

EVOLUCIÓN DIRIGIDA: Las bacterias al servicio de la Química

Académicos Jean-Paul F.C. Rossi y Rolando C. Rossi

La evolución dirigida, es un proceso de laboratorio mediante el cual se crean entidades biológicas con las características deseadas a través de ciclos iterativos de diversificación genética y selección de bibliotecas de DNA. Se ha convertido en una de las herramientas más útiles y extendidas en biología básica y aplicada y está revolucionando el diseño y la síntesis de moléculas para su uso industrial y en la elaboración y producción de fármacos.

En 1984, el premio Nobel Manfred Eigen publicó un artículo teórico que describe un posible flujo de trabajo para la evolución dirigida de enzimas. Eigen señaló que dicha optimización se convierte en un desafío interesante porque el genotipo y el fenotipo dependen de diferentes procesos y moléculas. Postuló que encontrar variantes mejoradas extravagantes de enzimas naturales en grandes bibliotecas de genes sería difícil, sino imposible. En su lugar, propuso el uso de bibliotecas más pequeñas y varias generaciones de mutagénesis y detección como un procedimiento que conduciría hacia el avance evolutivo. Eigen predijo que sería posible construir una “máquina evolutiva” iterativa para producir enzimas optimizadas para catalizar reacciones químicas excéntricas.⁽¹⁾

El guante lo recogió la reciente premio Nobel (2019), Frances H. Arnold quien, en 1993, realizó la primera evolución dirigida de enzimas. En uno de sus discursos manifestó: “No satisfechos con el vasto repertorio de la naturaleza, queremos crear nuevas enzimas y expandimos el espacio de codificación genética de las funciones enzimáticas. Utilizamos el proceso de diseño biológico más poderoso, la evolución, para optimizar las enzimas existentes e inventar nuevas. Imitando los trucos evolutivos de la naturaleza y usando un poco de intuición química, podemos generar nuevas familias de enzimas que catalizan reacciones importantes, incluyendo las no conocidas en biología. Estas nuevas capacidades aumentan el alcance de las moléculas y materiales que podemos construir utilizando la biología”.⁽²⁾

El mecanismo consiste en favorecer la variabilidad del ácido nucleico que codifica la proteína de interés mediante mutagénesis o recombinación al azar. Las técnicas convencionales implican utilizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en condiciones de bajo rigor o PCR propensa a errores (es decir se induce al error usando distintas concentraciones de los oligonucleótidos y/o variando la concentración de Mg^{2+}).

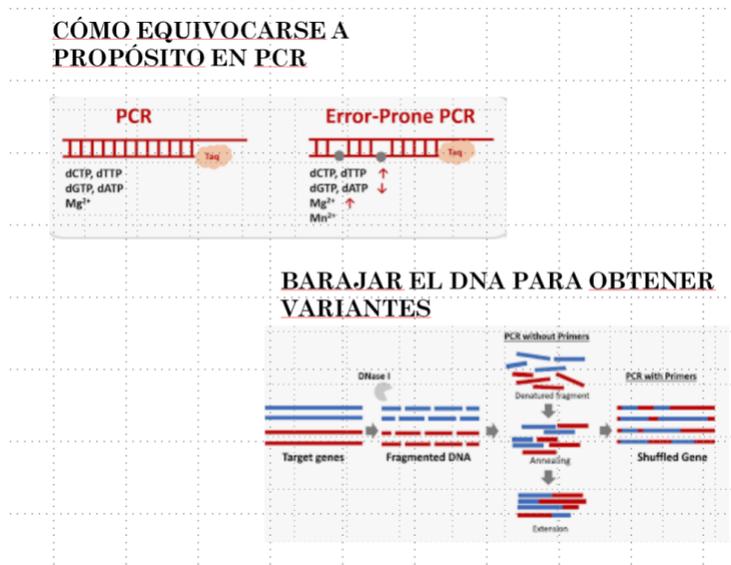


Figura 1. Producción de mutaciones mediante la PCR propensa a errores y el barajado de DNA (Extraído de la referencia ⁽³⁾)

En el panel superior de la figura 1 se indica, mediante flechas, el incremento en la concentración de ciertos oligonucleótidos a expensas de la concentración de otros, así como el aumento de la concentración de Mg^{2+} .

Otro método de producir mutantes es el barajado de DNA (en inglés, *DNA shuffling*). En este caso, se corta el DNA original, se lo asocia y se multiplica por PCR, sin utilizar oligonucleótidos. Luego se introduce el DNA en bacterias adecuadas para su expresión. Las mutantes de mayor interés se evalúan por su capacidad en la producción del efecto deseado, para lo cual se caracteriza el fenotipo, por ejemplo mediante ensayos bioquímicos de afinidad con un ligando y luego se seleccionan.

El proceso completo describe un ciclo iterativo de selección dirigida de las mutantes de interés como vemos en la figura 2:

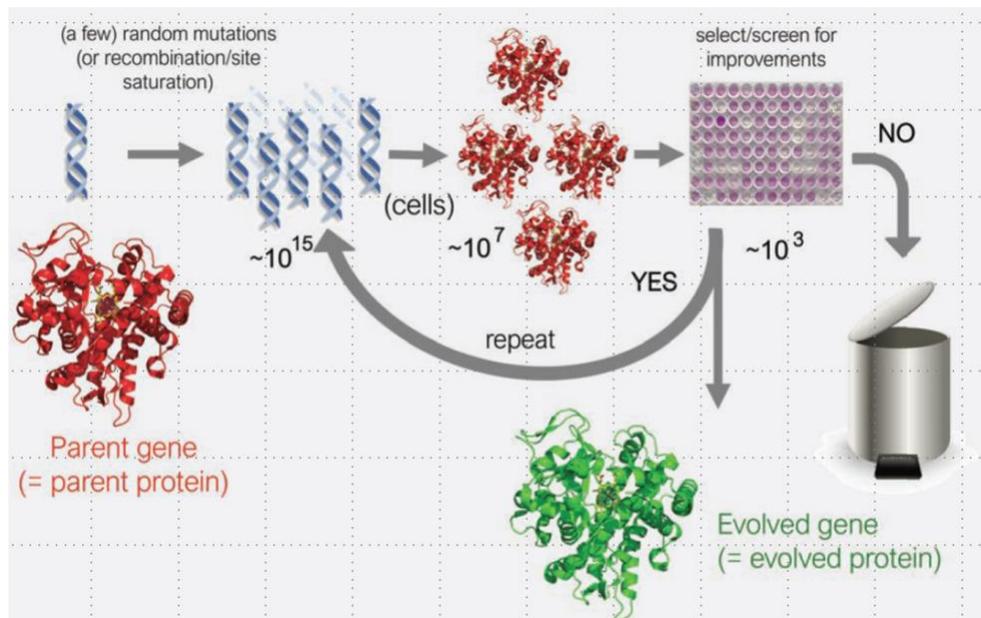


Figura 2 El proceso de evolución dirigida (Extraído de Arnold FH.⁽⁴⁾)

En forma somera este proceso cíclico de enriquecimiento de mutantes favorables se desarrolla como sigue:

(1) Se mezcla el DNA mediante recombinación homóloga *in vitro* de genes mutados, seleccionados mediante fragmentación aleatoria de DNA o PCR propensa a errores. El DNA recombinante generado aleatoriamente se reordena en genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Luego, este gen se inserta en un vector de expresión y se ensayan las cualidades deseadas. Se utiliza para escalar rápidamente una biblioteca de genes específicos.

(2) Se evalúan las variantes mutantes de mayor interés y se seleccionan, por ejemplo, mediante pruebas de afinidad bioquímica para un ligando.

(3) Se amplifican las mutantes útiles. Dado que la evolución dirigida es a menudo a gran escala y la generación de variantes es importante, es necesario determinar la base molecular del rasgo de interés; es decir, la clonación y secuenciación del DNA de las mutantes seleccionadas.

Luego se inician nuevos ciclos para finalmente obtener productos a través de la expresión en bacterias de rápido y fácil crecimiento, que dan origen a las especies químicas deseadas.

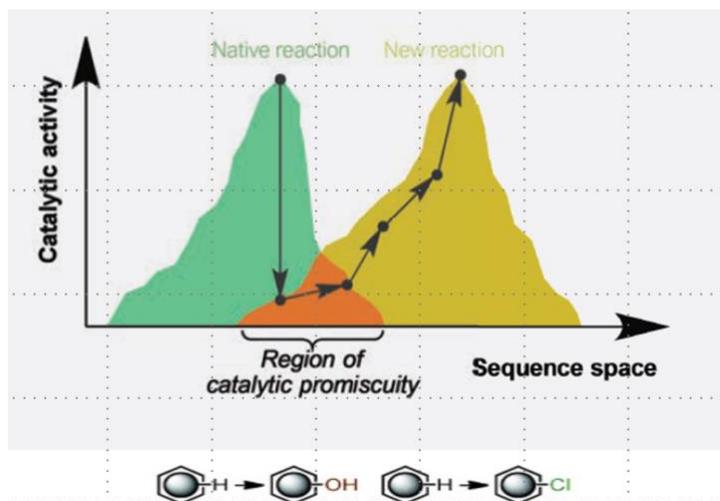


Figura 3. Ejemplo de selección de una mutante específica. En verde hay una reacción nativa original que produce el cambio de un protón por un oxhidrilo. El microorganismo es capaz, en una mínima fracción, de catalizar el cambio del protón por un cloruro (en naranja). Los sucesivos ciclos (en amarillo) permiten seleccionar la variante capaz de producir la nueva reacción en mucha mayor cantidad. (Extraído de Renata H *et al.*⁽²⁾)

Entre los numerosos avances que ofrece la aplicación de esta nueva tecnología podemos mencionar los siguientes:

Desentrañar las vías metabólicas

Una de las fortalezas del enfoque evolutivo directo es su capacidad para coevolucionar enzimas en la vía biosintética. En un ejemplo, Arnold y sus colegas desarrollaron una vía de múltiples enzimas para la producción de carotenoides en *E. coli*.⁽⁵⁾ Su laboratorio también muestra cómo es posible desarrollar biocatalizadores en células completas para la producción de sustancias químicas valiosas utilizando evolución dirigida para permitir la producción de L-metionina en *E. coli*.⁽⁶⁾

Obtener biocombustibles

Un desafío para la humanidad es encontrar sustitutos o suplementos adecuados para los combustibles fósiles, que se puedan producir de manera sostenible y respetuosa del medio ambiente. Aquí el objetivo era producir alcohol a partir de alcanos de cadena corta⁽⁷⁾ y un candidato a biocombustible destacado es el isobutanol. El isobutanol puede producirse por biosíntesis en *Escherichia coli* recombinante. Sin embargo, dos enzimas metabólicas requieren la reducción del fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida (NADPH) como cofactor, mientras que la glucólisis, una vía metabólica normal durante el crecimiento de *E. coli*, provoca la reducción del dinucleótido de adenina y nicotinamida (NADH). Para superar este obstáculo, Arnold y sus colegas utilizaron la evolución dirigida para modificar la dependencia de los cofactores de las enzimas y que ambas puedan depender del NADH, y producir las enzimas adecuadas para que la bacteria produzca isobutanol a partir de una fuente de glucosa.⁽⁸⁾

Formar nuevos enlaces químicos

Los enlaces carbono-silicio son posibles de encontrar en productos químicos artificiales, pero están ausentes en la naturaleza. La evolución dirigida puede utilizarse para que estos enlaces químicos puedan producirse en microorganismos. Arnold y sus colaboradores observaron que las proteínas *Hemo* pueden catalizar reacciones de inserción de carbeno artificiales. Después de seleccionar una serie de hemoproteínas de varios organismos, decidieron utilizar el citocromo C de *Rhodothermus marinus* como punto de partida. Esta proteína cataliza la formación de enlaces carbono-silicio con baja eficiencia, pero con una selectividad enantiomérica del 97%. Para ello examinaron una pequeña biblioteca de variantes durante el tratamiento térmico y en los ensayos de actividad catalítica y el mejor candidato se sometió a una serie adicional de mutagénesis y selección. El resultado de este trabajo es una enzima que cataliza la formación de enlaces silicio-carbono 40 veces mejor que la enzima de partida y con un 99% del isómero óptico deseado.⁽⁹⁾ La enzima desarrollada tuvo una velocidad de catálisis 15 veces mayor que el mejor catalizador no enzimático conocido para la misma reacción.

Otros ejemplos de enlaces y reacciones desconocidos en la naturaleza, para los cuales se utilizó la evolución dirigida para crear enzimas eficientes, fueron la producción de enlaces carbono-borano⁽¹⁰⁾ y la aminación C-H intramolecular enantio-selectiva.⁽¹¹⁾

Seleccionar enantiómeros

La evolución dirigida es un medio eficaz para seleccionar un determinado enantiómero mediante enzimas y perfeccionar su capacidad de catálisis asimétrica. Las enzimas evolutivas se utilizan en la producción de sustancias asimétricas de alta pureza enantiomérica. En 1996 Matcham y Bowen informaron del primer ejemplo de una evolución dirigida para mejorar la enantio-selectividad de una enzima relacionada con las transaminasas en la catálisis de la producción de aminas quirales.⁽¹²⁾ El resultado fue un biocatalizador que produjo la S-aminotetralina con una selectividad del 94%, que mejoró aún más mediante ciclos adicionales de mutagénesis y detección. Manfred Reetz y sus colaboradores informaron de otro ejemplo que condujo a una mejor enantio-selectividad de las lipasas en la hidrólisis de ésteres.⁽¹³⁾ A través de la evolución dirigida mediante cuatro ciclos de mutagénesis aleatoria, el factor de selectividad de una lipasa bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* se incrementó primero 11 veces y luego 35 veces después de una mayor diversificación de las mutantes.⁽¹⁴⁾

Evolución dirigida en la industria química

La evolución dirigida ha pasado rápidamente del ámbito académico a la aplicación industrial.⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ Las enzimas desarrolladas por evolución dirigida se utilizan en la industria para biocombustibles, materiales, productos químicos finos y a granel, detergentes, productos de consumo, reactivos y productos, así como productos intermedios para la industria farmacéutica. Muchas empresas han establecido sus propios equipos científicos que aplican estrategias de evolución dirigida para mejorar los catalizadores o terapias basadas en proteínas en términos de estabilidad, actividad, especificidad, toxicidad u otras propiedades. Ejemplos específicos de enzimas y productos evolutivos obtenidos de esta manera son los potenciadores del sabor, los fármacos para la diabetes y el ateroma y los fármacos para reducir los lípidos. Algunas enzimas producidas por evolución directa se producen a gran escala. Esto incluye lipasas utilizadas en detergentes comerciales. Los productos químicos industriales se producen en grandes cantidades utilizando catalizadores biológicos creados por evolución dirigida.

Química verde

La evolución dirigida está orientada a proporcionar enzimas con su propia especificidad, produciendo así biocatalizadores amigables con el medio ambiente. Las enzimas desarrolladas por evolución dirigida están reemplazando los complejos procesos industriales con biotecnologías más delicadas, que no requieren metales tóxicos o grandes cantidades de solventes orgánicos. Por ejemplo, el uso industrial de enzimas desarrolladas por esta metodología, ha reemplazado a los catalizadores químicos en la síntesis asimétrica y proporciona una alternativa ecológica que lleva al menor consumo de disolventes orgánicos y menos subproductos y residuos contaminantes.

Los servicios que ofrecen evolución dirigida

En la actualidad han surgido muchas industrias intermedias que ofrecen prestaciones de aplicación de la evolución molecular dirigida, para promover el descubrimiento, la optimización y el desarrollo de bioterapéuticos. Estas prestaciones utilizan una estrategia similar a la producida en la naturaleza durante millones de generaciones, con el propósito de elaborar biomoléculas aplicadas en diversos campos que abarcan la producción industrial, la ciencia médica y la investigación básica. La diferencia crucial es que utilizando la evolución dirigida, los resultados se pueden lograr mucho más rápidamente y en muchos casos con solo unos pocos ciclos de mutagénesis y selección.

REFERENCIAS

1. Eigen M, Gardiner W. (1984) Evolutionary molecular engineering based on RNA replication. *Pure Appl. Chem.* 56, 967-978
2. Renata H, Wang ZJ, Arnold FH. (2015) Expanding the enzyme universe: accessing non-natural reactions by mechanism-guided directed evolution. *Angew Chem Int Ed Engl.* 54:3351-67.
3. <https://lifescience.canvaxbiotech.com/product/pickmutant-error-prone-pcr-kit/>
<https://lifescience.canvaxbiotech.com/product/pickmutant-dna-shuffling-kit/>
Consultado en noviembre de 2021.
4. Arnold FH. (2018) Enzymes by Evolution: Bringing New Chemistry to Life, *Molecular Frontiers Journal*, 2: 9-18. <https://doi.org/10.1142/S2529732518400023>
5. Schmidt-Dannert C, Umeno D, Arnold FH (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat biotechnol.* 18: 750-753.
6. May O, Nguyen PT, Arnold FH (2000) Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat Biotechnol.* 18:317-320.
7. Glieder A, Farinas ET, Arnold FH (2002) Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nat Biotechnol.* 20: 1135–1139.
8. Bastian S, Liu X, Meyerowitz JT, Snow CD, Chen MMY, Arnold FH (2011) Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcoholdehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production a theoretical yield in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 13: 345–352.
9. 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. Kan SBJ, Huang X, Gumulya Y, Chen K, Arnold FH (2017) Genetically programmed chiral organoborane synthesis. *Nature.* 552: 132-136.
11. McIntosh JA, Coelho PS, Farwell CC, Wang ZJ, Lewis JC, Brown TR, Arnold FH (2013) Enantioselective intramolecular C-H amination catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes in vitro and in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl.* 52: 9309-9312.
12. Matcham GW, Bowen ARS (1996) Biocatalysis for chiral intermediates: meeting commercial and technical challenges. *Chimica Oggi (Chemistry Today).* 14: 20-24.
13. Reetz, M.T., Zonta, A., Schimossek, K., Liebeton, K. & Jaeger, K.-E. (1997). Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by in vitro evolution. *Angew Chem Int Ed Engl.* 36: 2830-2832.
14. Liebeton K, Zonta A, Schimossek K, Nardini M, Lang D, Dijkstra BW, Reetz MT, Jaeger KE (2000) Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem Biol.* 7: 709-718.
15. Fasan R, Crook NC, Peters MW, Meinhold P, Buelter T, Landwehr M, Cirino PC, Arnold FH (2011) Improved product-per-glucose yields in P450-dependent propane biotransformations using engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 108: 500-510.
16. Fischbach MA, Lai JR, Roche ED, Walsh CT, Liu DR (2007) Directed evolution can rapidly improve the activity of chimeric assembly-line enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 11951-11956.
17. Bajaj P, Sreenilayam G, Tyagi V, Fasan R (2016) Gram-Scale Synthesis of Chiral Cyclopropane-Containing Drugs and Drug Precursors with Engineered Myoglobin Catalysts Featuring Complementary Stereoselectivity. *Angew Chem Int Ed Engl.* 55: 16110-16114.
18. Hernandez KE, Renata H, Lewis RD, Jennifer Kan SB, Zhang C, Forte J, Rozzell D, McIntosh JA, Arnold FH (2016) Highly Stereoselective Biocatalytic Synthesis of Key Cyclopropane Intermediate to Ticagrelor. *ACS Catal.* 6: 7810-7813