediante ciclos de generación de variabilidad-selección

George P. Smith, profesor emérito de la Universidad de Missouri

Por su parte, George P. Smith desarrolló el método de despliegue en fagos (Phage Display, en inglés). Como se mencionó antes, uno de los grandes retos en la evolución dirigida, es encontrar a la proteína optimizada entre más de un millón de variantes menos buenas, en el mejor de los casos, o no funcionales en la mayoría. En el laboratorio del D. Smith se desarrolló un ingenioso método que permite desplegar en la superficie de un fago a las variantes de proteínas generadas mediante los métodos de mutagénesis como los descritos anteriormente. Para ello se construye a nivel del genoma del fago una fusión entre el gen que codifica para la proteína de interés y el de una proteína del fago que normalmente forma parte de su superficie exterior, de manera que la proteína de interés queda pegada a la superficie del fago. El desarrollo de esta tecnología fue implementado originalmente para exponer en la superficie de los fagos epítopes de antígenos y a través de la inmovilización de estos fagos poder seleccionar anticuerpos que se unieran a estos epítopes (Smith, 1985; Smith, 1991). El método presenta mucho más potencial, se puede utilizar no sólo para exponer fragmentos de proteínas, sino proteínas completas con las ventajas que a continuación se mencionan. Los fagos tienen la capacidad de infectar a las células de bacteria introduciendo su material genético con muy alta eficiencia, órdenes de magnitud mayor a la eficiencia de los métodos tradicionales, como la transformación

química o la electroporación en la que se permeabiliza de manera momentánea la membrana de las células para que se introduzcan plásmidos con los genes que codifican para la proteína de interés. Para ponerlo en contexto, mientras que trabajando los genes en plásmidos para transformar células de bacterias se logran librerías de alrededor de 100,000 a un millón de variantes, cuando se manejan en fagos, se pueden obtener bibliotecas de mil millones de variantes. La segunda ventaja es que al encontrarse en la superficie la proteína de interés, se puede medir su actividad sin necesidad de romper a las células para extraer a las proteínas, incluso en algunos casos en los que se tiene conocimiento del mecanismo de la reacción que cataliza una enzima, se puede aprovechar el principio fundamental de que las enzimas han desarrollado una alta afinidad por el estado de transición de la reacción, más que por el sustrato; de manera que si se inmoviliza un análogo al estado de transición en un material inerte, se puede hacer pasar toda la biblioteca de variantes a través de esta matriz y sólo se pegarán aquellas variantes capaces de unir al análogo, que presumiblemente deben ser las más activas. Como se puede imaginar, esta metodología permite acelerar de una manera exponencial el proceso de evolución de una proteína, ya que en un solo paso se pueden muestrear mil millones de variantes y quedarse sólo con unos cuantos cientos que tengan una buena afinidad por el análogo del estado de transición. La tercera ventaja es que, al hacer este tamizaje, el fago contiene el material genético que codifica para esas proteínas seleccionadas, de manera que se puede secuenciar fácilmente para saber los cambios de secuencia que dieron lugar al mejoramiento del atributo deseado en la proteína.

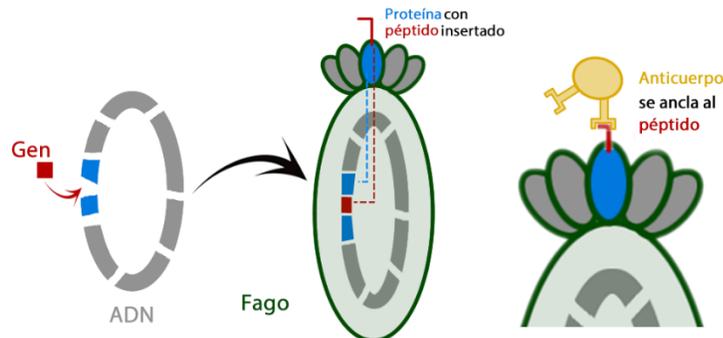


Figura 2. En esta figura se muestra el uso de despliegue en fagos, en el cual un péptido es expresado en la superficie del fago y se puede seleccionar de una muestra compleja de anticuerpos, aquellos capaces de unir al péptido con alta afinidad.

Gregory P. Winter, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge

Greg Winter por su parte, hizo uso del despliegue en fagos para evolucionar péptidos y anticuerpos. Los anticuerpos son proteínas que se generan en cada organismo como mecanismo de defensa contra cualquier agente invasor, llámese toxina o virus. Estas moléculas son capaces de reconocer cualquier sustancia extraña al organismo y la unen y rodean para de esta manera evitar que interaccione con proteínas de la célula y que impidan su correcto funcionamiento. De manera tradicional las vacunas se obtenían inmunizando caballos con el inmunógeno (toxina o virus) como lo hizo Edward Jenner en 1796 para desarrollar la primera vacuna contra la viruela. Sin embargo, una gran desventaja de esta metodología es que los anticuerpos generados en otros organismos pueden provocar una respuesta inmune en el ser humano pudiendo ser más letal que la intoxicación o infección que se quería evitar. Estructuralmente los anticuerpos tienen una forma de letra "Y". La región que comprende la base de la Y es específica dentro de cada organismo y es la región que puede provocar una respuesta inmune, mientras que las

regiones que comprenden los brazos de la "Y" son donde se concentran los aminoácidos que reconocen a los antígenos y son regiones hipervariables que permiten en los organismos que rápidamente se obtengan y selecciones anticuerpos específicos contra cualquier agente agresor. En el grupo del Dr. Winter diseccionaron el DNA que codifica para la región variable pesada de los anticuerpos para desplegarla en la superficie de fagos y mediante mutagénesis azarosa y unión de los fagos a antígenos inmovilizados en una matriz sólida, fueron capaces de evolucionar anticuerpos de alta afinidad contra muchos antígenos, imitando de manera artificial al sistema inmune (Hawkins, Russell & Winter, 1992; Marks & Winter, 1992). El potencial de esta tecnología es invaluable. Se pueden generar anticuerpos contra marcadores específicos para diagnóstico de enfermedades, anticuerpos que reconozcan de manera selectiva células tumorales para unir a ellos los fármacos para una quimioterapia más selectiva y con menos efectos adversos en el paciente, desarrollar anti-venenos, en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, etc.

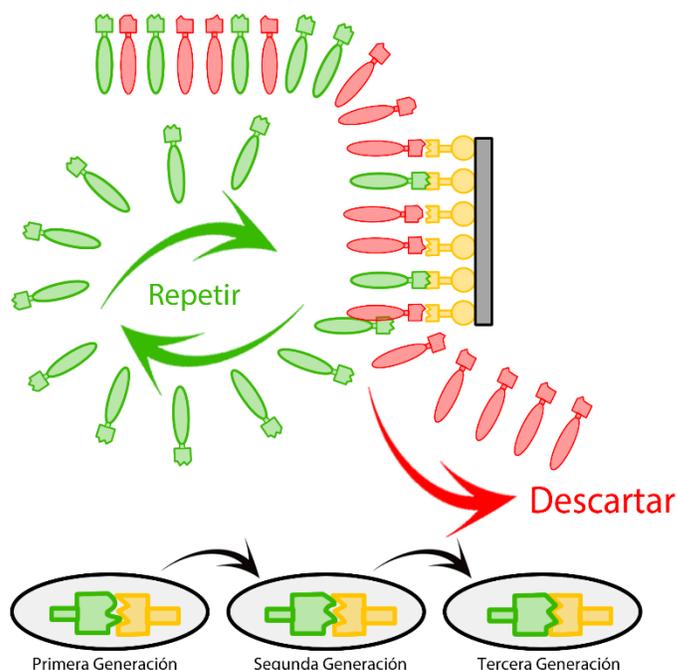


Figura 3. El uso de despliegue en fagos para la selección de anticuerpos contra una molécula blanco. La librería de anticuerpos completos o sólo de las cadenas variables unidas covalentemente es generada a través de evolución acelerada (mutagénesis azarosa en la región variable) y la mezcla de fagos se hace pasar a través de un soporte en el que está inmovilizada la molécula blanco, de manera que los anticuerpos que la unen con alta afinidad quedan retenidos en el soporte.

Relevancia

El premio Nobel de Química 2018 se otorga a tres investigadores que demostraron que era posible imitar el proceso de evolución natural en el laboratorio y de manera acelerada. El reconocimiento a la Dra. Frances Arnold es por sus contribuciones en el desarrollo de metodología para generar variabilidad y la selección de actividades desafiantes para desarrollar nuevos biocatalizadores. La contribución del Dr. Smith facilitó enormemente el escrutinio de grandes librerías de variantes permitiendo incrementar en al menos tres órdenes de magnitud el espacio de secuencia muestreado durante el tamizaje. Por su parte, el Dr. Winter, aplicó la tecnología desarrollada por George Smith para



aplicarla en fragmentos sintéticos de anticuerpos, pudiendo así encontrar anticuerpos contra prácticamente cualquier inmunógeno que se desee. Las aplicaciones de estas contribuciones están limitadas sólo por la imaginación. Sólo como ejemplo Arnold llevó a las enzimas a catalizar reacciones con elementos diferentes al Carbono y ajenos a moléculas biológicas. Por otro lado, el poder generar anticuerpos en una gran cantidad contra prácticamente cualquier blanco es sin duda uno de los más grandes avances en el campo de la medicina para diagnóstico y para terapia.

Referencias bibliográficas

- Cohen N, Abramov S, Dror Y, Freeman A. 2001. *In vitro enzyme evolution: the screening challenge of isolating the one in a million*. Trends Biotechnol 19:507-510.
- Hawkins RE, Russell SJ, Winter G. 1992. *Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation*. J Mol Biol 226:889-896.
- Kan SB, Lewis RD, Chen K, Arnold FH. 2016. *Directed evolution of cytochrome c for carbon-silicon bond formation: Bringing silicon to life*. Science 354:1048-1051. [10.1126/science.aah6219](https://doi.org/10.1126/science.aah6219)
- Kan SBJ, Huang X, Gumulya Y, Chen K, Arnold FH. 2017. *Genetically programmed chiral organoborane synthesis*. Nature 552:132-136. [10.1038/nature24996](https://doi.org/10.1038/nature24996)
- Li Y, Drummond DA, Sawayama AM, Snow CD, Bloom JD, Arnold FH. 2007. *A diverse family of thermostable cytochrome P450s created by recombination of stabilizing fragments*. Nat Biotechnol 25:1051-1056.
- Marks JD, Winter G. 1992. *An artificial immune system for making antibodies*. Behring Inst Mitt:6-12.
- Meyer MM, Silberg JJ, Voigt CA, Endelman JB, Mayo SL, Wang ZG, Arnold FH. 2003. *Library analysis of SCHEMA-guided protein recombination*. Protein Sci 12:1686-1693.
- Smith GP. 1985. *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science 228:1315-1317.
- Smith GP. 1991. *Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems*. Curr Opin Biotechnol 2:668-673.
- Voigt CA, Martinez C, Wang ZG, Mayo SL, Arnold FH. 2002. *Protein building blocks preserved by recombination*. Nat Struct Biol 9:553-558.