

PROTEÍNAS A MEDIDA

Juan Carlos Calvo

Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA. Investigador Independiente, CONICET. Director del Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA.

Recibido:

Recibido en: 04/07/2003

| Aceptado:

Aceptado en: 22/07/2003

Contacto: Juan Carlos Calvo - no_disponible

El otro día, mientras viajaba en subte, observé a una persona, probablemente un profesor o maestro, corrigiendo lo que parecía ser una composición cuyo tema era “Zapatillas a medida”. En ese momento, se me ocurrió el título para este comentario: “Proteínas a medida”.

Evidentemente, la gran variedad de seres humanos hace necesaria la existencia de productos hechos “a medida”: trajes, vestidos, zapatillas, etc.

Y esto cumple la función de cubrir las necesidades de cada individuo, haciendo la vida más confortable.

Y esto no es algo nuevo. Desde que el hombre se irguió sobre sus pies y observó a su alrededor, encontró animales y vegetales para su consumo, y también, para que lo ayudaran en su trabajo, por ejemplo: como animales de tiro.

Y esto le trajo bienestar, tanto a él como a sus vecinos. Pero, el avance trajo consigo nuevas necesidades, algunas vitales y otras que tenían que ver con deseos de progresar y estar mejor.

Con esto surge la Biotecnología, el uso de organismos biológicos o sus componentes, para el desarrollo de productos o la prestación de servicios. Y, así, combinó especies vegetales obteniendo especies híbridas con características particulares: resistencia a las heladas, a plagas, mejor sabor, aspecto, etc., por supuesto sin saber cómo ocurría esto. Y su curiosidad aumentó, dando paso a la investigación científica con avance en el conocimiento, y en paralelo, el desarrollo tecnológico.

Pasaron los años y el conocimiento avanzó desde el exterior hacia el interior de los organismos, llegando al nivel molecular.

Con el estudio de la manera de manejar la información por las células se llegó a la posibilidad de manipular dicha información. Y surgió la Ingeniería Genética, de la mano de la Biología Molecular, que no es más que la Química de la Vida (Química Biológica) aplicada especialmente a los procesos relacionados con el material genético y anexos.

Llegamos a la era del “Proyecto Genoma Humano”, con el desciframiento completo de nuestra información genética. O casi completo, porque la actividad dentro de nuestras células la lleva a cabo el conjunto de proteínas, organizadas en caminos metabólicos, entrelazados entre sí dando lugar al llamado

“Metaboloma”.

Como ocurrió en los inicios de la actividad humana, el mayor conocimiento de los sistemas llevó al deseo de mejorarlos, para que sirvieran mejor a las necesidades de los individuos.

Y del “Proyecto Genoma” se pasó al “Proyecto Proteoma”, o “Genómica Funcional”, visto que si la información contenida en el genoma no se expresa en otras moléculas funcionales (por ejemplo: proteínas) de nada servirá. Y el mejor conocimiento de la relación entre estructura, conformación espacial y función llevó a ese deseo, desde el comienzo insertado en el ser humano, de modificar la naturaleza para su bienestar, a querer rediseñar las proteínas, modificando la actividad de las mismas.

Evolución, la adaptación gradual a una presión selectiva, es la manera que tiene la naturaleza de responder a los variados desafíos ambientales. El principio evolutivo puede describirse como ciclos repetidos de introducción de mutaciones en el genoma, selección de fenotipos beneficiosos y pasaje de las mutaciones seleccionadas a la descendencia, en forma directa (propagación vegetativa) o vía recombinación genética con una pareja (propagación sexual).

Los productos de una evolución Darwiniana son aparentes a todo nivel, desde la impresionante diversidad en los organismos vivientes hasta las moléculas proteicas individuales. Los científicos que desean rediseñar estas mismas moléculas, están implementando su propia versión del algoritmo evolutivo. La llamada “evolución dirigida” que nos permitirá explorar funciones enzimáticas no requeridas por el medio ambiente natural y aquellas cuyas bases moleculares no se comprenden en detalle.

En definitiva, podríamos decir que es una forma de modificar la evolución, actuando directamente sobre las moléculas en cuestión, ya sea desde el comienzo modificando la información genética o, *a posteriori*, modificando directamente a la molécula de interés.

Si se reconstruye la historia evolutiva de las proteínas actuales, aprendemos que son moléculas altamente adaptables, al menos en la escala del tiempo evolutivo. Muchas de las enzimas que catalizan reacciones diferentes han evolucionado en forma divergente a partir de un ancestro común, adquiriendo capacidades muy diversas por procesos de mutación al azar, recombinación y selección natural. También sabemos que las enzimas que comparten una función común, por ejemplo, catalizan un paso particular en un camino metabólico, además de su estructura tridimensional pueden exhibir propiedades muy diferentes (estabilidad, solubilidad, tolerancia a pH, etc.) dependiendo de dónde se las encuentre.

¿Por qué la necesidad de una evolución dirigida?

Cuando se utilizan enzimas naturales para una aplicación industrial, para servir como catalizadores en síntesis químicas o como aditivos en detergentes de lavandería, se descubre que no se adaptan bien para estas tareas. Debido a la poca solubilidad del sustrato, ruptura de productos inestables o reacciones competidoras, las condiciones para una reacción enzimática pueden no ser apropiadas para una aplicación a gran escala.

Es posible producir nuevas enzimas en organismos recombinados, alterando la secuencia de aminoácidos y, por lo tanto, las propiedades mediante modificaciones apropiadas a nivel del ADN. Sin embargo, la experiencia demuestra que los cambios en las propiedades enzimáticas provienen de la acumulación de pequeños ajustes, muchos de los cuales están distribuidos a lo largo de distancias significativas en la molécula.

La evolución es una herramienta poderosa con habilidad comprobada para alterar la función enzimática y, especialmente, para ajustar las propiedades enzimáticas. Es un algoritmo que puede ser implementado en el laboratorio para rediseñar. El reto es comprimir la escala de tiempo a meses, o aún semanas.

A partir de este momento, pasamos a temas un poco más específicos y, tal vez, algo más complicados. Espero que las figuras ayuden a comprender un poco mejor estos conceptos.

¿Cómo hacer esto?

En estos momentos, tenemos a nuestro alcance oportunidades sin precedentes para generar nuevas enzimas y biocatalizadores, utilizando técnicas sofisticadas que mutan, recombinan y amplifican las secuencias de ácidos nucleicos.

Un experimento típico de evolución dirigida comienza con la selección de una biblioteca de secuencias de ADN parental que codifique para proteínas que involucran, en parte, la propiedad buscada. La diversidad de secuencias exploradas es, luego, incrementada mediante el paso de mutagénesis, introduciendo mutaciones nucleotídicas puntuales al azar y/o por recombinación de fragmentos de ADN. El paso de mutagénesis y fragmentación deja a todas, con pocas excepciones, las secuencias inactivas. Estas secuencias de ADN son, luego, ligadas a un vector de expresión y se transforman células de *Escherichia coli*. Luego, se emplea un procedimiento de búsqueda (“screening”) para aislar las pocas células transformadas que contienen las secuencias codificantes para enzimas activas o proteínas funcionales. Estas secuencias seleccionadas son, luego, amplificadas y se repite el ciclo de mutagénesis, búsqueda y amplificación, múltiples veces, hasta que se encuentran las proteínas con la función o propiedad deseadas.

Estrategias para las mutaciones.

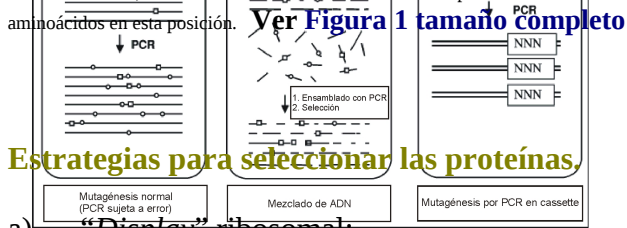
La mutagénesis de un gen puede realizarse en forma diseminada a lo largo de una secuencia o dirigida a una región en particular.

La primera puede lograrse mediante la llamada “PCR con predisposición a errores” (“error-prone PR”) o mediante la tecnología de “mezclado de ADN” (“DNA-shuffling”).

En la primera, el gen de interés es amplificado con una ADN polimerasa en condiciones donde la fidelidad transcripcional es baja y se introducen errores en las copias generadas. Dado que la mayoría de las mutaciones no son beneficiosas, dos mutaciones favorables se acumularán en el mismo gen, solamente con baja probabilidad y muchas mutaciones beneficiosas serán enmascaradas por las deletéreas. Para combinar varias mutaciones deseables, se utiliza un segundo método, donde el conjunto de fragmentos de ADN generado por la PCR es digerido por DNasa I, una enzima que corta en forma inespecífica, y se reensamblan los trozos por PCR. En principio, cada mutación puede ser recombinada y propagada individual e independientemente de otras mutaciones. Este proceso se asemeja al “crossing-over” que tiene lugar en los cromosomas de los organismos vivientes.

Para introducir mutaciones solamente en una región particular de un gen, puede utilizarse la mutagénesis en *cassette* por PCR. El fragmento de ADN conteniendo el punto mutado es recortado entre dos sitios de restricción flanqueantes. Luego, un producto de PCR, que puede ligarse exactamente en estos sitios de restricción, se genera con un cebador degenerado. Este iniciador se sintetiza químicamente para llevar una mezcla al azar de nucleótidos en uno o más codones y la proteína codificada lleva, por lo tanto, un conjunto de aminoácidos al azar, en esta posición particular. Desafortunadamente, un codón completamente formado al azar exhibirá una fuerte desviación hacia algunos aminoácidos que son codificados por más de un codón, por ejemplo, el aminoácido serina es codificado por seis codones diferentes, mientras que triptofano está codificado por un solo codón), siendo también difícil evitar la incorporación de un codón de terminación. La solución a este problema es usar trinucleótidos presintetizados (codones) para todos los 20 aminoácidos como bloques de construcción para la síntesis de ADN de los oligonucleótidos, en lugar de utilizar los mononucleótidos convencionales. Estos bloques pueden ser mezclados en cualquier proporción y solamente se necesita agregar aquellos trinucleótidos que el investigador desea en esta posición en la secuencia proteica.

Figura 1.- Estrategias para mutagénesis, con el fin de obtener las modificaciones localizadas o en genes enteros. En el panel (A) se muestra en forma esquemática el proceso de PCR “sujeto a error”, como una estrategia para la distribución no dirigida de mutaciones en un gen de interés. Se muestran dos tipos de mutaciones, las favorables (cuadrados) y las desfavorables (círculos). En ciclos sucesivos de PCR, se introducen más mutaciones de cada tipo y, generalmente, las moléculas contendrán alguna de cualquier tipo. Así, el efecto beneficioso de las mutaciones favorables puede ser opacado, completamente, por la presencia de las desfavorables. Una posible solución a este problema, se muestra en el panel (B) y se conoce como “mezclado de ADN”. El producto de PCR se corta en pequeños trozos, utilizando la enzima ADNasa I y se reensamblan, subsecuentemente, mediante PCR. Las mutaciones quedan, por lo tanto, cruzadas y los genes con el mayor número de mutaciones favorables pueden ser enriquecidos por selección. El panel (C) muestra el principio de PCR utilizando un “primer degenerado”. Este “primer” o iniciador contiene una mezcla de todos los cuatro posibles nucleótidos (abreviados en la letra N) en una posición determinada o, alternativamente, una mezcla de codones ensamblados a partir de trinucleótidos. Las proteínas sintetizadas a partir de este gen llevarán, por lo tanto, un grupo “randomizado” de aminoácidos en esta posición.



Estrategias para seleccionar las proteínas.

a) “Display” ribosomal:

Se transcribe una biblioteca de ADN, *in vitro*, a ARN mensajero utilizando ARN polimerasa. Esta biblioteca de ARN mensajero puede traducirse a proteína, utilizando la maquinaria bacteriana (extracto bacteriano S30). Luego de detener la traducción por enfriamiento y aumentando la concentración de magnesio, el ARN mensajero (ARNm), el ribosoma y la proteína recién sintetizada formarán un complejo ternario. Los complejos ribosomales deseados se seleccionan por afinidad, de la mezcla de traducción, por unión de la proteína nativa al antígeno inmovilizado. Los complejos ribosomales no específicos se eliminan por lavado exhaustivo. Los complejos ribosomales unidos se eluyen con antígeno y se puede recuperar el ARNm y transcribirlo en forma reversa obteniendo cADN (ADN copia) mediante la técnica de RT-PCR. Este cADN puede utilizarse en el próximo ciclo de enriquecimiento o puede analizarse por secuenciación.

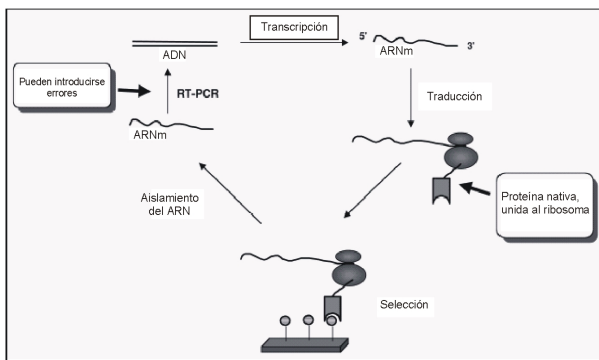


Figura 2.- Principio de búsqueda y selección de una proteína ligadora, a partir de una biblioteca de ADN, utilizando la tecnología del “display” ribosomal.

Ver Figura 2 tamaño completo

b) Ensayo de complementación de fragmentos proteicos (PCA), para la selección simultánea de interacciones proteína/proteína.

En este método, una biblioteca proteica puede ser analizada contra otra biblioteca proteica. Esto es útil para obtener un mapa de proteínas interactuantes dentro de un organismo pero también, para identificar ligandos de una biblioteca de anticuerpos.

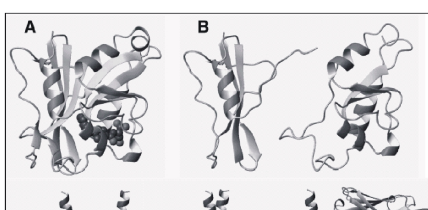


Figura 3.- Principio del ensayo de complementación de fragmentos proteicos: (A) Enzima dihidrofolato reductasa murina (DHFR), nativa, mostrada como diagrama de “cinta”. Esta enzima es importante para la biosíntesis de purinas, timidilato, metionina y pantotenato. En esta figura, también se muestra al cofactor folato, en un modelo espacial. Si esta enzima se parte, genéticamente, en dos (B), los fragmentos no se reasociarán y se perderá la actividad. Por lo tanto, se impide la división y el crecimiento celular en un medio mínimo. La fusión de los fragmentos individuales a dominios proteicos, formando un complejo (C) puede dirigir el reensamblado de los fragmentos de DHFR, recuperándose la actividad (D). Este sistema se utiliza, en la actualidad, para seleccionar anticuerpos scFv, a partir de una biblioteca de ADN, contra “blancos” definidos, fusionados a un fragmento de la DHFR (E).

Ver Figura 3 tamaño completo

Existen cuatro requerimientos para una evolución dirigida exitosa: 1) la función deseada debe ser físicamente posible, 2) la función debe ser, también, biológica o evolutivamente posible, 3) también debe ser posible obtener bibliotecas de mutantes, lo suficientemente complejas como para contener mutaciones beneficiosas y, 4) debe existir una forma rápida de seguimiento o selección que refleje la función deseada.

Recientemente se ha obtenido un gran éxito en la obtención de enzimas con utilidad industrial, con una mejora sustancial en la actividad y termoestabilidad, como así también de vacunas y productos farmacéuticos.

Cada vez cobra más realidad la afirmación: “el hombre se ha convertido en la primera criatura de la evolución, capaz de modificar la evolución”. El futuro dirá hasta dónde se podrán diseñar proteínas “a medida” de las necesidades que vayan surgiendo.

Por ahora, nos encontramos como nuestro antecesor prehistórico: asombrados ante la enorme vastedad de posibilidades y dispuestos a escribir un nuevo capítulo en la historia de los avances científicos.

Solamente resta esperar que todo sea para bien.

Bibliografía consultada:

-Modelling DNA mutation and recombination for directed evolution experiments. Gregory L. Moore and Costas D. Maranas J. theor. Biol. (2000) 205: 483-503

-Directed evolution with fast and efficient selection technologies. Ekkehard Mössner and Andreas Plückthun Chimia (2001) 55: 324-328

-<http://www.che.caltech.edu/groups/fha/Enzyme/directed.html> Directed enzyme evolution. Frances H. Arnold.

Química Viva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista Química Viva

Volumen 2, Número 2, Agosto de 2003

ID artículo:F1016

DOI: no disponible

[Versión online](#)