

## 9.1 Introducción al fago M13

Slide nr. and content:

- 1) Para entender el sistema de “phage display” (presentación sobre fago) es necesario presentar al fago M13, que es el fago más utilizado en sistemas de “phage display”.
- 2) M13 es un fago filamentoso F-específico, cuyo hospedador es *E. coli*.
  - 2.1 Como es típico para fagos F-específicos, infecta al hospedador utilizando el pilus F del mismo.

Esta estructura retráctil y extensible se utiliza normalmente para la adherencia y el acercamiento a otras bacterias en un proceso de reproducción denominado conjugación. Solo está presente en células de *E. coli* que contienen el plásmido de fertilidad, también llamado plásmido F.
  - 2.2 Sin embargo, en este caso el fago se aprovecha del pilus F y lo utiliza como punto de adherencia para la infección. Aquí se puede ver cómo el fago filamentoso M13 se adhiere a este pilus.
  - 2.3 También se puede ver por qué se llaman fagos filamentosos ya que estos fagos se presentan como filamentos largos y flexibles.
- 3) Los filamentos del fago tienen un diámetro de 7 nm y una longitud de 900 nm. Están formados por una cubierta proteica que encapsula la carga de ADN. La cubierta contiene 5 proteínas diferentes.
  - 3.1 La más abundante es la proteína codificada por el gen 8. Aproximadamente 2800 unidades de estas proteínas están presentes a lo largo de todo el filamento. En conjunto cubren casi todo el genoma del fago y lo protegen del ambiente externo. Cada uno de los extremos del filamento están decorados con un conjunto diferente de proteínas.
  - 3.2 En el extremo distal, se encuentran las proteínas codificadas por los genes 7 y 9. Estas son esenciales cuando se forman nuevos viriones filamentosos durante la infección. Reconocen el ADN del fago e inician su empaquetado.
  - 3.3 En el extremo proximal, están presentes las proteínas codificadas por los genes 6 y 3. Mientras que la proteína 6 principalmente proporciona estabilidad al virión, la proteína 3 está más expuesta y es necesaria para la interacción con el pilus F de las células diana.
  - 3.4 Los viriones contienen el genoma completo del fago en forma de cadena sencilla. Este pequeño genoma de unas 6400 pb codifica todos los genes necesarios para que la infección tenga éxito.
  - 3.5 Además de las proteínas estructurales que acabamos de mencionar, también codifica proteínas necesarias para la replicación del ADN y el ensamblaje del virión. También contiene una región intergénica que no codifica proteínas. Sin embargo, contiene 2 orígenes de replicación (ori), 1 para cada posible dirección de la replicación, que son necesarios para la replicación del genoma. También contiene una señal de empaquetado que es reconocida por el complejo proteico formado por los productos de los genes 7 y 9 para iniciar el empaquetado.

Bueno, ahora que sabéis qué aspecto tiene un filamento, vamos a entrar en más detalle sobre cómo se forman estos filamentos.

- 4) Durante una infección con el fago M13 se forman nuevos viriones. Aquí se muestra una representación de esta infección.
  - 4.1 Como se mencionó anteriormente, los filamentos del fago M13 solo pueden infectar células de *E. coli* que tienen un pilus F. Esto es porque necesitan reconocer el pilus y unirse al mismo mediante la proteína 3. Cuando se retrae el pilus, el fago es arrastrado hacia la superficie celular y finalmente entra en el hospedador. Durante el proceso de entrada, la cubierta proteica se desensambla y el ADN de cadena sencilla entra en la célula.
  - 4.2 Una vez dentro, el ADN pasa a ser de doble cadena mediante la acción de enzimas bacterianas. Entonces se replica el genoma formando nuevas copias que se utilizan tanto para la expresión de los genes codificados como para la formación de copias adicionales del genoma.
  - 4.3 Una vez están presentes las proteínas fágicas y las nuevas copias del genoma, se forman nuevas partículas víricas. Las nuevas copias del ADN son protegidas por la proteína 5 hasta que las proteínas 7 y 9 reconocen la señal de empaquetado. Esto inicia el proceso de empaquetado empezando por el extremo distal en un complejo de membrana que consta de varias proteínas del fago.
  - 4.4 Finalmente, se liberan los nuevos filamentos fágicos al ambiente a través de este complejo de membrana. Este proceso no mata a la célula hospedadora, sino que se trata más bien de una infección crónica que permite la liberación continua de partículas fágicas. Estas partículas fágicas pueden entonces infectar a otros hospedadores en el ambiente. Por ello, una sola partícula fágica puede amplificarse hasta niveles altos. La baja complejidad, facilidad de amplificación y las proteínas expuestas de este fago lo hacen perfecto para el desarrollo de un sistema de "phage display". Esto se comentará en la parte 2.