

9.2 Phage display (librería de expresión en fagos)

Diapositiva 1

“Phage display” es una técnica utilizada para el estudio de las interacciones entre proteínas o péptidos con diferentes ligandos u otras proteínas. En esta técnica, un conjunto o librería de péptidos o proteínas se fusiona a la proteína de la cubierta del fago de modo que se expone sobre la superficie de las partículas fágicas. Así, se puede realizar una selección en función de su capacidad de unión a una determinada diana e identificar, simplemente por secuenciación de ADN, aquellas secuencias que codifican las proteínas que interactúan con la diana dado que los genes que codifican cada fusión se encuentran en el genoma fágico.

Diapositiva 2

Las fusiones se restringen a las proteínas de la cubierta de los fagos. Estas fusiones de péptidos o proteínas se llevan a cabo habitualmente con la proteína menor de la cubierta gIIIp o la proteína mayor de la cubierta gVIIIp. Se utilizan diferentes sistemas de vectores: Vectores fágicos con una única copia del gen de la proteína de la cubierta, de modo que la inserción de la librería implica que la fusión ocurre en todas las copias de la proteína de la cubierta. Estos sistemas se conocen como sistemas 3 u 8, dependiendo de la proteína de la cubierta utilizada para la fusión. Un segundo tipo de vectores contienen dos copias del gen de la proteína de la cubierta, de modo que la inserción de la librería en una de las copias del gen conlleva tanto la síntesis de la proteína de la cubierta sin modificar como aquellas que llevan la fusión. Estos sistemas se conocen como sistemas 33 u 88. Finalmente, un tercer tipo implica dos elementos diferentes, un fagémido, que es un plásmido que contiene las señales de empaquetamiento y una copia del gen de la proteína de cubierta que contiene la fusión de la proteína o librería, y un fago “helper” o auxiliar, normalmente el fago M13 cuyas señales de empaquetamiento son defectivas. Cuando una célula hospedadora que porta el fagémido es infectada por el fago auxiliar, se producen partículas fágicas con una mezcla de proteína de la cubierta con y sin fusión. Estos sistemas se denominan sistema 3+3 o 8+8.

Diapositiva 3

La construcción de la librería es un proceso clave en “phage display”. Pueden seguirse varias aproximaciones para generarla pero, en general, los métodos se dividen en 3 categorías principales. La primera categoría consiste en métodos que persiguen cambiar de forma aleatoria la secuencia original. Aquí se incluyen el uso de agentes mutagénicos, cepas mutantes, que son cepas de *E. coli* cuyos mecanismos de reparación de ADN son deficientes e introducen mutaciones en los plásmidos que se utilizan, y el uso de la PCR “error prone”, propensa a introducir mutaciones. La segunda categoría agrupa los métodos que buscan modificar de forma aleatoria una región específica de la proteína. Estos métodos se llaman “métodos directos” e implican el uso de oligonucleótidos sintéticos de secuencias aleatorias para generar las variantes mediante PCR o clonación.

Diapositiva 4

Finalmente, en la tercera categoría de métodos, el objetivo principal no es generar diversidad de secuencias sino que persigue combinar fragmentos de secuencias ya conocidas en diferentes conformaciones. Se conocen como las técnicas de recombinación.

Diapositiva 5

Una vez que la librería de la proteína deseada se produce sobre las partículas fágicas, se llevan a cabo múltiples rondas de selección, en las cuales se van seleccionando las variantes con afinidades más altas por la diana en estudio. Este proceso se conoce como "bio-panning". Durante el bio-panning el ligando o diana se biotinila y se inmoviliza sobre una matriz de estreptavidina, por ejemplo en una placa de microtitulación. Posteriormente, las partículas fágicas se depositan en los pocillos. Aquellos fagos que se unan al ligando permanecerán adheridos mientras que los que no, serán eliminados durante los sucesivos lavados. Los fagos retenidos se eluyen y se amplifican mediante la propagación en *E. coli*. Estos fagos seleccionados se someten a rondas sucesivas de selección. El enriquecimiento típico de un determinado fago es generalmente de unas 20 a 1000 veces por ciclo. Por esta razón, se necesitan varias rondas de selección para conseguir enriquecer de forma significativa los fagos con mayor afinidad. Tras múltiples rondas, las variantes con mayor afinidad por el ligando se pueden identificar por secuenciación de su ADN.

Diapositiva 6

"Phage display" es una técnica robusta que nos permite cribar simultáneamente miles de variantes de péptidos o proteínas en función de su mejor o novedosa capacidad de unión, no solamente para las interacciones ligando-proteína sino también entre proteínas y proteína-ADN. La eficacia de esta técnica y su relativa sencillez la ha convertido en una técnica muy útil en investigación básica y aplicada, especialmente en el campo de la investigación clínica para la generación de anticuerpos recombinantes y para la identificación de péptidos con relevancia clínica.