

# La Química como Herramienta en Biomedicina

II CURSO DE DIVULGACIÓN  
“LOS AVANCES DE LA QUÍMICA Y SU IMPACTO EN  
LA SOCIEDAD”

Enrique Mann

11 de noviembre de 2010

- 
- 
- Introducción
  - Química en organismos vivos
    - Química “click”
    - Química “click” *in vivo*
  - Química para modificar proteínas
    - Aplicaciones de proteínas modificadas
    - Métodos para modificar proteínas
-

**biomedicina.**

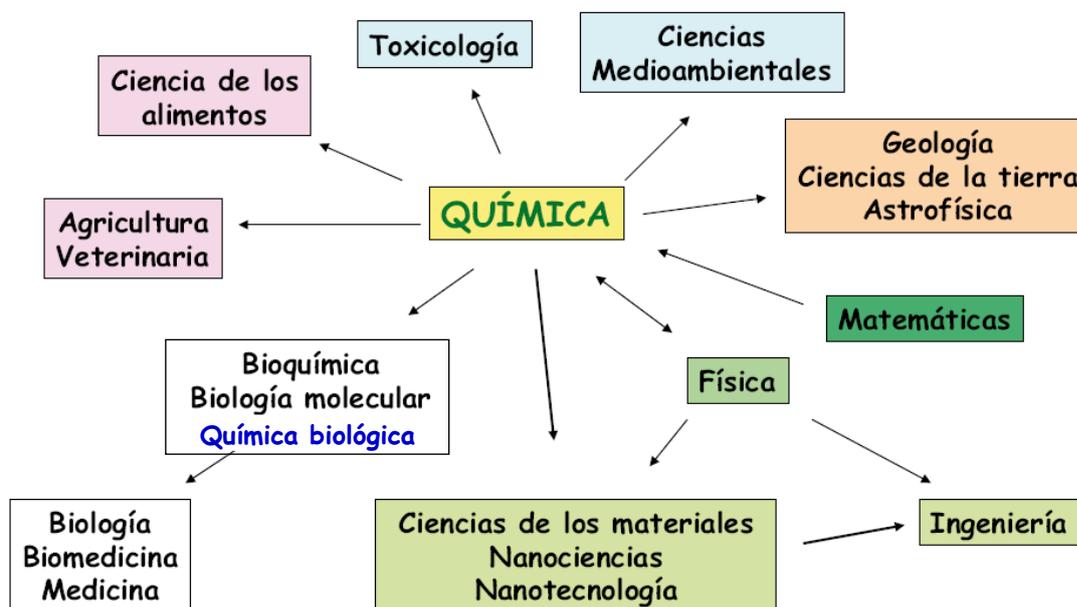
1. f. Conjunto de disciplinas como la bioquímica, la biología molecular y celular y la genética, que desempeñan un papel fundamental en la medicina actual.



La **biomedicina** es un término que engloba el conocimiento y la investigación que es común a los campos de la medicina, veterinaria, odontología y a las biociencias como bioquímica, química, biología, histología, genética, embriología, anatomía, fisiología, patología, ingeniería biomédica, zoología, botánica y microbiología. La **biomedicina no se relaciona con la práctica de la medicina, sino con el estudio e investigación de las ciencias de salud**. Permite **la creación de nuevos fármacos, comprender a nivel molecular los mecanismos fisiopatológicos**, etcétera. Todo esto se aplica a los avances en el diagnóstico y el tratamiento.

- creación de nuevos fármacos
- comprensión a nivel molecular de los mecanismos fisiopatológicos

## La Química y su relación con otras Ciencias



---

---

“comprensión a nivel molecular de los mecanismos fisiopatológicos”

## Química Biológica

“Un área multidisciplinar que aborda problemas biológicos fundamentales empleando una aproximación intelectual que se basa en la química”

- La Química es la ciencia del **enlace** (covalente y no covalente), la **reactividad** y la **estructura** (nano)
- Históricamente la bioquímica ha jugado este papel; sin embargo, en la actualidad, la comprensión a nivel molecular de estos mecanismos requieren **un conocimiento más profundo de química** que el que generalmente se requiere para aplicar las aproximaciones bioquímicas estándar.

---

- 5 -

---

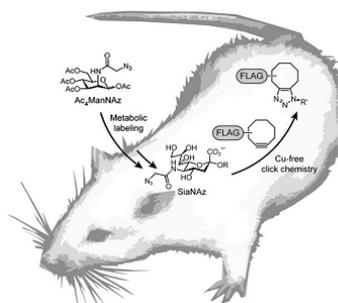
---

### ● Química en organismos vivos

- ¿Qué es la Química Click?



- Química click “in vivo”



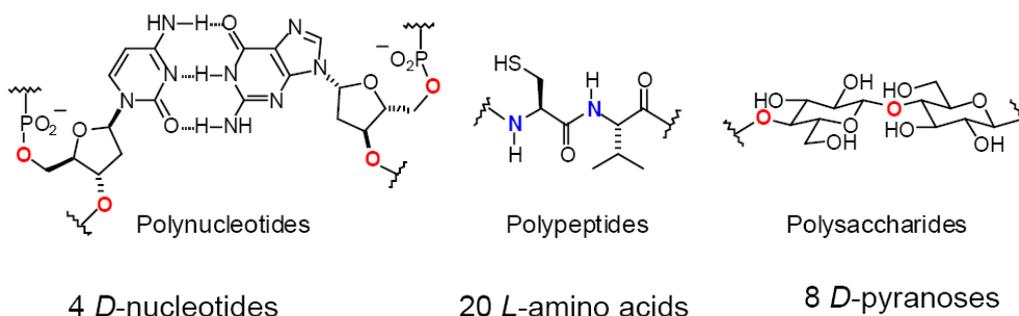
---

- 6 -

## LA NATURALEZA COMO FUENTE DE INSPIRACIÓN

□ La vida, al igual que la industria petroquímica, se basa en la construcción modular de oligómeros.

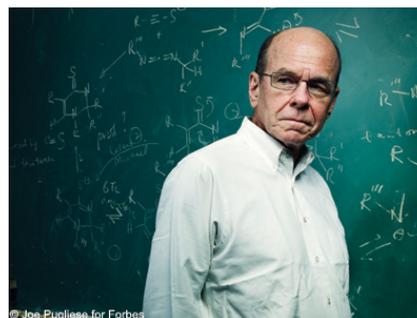
- A partir de alrededor de 30 módulos la naturaleza crea biopolímeros de asombrosa variedad tanto estructural como funcional.
- Estos módulos se unen entre sí mediante largas secuencias de reacciones INTERMOLECULARES



- 7 -

## ¿Qué es la “química click”?

“Es un concepto propuesto por K. B. Sharpless (2001) y que define un tipo de química pensada para generar nuevos compuestos de una manera rápida y fiable mediante la unión entre sí de unidades estructurales de menor tamaño **vía enlaces carbono-heteroátomo (C-X-C).**”



K. B. Sharpless

### ❖ Requisitos de las reacciones click:

- Rendimientos altos
- Condiciones de reacción simples
- Alta economía atómica
- Aislamiento y purificación sencilla



- 8 -

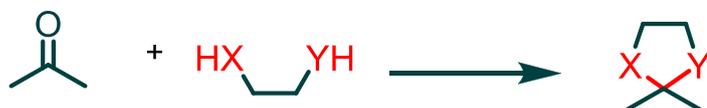
## Reacciones Click

- Apertura con nucleófilos de anillos muy tensionados



Epóxidos, aziridinas, sales de aziridinio, sulfatos cíclicos...

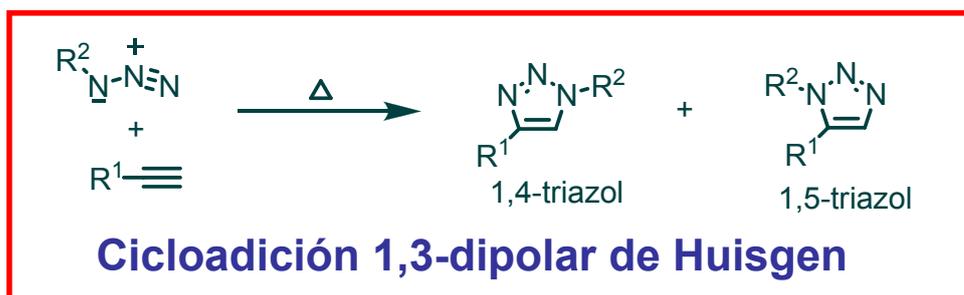
- Reacciones tipo "protección" de grupos carbonilo



Acetales y aza-análogos

- Reacciones de cicloadición

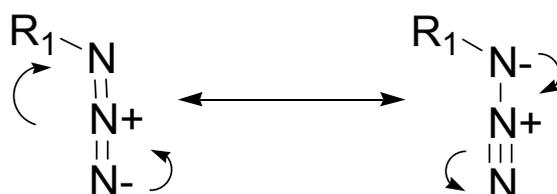
➤ Cicloadiciones [1,3]-dipolares con heteroátomos presentes



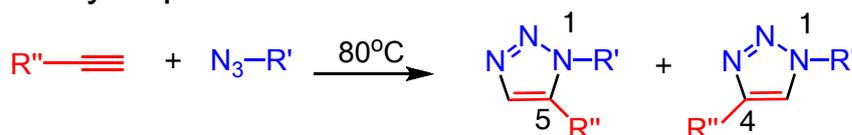
- 9 -

## Perspectiva histórica de las cicloadiciones azida/alquino

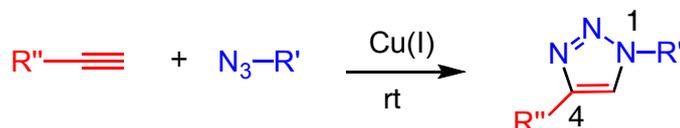
- 1933- Linus Pauling describe la naturaleza dipolar del grupo azida



- 1960- Rolf Huisgen describe la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos

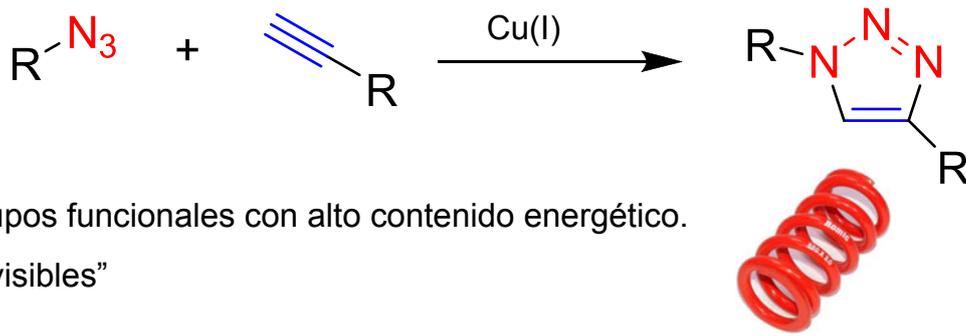


- 2002- Sharpless y Meldal describen cicloadición entre azidas y alquinos catalizada por cobre

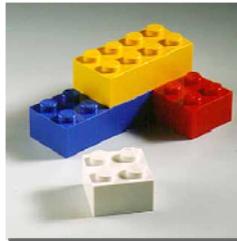


- 10 -

## ¿Por qué azidas y alquinos?



...pero cuando se encuentran entre ellos en las condiciones adecuadas... “CLICK”!!!!



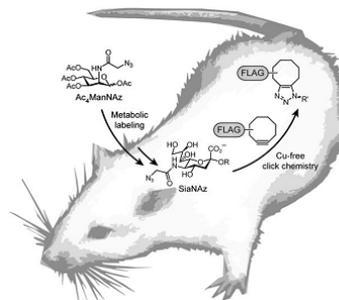
- 11 -

## Aplicaciones de Química Click en Biomedicina

- ¿Qué es la Química Click?



- Química click “*in vivo*”



- 12 -

## Química dentro de células y organismos vivos

❖ ¿Por qué queremos hacer reacciones químicas en células y organismos vivos?



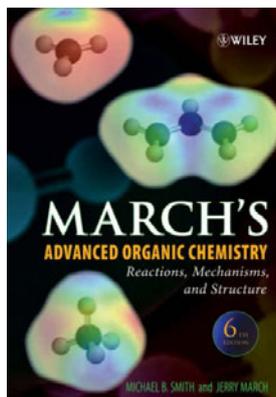
- 13 -

## Química dentro de células y organismos vivos

❖ ¿Por qué es difícil realizar reacciones de manera selectiva en células y organismos vivos?

- La Naturaleza emplea enzimas
- Inviabile (hoy en día) preparar nuevas enzimas para llevar a cabo nuevas reacciones

¿Por qué no hacer una reacción química como uno haría en un laboratorio de síntesis convencional?

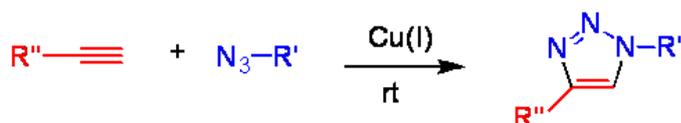


- Sensibles al agua ✗
- Compuestos que reaccionen con aminas y tioles ✗
- Compuestos sensibles a condiciones redox ✗
- Temperatura > 37°C, presión o altas concentraciones ✗
- Reactivos sensibles a las enzimas "asas" ✗
- Toxicidad ✗



- 14 -

## La química click acude al rescate



- Insensibles al agua
- Compuestos que **no** reaccionen con aminas y tioles
- Compuestos **insensibles** a condiciones redox
- Temperatura = 37°C, **sin** presión o **sin** altas concentraciones
- Reactivos **insensibles** a las enzimas "asas"
- Toxicidad ❌



Cu(I) es tóxico!!!



- 15 -

## La heroína



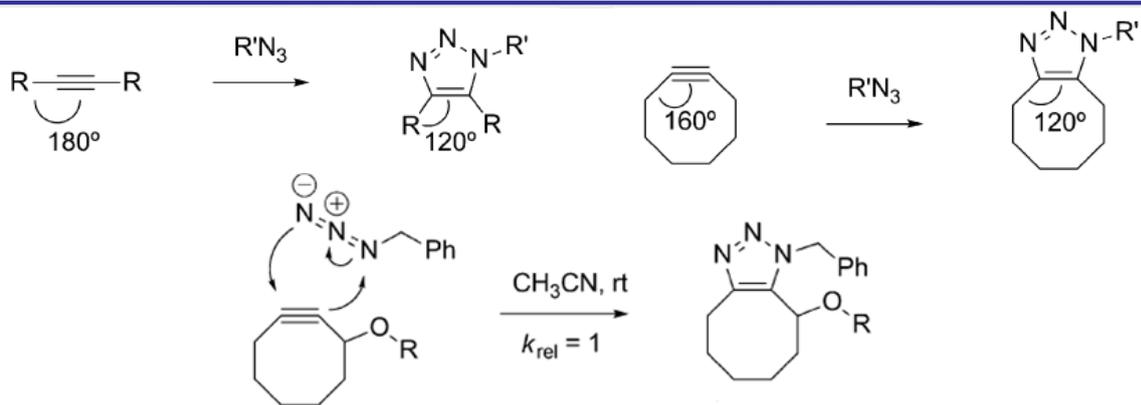
Carolyn Bertozzi

- ❖ Los carbohidratos de la superficie celular es una rica fuente de información acerca del estado fisiológico de la célula:
- Relacionados con el desarrollo embrional, desarrollo de tumores, etc
- Biomarcadores para alteraciones en la expresión génica durante el desarrollo y la progresión de enfermedades.
- Su abundancia nos da información relacionada con el estado y funcionamiento de las rutas metabólicas
- Dianas muy interesantes para ser estudiadas in vivo
- Aplicaciones directas en biomedicina

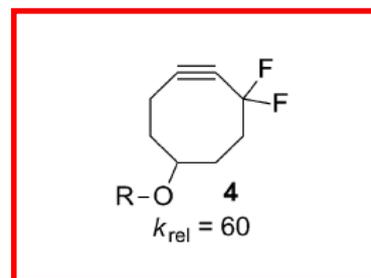
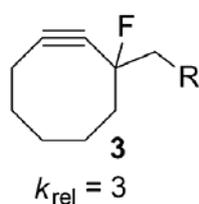
**Necesidad de desarrollar técnicas para la visualización de carbohidratos en la célula a tiempo real!!**

- 16 -

# La solución (Bertozzi)

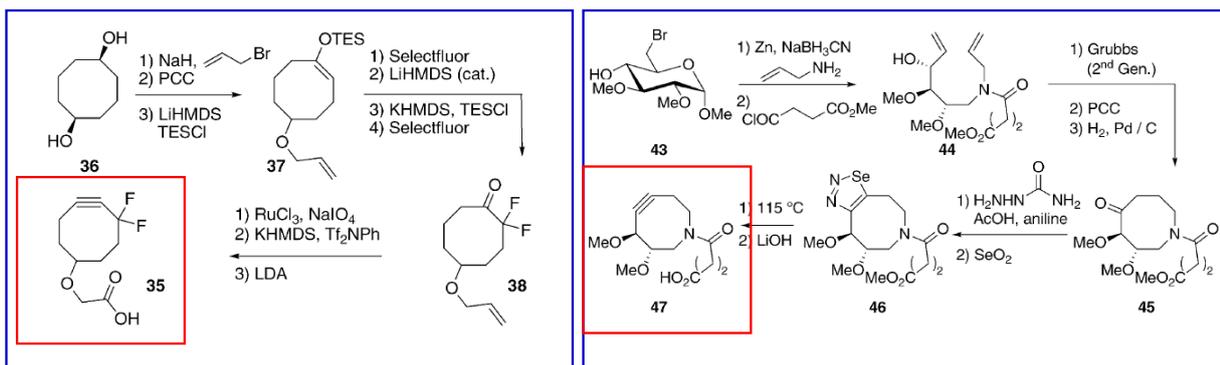
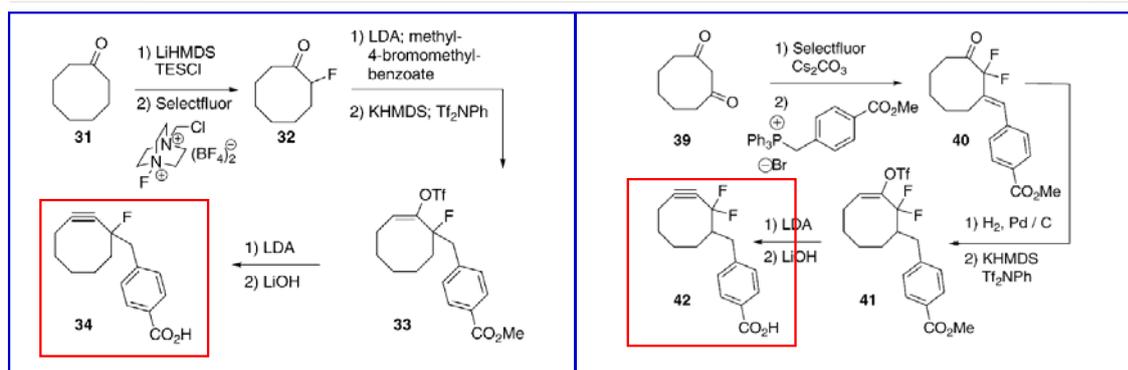


## Química Click “sin cobre” !!!



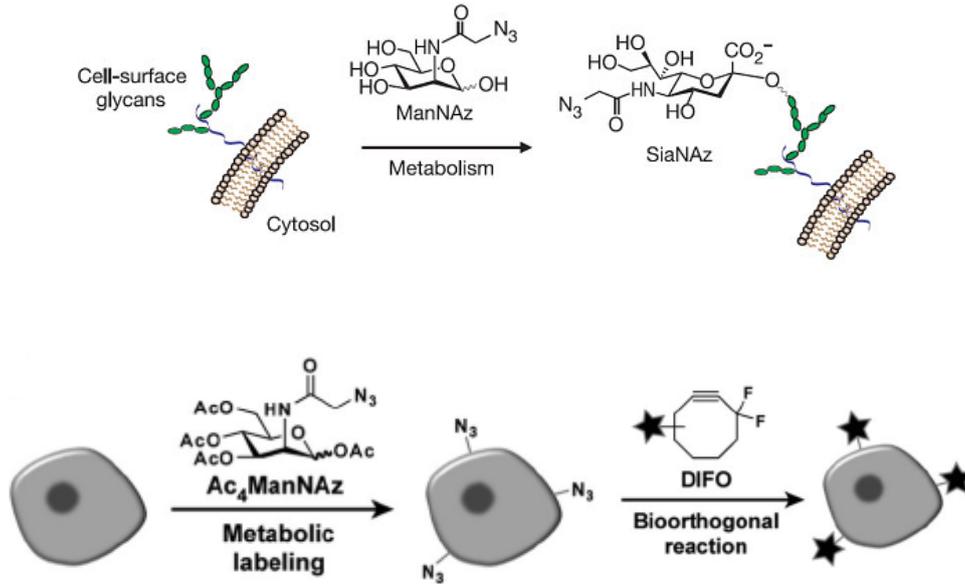
- 17 -

## Síntesis de alquinos funcionalizados (Bertozzi)



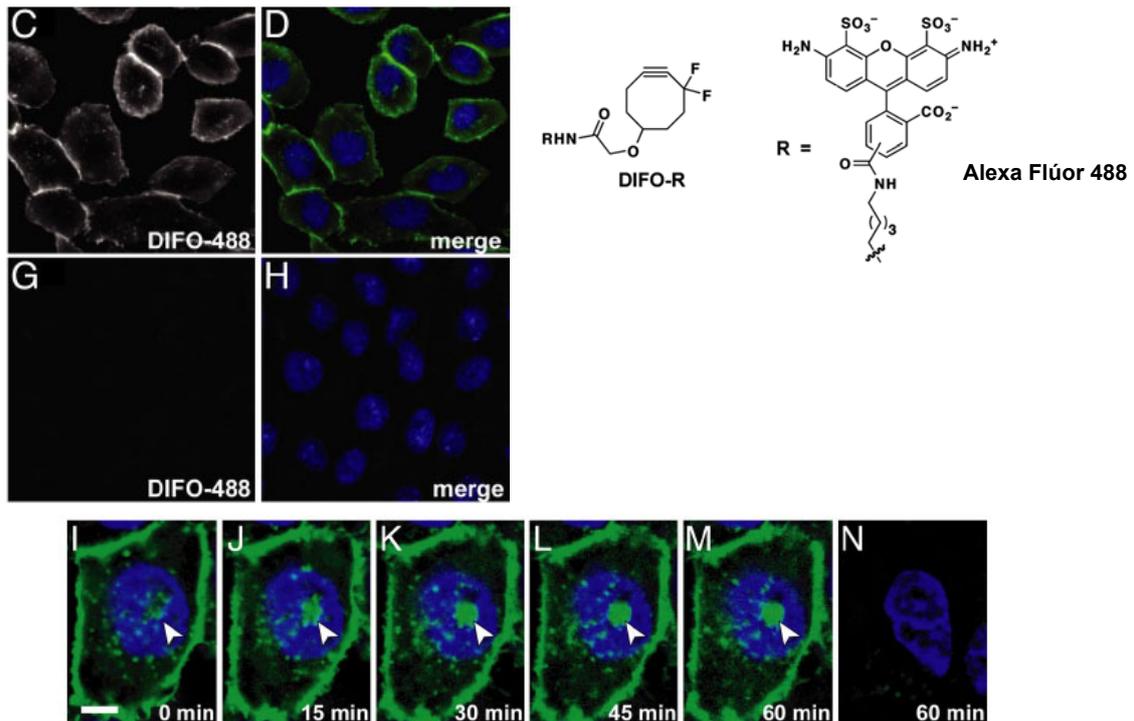
- 18 -

# La solución (Bertozzi)



- 19 -

## Química click en células vivas de ovario de hamster



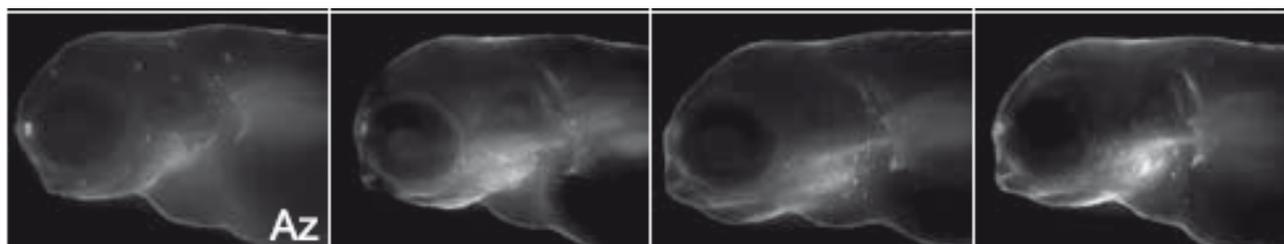
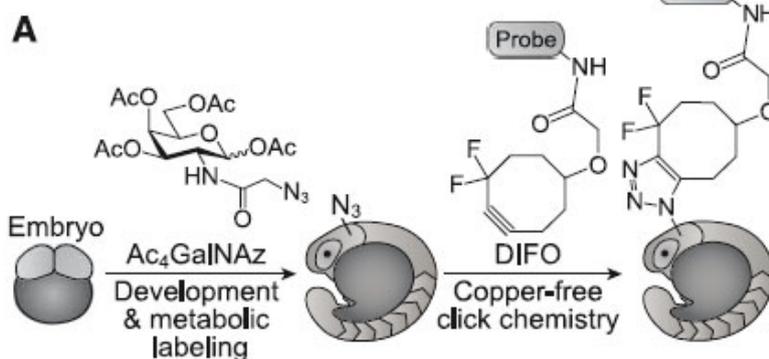
PNAS, 2007, 43, 16793

- 20 -

## Química click en embriones de pez cebra



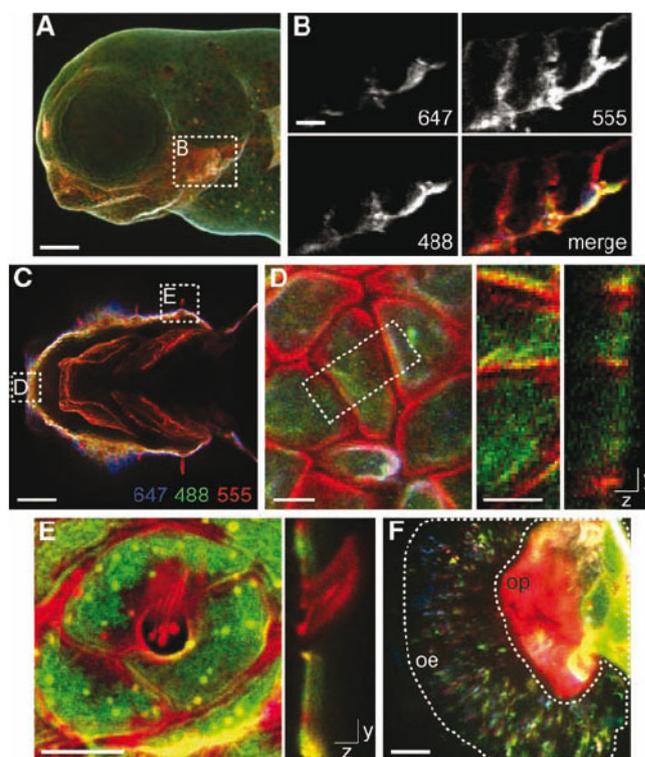
pez cebra (*Danio rerio*)



*Science*, **2008**, 320, 664-667

- 21 -

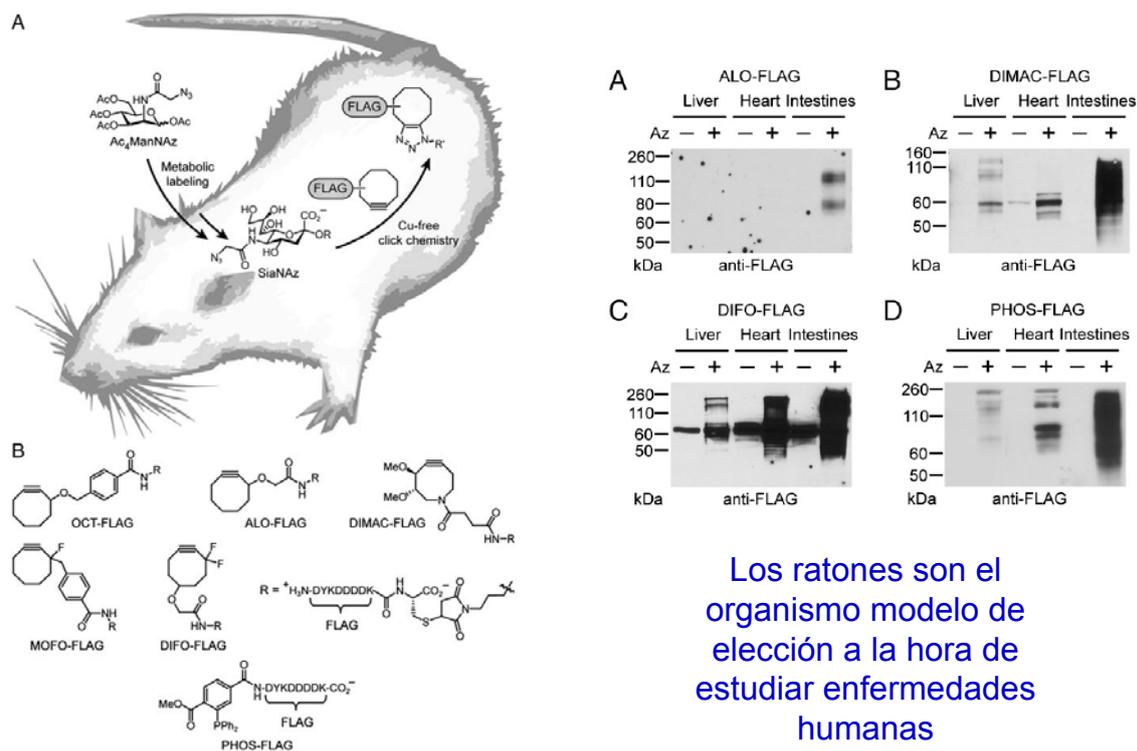
## Química click en embriones de pez cebra



*Science*, **2008**, 320, 664-667

- 22 -

## Química click en ratones vivos!!!



PNAS, 2010, 107, 1821

- 23 -

“While the field of bioorthogonal chemistry has expanded rapidly, there remains a pressing need for new reagents with fewer side reactions and increased efficiencies. **Where will these new reactions come from?** Using history as a guide, they are found in the least likely of places, buried in a piece of purely academic scholarship that is being written up at this very moment”

Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R.. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1272-1279.



- 24 -

- 
- 
- Introducción
  - Química en organismos vivos
    - Química “click”
    - Química “click” *in vivo*
  - Química para modificar proteínas
    - Aplicaciones de proteínas modificadas
    - Métodos para modificar proteínas
- 

- 25 -

---

## Química para modificar proteínas

---

### Algunas aplicaciones de proteínas químicamente modificadas

❖ Aplicaciones para la modificación de proteínas aisladas

❖ Aplicaciones para la modificación de proteínas en sistemas vivos

➤ **Sondas fluorescentes**

➤ **Modificaciones post-traduccionales**

➤ **Entrecruzamiento químico**

➤ **Sondas de afinidad**

➤ **Sondas radioactivas**

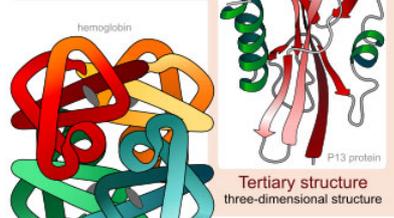
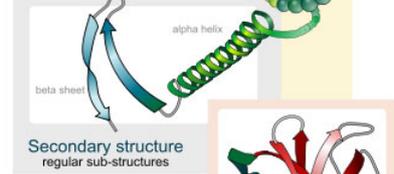
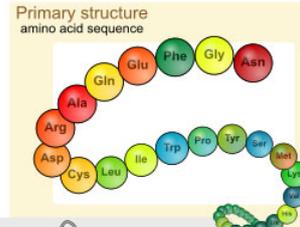
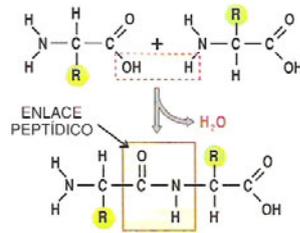
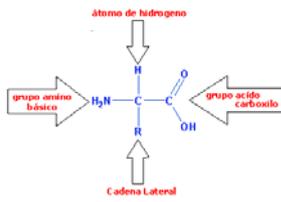
➤ **Sondas magnéticas**

---

- 26 -

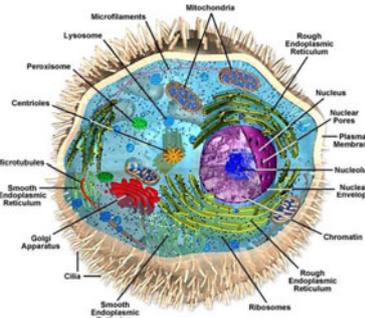
# Proteínas: algunos conceptos básicos

## Las proteínas son polipéptidos plegados con modificaciones postraduccionales



✓ Las proteínas se fabrican en los **ribosomas** localizados en la superficie del **retículo endoplasmático rugoso**

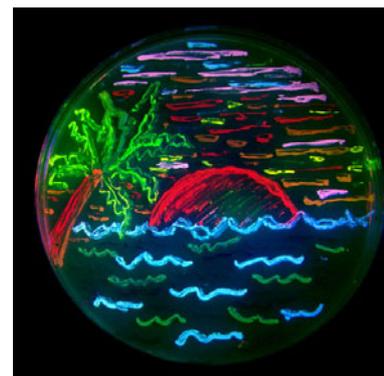
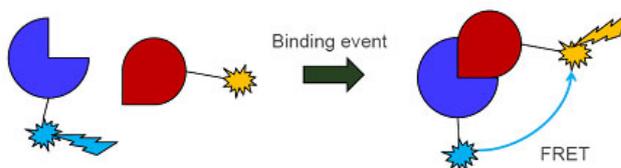
✓ Posteriormente, sufren numerosas modificaciones postraduccionales (MPT) en el **RE**, **Golgi** y **citoplasma**.



## Aplicaciones de proteínas químicamente modificadas

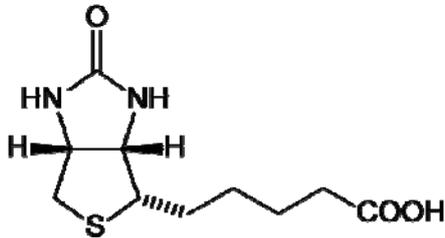
### SONDAS FLUORESCENTES

- Herramienta muy poderosa para la visualización y seguimiento de proteínas en células vivas
- Muy útiles en ensayos basados en fluorescencia: cribado de actividad de compuestos con potencial actividad biológica
- Detección de cambios conformacionales mediante la medida de distancias (en la proteína o en sistemas mas complejos) empleando técnicas como Forster (o Fluorescence) Resonance Energy Transfer (FRET)

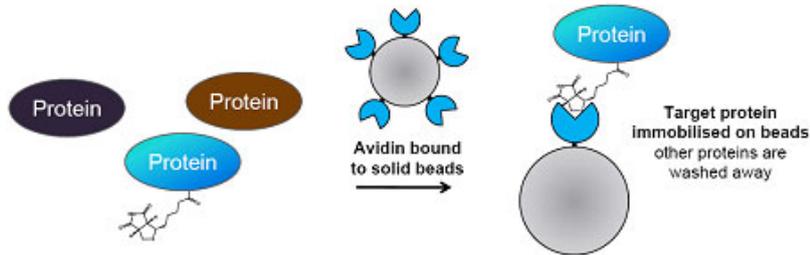


## Marcadores de afinidad (affinity labels)

### Biotina: la “supeestrella” de los marcadores de afinidad



- Biotina (vitamina H): sonda de afinidad muy útil y ampliamente empleada
- ❖ Afinidad extrema por una proteína llamada avidina
- ❖ Una de las interacciones no covalentes más fuertes que se conocen
- ❖ Esta propiedad se emplea para el aislamiento (“pull-down”) de proteínas.

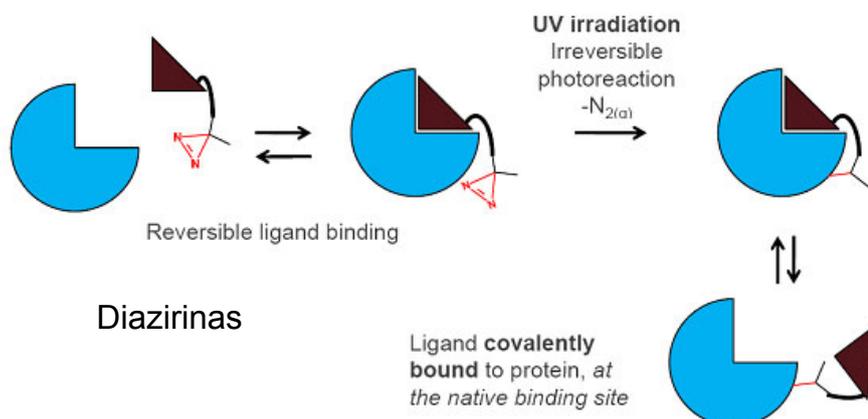


- 29 -

## Entrecruzamiento Químico (Cross-linking): estudio del sitio de unión de un ligando

➤ Aplicable a complejos ligando-proteína, proteína-proteína, ADN-proteína, etc

- ❖ El complejo ligando-proteína es atrapado mediante una funcionalidad química que puede ser “activada” en unas condiciones específicas (por ejemplo, irradiación con luz ultravioleta)



- 30 -

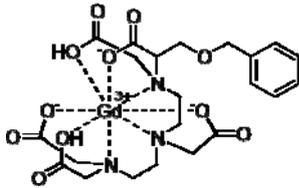
# Aplicaciones de proteínas químicamente modificadas

## SONDAS MAGNÉTICAS

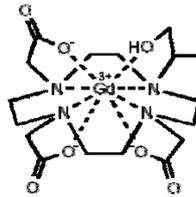
- Preparación de agentes de contraste
- Aplicaciones en Imagen por Resonancia Magnética (MRI)

Basados en  $Gd^{3+}$  (paramagnético)

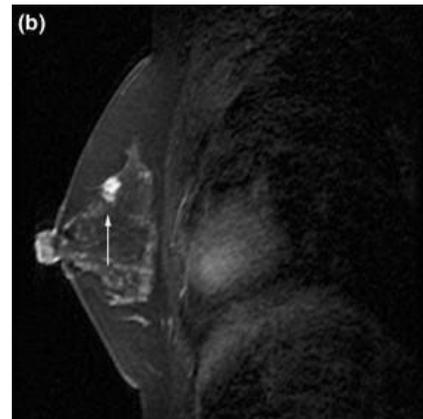
Los agentes de contraste alteran los tiempos de relajación del agua en los tejidos donde están presentes



Ácido gadobénico  
(*Multihance*)



Gadoteridol  
(*ProHance*)



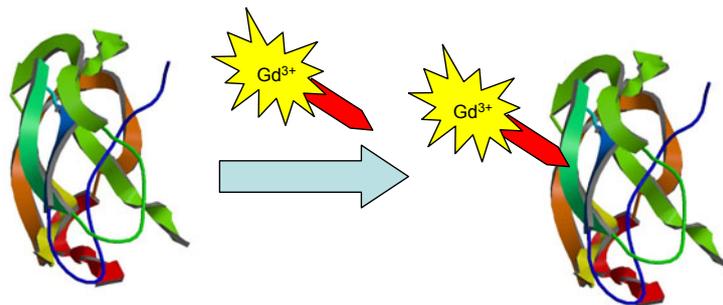
- ❖ Inconvenientes:
  - Baja eficiencia: altas dosis de Gd tóxico
  - Baja selectividad
  - Baja biodisponibilidad

- 31 -

# Aplicaciones de proteínas químicamente modificadas

## SONDAS MAGNÉTICAS EN PROTEÍNAS

- ❖ Incrementar los valores de relajación para incrementar el contraste generado, permitiendo el uso de dosis más bajas de Gd y disminuir la posibilidad de efectos tóxicos.
  - Aumentar biodisponibilidad
  - Aumentar selectividad



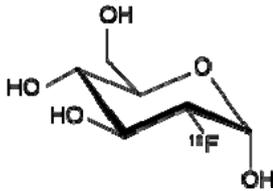
- 32 -

# Aplicaciones de proteínas químicamente modificadas

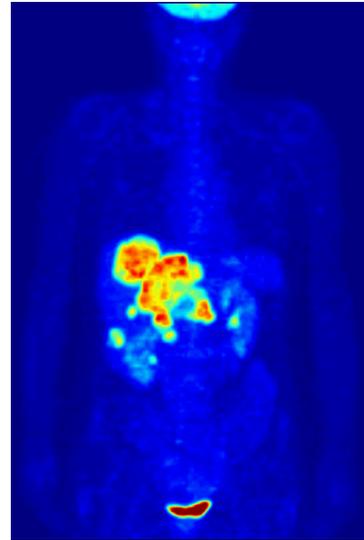
## SONDAS RADIOACTIVAS

### Tomografía por Emisión de Positrones (PET)

Detección de rayos gamma procedentes de la desintegración de radionucléidos ( $^{18}\text{F}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ , etc)



2-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluor-2-desoxi-D-glucosa



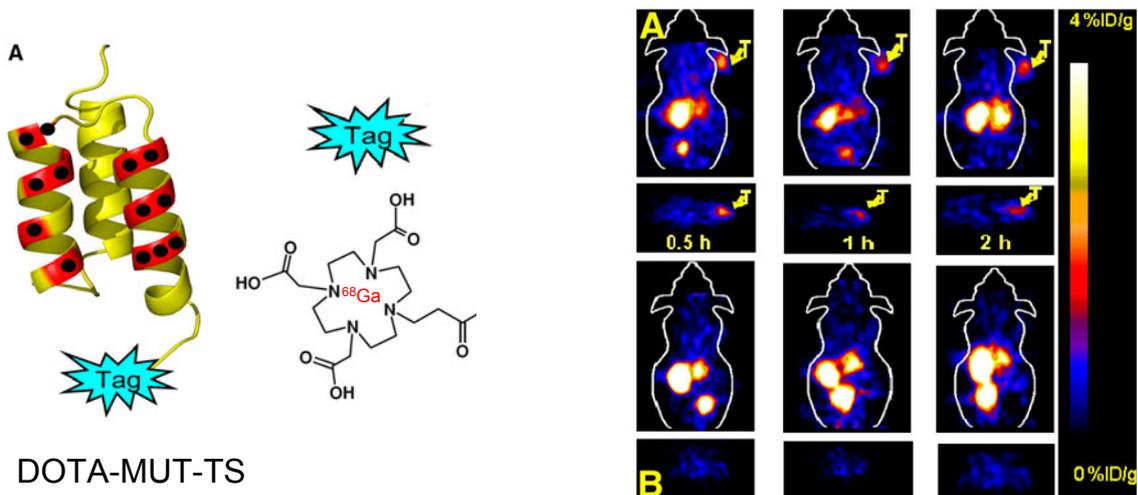
- 33 -

# Aplicaciones de proteínas químicamente modificadas

## SONDAS RADIOACTIVAS

Selectividad, selectividad y selectividad!!

El receptor tipo-2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) es una proteína sobre-expresada en el 25-30% de los cánceres de mama en humanos.



"A 2-helix small protein labeled with  $^{68}\text{Ga}$  for PET imaging of HER2 expression" *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 1492

- 34 -

# Química de las proteínas

## ¿Cómo podemos modificar químicamente las proteínas?

### ➤ Cadenas laterales

❖ Grupos químicamente reactivos (en potencia) de una proteína

❖ Solo los residuos expuestos al disolvente son accesibles para ser modificados

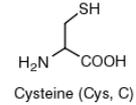
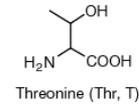
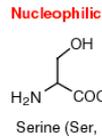
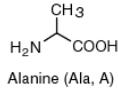
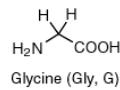
### ➤ Aminas

❖ Extremo N-terminal, cadenas laterales de lisina (Lys)

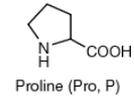
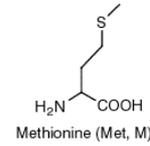
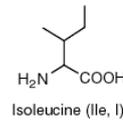
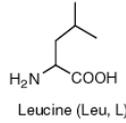
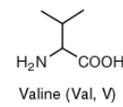
### ➤ Tioles

❖ Cisteína (Cys)  
❖ Mantienen bastante su reactividad en el medio fisiológico

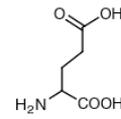
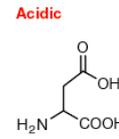
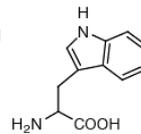
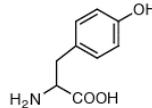
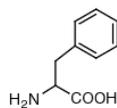
#### Small



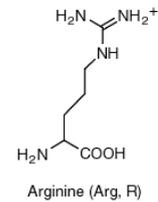
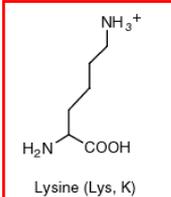
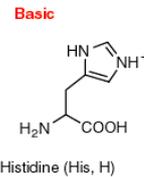
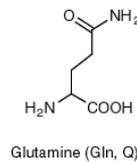
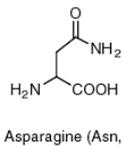
#### Hydrophobic



#### Aromatic



#### Amide



- 35 -

## ¿Qué tipo de química podemos realizar en cualquier proteína de manera genérica para modificarla?

### ➤ Pequeño margen de posibilidades:

- Kits comercialmente disponibles (cajas negras)
- Ignorancia total a nivel químico (en general) por los consumidores finales (biólogos)

### ➤ Reacciones en cisteínas (Cys)

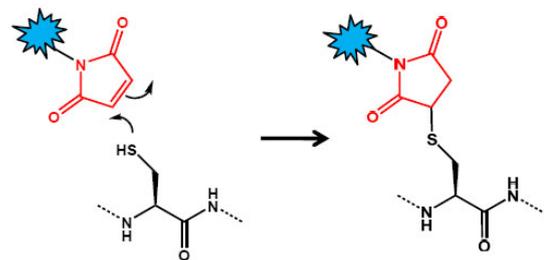
- Disulfuros
- Ataques nucleófilos

### ➤ Reacciones en aminas (lisinas)

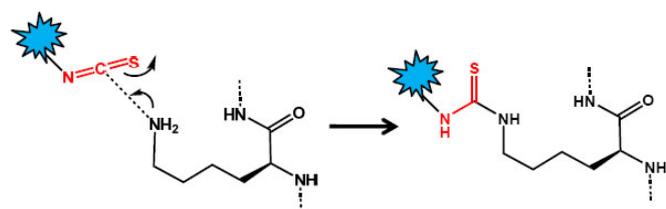
- Ataques nucleófilos
- Difícil de controlar por la abundancia de lisinas en las superficies

➤ Difícil para realizar transformaciones en residuos específicos de la proteína

➤ No aplicables (en general) al etiquetado de proteínas en sistemas vivos



Maleimidas: reaccionan con tioles



Isotiocianatos: reaccionan con aminas

- 36 -

# Modificación de proteínas “en el ribosoma”

## ❖ Etiquetado mediante proteínas recombinantes

- Introduce una sonda/etiqueta codificada en el material genético

### Ventajas

- Específico en posición y barato
- No requiere técnicas “especiales”

### Desventajas

- Se debe hacer el etiquetado proteína a proteína
- El tamaño sí importa: interferencias con la función de la proteína a estudiar

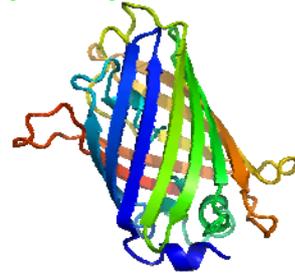
## Proteína verde fluorescente (GFP)



Aequorea victoria



Osamu Shimomura

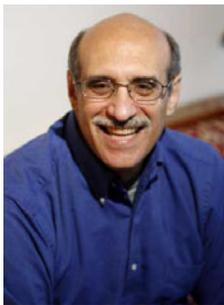


238 aminoácidos

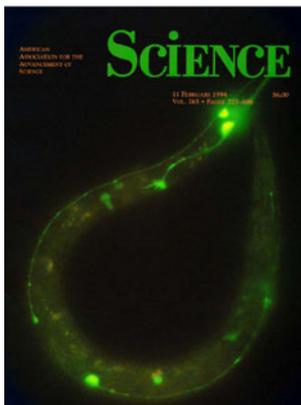
Forma de barril

Grupo cromóforo que absorbe luz UV

# Modificación de proteínas “en el ribosoma”: GFP



Martin Chalfie



Columbia University in the City of New York | New York, N.Y. 10027

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL SCIENCES

SHEFFAN FAIRCHILD CENTER  
FOR THE LIFE SCIENCES

Martin Chalfie  
Dept. of Biology  
Columbia University  
New York, N.Y.



Dear Marty,

It is perfect  
unpublished results  
meet the following

1. You make me happy for the next two months, ready by the time I return.
2. You prepare a special french dinner at a time of your choosing.
3. You empty the garbage nightly for the next month.

Douglas Prasher

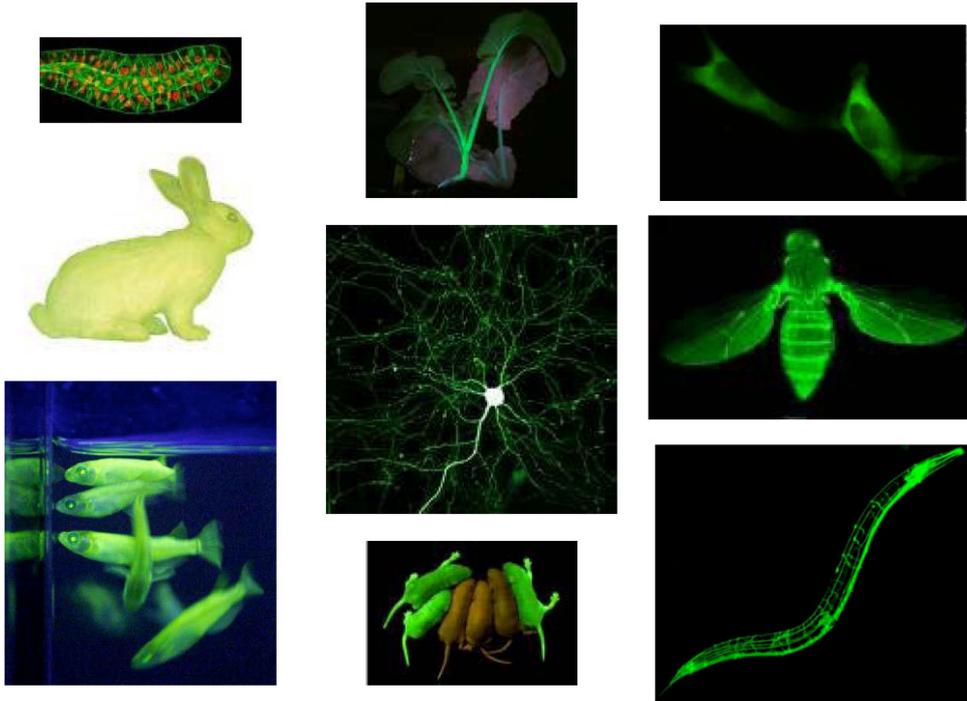
Your sincerely,

*Douglas Prasher*  
Douglas Prasher

## Modificación de proteínas “en el ribosoma”: **GFP**

---

---



- 39 -

## Modificación de proteínas “en el ribosoma”: **GFP**

---

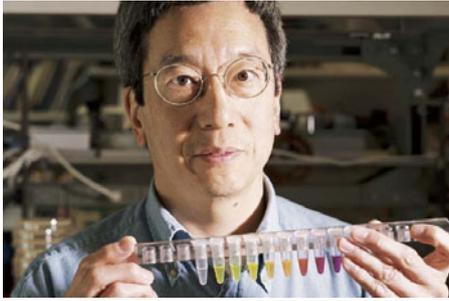
---

**Humano con GFP en sus células**

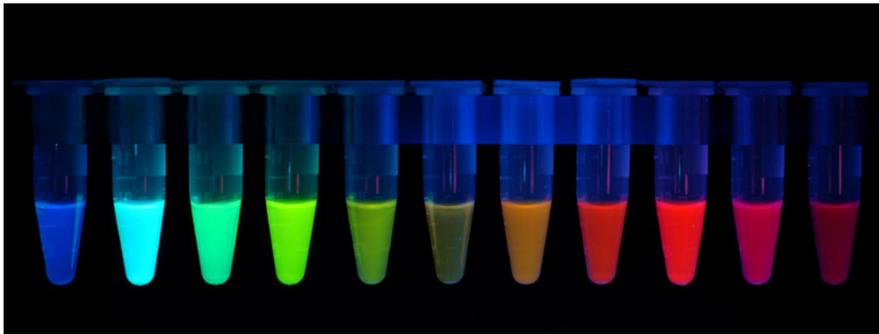
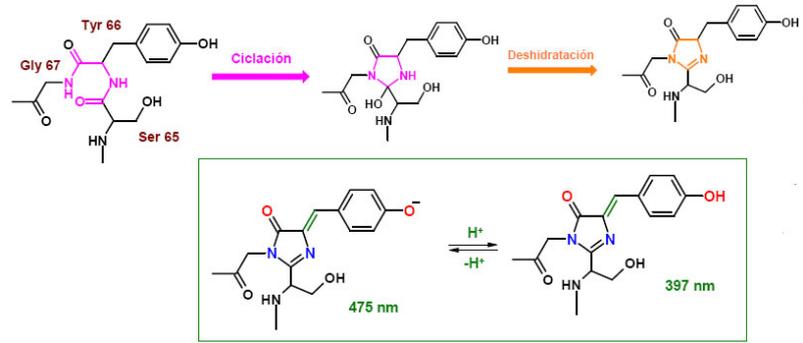


- 40 -

## Modificación de proteínas “en el ribosoma”: GFP



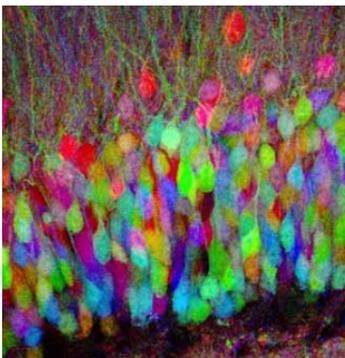
Roger Tsien



- 41 -

## Modificación de proteínas “en el ribosoma”: GFP

- Visualización daños cerebrales por Alzheimer
- Estudio células beta del páncreas
- Desarrollo neuronal
- Desarrollo de tumores



Chemistry



The Nobel Prize in Chemistry 2008

"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"

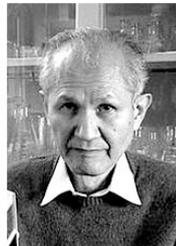


Photo: J. Henriksson/SCANPIX

**Osamu Shimomura**

1/3 of the prize

USA

Marine Biological Laboratory (MBL)  
Woods Hole, MA, USA

b. 1928



Photo: J. Henriksson/SCANPIX

**Martin Chalfie**

1/3 of the prize

USA

Columbia University  
New York, NY, USA

b. 1947



Photo: UCSD

**Roger Y. Tsien**

1/3 of the prize

USA

University of California  
San Diego, CA, USA

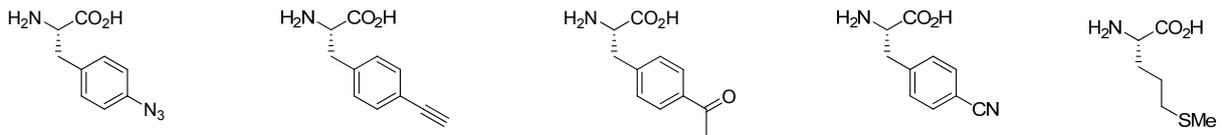
b. 1952

Titles, data and places given above refer to the time of the award.

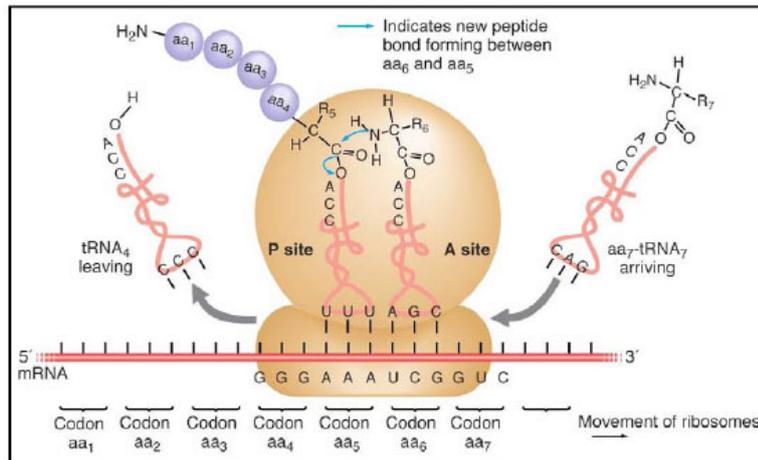
- 42 -

# Ribosomas para modificar proteínas

## Aminoácidos no naturales



¿Sería posible introducir aminoácidos no naturales en proteínas aprovechando la maquinaria sintética de la célula (ribosomas)?



- 43 -

## ALGUNAS DEFINICIONES

Dogma central de la biología molecular



### ➤ Traducción

- ❖ Proceso de síntesis de proteínas a partir del código contenido en moléculas de ARN mensajero
- ❖ Transcurre en el ribosoma
- ❖ Se llama traducción porque implica el cambio del "lenguaje" de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) al "lenguaje" de las proteínas (aminoácidos)

Chemistry



The Nobel Prize in Chemistry 2009

"For studies of the structure and function of the ribosome"



Photo: MRC Laboratory of Molecular Biology

**Venkatraman Ramakrishnan**

🏆 1/3 of the prize

United Kingdom

MRC Laboratory of Molecular Biology  
Cambridge, United Kingdom



Credits: Michael Marsland/Yale University

**Thomas A. Steitz**

🏆 1/3 of the prize

USA

Yale University  
New Haven, CT, USA;  
Howard Hughes Medical Institute



Credits: Michalene Palleiret/Corbis

**Ada E. Yonath**

🏆 1/3 of the prize

Israel

Weizmann Institute of Science  
Rehovot, Israel

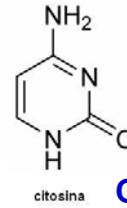
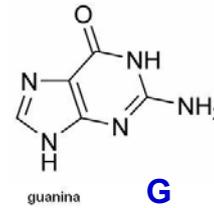
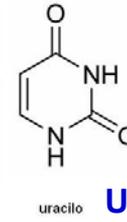
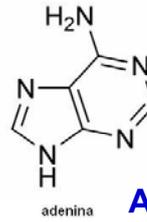
- 44 -

## El código genético

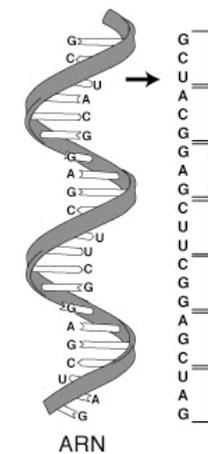
➤ Compuesto por “palabras” de tres letras denominados **codones** (AUG, UGG, etc)

➤ Las bases nitrogenadas se pueden combinar para dar lugar a 64 codones diferentes.

➤ Estas 64 combinaciones son suficientes para codificar los 20 aminoácidos diferentes



## El código genético



Ácido ribonucleico

Codón 1  
Codón 2  
Codón 3  
Codón 4  
Codón 5  
Codón 6  
Codón 7

|   | U  | C  | A  | G   |                  |
|---|--|--|--|---|------------------|
| U | UUU } Phe<br>UUC }<br>UUA }<br>UUG } Leu | UCU }<br>UCC } SER<br>UCA }<br>UCG } Leu | UAU } Tyr<br>UAC }<br>UAA }<br>UAG } Stop    | UGU } Cys<br>UGC }<br>UGA } Stop<br>UGG } Trp | U<br>C<br>A<br>G |
| C | CUU }<br>CUC } Leu<br>CUA }<br>CUG } Leu | CCU }<br>CCC } Pro<br>CCA }<br>CCG } Pro | CAU } His<br>CAC }<br>CAA } Gln<br>CAG } Gln | CGU }<br>CGC } Arg<br>CGA }<br>CGG } Arg      | U<br>C<br>A<br>G |
| A | AUU } Ile<br>AUC }<br>AUA }<br>AUG } Met | ACU }<br>ACC } Thr<br>ACA }<br>ACG } Thr | AAU } Asn<br>AAC }<br>AAA } Lys<br>AAG } Lys | AGU } Ser<br>AGC }<br>AGA } Arg<br>AGG } Arg  | U<br>C<br>A<br>G |
| G | GUU }<br>GUC } Val<br>GUA }<br>GUG } Val | GCU }<br>GCC } Ala<br>GCA }<br>GCG } Ala | GAU } Asp<br>GAC }<br>GAA } Glu<br>GAG } Glu | GGU }<br>GGC } Gly<br>GGA }<br>GGG } Gly      | U<br>C<br>A<br>G |

### ❖ Características del código genético

- Universal
- Específico: un codón → un aminoácido
- Degenerado: varios codones → un aminoácido

VUELCO EN LA INVESTIGACION DE DOS HOMICIDIOS

## El ADN vincula la muerte de Sonia Carabantes y de Rocío Wanninkhof

La piel hallada bajo una uña de la joven de Coin es de alguien que vio el crimen de Mijas Las pruebas descartan que la chica asesinada en agosto fuera violada antes de morir

02/09/2003 SALOME MACHIO SEVILLA

comentarios enviar imprimir valorar añade a tu blog

Los resultados de las pruebas de ADN que la Guardia Civil ha practicado sobre restos de piel hallados bajo una uña de Sonia Carabantes han dado un vuelco sorprendente a la investigación sobre el asesinato de la chica de Coin (Málaga), cuyo cadáver apareció el pasado 20 de agosto. El código genético de la piel analizada coincide con el de los restos de saliva de un cigarrillo que los agentes encontraron hace cuatro años en Marbella (Málaga) junto al cadáver de Rocío Wanninkhof, la joven de 19 años de Mijas que fue asesinada en octubre de 1999 y cuyo cuerpo apareció un mes más tarde. Es decir, una misma persona --no se sabe quién-- estuvo presente en ambos crímenes.



Sonia Carabantes.



Las nuevas pruebas pueden dar un giro al caso Wanninkhof. Especialmente, en lo que se refiere a la única imputada, Dolores Vázquez, que está en

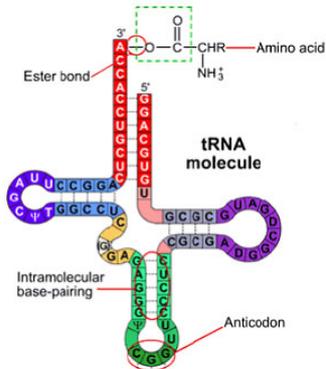
## El proceso de traducción

### ❖ ARN mensajero (mARN)

Transporta la información (secuencia de codones) del ADN al ribosoma

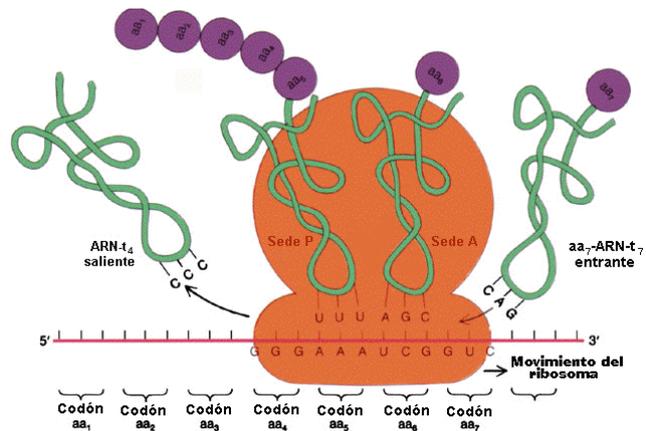
### ❖ ARN transferente (tRNA)

Descodifica un codón del mRNA emparejándolo con un anticodón



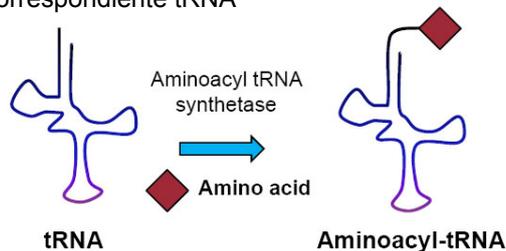
A → U

G → C



### ❖ Aminoacyl tARN sintetasa

Transfiere de manera específica un aminoácido al correspondiente tRNA



# Ribosoma para modificar proteínas

## Expansión del código genético con aminoácidos no naturales: hipótesis de trabajo

➤ Para un organismo dado, algunos codones son poco usados o redundantes

- ❖ Algunos codones “stop” que generalmente finalizan el proceso de traducción (ej. UAG o UGA)
- ❖ Codones “raros” (ej. AGG, el cual codifica la arginina)

|   | U  | C                                    | A  | G  |                  |
|---|--|--------------------------------------|--|--|------------------|
| U | UUU } Phe<br>UUC }<br>UUA } Leu<br>UUG } | UCU } SER<br>UCC }<br>UCA }<br>UCG } | UAU } Tyr<br>UAC }<br>UAA }<br>UAG }     | UGU } Cys<br>UGC }<br>UGA }<br>UGG } Trp | U<br>C<br>A<br>G |
| C | CUU } Leu<br>CUC }<br>CUA }<br>CUG }     | CCU } Pro<br>CCC }<br>CCA }<br>CCG } | CAU } His<br>CAC }<br>CAA } Gln<br>CAG } | CGU } Arg<br>CGC }<br>CGA }<br>CGG }     | U<br>C<br>A<br>G |
| A | AUU } Ile<br>AUC }<br>AUA }<br>AUG } Met | ACU } Thr<br>ACC }<br>ACA }<br>ACG } | AAU } Asn<br>AAC }<br>AAA } Lys<br>AAG } | AGU } Ser<br>AGC }<br>AGA } Arg<br>AGG } | U<br>C<br>A<br>G |
| G | GUU } Val<br>GUC }<br>GUA }<br>GUG }     | GCU } Ala<br>GCC }<br>GCA }<br>GCG } | GAU } Asp<br>GAC }<br>GAA } Glu<br>GAG } | GGU } Gly<br>GGC }<br>GGA }<br>GGG }     | U<br>C<br>A<br>G |

¿Podemos emplear estos codones para introducir aminoácidos no naturales en proteínas aprovechando la maquinaria del ribosoma?

- 49 -

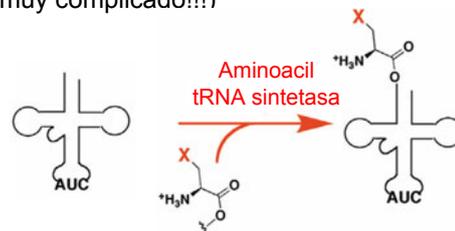
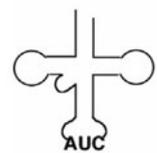
## EXPANSIÓN DEL CÓDIGO GENÉTICO

➤ Metodología para expandir el código genético

1. Diseñar un tRNA que reconozca uno de esos codones de terminación (complicado)

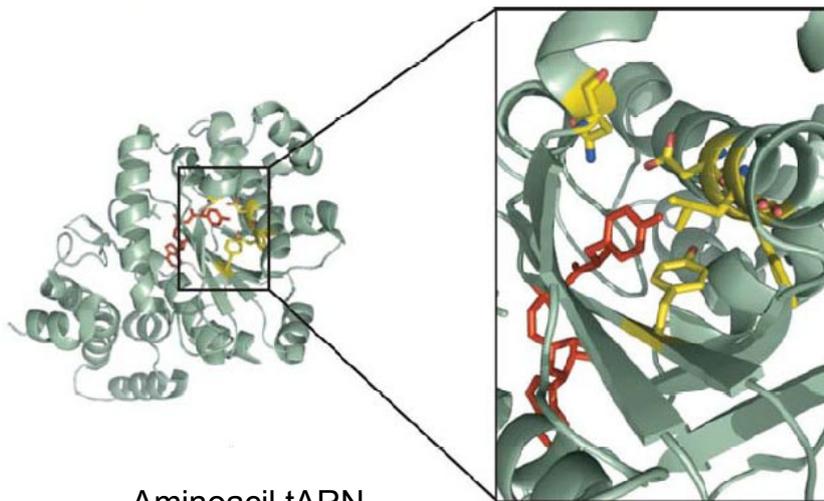
Afortunadamente, ciertos organismos (arqueobacterias) genéticamente sin relación con los organismos típicos (el resto) han evolucionado para usar esos codones

2. Diseñar un tRNA aminoacil sintetasa que añada un amino ácido no natural de manera específica a ese tRNA (muy complicado!!!)



- 50 -

## Como obtener una Aminoacil tARN sintetasa artificial



Aminoacil tARN sintetasa

Mutaciones aleatorias de los residuos implicados en el reconocimiento del aminoácido



Expresión en un organismo (*E. coli*)



Selección de los mutantes que pueden unir el aminoácido no natural de interés

- 51 -

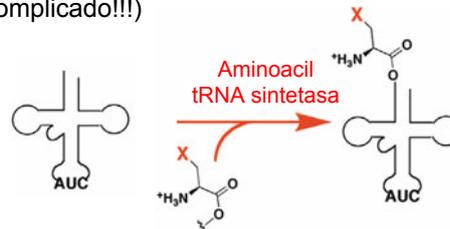
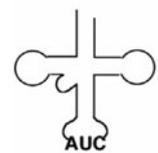
## EXPANSIÓN DEL CÓDIGO GENÉTICO

### ➤ Metodología para expandir el código genético

1. Diseñar un tRNA que use uno de esos codones (complicado)

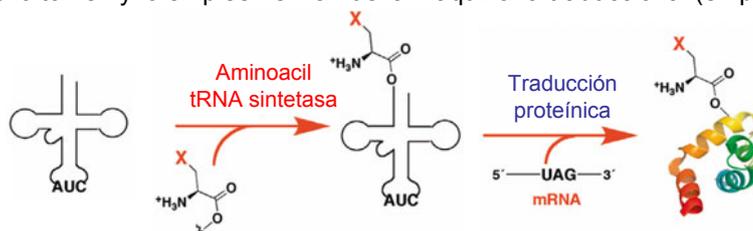
Afortunadamente, ciertos organismos (arqueobacterias) genéticamente sin relación con los organismos típicos (el resto) han evolucionado para usar esos codones

2. Diseñar un tRNA aminoacil sintetasa que añada un amino ácido no natural de manera específica a ese tRNA (muy complicado!!!)



3. Introducir ambos en un organismos (levadura, bacteria, células de mamíferos...) (facil)

4. Crecer el organismo en un medio con el aminoácido no natural presente, de manera que las células lo tomen y lo empleen en la nueva maquinaria traduccional (en principio, fácil)



- 52 -

# EXPANSIÓN DEL CÓDIGO GENÉTICO

## Resultados

❖ Clonando el codón de “uso extendido” en una proteína, el aminoácido no natural se podría introducir a discreción en cualquier punto de la secuencia peptídica

❖ Nuevos organismos que posean un código genético expandido y usen más de los 20 aminoácidos naturales!!

### Expanding the Genetic Code of *Escherichia coli*

Lei Wang,<sup>1</sup> Amgar Brock,<sup>2</sup> Brad Heberich,<sup>1</sup> Peter G. Schultz<sup>1,2\*</sup>

A unique transfer RNA (tRNA)/aminoacyl-tRNA synthetase pair has been generated that expands the number of genetically encoded amino acids in *Escherichia coli*. When introduced into *E. coli*, this pair leads to the *in vivo* incorporation of the synthetic amino acid *O*-methyl-L-tyrosine into proteins in response to an amber nonsense codon. The fidelity of translation is greater than 99%, as determined by analysis of dipeptide products containing the unnatural amino acid. This approach should provide a general method for increasing the genetic repertoire of living cells to include a variety of amino acids with novel structural, chemical, and physical properties not found in the common 20 amino acids.

The genetic code of all organisms encodes the same 20 common amino acids. These amino acids can be modified by posttranslational modifications, e.g., phosphorylation or oxidation, and in rare instances, augmented by selenocysteine (1). Nevertheless, it is remarkable that polypeptides synthesized from 20 simple building blocks carry out all of the complex processes of life. It is possible that the properties of proteins, or possibly an entire organism, could be enhanced by expanding the genetic code to include additional amino acids with novel biological, chemical, or physical properties. To begin to address this question, we developed a strategy that makes it possible to site-specifically incorporate unnatural amino acids directly into proteins in living cells. This methodology should also provide a powerful tool for studying protein function both *in vivo* and *in vitro*.

Unnatural amino acids can be site-specifically incorporated into proteins *in vitro* by the addition of chemically aminoacylated tRNA to protein synthesis reactions programmed with a gene containing a desired amber nonsense mutation (2–6). One can also substitute a number of the common 20 amino acids with close structural homologs using mutagenic strains (7–9). However, the addition of a new amino acid to the genetic repertoire *in vivo* requires additional components for the biosynthetic machinery. A new tRNA must be constructed that is not recognized by existing *E. coli* aminoacyl-tRNA synthetases, but functions efficiently in translation (see orthogonal tRNAs). This tRNA must deliver the novel amino acid in response to a codon that does

not interact with the tRNA synthetase pair of the host organism. The tRNA synthetase pair of the host organism must be modified so that the new amino acid is not recognized by the host tRNA synthetase. This is achieved by site-specific mutagenesis of the tRNA synthetase gene (10) or by the use of a suppressor tRNA synthetase (11). The latter can be suppressed efficiently by tRNAs carrying modified anticodons (12, 13). A new aminoacyl-tRNA synthetase (an orthogonal synthetase) is also required that aminoacylates the orthogonal tRNA, but does not recognize any of the endogenous *E. coli* tRNAs. This synthetase must aminoacylate the tRNA with only the desired unnatural amino acid and none of the common 20 amino acids. Likewise, the unnatural amino acid cannot be a substrate for the endogenous synthetases. Lastly, the amino acid, when added to the growth medium, must be efficiently transported into the cytoplasm.

The orthogonal tRNA/synthetase pair in *E. coli* can be generated by importing a pair from a different organism if cross-species aminoacylation is efficient and the amino acid loop is not a key determinant of synthetase recognition. One such candidate pair is the tryptophan tRNA/synthetase pair of *Methylobacterium jannaschii*, an archaeobacterium whose tRNA<sup>Trp</sup> identity elements differ from those of *E. coli* tRNA<sup>Trp</sup> (in particular, the first base pair of the acceptor stem is G-C in *E. coli* and C-G in *M. jannaschii*), and whose tRNA<sup>Trp</sup>/tRNA synthetase (TyrRS) has only a minimal anticodon loop binding domain (14). In addition, the *M. jannaschii* TyrRS does not have an editing mechanism (15) and, therefore, should not proofread an unnatural amino acid ligated to the tRNA. We have shown that the *M. jannaschii* TyrRS efficiently aminoacylates an amber suppressor tRNA derived from the organo tRNA<sup>Trp</sup> (16), but does not aminoacylate *E. coli* tRNA<sup>Trp</sup> (15). Moreover, the *M. jannaschii* tRNA<sup>Trp</sup> is a poor substrate for the *E. coli* TyrRS, but functions efficiently in protein translation in *E. coli* (15). To further reduce recognition of the *M. jannaschii*

tRNA<sup>Trp</sup> by *E. coli* synthetases, 11 nucleotides of the tRNA that do not interact directly with the *M. jannaschii* TyrRS (C64, C17, U74, U24, C22, G27, A38, U48, U47, A59, and U60) were randomly mutated to generate a suppressor tRNA library. This tRNA library was passed through a negative selection (oppression) of amber nonsense in the host gene, which removes tRNAs that are aminoacylated by *E. coli* synthetases, and then a positive selection for tRNAs that are efficiently aminoacylated by *M. jannaschii* TyrRS (expression of amber nonsense in the *M. jannaschii* gene) (15). The orthogonal nature of the resulting suppressor tRNAs was tested by *in vitro* complementation assays, which is based on suppression of an amber stop codon at a nonessential position (A6<sup>His</sup>) of the TEM1  $\beta$ -lactamase gene carried on plasmid pRLAM. Aminoacylation of a nonfunctional suppressor tRNA by any endogenous *E. coli* synthetase results in cell growth in the presence of ampicillin. *E. coli* transformed with the *M. jannaschii* tRNA<sup>Trp</sup> and pRLAM never at 55 mg/ml ampicillin. When the best mutant suppressor tRNA (tRNA<sup>Trp</sup><sub>24</sub>) selected from the library was expressed (17), cells receive only 12 mg/ml ampicillin; similar values are obtained in the absence of any suppressor tRNA. When the *M. jannaschii* TyrRS is coexpressed with the mutant tRNA<sup>Trp</sup>, cells receive at least 100 mg/ml ampicillin. Thus, the tRNA<sup>Trp</sup><sub>24</sub> is a poorer substrate for the endogenous synthetases than the *M. jannaschii* tRNA<sup>Trp</sup>, but is still aminoacylated efficiently by the *M. jannaschii* TyrRS.

To alter the amino acid specificity of the orthogonal TyrRS so that it changes the tRNA<sup>Trp</sup><sub>24</sub> with a desired unnatural amino acid, a library of TyrRS mutants was generated and screened. On the basis of the crystal structure of the homologous TyrRS from *Bacillus anthracis* (18), five residues (Tyr<sup>67</sup>, Tyr<sup>68</sup>, Tyr<sup>69</sup>, Tyr<sup>70</sup>, and Tyr<sup>71</sup>) in the active site of *M. jannaschii* TyrRS that are within 6.5 Å of the para position of the aryl ring of bound tyrosine were mutated (Fig. 1) (19). These residues were all initially mutated to alanine, and the resulting mutant Ala<sub>67</sub> TyrRS was used as a template for polymerase chain reaction (PCR) mutagenesis with lipid oligonucleotides. A positive selection was then applied that is based on suppression of an amber stop codon at a nonessential position (Arg112) in the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene (20). Cells transformed with the mutant TyrRS library and tRNA<sup>Trp</sup><sub>24</sub> gene were grown in media containing the antibiotic and cells that were selected for their survival in the presence of various concentrations of chloramphenicol. If a mutant TyrRS changes the orthogonal tRNA<sup>Trp</sup><sub>24</sub> with any amino acid, either natural or unnatural, the cell produces CAT and survives. The surviving cells were then grown



Peter G. Schultz

Bacteria con un código genético capaz de expresar proteínas con 21 aminoácidos!!!!

498

20 APRIL 2001 VOL 292 SCIENCE www.sciencemag.org

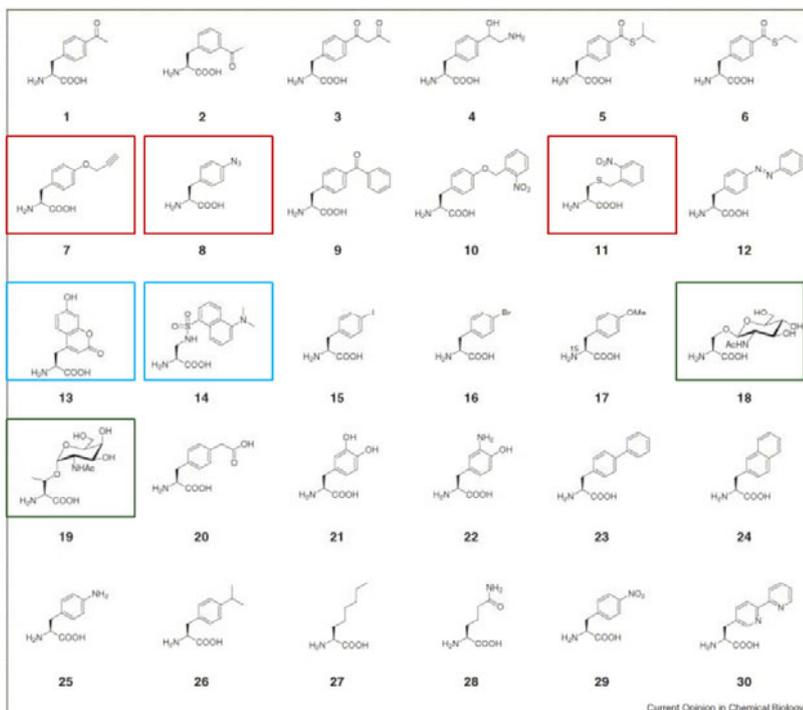
# EXPANSIÓN DEL CÓDIGO GENÉTICO

Alrededor de 30 nuevos aminoácidos han sido introducidos en organismos empleando este método

Entrecruzamiento químico

Sondas fluorescentes

Modificaciones post-traduccionales (introducidas durante la traducción!!)



Current Opinion in Chemical Biology

❖ Esta técnica permite la síntesis de proteínas con nuevas propiedades biológicas, químicas y físicas con consecuencias significativas en áreas como la biotecnología y la biomedicina.

El origen del código genético, tanto si creó en un momento puntual como si es el resultado de la expansión de un código primigenio con menos aminoácidos, **es un enigma**.

- ¿Hay alguna razón para que el código genético sea de solo 20 aminoácidos?
- ¿Y por qué esos 20 en particular?
- ¿Y por qué no ha evolucionado?
- ¿Organismos con aminoácidos adicionales tendrán ventajas con respecto a otros que no los tienen...?

