

# Evolución experimental de proteínas

Lorenzo Segovia y Xavier Soberón

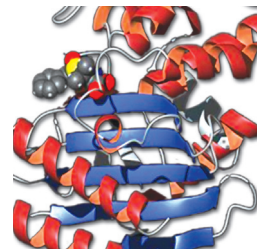
## El potencial extraordinario de las proteínas

La evolución biológica, observada en el nivel molecular, tiene como actores centrales a las proteínas. A partir de su aparición, estos polímeros lineales de amino ácidos, cuya estructura (determinada por sus secuencias) está definida directamente por la secuencia de bases de los genes, han ido evolucionando hasta dar lugar a cientos de miles, o tal vez millones, de actividades biológicas distintas, presentes en los seres vivos contemporáneos. La capacidad de las proteínas para efectuar transacciones biológicas es verdaderamente impresionante. En efecto, dentro del casi infinito espacio de secuencias posibles, la naturaleza ha encontrado proteínas útiles para casi todas sus necesidades: desde aquéllas cuya función depende solamente del reconocimiento molecular (frecuentemente con exquisita especificidad), hasta las que constituyen materiales con propiedades notables; y qué decir del increíble mundo de las enzimas, los catalizadores que orquestan la esencia misma del fenómeno viviente. Es imposible abordar aquí con amplitud el impresionante proceso subyacente, la evolución mo-

lecular de proteínas. Recordemos, sin embargo, que la evolución opera sobre dos componentes fundamentales: la variación genética y la selección de los individuos.

En efecto, la observación de la vastísima variedad de actividades presentes en las proteínas, así como el hecho de que provengan de un proceso de variación y selección, suscita formularse una pregunta: ¿es posible que este proceso sea reproducido o simulado en el laboratorio? Un primer análisis sugiere precaución. El proceso natural ha tomado miles de millones de años y ha contado con vastas cantidades de material para experimentar (la extensión misma de la biósfera).

Además, existe también la alternativa de proceder por un camino más firme, y quizá más propio de la ciencia: analizar a los sistemas y modificarlos de manera “inteligente”, es decir, con base en el conocimiento que se va generando. En las siguientes páginas buscaremos explicar por qué la evolución experimental resulta un enfoque atractivo para el estudio y modificación de proteínas y cómo se relaciona con otros avances del conocimiento de este apasionante campo de la ciencia.



1  
2  
3

### Papel central de las proteínas en biología

La diversidad de funciones que desempeñan las proteínas en los seres vivos es verdaderamente amplia. Prácticamente toda transacción biológica muestra, a nivel molecular, la intervención de una o más proteínas. Algunas cadenas polipeptídicas (proteínas globulares) forman glóbulos compactos solubles en agua, otras se estructuran en fibras con propiedades de alta resistencia o elasticidad (proteínas fibrosas), otras más pueden embeberse en los ambientes hidrófobos de las membranas (proteínas membranales). En términos generales, podemos dividir también a las proteínas en grandes grupos funcionales, entre los que destacan aquellas que catalizan reacciones químicas (*enzimas*) y aquellas que median señalización molecular sin afectar la estructura covalente de las moléculas con las que interactúan (*factores*). Con base en los proyectos genómicos sabemos hoy que en cualquier organismo vivo existen varios miles de proteínas diferentes involucradas en sus funciones biológicas.

Desde las reacciones iniciales de degradación de compuestos alimenticios en el sistema digestivo, hasta la construcción, paso a paso, de las moléculas más complejas, las enzimas ejecutan las instrucciones plasmadas en el genoma para orquestar el flujo de materia y energía que subyace en el funcionamiento de todo ser vivo. Existen desde enzimas relativamente sencillas y pequeñas, que catalizan reacciones simples, sin mayor regulación, hasta verdaderas máquinas moleculares como la sintasa de ATP (recuérdese que el ATP es el compuesto intracelular con el que se energizan la mayoría de las reacciones). Esta enzima transmembranal se puede considerar como un canal iónico, selectivo para protones que, además, resulta en la generación de ATP a través de un proceso que involucra la formación de energía mecánica: mediante el giro de varios componentes de la enzima se da el proceso de unión de los sustratos y liberación de los productos. Por estas razones, a la sintasa de ATP se le ha llamado un “nanomotor electroquímico-mecánico-químico”.

Otro tema recurrente en proteínas es su capacidad para emitir y recibir señales de todo tipo. En un nivel fundamental, moléculas de proteínas se asocian al material genético y convierten condiciones ambientales en señales para activar o desactivar genes específicos, como en el caso del famoso represor de la vía metabólica para degradación de lactosa. Más aún, un gran número de hormonas, tales como la insulina, tienen naturaleza proteínica, así como la gran mayoría de los receptores que detectan las señales y las “transducen” hacia el interior de las células. Los propios receptores están normalmente constituidos por proteínas con componentes transmembranales.

La función de las proteínas también puede resultar de propiedades periódicas, de manera análoga a lo que ocurre con polímeros artificiales. Tal es el caso de las proteínas fibrosas, que normalmente se conforman a partir de repeticiones de secuencias sencillas y cortas. La queratina, constitutiva de pelo y uñas, y la colágena, presente en tendones y tejido conectivo son ejemplos de proteínas fibrosas.

### Las proteínas como producto del proceso evolutivo

La variabilidad genética es el motor de la evolución. La selección natural, por su parte, ejerce un efecto controlador sobre el número de variantes sobrevivientes al seleccionar las que confieren la mayor capacidad de adaptación. A través de este proceso de generación de variabilidad han aparecido una enorme cantidad de genes homólogos (es decir, que descienden de un ancestro común), los cuales codifican para proteínas adaptadas a los medios más diversos y a las condiciones más extremas, pero manteniendo la misma actividad catalítica. Estos genes son llamados *ortólogos*. En otros casos, a través de duplicaciones genéticas dentro de un mismo genoma, han surgido genes llamados *parálogos*, los cuales han podido divergir hasta el punto de codificar para proteínas con actividades distintas. Se piensa que este último fenómeno ha sido central

para la aparición de las numerosas actividades catalíticas existentes. Existen varios mecanismos genéticos adicionales que permiten la aparición de nuevas formas. En particular, la recombinación genética produce nuevas variantes que poseen propiedades provenientes de ambos donadores o inclusive propiedades totalmente nuevas.

### La estructura tridimensional

La anterior descripción somera de las características y funciones de algunas proteínas se nutre de conocimientos obtenidos utilizando diversas metodologías, entre las que destaca, por su potencia explicativa, el desciframiento de sus estructuras tridimensionales. Debido a que una proteína consta de varios cientos de aminoácidos, resulta ser un complejísimo sistema con varios miles de átomos; así que la determinación experimental de la posición relativa de estos átomos en el espacio requirió el desarrollo y adaptación de técnicas, específicamente de cristalografía de rayos X, durante varias décadas. La solución de la primera estructura de proteína tomó a Max Perutz más de 20 años. Hoy en día la solución de una estructura nueva puede ocurrir en unos cuantos meses, o incluso días, en los proyectos de genómica estructural, pero sigue constituyendo un logro extraordinario, por la belleza de las técnicas y por la cantidad de información que rinde. En los últimos años se ha logrado, asimismo, incorporar la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) al arsenal de herramientas para la determinación de estructuras proteínicas. Producto de los esfuerzos de cristalógrafos y espectroscopistas, disponemos de varios miles de estructuras tridimensionales independientes, con las que podemos realizar estudios comparativos y derivar nociones generales sobre la arquitectura de estas biomoléculas, así como acercarnos desde otra perspectiva al estudio de la evolución molecular. Naturalmente, la información estructural resulta un insumo fundamental para la ingeniería de proteínas.

### El concepto básico de evolución dirigida y su historia

En su trayectoria relativamente corta, de unos 30 años, las técnicas de ADN recombinante han avanzado de manera sostenida. Partiendo de un pequeño conjunto de enzimas y procedimientos que permitieron recombinar segmentos de genes de unos organismos con otros, tenemos hoy día la era genómica, heraldo del siglo XXI, con un arsenal variadísimo de técnicas y enfoques, al punto que prácticamente se puede decir que el factor limitante en el avance de la investigación está siendo la capacidad de asimilación y la imaginación de la comunidad científica. Pero, ¿en qué forma se inserta la evolución experimental de proteínas en este gran esquema de avance de la biología molecular moderna?

Como suele suceder, las ideas básicas existen desde etapas bastante tempranas. Desde el inicio de los años ochenta se propuso que la utilización del ADN sintetizado químicamente, a través de los procedimientos conocidos como mutagénesis sitio-dirigida, permitiría estudiar a las proteínas de manera particularmente poderosa. Esta herramienta permitía modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína, y evaluar así hipótesis específicas en cuanto a la relación que guardan secuencia, estructura y función. Pero este enfoque, denominado ingeniería de proteínas, requiere de un conocimiento previo del que frecuentemente no se dispone. Las proteínas son máquinas moleculares de notable complejidad, constituidas por miles de átomos, con estructuras tridimensionales cuya estabilidad es más bien marginal. Así que, aunque cueste trabajo admitirlo, estamos todavía a una importante distancia de poder hacer predicciones razonablemente precisas sobre los efectos que tendrán mutaciones específicas en las proteínas. Y es por ello que, también desde los albores del estudio de proteínas utilizando ingeniería genética, se introdujeron enfoques que reconocían esta limitación. El trabajo pionero de Matteuci y sus colaboradores utilizó oligonucleótidos (pequeños segmentos de ADN sintético) con secuencias variadas para

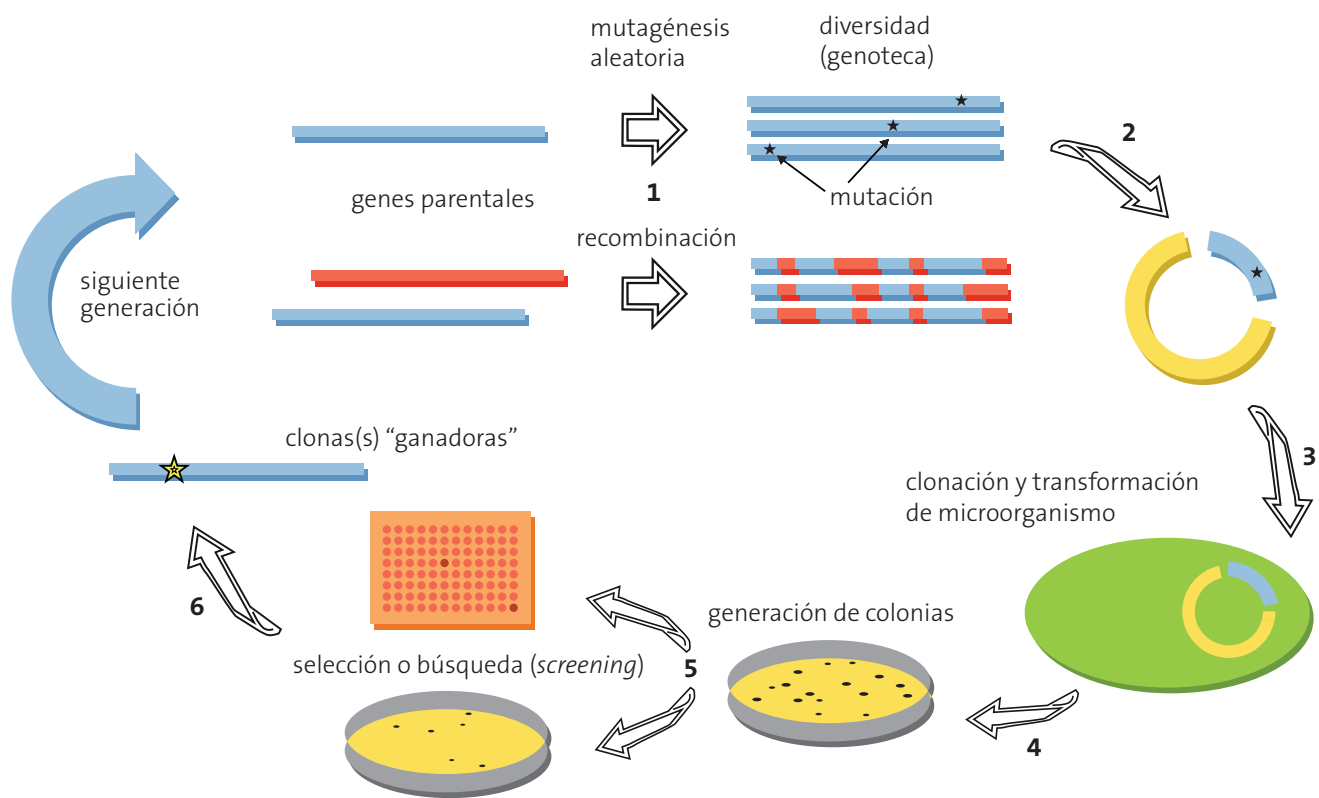


Figura 1. Etapas del proceso de evolución dirigida de proteínas.

explorar los efectos no sólo del cambio de un aminoácido, sino de varios, en una posición particular de la proteína. El paso natural siguiente es la introducción de diversidad en más de una posición, y el uso de técnicas más y más simples para determinar rápidamente cuáles mutaciones generan proteínas con características útiles o interesantes.

Así, en el curso de dos décadas, se ha ido avanzando en lo que podemos definir esquemáticamente como los dos enfoques para el estudio de proteínas con ADN recombinante: la ingeniería de proteínas y la evolución experimental o evolución dirigida. Todo ello acompañado de estudios teóricos que ayudan a enmarcar el fenómeno. Destacan en esta historia los estudios de Stuart Kauffman (Santa Fe Institute) durante los años noventas y los experimentos fundamentales de Frances Arnold (CalTech) y Pim Stemmer (Affimax, Maxigen) en esa misma década. Los resultados de estos grupos muestran que es enteramente posible aislar variantes de proteínas con características mejoradas a partir de genotecas de variantes, incluso de muchos millones de ellas, siempre y cuando se cuente con un sistema poderoso de búsqueda o selección. También demostraron que este método podía ser más rápido y eficaz que el de la ingeniería de proteínas basada en diseño.

Así se estableció el siguiente principio: aunque en teoría es posible llegar a conocer los sistemas proteínicos, y modificarlos con base en predicciones específicas, estamos aún muy distantes de poder lograrlo de manera consistente; por lo tanto, la imitación del proceso natural de variación y selección constituye un enfoque interesante y más redituable por el momento. Este enfoque, conocido como *evolución dirigida*, se puede describir en el esquema de la figura 1.

La evolución dirigida arriba descrita es bastante sencilla conceptualmente. Desde el punto de vista práctico, sin embargo, existen limitaciones tanto en el componente de creación de diversidad, como en el de métodos de búsqueda y selección. Decenas de laboratorios en el mundo, los del Instituto de Biotecnología en-

tre ellos, cultivan este enfoque e intentan aprovecharlo para mejorar las propiedades de sus proteínas favoritas, al tiempo que desarrollan cada día más los métodos involucrados. En la última sección de este capítulo describiremos algunas de nuestras líneas de investigación y experimentos.

### La evolución experimental como aproximación para el conocimiento

La teoría de la evolución es precisamente eso, una teoría. Es una explicación *a posteriori*, ya que sólo es un edificio conceptual que pretende explicar lo que se observa en la naturaleza. Las numerosas inferencias producidas por los análisis evolutivos deben poder ser puestas a prueba con un enfoque experimental que permita evaluar si son correctas. En ese sentido, se han generado dos grandes líneas, una basada en la reconstrucción filogenética de la historia evolutiva de algún gene particular, y la otra en la realización de experimentos tendientes a reproducir algún paso evolutivo. Cabe resaltar que las principales limitaciones de cualquier enfoque evolutivo experimental son primero el tiempo, ya que la evolución natural toma de millones a miles de millones de años, y segundo, el gran tamaño de las poblaciones en la naturaleza. Sin embargo, un experimento bien planteado permite poner en tela de juicio preguntas muy específicas.

### La evolución experimental como tecnología biológica

Uno de los mitos de la evolución actual ha sido que las enzimas ancestrales deben de ser poco eficientes, ya que suponemos que eran menos específicas catalíticamente. Esto es producto de una serie de prejuicios en que las imaginamos como algún troglodita molecular que arrastra sus nudillos. Para poner a prueba esta idea, el grupo de S. Benner de la Universidad de Florida determinó la secuencia más probable del ancestro de las ribonucleasas del rumen de la vaca y construyó un gene sintético que la co-

dificaba. Cada una de las formas actuales tiene especificidades distintas para ARN de cadena doble o sencilla y actividades óptimas a diferentes pH. Una de las hipótesis era que el producto del gene ancestral tendría una procesividad igual de mala en cualquier condición. Sin embargo, mostró ser extremadamente activo contra ambos sustratos y en las condiciones de pH más diversas. Contrariamente a lo que se pensaba, este grupo demostró que la evolución no producía enzimas más eficientes y adaptadas a distintos medios a partir de un ancestro general y poco procesivo, sino que genera formas especializadas a partir de un ancestro general extremadamente eficiente que pierde las características de amplio espectro.

Una derivación interesante de este tipo de trabajo ha sido el estudio de las propiedades del consenso de secuencia de una familia de proteínas. En este contexto, *consenso* se entiende como una secuencia de aminoácidos que en cada posición tiene el residuo más común en un alineamiento múltiple. Se ha mostrado en la literatura reciente que estas proteínas consenso tienen propiedades extremadamente interesantes, como son una mayor estabilidad y, en algunos casos, mayor amplitud de sustratos. Ésta es un área en plena expansión que permite explicar por qué mutaciones aparentemente deletéreas, que disminuyen la estabilidad de una proteína, son seleccionadas y mantenidas en la población.

### Las herramientas básicas para la evolución experimental

Una de las ventajas de la evolución dirigida es que en principio no se necesita ninguna información *a priori*. Sólo basta tener el gen con el que se piensa iniciar el proceso y no es necesario tener información de su estructura. En particular, una propiedad como la estabilidad no está determinada por cambios fácilmente predecibles, sino que es difusa a través de la estructura y, por lo tanto, no se requiere conocerla. No obstante, como se detallará más adelante, a veces será conveniente limitar la

generación a algunos residuos particulares, los cuales podrían estar involucrados en la propiedad que se busca cambiar cuando está claramente localizada en el sitio activo. En este caso, se deberá contar con la mayor información posible. El primer paso es conocer la secuencia del mayor número de ortólogos posible para determinar la variabilidad de distintas zonas de las secuencias. Este tipo de información nos permite identificar las zonas de menor variabilidad, las cuales están frecuentemente asociadas al sitio activo o a zonas reguladoras. La manera más fácil es buscar en bancos de secuencias utilizando técnicas bioinformáticas. Posteriormente, se construyen alineamientos múltiples que muestran las zonas equivalentes en cada secuencia. Este enfoque permite, en algunos casos, identificar secuencias homólogas de estructura tridimensional conocida. Se pueden construir modelos relativamente precisos de la estructura tridimensional de la enzima problema utilizando como molde la estructura homóloga. Esta información, a su vez, permite dirigir la mutagénesis con mayor precisión y, por ende, eficiencia. En algunos casos donde no existen homólogos de estructura conocida, también se puede identificar la estructura de una proteína utilizando técnicas de hilvanamiento (*threading*) para construir modelos.

### Métodos y enfoques para la creación de diversidad

Una proteína de *E. coli* tiene en promedio 319 aminoácidos. Existen 6061 variantes de mutaciones sencillas, 18 millones de variantes dobles, 36 mil millones de variantes con tres cambios y  $19^{319}$  variantes con cambios en todas las posiciones. Este último número es mayor al número de partículas atómicas en el universo. Como se puede ver, sólo es posible analizar un número extremadamente restringido de variantes en un experimento. Los mejores bancos disponibles tienen cerca de  $10^8$  variantes, lo cual indica que sólo se podrían analizar todas las variantes con tres o menos cambios por experimento. Por otra parte, la comparación de

secuencias indica que existen numerosos casos de enzimas homólogas que tienen sólo 25% de identidad y sin embargo sus actividades catalíticas son indistinguibles. En este sentido, la exploración de variantes en el laboratorio podría ser extremadamente limitada en comparación con la realizada por la evolución natural.

Además, se ha observado que con las técnicas de mutagénesis puntuales empleadas sólo se pueden obtener un promedio de cinco residuos distintos por posición. Para tratar de remediar estas carencias se han seguido distintos enfoques más o menos exitosos. Por ejemplo, se ha concentrado la mutagénesis en las zonas en las que se piensa deben estar los residuos determinantes para obtener el resultado deseado. Se han generado estrategias de combinación de bancos de variantes concentrados en distintas zonas de la proteína. Sin embargo, las técnicas basadas en la generación de mutaciones puntuales tienen limitaciones importantes, por lo que se hace necesario desarrollar nuevas técnicas. Más adelante se presentarán algunos de los intentos que hacemos en nuestro laboratorio por vencer dichos escollos.

### Métodos de selección y búsqueda

Los mejores métodos de obtención son los que se basan en la selección directa de las variantes deseadas, ya sea por complementación de mutantes carentes de esta actividad o por conferir resistencia a algún antibiótico, entre otras. Sin embargo, estos casos son los menos, ya que algunas de las actividades o propiedades deseadas no pueden ser seleccionadas *in vivo*. Por ejemplo, es prácticamente imposible si se busca una actividad enzimática que funcione a más de 100°C y a un pH de 1, ya que son condiciones que muy rara vez se encuentran en la naturaleza. En estos casos es necesario ensayar individualmente las propiedades bioquímicas de cada una de las variantes, para lo cual se usan sistemas de tamiz de alta densidad robotizados (*high throughput screening*). En los mejores casos, estos sistemas pueden analizar unas pocas decenas de miles de clo-

nas, cuando en un sistema de selección directa se pueden analizar millones de clonas. Existen también casos en los que las actividades deben ser medidas con sistemas de cromatografía de gases o de HPLC, que limitan aún más el número de clonas analizables. Para tratar de evadir estas limitaciones, algunos grupos han utilizado sistemas donde miden la catálisis de algún análogo. Desafortunadamente, han observado que con frecuencia obtienen enzimas que han sido seleccionadas para mejorar sólo en las propiedades necesarias con el análogo, no con el sustrato de interés, por lo que es un enfoque que hay que utilizar con mucha cautela.

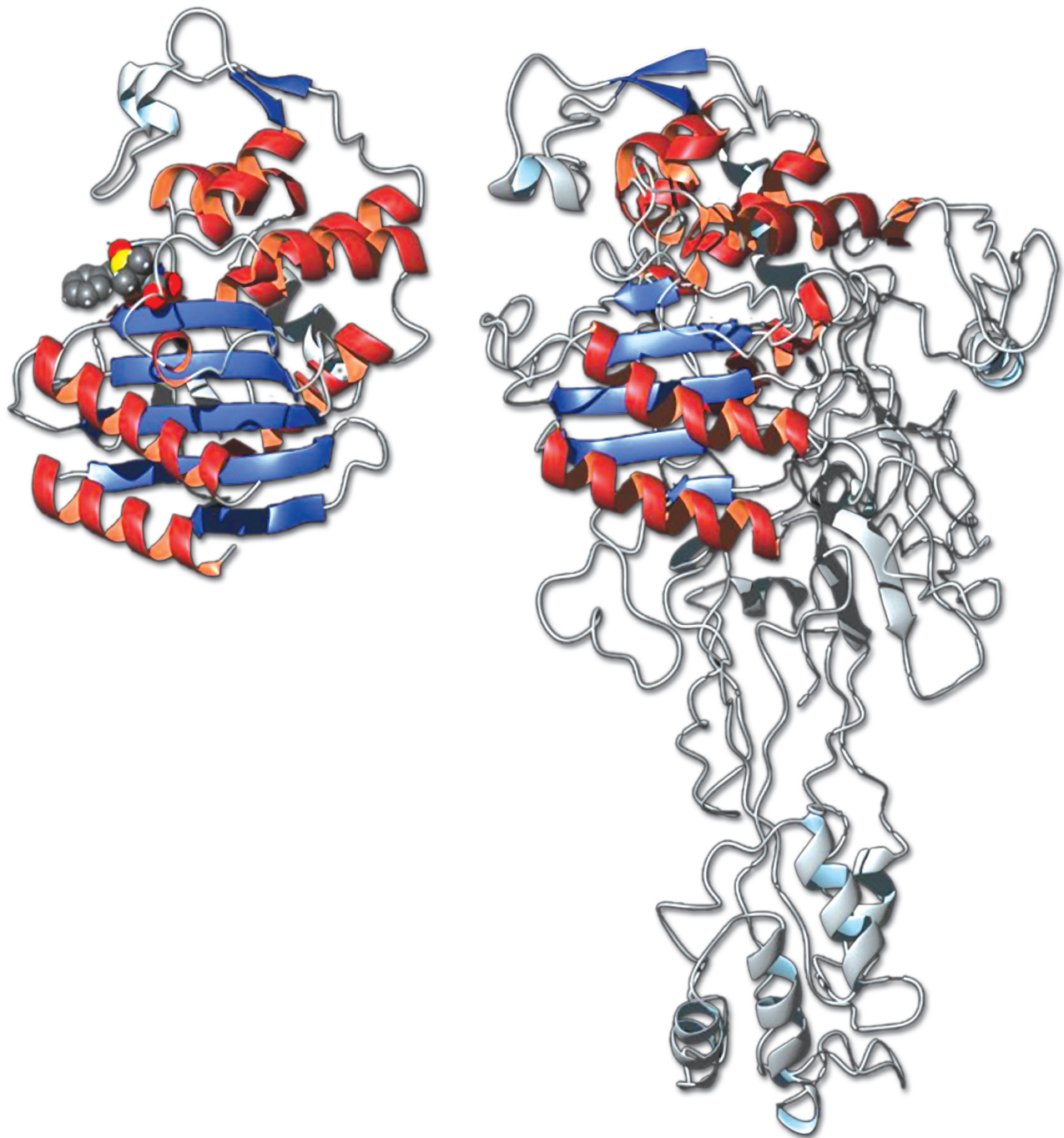
### La contribución del IBT en el área de la evolución experimental

En el Instituto existen varios grupos que han contribuido en este apasionante campo. Nos referiremos aquí a algunos de los resultados que competen a los grupos de los dos autores, aunque debe mencionarse que también en los laboratorios de Baltazar Becerril, Alejandra Bravo, Enrique Morett y Mario Soberón se han llevado a cabo investigaciones que se enmarcan en este enfoque. Las investigaciones que hemos querido describir nos parecen particularmente ilustrativas sobre la frontera del campo.

### Enfoques novedosos para la creación de diversidad molecular

Como ya se mencionó, uno de nuestros grupos de investigación está intentando superar la limitación para la creación experimental de genes mutantes. Un primer conjunto de proyectos pretende ir más allá de la mutación puntual, es decir, la que cambia una sola base a la vez. Puede verse con facilidad que, debido a la naturaleza del código genético, las mutaciones de una sola base, que alteran sólo una de las tres bases del codón, dan origen a proteínas en las que se observan no más de la tercera parte de los cambios de aminoácidos en cada posición. A través del uso de química ortogonal en la síntesis de ADN, hemos logrado una técnica para introducir las





**Figura 2.** Comparación de las estructuras de la  $\beta$ -lactamasa TEM1 con una molécula de bencil penicilina (izquierda) y la DD-peptidasa pbp2x (derecha). Los dominios homólogos están coloreados.



mutaciones codón por codón, es decir, de tres en tres. De esta manera se puede acceder a la totalidad de los reemplazos de aminoácidos, esto es, al 66% de ellos (que nunca han sido explorados con las técnicas actuales).

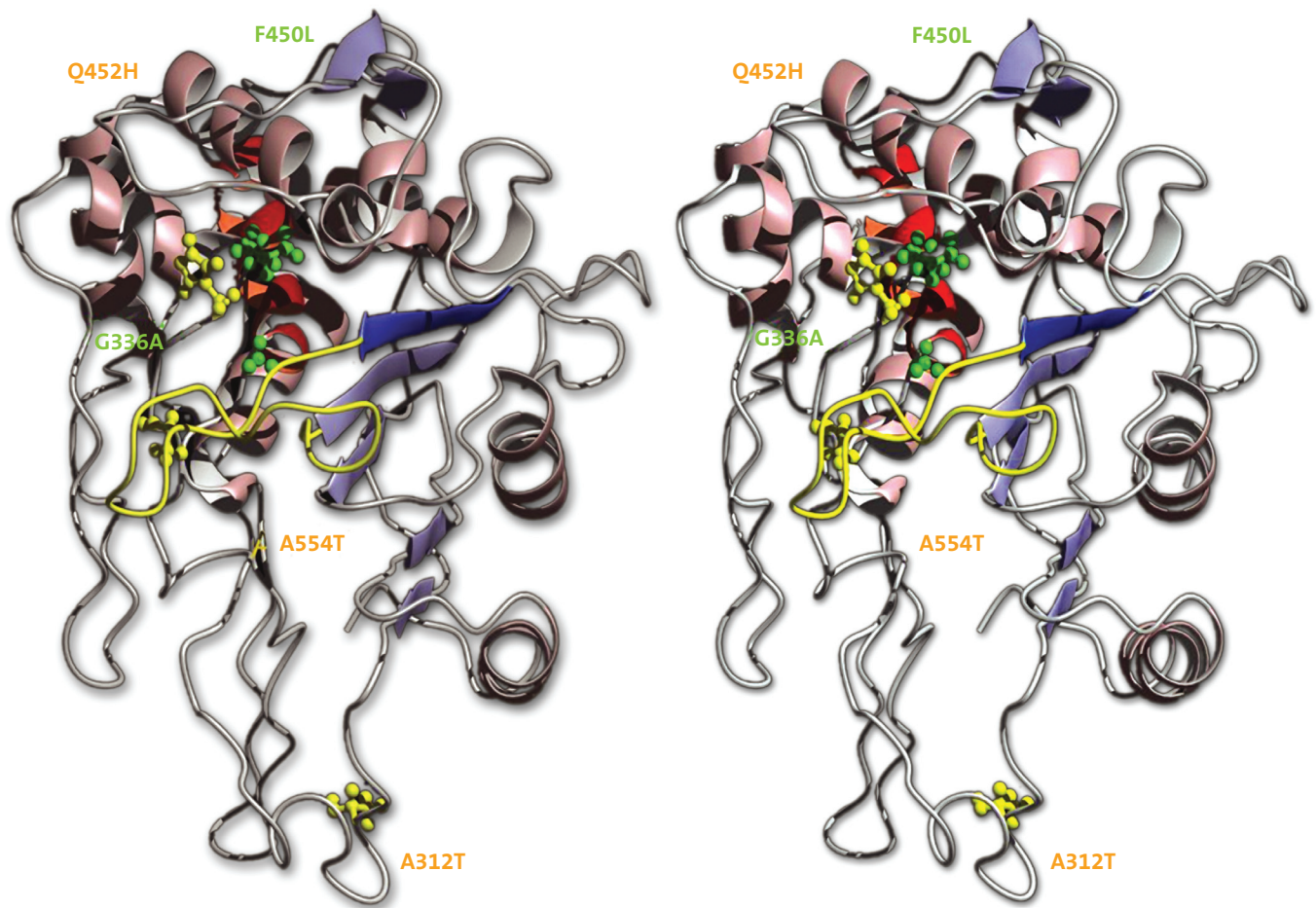
La otra limitación muy importante en las técnicas actuales se refiere a la ausencia de inserciones y eliminaciones como componente de la variabilidad. Cualquier análisis de proteínas homólogas nos muestra que la diversificación de funciones invariablemente se da en un contexto en el que hay aminoácidos adicionales o ausentes. Más aún, frecuentemente estas adiciones o eliminaciones corresponden a segmentos completos, y aun dominios de proteína. Pero estos tipos de modificaciones han estado fuera del alcance de las técnicas de laboratorio actuales. Nosotros nos hemos dado a la tarea de diseñar metodologías que superen estas limitaciones. Así, usando también la química ortogonal en síntesis de oligos, logramos un método para la inclusión de deleciones, que denominamos COBARDE (*codon-based random deletion*). También hemos avanzado en la implementación de métodos en los que la diversidad se induce por el reemplazo de elementos completos de estructura, específicamente las asas que conectan segmentos con estructura secundaria en las proteínas.

### Trabajo pionero en migración catalítica

Inicialmente elegimos a la superfamilia estructural de la  $\beta$ -lactamasa/DD-peptidasa como modelo experimental, ya que ofrece un sistema de selección muy sencillo que permite tanto la obtención de variantes con cambios en especificidad como en actividad específica (figura 2). Además, las serin- $\beta$ -lactamasas, las DD carboxipeptidasas y las DD transpeptidasas operan mediante el mismo mecanismo de abstracción-donación de protones, tienen el mismo plegamiento y presentan algunos motivos de secuencia conservados. Sin embargo, realizan funciones diferentes y la similitud de sus secuencias es casi inexistente.

Las  $\beta$ -lactamasas inactivan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y son las responsables de esta resistencia. Las DD peptidasas están involucradas en la síntesis y mantenimiento de la pared celular bacteriana; estas enzimas también son llamadas PBP (*penicillin binding proteins*) debido a que son inhibidas competitivamente por antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Estudios filogenéticos a partir de la secuencia de aminoácidos y de la estructura terciaria muestran que las  $\beta$ -lactamasas provienen evolutivamente de las DD peptidasas. A partir de la comparación de las estructuras cristalográficas de estas proteínas y del análisis de secuencias se ha propuesto que las serin- $\beta$ -lactamasas han surgido en tres ocasiones independientes a partir de las PBP.

Buscando entender cuáles pueden ser los determinantes más importantes para cada tipo de catálisis en ambos tipos de enzimas, realizamos una migración catalítica de una DD-peptidasa a una  $\beta$ -lactamasa. Diseñamos un esquema mutagénico combinatorio dirigido sobre once residuos del sitio catalítico y adicionalmente la mutagénesis al azar del dominio estructural completo de la *pbp2X* (figura 3) de *Streptococcus pneumoniae*. Con este esquema obtuvimos una mutante quintuple que tiene actividad de cefalosporinasa, la cual le confiere una resistencia al antibiótico de 20 a 100 veces mayor dependiendo del vector de expresión utilizado. Al analizarla encontramos que sólo tres mutaciones (G336A, F450LM y Q452H) son necesarias y suficientes para conferir este fenotipo. Esta mutante triple no ha perdido la actividad de DD-peptidasa. La única característica cinética que parece haber cambiado es la velocidad de desacilación, la cual aumentó más de 100 mil veces, confiriéndole así la capacidad de hidrolizar cefalosporinas. Hemos tratado sin éxito de obtener variantes que confieran niveles aún mayores de actividad. Nuestros datos indican que hemos reproducido lo ya sucedido en la evolución de estas enzimas. Este trabajo fue publicado y ocupó la portada de la revista *Protein Engineering*, enero 2003.



**Figura 3.**  
 Vista estereoscópica de un modelo de la pbp2x mostrando los aminoácidos cambiados en la mutante quintuple. Los letreros amarillos indican las mutaciones producidas al azar y los verdes las de manera dirigida. En rojo se resalta la hélice alfa que sostiene a la serina catalítica, crítica para el mecanismo de reacción. En amarillo, la llamada asa omega, que cubre el sitio activo.

### **Modificación de enzimas para la ingeniería celular**

Este capítulo estaría incompleto si no hiciéramos mención a los trabajos relacionados con aplicaciones de la evolución experimental. Nosotros tenemos la convicción de que es una tecnología con amplios ámbitos de aplicación (tecnología “habilitante”). Hemos incursionado en varios de ellos, pero mencionaremos uno en particular que ilustra el potencial del enfoque.

El campo de la ingeniería celular se refiere a las modificaciones genéticas específicas que se hacen a una célula para inducirla a comportarse conforme a un plan establecido. Típicamente se pretende mejorar la productividad de los cultivos celulares de ma-

nera que se maximice el rendimiento de los productos deseados respecto a las materias primas. En colaboración con el laboratorio de Francisco Bolívar y Guillermo Gosset, logramos una combinación entre los métodos de modificación de regiones reguladoras y eliminación de genes específicos (técnicas fundamentales de la ingeniería celular), con la modificación de la regulación a nivel alostérico, utilizando la evolución dirigida, de una de las enzimas participantes en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos. El resultado de estos experimentos es la obtención de cepas que producen una mayor cantidad de la aminoácido L-fenilalanina, en niveles que eran inalcanzables anteriormente. ●

