

### 9.3: Ejemplos y aplicaciones

- 1) Ahora que tenéis una mayor comprensión de los mecanismos del sistema de “phage display”, vamos a ver cómo se utiliza en la investigación.
  - i) La técnica de “phage display” tienen un rango amplio de aplicaciones que van desde la mejora de enzimas, al análisis proteómico o al descubrimiento de drogas o dianas terapéuticas, entre otras aplicaciones.
- 2) En primer lugar, me voy a centrar en la optimización de enzimas. Hoy en día se utilizan una gran variedad de enzimas en distintos campos de la industria y la biotecnología. Estas enzimas son originalmente producidas por organismos para una función específica en un nicho o ambiente específico, como dentro del citoplasma celular. Por tanto, a menudo tienen propiedades no deseadas para la función o ambiente en el que los queremos usar. Pueden que no funcionen bastante rápido, ser inestables en las condiciones de uso o no funcionar sobre el sustrato deseado. La técnica de “phage display” puede ayudar a mejorar estas enzimas seleccionando por ejemplo mejor termoestabilidad, mejor actividad o mejor unión al sustrato.
  - i) Vamos a empezar por la estabilidad. Por ejemplo, una enzima que está normalmente presente en el citoplasma de una célula a 37°C. Sin embargo, cuando la usamos en un proceso industrial en el que necesitamos 50°C, la enzima se vuelve inestable y se desnatura. En la técnica de “phage display” podemos hacer una librería de enzimas mutagenizadas y mostrarlas en este caso en la proteína codificada por el gen 3 del fago. En el paso de unión del “biopanning” (purificación por afinidad) la mayoría de los fagos no serán capaces de unir el sustrato enzimático a 50°C y se desnaturarán. Solo los fagos que muestren una enzima que es capaz de plegarse correctamente a esta temperatura se mantendrán y amplificarán en los siguientes pasos del “biopanning”. Estos fagos pueden ser secuenciados para obtener la secuencia de la proteína estable.
  - ii) También se puede obtener resistencia a la proteólisis mediante “phage display”. En este ejemplo, se expresa una librería de enzimas mutagenizadas como proteína de fusión con el enzima de interés en el centro de g3p. Después de la digestión, solo los fagos que llevan una enzima resistente a la proteólisis tienen un extremo amino terminal de g3p necesario para la interacción con el pilus F. Por tanto, solo estos fagos se amplificarán en el “biopanning”. La secuencia de ADN obtenida a partir de estos fagos codificará de nuevo esta enzima resistente y podrá ser utilizada para la producción del enzima modificado.
- 3) También es posible mejorar la actividad catalítica de enzimas. En este ejemplo, comentaré una forma de hacer esto para metaloenzimas. Estas enzimas necesitan un átomo de un metal para mostrar actividad. En este caso se utilizó una  $\beta$ -lactamasa, un enzima que puede inactivar antibióticos  $\beta$ -lactámicos.
  - i) Se preparó una librería de  $\beta$ -lactamasas mutagenizadas fusionadas a la proteína 3 del fago M13. En un primer paso, se trataron los fagos con un

agente quelante, eliminando todos los átomos metálicos. De este modo se inactiva el metaloenzima. Sin embargo, aún podrá unir su sustrato. De ahí se hace una primera selección de enzimas que aún pueden unir su sustrato. Después de lavar, se añade el metal de nuevo para que los enzimas que son funcionales se activen. Los enzimas más activos romperán el sustrato mejor y eluirán mejor. De este modo se hace una selección positiva de enzimas que sean más activos catalíticamente.

- ii) Después de dos rondas de “biopanning”, los investigadores obtuvieron un enzima que mostraba 60 veces más actividad. La técnica puede aplicarse a otros metaloenzimas.
- 4) La técnica de “phage display” puede utilizarse también en proteómica. Muchas proteínas efectúan su función mediante la interacción con otras proteínas. Sin embargo, en muchos casos, se desconoce con qué proteína interaccionan. Para encontrar estas proteínas mediante “phage display” se hace una librería de cDNA o de ORFs a partir del proteoma de interés. Estas librerías codifican prácticamente todas las proteínas posibles que pueden expresarse en una célula determinada. Por ello, los diferentes fagos de la librería expresarán y mostrarán todas estas posibles proteínas en su superficie, en este caso se utiliza la proteína codificada por el gen 8. Entonces se hace “biopanning” utilizando la proteína de interés como cebo. Después de un par de rondas de “biopanning”, los fagos que queden estarán enriquecidos en proteínas que interaccionan con la proteína cebo. La secuenciación de estos fagos generará una lista de dianas potenciales que pueden ser entonces confirmadas mediante otras técnicas.
  - 5) Un último ejemplo que mostraré es la búsqueda de un péptido que puede atravesar la barrera hematoencefálica. En el desarrollo de drogas es difícil desarrollar compuestos que puedan pasar al cerebro. Esto se debe a que el cerebro tiene la denominada barrera hematoencefálica. Esta barrera está presente solo en los vasos sanguíneos del cerebro pero no del resto del cuerpo. Las células endoteliales adyacentes a estos vasos sanguíneos están conectadas por uniones estrechas que forman una barrera continua y difícil de atravesar entre el vaso sanguíneo y el cerebro. Esto constituye un problema, por ejemplo, en el desarrollo de drogas frente a la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, esta barrera no es imposible de atravesar. Algunas proteínas y nutrientes son capaces de travesar esta barrera. Una forma de permitir el paso de drogas sería unir el compuesto a un pequeño péptido que pueda atravesar. Por ello, los investigadores montaron un sistema de “phage display” para encontrar tal péptido.
    - i) Para este fin, se construyó una librería de péptidos de 12-mers elegidos al azar para ser expuestos en la superficie del fago. En lugar de hacer “biopanning” *in vitro*, se utilizó una estrategia de “biopanning” *in vivo* para encontrar los péptidos de interés. En esta técnica, se inyectaron los fagos en la vena de la cola de ratones. Se permitió que el fago circulara durante minutos u horas para permitir que se uniera a receptores. Entonces se sacrificaron los ratones y se extrajeron los fagos a partir del cerebro.

- 6) Después de dos rondas de “biopanning” *in vivo*, se secuenciaron 20 péptidos, 12 de los cuales tenían la misma secuencia consenso.
  - i) Se fusionó este péptido consenso a una nanopartícula, se marcó con un marcador fluorescente y se inyectó en ratones. Entonces se analizaron imágenes *in vivo* que permitieron la localización de las nanopartículas. Los dos primeros ratones son ratones control, el tercero y el cuarto tienen las partículas fusionadas en distintas proporciones. Se ve claramente la localización en la región cerebral del ratón. También cuando se mira la localización en distintos órganos en la figura de la derecha se ve claramente una fuerte acumulación de las nanopartículas en el cerebro, lo que no ocurre en los ratones control. Por ello, el péptido identificado mediante “phage display” podría dirigir nanopartículas o drogas al cerebro.

Estos ejemplos muestran claramente la versatilidad del sistema de “phage display” y cómo se puede aplicar en la práctica.

- 7) En los siguientes artículos se puede encontrar más información sobre la técnica de “phage display” y los ejemplos que he comentado.