

Vida científica

SEMBLANZAS DE LOS PREMIOS NOBEL 2018

EN QUÍMICA

INTRODUCCIÓN

La Real Academia de las Ciencias de Suecia ha otorgado la mitad del Premio Nobel en Química 2018, a Frances H. Arnold por sus estudios en evolución molecular dirigida de enzimas y la otra mitad, a George P. Smith y Gregory P. Winter, por la presentación en fagos (*phage display*) de péptidos y anticuerpos. Ambos estudios han reproducido en el laboratorio, los principios de la evolución natural postulada por Darwin, para mejorar y obtener nuevas proteínas que pueden conducir a grandes avances en tecnología y medicina.

Frances H. Arnold es la quinta mujer galardonada con el Premio Nobel en Química, después de Maria Skłodowska-Curie (1911), Irène Joliot-Curie (1935), Dorothy Crowfoot Hodgkin (1964) y Ada Yonath (2009). Graduada en Ingeniería Mecánica y Aeroespacial por la Universidad de Princeton y más tarde, doctora en Inge-

nería Química por la Universidad de California en Berkeley. Durante su estancia postdoctoral en Caltech se interesó en la química y en la biología de las enzimas, y es donde actualmente sigue desarrollando su actividad.

George P. Smith, se graduó en Haverford College (Pensilvania) en biología, para doctorarse más tarde en la Universidad de Harvard en bacteriología e inmunología. Realizó su estancia postdoctoral en la Universidad de Duke con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina, Oliver Smithies, y después de trasladó a la Universidad de Missouri. Realizó una estancia postdoctoral en Columbia con Robert Webster donde comenzó a desarrollar la técnica de presentación en fagos. En la actualidad es profesor emérito en la Universidad de Missouri donde ha desarrollado gran parte de su carrera científica.

Gregory P. Winter, se graduó en Biología en la Universidad de Cambridge (Trinity College) para doctorarse en el Laboratory for Molecular Biology (LMB) en Cambridge. Su carrera científica se ha desarrollado en el LMB y en el Center for Protein Engineering (CPE) del MRC (Medical Research Council). Su gran logro, ha sido utilizar la técnica de presentación en fagos para producir anticuerpos monoclonales humanos. Actualmente es investigador emérito del LMB.



Frances H. Arnold (Pittsburgh, EE.UU., 1956), doctora por la Universidad de California, Berkeley (Estados Unidos). Actualmente es profesora en el Instituto de Tecnología de California (Caltech), Pasadena (EE.UU.).



George P. Smith (Norwalk, Estados Unidos, 1941), doctor por la Universidad de Harvard (EE.UU.). Actualmente es profesor emérito en la Universidad de Missouri, Columbia (EE.UU.).



Gregory P. Winter (Leicester, Reino Unido, 1951), doctor por la Universidad de Cambridge (Reino Unido). Actualmente es investigador emérito del Laboratorio de Biología Molecular del MRC, Cambridge (Reino Unido).

PRESENTACIÓN O VISUALIZACIÓN EN FAGOS

A finales de los años ochenta, el biólogo americano George P. Smith desarrolló la técnica llamada en inglés *phage display* (presentación o visualización en fagos) [1]. Esta técnica ha permitido usar el fundamento de la evolución, es decir, la capacidad de los organismos de sufrir mutaciones iterativas unido a la selección natural, ambas necesarias para la supervivencia en la naturaleza [2]. Ejemplos de evolución dirigida fenotípicamente, son la selección de un tipo determinado de cultivos en agricultura o las razas de determinadas especies del reino animal seleccionadas por los humanos. En el caso de la evolución dirigida de las enzimas, esta selección se hace desde el punto de vista genotípico. Es precisamente la diversidad genética la que cataliza la evolución. Las proteínas han evolucionado gracias a las mutaciones genéticas aleatorias que se transmiten durante la reproducción y cuyo fin, es la supervivencia de los organismos. La evolución natural es un proceso complejo en el que están implicados varios genes y hoy en día gracias a las técnicas de las que hablaremos más adelante, ha sido posible “resucitar” proteínas muy antiguas que ya no existen como tales en el mundo natural [3].

Este proceso evolutivo, para que fuera visible en la escala temporal de un experimento de laboratorio, sería muy lento si se dejase actuar a la naturaleza. Cada familia de proteínas tiene una base común u homóloga y los cambios genéticos ocurridos, han sido los responsables de codificar cambios en la estructura proteica, de modo que su función ha sido modificada.

Los bacteriófagos o fagos son virus capaces de infectar bacterias y actúan como vectores de transferencia horizontal de información genética, y están implicados en la evolución de las bacterias. Por ello, han atraído la atención de la comunidad científica debido a sus aplicaciones en transferencia genética, para el desarrollo de técnicas diagnósticas y de terapia génica. Los bacteriófagos fueron descubiertos por Twort en 1917 y por d’Herelle en 1917 [4]. En la naturaleza se encuentran en lugares donde hay grandes poblaciones de bacterias, como por ejemplo en suelos y en entornos de agua salada. Los bacteriófagos se han usado como alternativa a los antibióticos antes del descubrimiento de estos últimos [5].

La presentación o visualización en fagos es una variante de la tecnología standard de DNA recombinante. Como sabemos, la síntesis de proteínas está controlada

por la replicación del DNA que contiene las secuencias que codifican los aminoácidos de las proteínas. Cuando introducimos un vector o fago en el DNA de un anfitrión este va a crear nuevas generaciones del anfitrión que expresarán una determinada proteína. La característica principal de los vectores de DNA, es que pueden incorporarse en el genoma de otro organismo, ya sea una bacteria, DNA humano o DNA sintético.

Un vector de expresión de proteínas que puede ser parte de un vector de visualización en fago tiene como característica principal el poder expresar una proteína codificada por su propio genoma. Es decir, es capaz de usar la maquinaria del organismo anfitrión para sintetizar la proteína determinada por su secuencia de nucleótidos [6].

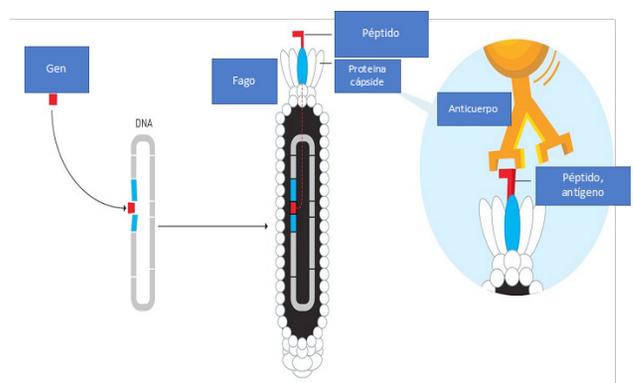


Figura 1. Presentación de fagos. Fuente: adaptado de Johan Jarnestad / The Royal Academy of Science.

Los vectores de visualización en fagos se diferencian de los vectores de expresión normales en que el gen que codifica la proteína que se quiere expresar se inserta en el gen que codifica una determinada proteína de la cápside del bacteriófago. Se genera así, una proteína híbrida. Esta se incorpora a la envoltura proteica del bacteriófago al ser expulsada del organismo anfitrión de manera que la proteína codificada está en el exterior del bacteriófago (virión) y en su interior el material genético que la codifica. El poder de esta técnica es que conecta el fenotipo con el genotipo. La proteína puede participar en procesos de cribado para detectar las interacciones con otras moléculas *in vitro* del mismo modo que ocurre en la selección natural.

Los bacteriófagos más usados son los llamados filamentosos que infectan bacterias como *Escherichia coli*. Su genoma consiste en una hebra de DNA que se recombina para reproducirse y producir las proteínas de la envoltura del fago. Estas nuevas proteínas híbridas encapsulan el material genético y son expulsadas del orga-

nismo anfitrión. Este tipo de fagos presenta muchas ventajas como vector de clonación, por ejemplo, su genoma tolera la inserción en zonas no esenciales sin que se modifique la estructura de su proteína externa, su genoma puede ser aislado tanto en forma de una hebra o de doble hebra para clonación y generación de bibliotecas de fagos. El tipo más común de estas bibliotecas es el que genera péptidos con mutaciones aleatorias.

Gregory Winter utilizó esta técnica para producir anticuerpos monoclonales [7]. La presentación en fagos aplicada a la producción de anticuerpos ha permitido producir anticuerpos tolerados por nuestro sistema inmune. Se generan bibliotecas de anticuerpos específicos para determinados antígenos que pueden ser dirigidas mediante la propagación del vector de manera que en unas generaciones pueden obtenerse anticuerpos monoclonales, es decir, anticuerpos que reconocen un solo antígeno, como puede verse en la Figura 2. De hecho, en 2002 se aprobó el primer medicamento basado en anticuerpos humanos, Humira (adalimumab), que presenta una doble acción. Por un lado, disminuye el efecto del factor de necrosis tumoral (TNF- α), una citoquina implicada en procesos inflamatorios y por otra, induce la apoptosis (muerte celular) de linfocitos que se encuen-

tran anormalmente activados. Entre las aplicaciones del adalimumab encontramos el tratamiento de la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la artritis psoriásica, la psoriasis y la hidradenitis supurativa. Esta técnica supuso un gran avance ya que hasta entonces los anticuerpos se producían por procesos inmunológicos y no existían anticuerpos humanos comerciales [8].

EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE ENZIMAS

Las enzimas, son proteínas que catalizan las diferentes reacciones químicas que conforman el metabolismo celular de los seres vivos permitiendo la evolución de las especies a lo largo de los años. Su gran complejidad estructural les dota de una gran eficiencia y especificidad que les diferencia de los catalizadores químicos. Por otro lado, hay que destacar que las condiciones de reacción de la catalisis enzimática son suaves (pH neutro, temperatura ambiente y soluciones acuosas), por lo que su aplicación biotecnológica e industrial se encuentra limitada debido a que en estos procesos las condiciones de reacción son más drásticas (disolventes orgánicos, temperaturas elevadas, pH extremo, etc.) originando la inactivación o la desnaturalización de la enzima.

En las últimas tres décadas se han desarrollado un gran número de investigaciones de ingeniería molecular de enzimas, centrándose en el estudio de la relación estructura-función proteica, dando lugar a una amplia variedad de enzimas de interés industrial. Pero nuevamente surgen inconvenientes, debido a la gran complejidad de las enzimas que en muchos casos conduce al desconocimiento de la informacional estructural y de los mecanismos requeridos. Como alternativa a la posible solución de estos problemas surge la evolución dirigida de enzimas y de esta manera se crean enzimas más pequeñas y estructuralmente más sencillas que se utilizan para fabricar desde combustibles a productos farmacéuticos [9,10].

En este proceso, se seleccionan unos genes que serán sometidos a repetidas mutaciones y que serán expresados por bacterias para que produzcan enzimas mutantes. Estos se ensayarán en la reacción catalítica, de manera que alterando rasgos específicos de la molécula parental, se llegue a un nivel de rendimiento satisfactorio en términos de actividad enzimática (Figura 3) [9,11].

Con la evolución dirigida, se consigue aumentar el rendimiento de las reacciones pudiendo utilizar temperaturas más elevadas, alta acidez o basicidad, disolventes

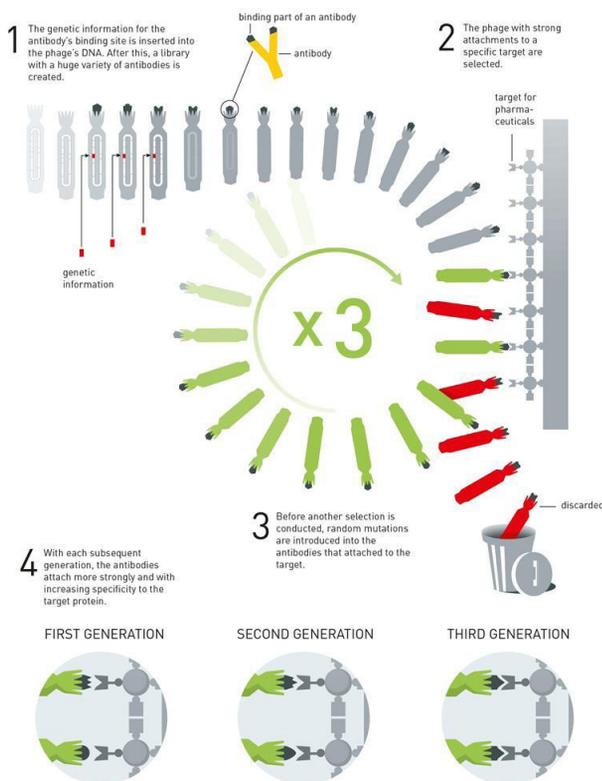


Figura 2. Presentación en fagos para la obtención de anticuerpos monoclonales. Fuente: Johan Jarnestad / The Royal Academy of Science.

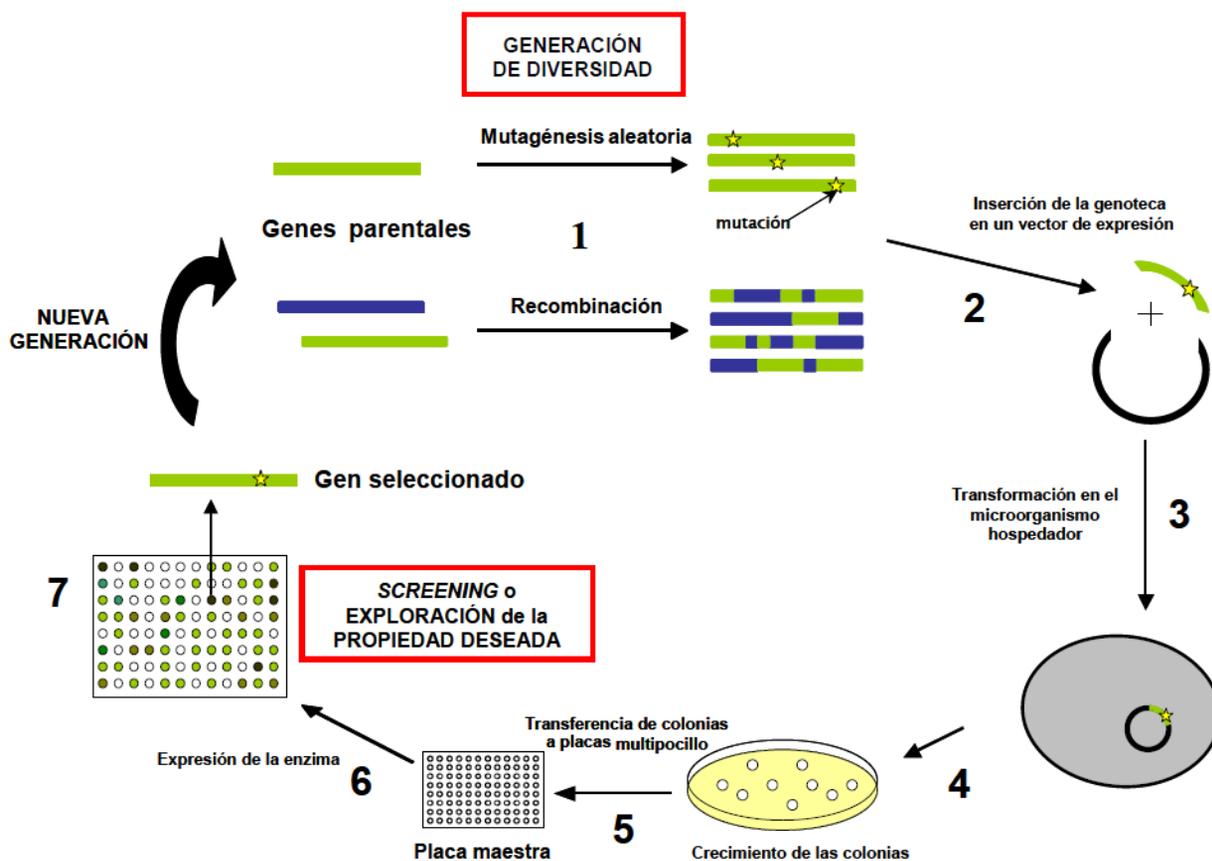


Figura 3. Esquema representativo de la evolución dirigida de enzimas. Fuente: Alcalde, M. (2012). Fundamentos de evolución molecular dirigida de enzimas. Monografía XXXV: Biotáctis aplicada a la obtención de fármacos y productos de alto valor añadido. Monografías de la Real Academia de Farmacia.

orgánicos y tiempos de reacción más cortos, que los que tienen lugar por evolución natural. Por otro lado, estas enzimas artificiales ofrecen una alternativa eficiente y respetuosa con el medio ambiente frente a los catalizadores metálicos y orgánicos. El primer trabajo experimental en este campo, fue llevado a cabo en 1993 por Frances H. Arnold, donde realizaba la evolución dirigida de la enzima subtilisina E (Figura 4) para obtener una variante enzimática que era activa en un entorno desnaturalizante. Se llevaron a cabo cuatro rondas secuenciales de mutagénesis y se ensayaron las enzimas obtenidas en reacciones en *N,N*-dimetilformamida (disolvente orgánico polar) y agua obteniendo una actividad enzimática 256 veces mayor que la enzima natural en un mutante (PC3) con 10 mutaciones puntuales, muchas de ellas en aminoácidos cercanos al centro activo [12].

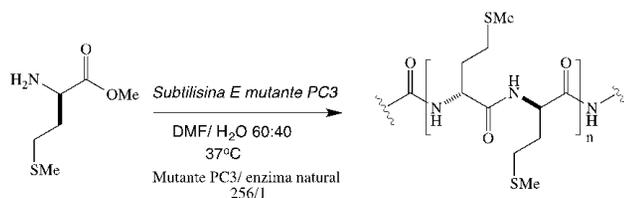


Figura 4. Reacción con enzima mutante en DMF/H₂O.

Frances H. Arnold, en una de sus más recientes investigaciones, ha creado una variante de la globina de *Bacillus subtilis* que cataliza la ciclopropanación del 3,4-difluoroestireno, dando lugar al estereoisómero deseado con un elevado rendimiento (Figura 5) [13]. Este estereoisómero es un precursor del fármaco Ticagrelor, que es un antiagregante plaquetario que se emplea para la prevención de la trombosis arterial.

También, en uno de sus últimos estudios, describen enzimas que forman enlaces químicos que no se encuentran en la naturaleza, como son los enlaces carbono-silicio. Estos enlaces son de gran utilidad en química médica, en productos químicos y en una gran variedad de productos de consumo, como pueden ser las pantallas de

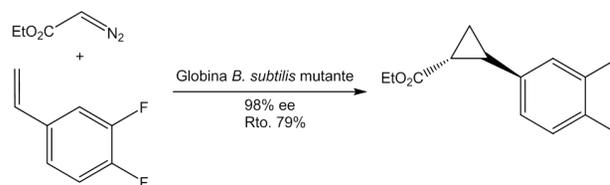


Figura 5. Síntesis de un precursor de Ticagrelor utilizando una variante de la globina *B. subtilis* diseñada por evolución dirigida.

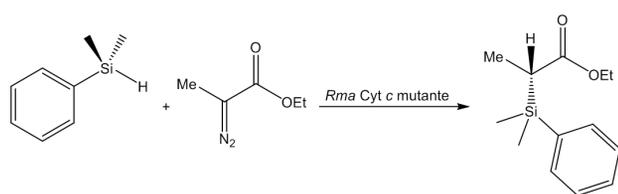


Figura 6. Formación de enlace C-Si quiral catalizado por la enzima mutante.

ordenador y de televisión. En la Figura 6 se muestra la formación de estos enlaces catalizados en el laboratorio por una variante de la enzima citocromo c extraída de la bacteria *Rhodothermus marinus*, dando lugar a una gran variedad de compuestos de organosilicio a partir de sustratos silicio y grupos diazo. Con la evolución dirigida consiguen que con sólo tres mutaciones, la enzima forme enlaces C-Si con una elevada enantioselectividad [13].

CONCLUSIÓN

Destacar que el Premio Nobel en Química de este año tiene un carácter pluridisciplinar, de hecho, los galardonados se han formado en química, biología e ingeniería. Su inspiración ha sido la Teoría de Darwin, en la que la evolución fenotípica está ligada al cambio genético y la selección natural. Utilizando la maquinaria celular para codificar secuencias de aminoácidos, se pueden introducir genes específicos que alteren la estructura de un determinado enzima para que pueda catalizar la reacción que interesa, bien sea en medios no acuosos o en condiciones diferentes a las fisiológicas, o mejorar en unas cuantas generaciones su poder catalítico con el fin de ser usadas en procesos industriales. La técnica de presentación en fagos puede considerarse una variante de la evolución dirigida y su uso para la producción de anticuerpos monoclonales para combatir enfermedades como el cáncer es ya una realidad. El Premio Nobel en Química de 2018 ha querido premiar todos estos aspectos.

REFERENCIAS

[1] Smith GP (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315–1317.

[2] Newton MS, Arcus VL, Gerth ML, Patrick WM (2018). Enzyme evolution: innovation is easy, optimization is complicated. *Current Opinion in Structural Biology* **48**, 110–116.

[3] Voordeckers K, Brown CA, Vanneste K, van der Zande E, Voet A, Maere S, Verstrepen, KJ (2012). Reconstruction of ancestral metabolic enzymes reveals molecular mechanisms underlying evolutionary innovation through Gene Duplication. *PLoS Biology* **10**, e1001446.

[4] Hatfull GF, Hendrix RW (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current opinion in virology* **1**, 298–303.

[5] Clark JR, March JB (2006). Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in Biotechnology* **24**, 212–218.

[6] Smith GP, Petrenko VA (1997). Phage display. *Chemical Reviews* **97**, 391–410.

[7] Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR (1994). Making Antibodies by Phage Display Technology. *Annual Review of Immunology* **12**, 433–455.

[8] Sorbera LA, Rabasseda X, Castaner RM (2001) Adalimumab. *Drugs Future* **26**, 639–646.

[9] Alcalde M (2012). Fundamentos de evolución molecular dirigida de enzimas. Monografía XXXV: Biocatálisis aplicada a la obtención de fármacos y productos de alto valor añadido. Monografías de la Real Academia de Farmacia. DOI: <http://dx.doi.org/ES/monoranf.v0i0.1320>.

[10] Arnold FH (2015). The Nature of Chemical Innovation: New Enzymes by Evolution. *Quarterly Reviews of Biophysics* **48**, 404–410.

[11] Arnold FH (2009). How Proteins Adapt: Lessons from Directed Evolution. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **74**, 41–46.

[12] Directed Evolution of Enzymes and Binding Proteins. <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/10/advanced-chemistryprize-2018.pdf> (Consultado el 31-10-18).

[13] Arnold FH (2018) Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. *Angewandte Chemie International Edition* **57**, 4143–4148.

M.ª Ángeles Farrán Morales
Marta Pérez Torralba

Dpto. de Química Orgánica y Bio-Orgánica