



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

La química es impensable sin catalizadores. Los catalizadores permiten que muchas reacciones químicas se produzcan o, al menos, las aceleran fuertemente. Durante las reacciones, estos químicos multifuncionales no se consumen y permanecen inalterados al finalizar la misma, lo que constituye su segunda característica. Con el correr del tiempo, los químicos han desarrollado una variedad de catalizadores sintéticos, pero desafortunadamente, estos a menudo no funcionan de forma tan eficiente y ecológica

do, cuando las sustancias deben ser bioquímicamente eficaces. Esto, por supuesto, se aplica a la fabricación de ingredientes activos para la farmacéutica, un mercado enorme que en todo el mundo genera ingresos anuales por más de cien mil millones de dólares. Cuando los químicos quieren usar la enzima natural de **tipo salvaje** como catalizador artificial, tienen que rediseñarla de forma específica. Sin embargo, hasta ahora, esto lo lograron sólo en unos pocos casos; la prometedora "biotecnología blanca" todavía

## Evolución dentro del tubo de ensayo

### Cómo los investigadores perfeccionan enzimas

como se diseñaría. La naturaleza nos enseña la forma elegante de hacerlo: como **biocatalizadores**, las enzimas mantienen en funcionamiento prácticamente todos los procesos metabólicos del organismo. "Elas son los catalizadores de la vida", dice Manfred Reetz, director del Instituto Max Planck para la Investigación del Carbono en Mülheim.

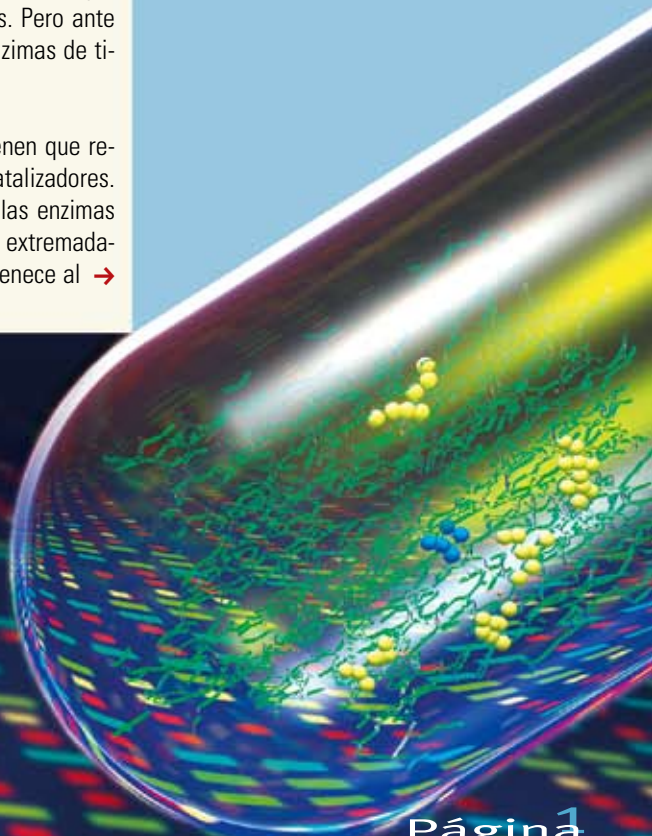
Las **enzimas** funcionan en medios acuosos, por lo que no necesitan solventes tóxicos y, a diferencia de muchos catalizadores artificiales, no operan a varios cientos de grados sino a temperatura ambiente, lo que ahorra mucha energía. Ya sólo por esta razón son muy atractivas para la química orgánica sintética. La utilización del amplio surtido de catalizadores naturales es de gran interés, sobre to-

está en pañales. Las enzimas naturales plantean un problema mayúsculo a los científicos: en el entorno artificial de los tubos de ensayo suelen perder su capacidad catalítica. Una complicación adicional es que los químicos a menudo no quieren copiar la reacción bioquímica del organismo, lo que ya sería bastante difícil. En lugar de ello, la enzima debe poder catalizar compuestos químicos sintéticos que difieren un poco de los naturales. Pero ante estos sustratos sintéticos, las enzimas de tipo salvaje suelen fallar.

Así es que los investigadores tienen que reconstruir químicamente sus biocatalizadores. Este es un reto enorme, porque las enzimas tienen una estructura molecular extremadamente compleja. La mayoría pertenece al →

A

► Una molécula de la lipasa de tipo salvaje de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. En el área con los átomos de color azul se encuentra el sitio activo catalítico. Los átomos marcados en amarillo señalan los lugares donde la sustitución de aminoácidos ha generado un mutante con la mejor enantioselectividad.





**B**

▲ En un primer paso se genera, mediante mutagénesis al azar, una "biblioteca" con diferentes mutaciones del gen de tipo salvaje. Estos mutantes expresan diferentes enzimas que se analizan en complejas pruebas de cribado (*screening*) para determinar su enantioselectividad. El "mejor" mutante se convierte en el punto de partida para un nuevo ciclo - los investigadores denominan este proceso evolución dirigida.

→ grupo de las proteínas - la excepción son las moléculas de ARN, que no son proteínas pero también actúan como elemento catalizador.

Están constituidas por largas cadenas de moléculas de aminoácidos que se alinean como perlas en un collar. Existen veinte aminoácidos diferentes que pueden ser utilizados. Éstos se vinculan en diferente número y secuencia y, luego, en la forma biológicamente activa, esta cadena se pliega formando un complejo entramado con una hendidura. Esta "hendidura vinculante" alberga el sitio activo catalítico de la enzima. La reacción química se produce sólo cuando el sus-

trato se acopla a esta hendidura, como la llave a su cerradura. "Este **modelo de llave-cerradura** fue descubierto ya hace cerca de un siglo por Hermann Emil Fischer, el Premio Nobel y padre fundador del Instituto de Mülheim", explica Reetz.

Los químicos deben reestructurar esta "cerradura" de tal forma que su "llave sintética" encaje. Para modificar la hendidura vinculante, los químicos reemplazan ciertos aminoácidos en la molécula. Sin embargo, no es fácil estimar con precisión el impacto de estas intervenciones. Las enzimas son moléculas gigantes con cadenas entrelazadas de miles

de átomos y electrones responsables de sus propiedades químicas (**Fig. A**). Por eso, es extremadamente difícil identificar los lugares adecuados para tales manipulaciones. Idealmente, los modelos moleculares teóricos indican a los investigadores dónde intervenir. "Este diseño racional es maravilloso, pero por desgracia, funciona muy rara vez", dice Reetz. Él mismo muchas veces se vio sorprendido por el hecho de que una modificación lejana al sitio activo de la molécula finalmente generara el efecto deseado. En tales casos, la modificación se propaga como fichas de dominó que van cayendo a través de la red molecular hasta toparse con la hendidura.

## UNA BIBLIOTECA SIN LIBROS

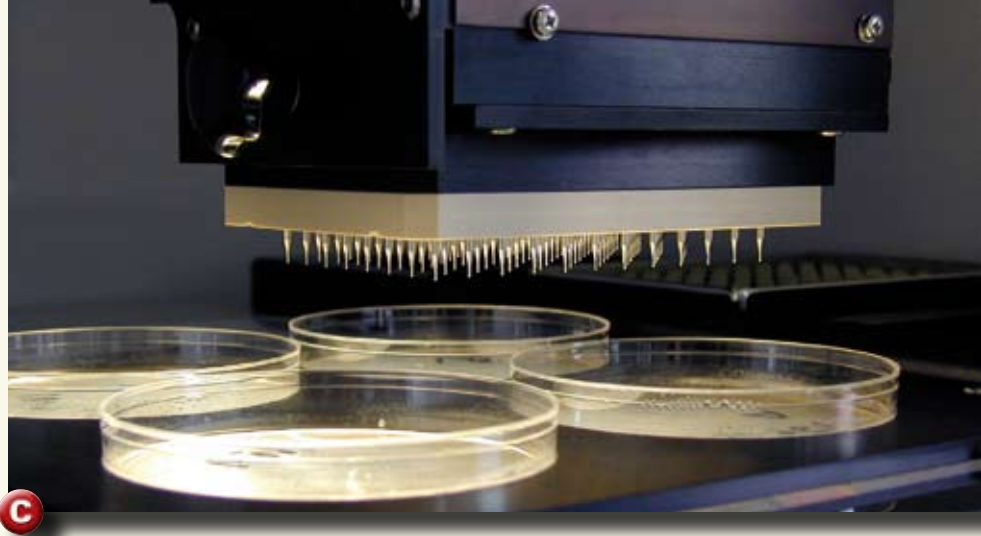
Dado que la teoría ofrece una ayuda limitada, los químicos como Reetz toman el modelo de la naturaleza. En ella, la **evolución** dirige la generación azarosa de alteraciones en biomoléculas individuales u organismos enteros. Esto da lugar a **mutantes** que se adaptan mejor a las condiciones ambientales existentes. Los investigadores de Mülheim quieren imitar en el laboratorio esta exitosa estrategia darwiniana. Hace ya más de diez años trabajan en el desarrollo de procedimientos con los que pueden crear mutantes optimizados de las enzimas relevantes. Para ello, proceden en varios pasos (**Fig. B**): en primer lugar, utilizan el azar para sus propios fines generando una "biblioteca" de diferentes mutantes de las enzimas de tipo salvaje. Luego, mediante el complejo proceso de cribado (*screening*), testean cuán bien catalizan la reacción deseada. A partir de los mutantes "buenos", y nuevamente por mutaciones al azar, crean una nueva biblioteca mejorada que se vuelve a testear. Si las cosas van bien, después de algunas generaciones de este tipo obtienen una enzima optimizada para la reacción sintética.

Para su proceso evolutivo, los investigadores de Mülheim debieron adoptar los métodos de la biotecnología, es decir, cambiar el tubo de ensayo por el cultivo de bacterias. Éstas producen las enzimas modificadas como si fueran pequeñas biofábricas. En realidad, hoy en día esto es rutina, pero dada la enorme cantidad de posibles mutaciones, la evolución artificial sigue siendo un desafío. Esto se demuestra en el ejemplo de la lipasa de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, que también está presente en nuestro tracto digestivo. Esta enzima cataliza la descomposición química de la grasa, contribuyendo así a la

digestión. Está compuesta por 285 aminoácidos. Desde el punto de vista aritmético, si los investigadores quisieran cambiar un aminoácido en cada uno de los 285 sitios tendrían que testear 5415 mutantes diferentes. Para el intercambio de dos aminoácidos, este “espacio de secuencias proteicas” teóricamente ya abarca 14 millones de mutantes; ¡con tres se dispara a 26 mil millones! La naturaleza no tiene ningún problema con enormes números como éstos, porque para ella no cuentan ni los millones de años ni las innumerables moléculas. Pero en el laboratorio los investigadores pueden manejar sólo algunos miles de mutantes y deben alcanzar el objetivo dentro de unos pocos años. El “pajar de mutantes” es demasiado grande como para buscar el “alfiler enzimático” a ciegas. “Tuvimos que desarrollar métodos más eficientes para analizar el espacio de secuencias proteicas de forma dirigida. Mientras tanto, ya hemos logrado el gran quiebre”, cuenta Reetz.

## IMÁGENES ESPECULARES INDESEADAS

Los investigadores de Mülheim se centraron en una propiedad química que juega un papel preponderante en la naturaleza y en la industria: la **enantioselectividad** de los catalizadores. Los **enantiómeros** son hermanos dispares de una misma molécula, donde uno posee la estructura química especular del otro. “Se los puede imaginar como la mano izquierda y la derecha”, explica Reetz. Por eso, los científicos hablan de quiralidad, que deriva de la palabra del griego antiguo *χειρ* (*cheir*) que significa ‘mano’. Esta facultad es importante en la naturaleza. En los organismos, en general, la bioquímica prioriza la configuración dextrógira (de rotación hacia la derecha). Incluso nuestra nariz con sus sensores químicos puede diferenciar ciertos enantiómeros (**ver recuadro**). En el supermercado el tema se nos presenta, por ejemplo, en forma de ácido láctico dextrógiro (D-) o levógiro (L-) en el yogur. Químicos como Reetz, sin embargo, prefieren la denomina-



▲ En el laboratorio, un robot transfiere las colonias de bacterias a placas de microtitulación.

ción de enantiómero-R y -S. 19 de los 20 aminoácidos que modelan las enzimas son quirales. Por eso, muchas enzimas catalizan selectivamente sólo un enantiómero del sustrato dejando al otro inalterado. La enzima funciona cuasi como una máquina de rosca-do que produce tornillos que únicamente poseen rosca hacia la izquierda o derecha.

Esta enantioselectividad tiene una gran importancia para la industria farmacéutica. La causa es la tragedia ocurrida en la década de 1960 en torno a un remedio analgésico y calmante; la **talidomida**. Al ingerirlo en determinada etapa del embarazo, las mujeres daban a luz a niños con graves malformaciones. Más tarde se determinó que la forma quiral S de la droga talidomida era la responsable. Por el contrario, el enantiómero-R actuaba de la manera deseada, pero el medicamento incluía ambos enantiómeros. Hoy en día, la legislación establece que ambos enantiómeros de un nuevo fármaco quiral siempre deben ser probados por separado. Desafortunadamente, las reacciones de síntesis por lo general producen una “mezcla racémica” que contiene ambas formas quirales en partes iguales. Es muy difícil separarlos posteriormente, porque ambos enantiómeros tienen propiedades químicas y físicas casi idénticas. Sin embargo, si la industria

podiera trabajar con enzimas enantioselectivas, entonces, desde un principio podría producir moléculas sólo de la quiralidad deseada. Una separación posterior no sería necesaria. Por eso es que las enzimas son tan atractivas para la biotecnología blanca.

## JUGAR CON EL AZAR

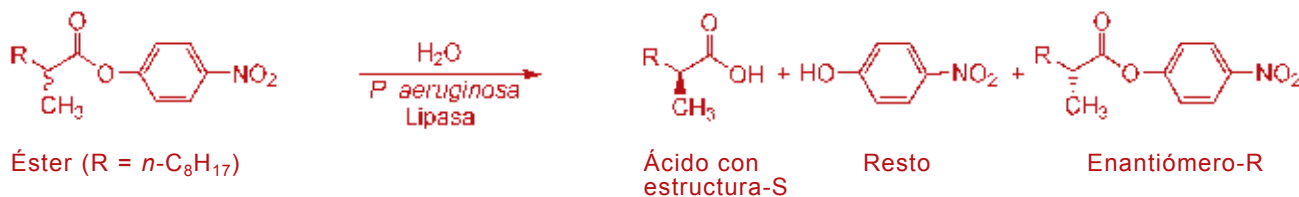
En muchos años de ensayos Manfred Reetz y sus colaboradores han desarrollado una estrategia evolutiva de laboratorio que puede producir enzimas mutantes con alta enantioselectividad. El científico del Instituto Max Planck explica el método utilizando el ejemplo de la lipasa de *P. aeruginosa*. Químicamente la digestión de grasas se basa en la ruptura de triglicéridos que, si son grasas naturales, se componen de una molécula de glicerol y tres moléculas de ácidos grasos. La división se realiza por reacción con el agua, por lo que este tipo de reacción se denomina hidrólisis. Para producir mutantes de lipasa que soporten el ambiente artificial de un laboratorio y además sean enantioselectivas, los investigadores de Mülheim trabajan con cultivos bacterianos, como ya fue mencionado. Mediante un proceso de varias etapas (mutagénesis por saturación iterativa) pueden manipular perfectamente las instrucciones genéticas de la lipasa. El fragmento de ADN correspondiente, es decir, el gen alterado, se inserta en la bacteria donde es utilizado como modelo para la elaboración de una enzima en la cual son sustituidos algunos aminoácidos únicamente en los sitios deseados.

Si los investigadores desde un principio supieran qué aminoácidos intercambiar y en dónde, ya habrían alcanzado la meta. Dado que éste no es el caso, se valen del azar, aunque de manera dirigida. Como químicos experimentados y basándose en la estructu-

## UNA NARIZ PARA DEXTRÓGIROS Y LEVÓGIROS

En algunas moléculas, nuestra nariz puede distinguir si poseen configuración dextrógira o levógira. Un buen ejemplo es el limoneno, una sustancia natural del grupo de los terpenos. El limoneno-R no se distingue visualmente del limoneno-S; ambos son líquidos incoloros. Pero el limoneno-R huele a naranja mientras que el limoneno-S a limón. Otro ejemplo son los enantiómeros de la carvona que está estrechamente relacionada y que es producida

naturalmente en el comino y el eneldo. Realmente la carvona-S huele a comino, mientras que la carvona-R produce olor a menta. Para un experimento de escuela se recomiendan niveles de concentración bajos para no adormecer la nariz. Lo mejor sería realizar una prueba antes. Precaución: la carvona y el limoneno son irritantes; información detallada se encuentra en los prospectos del fabricante (por ejemplo en [chemdat.merck.de](http://chemdat.merck.de)).



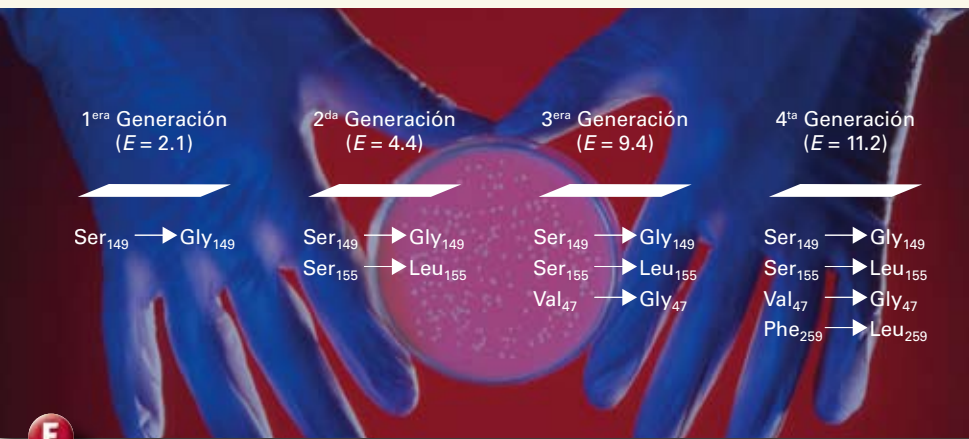
▲ Ambos enantiómeros del éster quiral (izquierda) se presentan como una mezcla (por eso la unión del grupo CH<sub>3</sub> se representa con una línea ondulada). La lipasa de *P. aeruginosa* cataliza la hidrólisis del enantiómero-S formando un ácido con estructura-S (el grupo CH<sub>3</sub> apunta hacia arriba ▲) y en el caso ideal, un residuo, el enantiómero-R (el grupo CH<sub>3</sub> apunta hacia abajo ▽) se mantiene sin cambios (derecha).

D

→ ra molecular, al menos pueden suponer dónde se sitúan los “puntos calientes” para la intervención. Así se aseguran que precisamente allí se introduzcan los errores de copia durante la multiplicación de los fragmentos de ADN. El resultado es una biblioteca relativamente pequeña que, así y todo, puede incluir varios miles de mutantes. Cuando los investigadores realmente encuentran los “hot spots” pueden entonces sí, mediante varias series de pruebas, producir enzimas mutantes que ya pueden catalizar de forma

con palillos de dientes, pero ahora un robot de laboratorio se encarga de esto (Fig. C). Las placas de microtitulación poseen más de 9.000 pequeños reservorios con una solución nutritiva dentro de las cuales se encuentra un mutante de *P. aeruginosa* respectivamente. Así, los investigadores obtienen una biblioteca de lipasas mutadas que son testeadas. El objetivo de los químicos es que la lipasa únicamente descomponga al enantiómero-S del éster quiral en el ácido con estructura-S más un resto; el enantiómero-R

forma durante la hidrólisis de enantiómero-S aparezca de color amarillo ante la luz ultravioleta. El color amarillo es un indicador de la cantidad de éster que ya se degradó en las gotas de placas de microtitulación analizadas. De esta manera, los investigadores pueden ver cuán bien trabaja la enzima mutante observada. La radiación con UV puede ser elegantemente automatizada para examinar muchas muestras de manera simultánea - los investigadores lo llaman **rastreo de alto rendimiento** (en inglés *High-throughput screening*). Esto es importante, porque la evolución dirigida sólo representa una ventaja si el gran número de mutaciones también puede ser rápidamente testado.



E

▲ El intercambio de aminoácidos constitutivos en cuatro sitios eleva la enantioselectividad de la lipasa en el lapso de cuatro generaciones. El subíndice numérico indica la posición del aminoácido.

enantioselectiva y muy eficiente. “Combinamos cerebro con evolución para generar una evolución dirigida”, dice Reetz.

En el laboratorio, el ingeniero químico Marcus Hermes demuestra cómo continúa el proceso después de la inserción del ADN: las bacterias se siembran en placas de agar donde crecen hasta formar colonias. Ahora la naturaleza juega a favor de los investigadores: cada mancha sobre el medio de cultivo corresponde a una colonia pura de un único mutante de *P. aeruginosa*. Estas colonias son recogidas y trasladadas a placas de microtitulación - inicialmente Hermes y sus colaboradores realizaban esta tarea manualmente

debe mantenerse sin variación el mayor tiempo posible (Fig. D). En realidad sucede que el enantiómero-R también se descompone en el tubo de ensayo, pero su reacción química es mucho más lenta que la del enantiómero-S (para aplicaciones prácticas, el enantiómero-S debe ser degradado cincuenta veces más rápido). Los químicos describen esta relación de velocidad entre la reacción R y S como factor de selectividad *E*. Pero ¿cómo pueden averiguar los investigadores lo que sucedió en la reacción de prueba? Después de todo, tienen que analizar miles de mutantes en las placas de microtitulación. En el caso de la lipasa de *P. aeruginosa* les es de ayuda que el resto que se

Manfred Reetz y sus colaboradores han demostrado con algunos ejemplos que la evolución dirigida en tubos de ensayo funciona. En el caso de la lipasa de *P. aeruginosa* en apenas cuatro generaciones pudieron elevar la enantioselectividad a un factor de selectividad de 11,2 (Fig. E). En otros experimentos, con un total de 80.000 colonias de bacterias, superaron incluso el valor crítico de 50. Con otras enzimas los investigadores de Mülheim han alcanzado factores de selectividad mayores a 100 en apenas cinco o seis pasos. “Con esto, la biotecnología blanca dispone de una nueva herramienta”, resume el investigador del Instituto Max Planck. Y en un futuro es posible que muchas otras personas se interesen por esto.

## PIE DE IMPRENTA

Sociedad Max-Planck, Departamento de Información y Relaciones Públicas, Hofgartenstraße 8, 80539 München / e-mail: presse@gv.mpg.de

Redacción: Dra. Christina Beck

Traducción: Ing. Agr. Roberto Neuwald

Diseño: www.haak-nakat.de

La versión en español se hizo con el apoyo del DAAD y con fondos del Ministerio de Relaciones Exteriores de Alemania.



SIEMENS

DAAD Deutscher Akademischer Austausch Dienst Servicio Alemán de Intercambio Académico

