

ARTÍCULO ORIGINAL

CONSTRUCCIÓN DE UN FAGÓMIDO QUE POSEA UNA SECUENCIA DE UNIÓN A ESTREPTAVIDINA ACOPLADO A LA PROTEÍNA PIII DEL BACTERIÓFAGO M13¹

*CONSTRUCTION A PHAGEMID VECTOR
FOR THE PRODUCTION OF PIII LIBRARIES
THAT INCLUDE THE SEQUENCE OF
STREPTAVIDIN BINDING
PEPTIDE¹*

Pablo H. Sotelo²

Silvia Trigüis³

Alejandra Recalde³

Lady Franco³

Silvia Zarate³

- 1 Trabajo presentado por la Facultad de Ciencias Químicas y financiado con rubros del Rectorado de la Universidad Nacional de Asunción, durante el año 2013.*
- 2 Investigador Principal, Dr. en Bioquímica, PhD en Microbiología, Jefe del Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, UNA. e-mail: phsotelo@qui.una.py*
- 3 Estudiantes de la Carrera de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas, UNA,*

RESUMEN

El uso de genotecas de exposición en bacteriófagos (GEB) se ha utilizado ampliamente para identificar y aislar moléculas capaces de interactuar con blancos de interés, utilizándose en el desarrollo de medicamentos, métodos de diagnóstico, biosensores entre otros. Pese a su amplio uso, existen en el mercado un número limitado de vectores para la construcción de GEB. Además, los vectores comerciales no permiten una extracción sencilla de las moléculas obtenidas para su uso como herramienta analítica. En este trabajo, se construyó un vector de tipo fagómico que permite la producción de GEB acopladas a la proteína PIII y que incorpora una secuencia codificante para un péptido de unión a estreptoavidina. La estreptoavidina es ampliamente utilizada para la detección de moléculas biotiniladas por lo que la unión con la misma permitirá que las moléculas seleccionadas, a partir de GEBS construidas con este vector sean utilizadas como herramienta analítica sin ninguna otra modificación.

PALABRAS CLAVE: Fagómico, Estreptoavidina

ABSTRACT

Phage display libraries (PDL) are one of the most commonly used strategies to identify and isolate proteins able to interact with a desired target. This method was used in the development of medicines, diagnostics methods, biosensors, etc. Despite the fact that PDLs are widely used, there is a

limited number of commercial vectors available. Also most these vectors are not designed to use the isolated proteins as analytical tools. In this work, we constructed a phagemid vector for the production of PIII libraries that include the sequence of streptavidin binding peptide. The streptavidin is commonly used to identify the presence of biotinylated proteins; the binding of selected proteins from PDLs constructed with this vector, with streptavidin will allow its use as analytical tools, without any further modification.

KEY WORDS: Phagemid, Streptavidin.

INTRODUCCIÓN

Debido a sus características los bacteriófagos se han utilizado en los orígenes de la biología molecular para la amplificación y transporte de material genético.

En 1985 Smith desarrolló la tecnología de exposición de péptidos en bacteriófagos, la cual permite identificar y aislar moléculas capaces de interactuar con diferentes blancos (SMITH, 1985). Esta tecnología se desarrolló ampliamente volviéndose una herramienta esencial en bioingeniería, utilizándose en el tamizaje de ligandos, el desarrollo de nuevos medicamentos y vacunas, evolución de moléculas de diseño, métodos de diagnóstico, herramientas para la entrega de medicamentos o biosensores (BAR, YACOBY Y BENHAR, 2008; BRADBURY Y MARKS, 2004; MAO et al., 2012; MERZLYAK Y LEE, 2006;

POUL Y MARKS, 1999; RAKONJAC Y BENNETT, 2009; MAO, LIU Y CAO, 2009).

En las GEBs, las diferentes secuencias se acoplan a una proteína estructural del bacteriófago M13, por medio de ingeniería genética, de tal manera que cada virus filamentoso exponga en su superficie una sola secuencia, con una única especificidad (BARBAS, 2001). Así, se produce una colección de bacteriófagos (entre un millón a diez mil millones de clones diferentes) que son capaces de interactuar con diferentes blancos. Según el tipo de moléculas que se desea exponer se pueden utilizar distintas moléculas estructurales en el bacteriófago M13, en el caso de péptidos pequeños se utiliza la proteína PVIII la cual se encuentra en un alto número de copias, del orden de 2700 por partícula viral. En caso de proteínas de mayor tamaño se utiliza la proteína PIII, esta proteína se encuentra del orden de 2 a 3 por partícula viral (BARBAS, 2001).

Entre las moléculas que mejor se ha acoplado a la proteína PIII se encuentran los anticuerpos de esta manera ha surgido la tecnología de Exposición de Anticuerpos en Bacteriófago (EAB), una herramienta altamente eficaz para obtener un gran número de anticuerpos contra múltiples blancos (SMITH, 1985; BRADBURY Y MARKS, 2004; MCCAFFERTY et al., 1990). En esta tecnología, las regiones variables de los anticuerpos (RVA) se fusionan a una proteína estructural PIII por medio de ingeniería genética, de tal manera que cada virus filamentoso exponga en su superficie

una sola RVA, con una única especificidad antigénica. Así, se produce una colección de bacteriófagos que son capaces de interactuar con diferentes antígenos, denominada Genoteca de Exposición de Anticuerpos en Bacteriófagos (BRADBURY y MARKS, 2004). Es de notar que esta estrategia ha sido ampliamente utilizada para encontrar anticuerpos específicos, para su uso en terapia o como herramienta analítica (BRADBURY et al., 2003; BREKKE y SANDLIE, 2003; BRENNAN et al.).

Inicialmente se utilizaban en la construcción de GEBs los genomas virales, sin embargo la complejidad del manejo llevó al desarrollo de los fagómidos. Estos constituyen plásmidos que poseen aparte de la proteína viral PIII o PVIII, un origen de replicación viral y que en presencia de virus colaboradores son capaces de ser incorporados como genoma dentro de las partículas virales.

Pese a existir una gran difusión de las GEBs como herramienta biotecnológica, son pocas las alternativas comerciales que existen para la construcción de genotecas, en particular relacionadas con el uso de PIII como proteína de anclaje. Además las disponibles son poco eficientes en obtener moléculas de su uso en analítica, ya que no permiten la asociación de las moléculas seleccionadas con sistemas transduccionales (QI et al., 2012).

La estreptavidina es una proteína producida por la bacteria *Streptomyces avidinii*, la cual actúa como un homotetrámero y es capaz de unir a biotina

con gran afinidad. Debido a esta afinidad ha sido ampliamente usada para la purificación y detección de biomoléculas. La estreptavidina es utilizada como sistema de detección ya que es fácilmente conjugada con enzimas tales como la peroxidasa del rábano picante, moléculas fluorescentes como fluoresceína, nanopartículas de oro, partículas magnéticas entre otras. Recientemente se han identificado diferentes péptidos capaces de interactuar con estreptavidina, lo que facilita la construcción de moléculas recombinantes que usen este sistema para ser detectadas o purificadas (SMITH, 1985; KEEFE et al., 2001; LAMLA y ERDMANN, 2004; SKERRA y SCHMIDT, 2000). Con el advenimiento de la tecnología de síntesis de grandes fragmentos de ADN, se ha introducido un nuevo concepto, la biología sintética. En esta área mediante el uso de bases de datos de secuencias conocidas permite modificar o desarrollar nuevos organismos, utilizando genes sintéticos. De esta manera es posible el diseño y construcción de moléculas ADN quiméricas complejas, con secuencias provenientes de diferentes organismos sin necesidad de contar con el ADN progenitor.

Utilizando esta estrategia, en este trabajo se procedió a diseñar, sintetizar y construir un vector de tipo fagómido que permita la expresión de proteínas acopladas a un péptido de unión a estreptavidina. Además este vector permite la expresión de las proteínas seleccionadas unida a la proteína PIII o no, dependiendo en cual cepa bacteriana se exprese, debido a la presencia

de un codón de término ámbar entre la secuencia de unión a estreptavidina y PIII.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño para la construcción del fagómido:

Debido al gran tamaño de la proteína PIII, la síntesis de la misma requería un gran costo por lo que se realizó la construcción en dos etapas. En una primera instancia se procedió a sintetizar una secuencia polifuncional que incorpore secuencias promotoras reguladoras, señal de exportación y la secuencia de unión a estreptavidina. La secuencia polifuncional además posee los sitios de corte por BamHI y HindIII para la inserción de la proteína PIII dentro del vector. Para ello se procedió a realizar una búsqueda en Pubmed y Genbank de secuencias de interés. Luego se procedió a ensamblarlas usando el programa Gene Designer (VILLALOBOS et al., 2006; WELCH et al.).

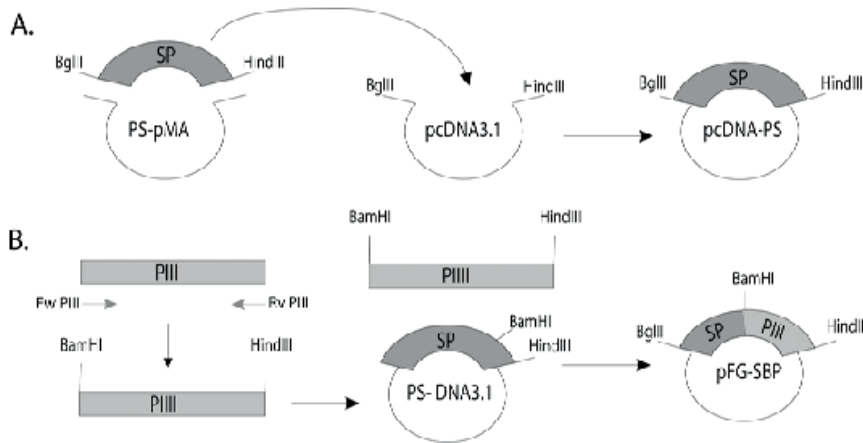
El gen diseñado fue subclonado in silico en los vectores deseados, con el editor de secuencias Ape (DAVIS), modificaciones fueron realizadas en la secuencia con el fin de asegurar el correcto marco de lectura de las secuencias de interés. La secuencia polifuncional fue sintetizada por el servicio de GeneArt (Invitrogen).

Construcción de un fagómido con la secuencia polifuncional:

En la Figura 1 se grafica un esquema de las diferentes etapas en la construc-

(A) Clonamiento de secuencia poli- funcional en pcDNA 3.1.(-) (B) Clo- namiento de PIII en pcDNA-PS. SP: secuencia polifuncional.

Figura 1: Esquema de los diferentes clonamientos realizados para la obtención de pFG-SBP.



ción del vector. Una vez sintetizado la secuencia polifuncional se procedió a clonarla en el vector pcDNA3,1. Para ello el gen con la secuencia polifuncional y el vector pcDNA 3.1 (-) fueron cortados con las enzimas BglII y HindIII (Invitrogen), posteriormente fueron resueltos en geles de agarosa al 1% en TBE y las bandas correspondientes a los fragmentos deseados cortados. Las moléculas de ADN fueron eluidas del gel usando el kit Wizard SV gel and PCR Clean Up System (Promega).

Las moléculas fueron cuantificadas por espectrofotometría y ligadas usando la enzima T4 ligasa (Promega). El producto de ligación fue transforma-

do por el método de cloruro de calcio en bacterias *E.coli* DH5 α y seleccionadas en medio LB agar conteniendo ampicilina a una concentración de 100 μ g/ mL. El ADN plasmidial fue obtenido de las colonias resistentes por medio de miniprep y se realizó un tamizaje por restricción usando con la enzima PstI. De esta manera se obtuvo el vector pcDNA-PS.

Clonamiento PIII:

Para el clonamiento de PIII se procedió a amplificar el gen por PCR, para ello se diseñaron primers que amplifique el extremo C terminal de PIII y posean sitios de corte para las enzimas BamHI y HindIII (Tabla 1) .

Tabla 1: Primers

Primer	Secuencia ^a
Fw PIII BamHI	TTTT TGGAT CCCTGCTCAACCTCCTGTCAATGC
Rv PIII HindIII	TTTT TAAGCTT TAAGACTCCTTATTACGCAGTATG

^a Las secuencias en negritas corresponden a los sitios de restricción.

El gen de fue amplificado por medio de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) utilizando como templado el bacteriófago M13KO7 (New England Biolabs) la enzima de alta fidelidad Platinum Pfx DNA polimerase (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. El programa de amplificación fue el siguiente: una denaturación inicial de 5 min. a 94°C; una amplificación de 30 ciclos de 45 seg. a 94°C, 45 seg. a 56°C, 45 seg a 68°C y una extensión final de 5 min. a 68°C. El producto del PCR fue resuelto en gel de agarosa, la banda cortada y purificada como fue descrito anteriormente.

El producto de PCR y el vector pcDNA-PS fueron cortados con las enzimas BglII y HindIII (Invitrogen), resueltos en geles de agarosa al 1% en TBE y las bandas correspondientes a los fragmentos deseados cortados y purificados como fue descrito anteriormente.

Las moléculas fueron cuantificadas por espectrofotometría y ligadas usando la enzima T4 ligasa (Promega). El producto de ligación fue transformado por el método de cloruro de calcio en bacterias *E.coli* DH5 α . Las bacterias positivas fueron tamizadas por PCR usando los primers utilizados para el clonamiento. Para ello cada colonia fue resuspendida en 20 μ L de agua y 5 μ L de la misma fue incorporada al mix de reacción. De esta manera se obtuvo el vector pFG-SBP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de secuencia de unión a estreptavidina y diseño de secuencia polifuncional

En una primera instancia se realizó una búsqueda de secuencias de unión a moléculas con capacidad de transducir señales analíticas tales como, proteína A, epitopos antigénicos. A partir de estas se seleccionó secuencias capaces de unir a estreptavidina, debido a que esta molécula es ampliamente usado en sistemas analíticos (LAITINEN et al., 2006).

Pese a existir varias secuencias peptídicas disponibles (SMITH, 1985; KEEFE et al., 2001; LAMLA y ERDMANN, 2004; SKERRA y SCHMIDT, 2000), se seleccionó la secuencia de unión a estreptavidina (SUE) publicada por HUANG et al., 2005, por haber probado ser funcional acoplada a la proteína PIII de bacteriófagos filamentosos.

Con el fin de construir un vector que pueda ser utilizado en analítica se procedió a diseñar una secuencia sintética de ADN que posea todos los elementos requeridos la producción y síntesis de una proteína de fusión con PIII. Los componentes de esta secuencia y su función se encuentran detallados en la Tabla 2, además en la Figura 2 se grafica un esquema con la disposición de los distintos elementos.

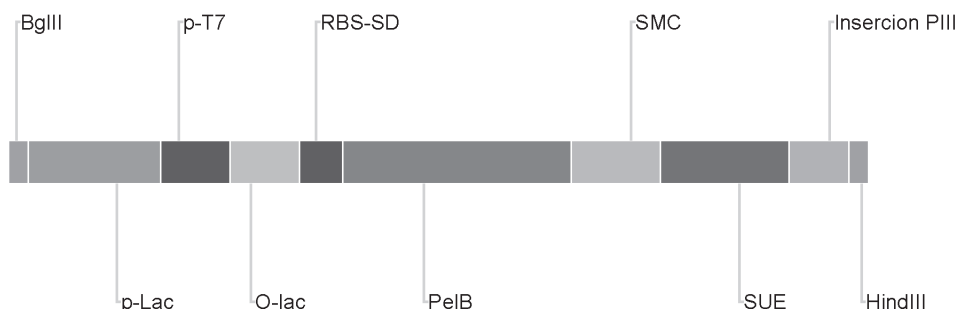
Tabla 2: Componentes de la secuencia polifuncional.

Elemento	Función
Promotor Lac	Permite la transcripción en bacterias.
Promotor T7	Permite la transcripción en bacterias <i>E.coli</i> BL21.
Operador Lac	Permite la regulación de transcripción por IPTG.
RBS, SD	Permite la unión del ribosoma y la traducción del ARN.
Pel B	Señal de exportación al periplasma.
SMC	Posee múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias en la construcción de las GEB.
Codón ámbar	Secuencia de término de la traducción, dependiente de cepa de <i>E.coli</i> .
SUE	Secuencia codificante para el péptido de unión a estreptavidina.
Inserción PIII	Secuencia con sitios de restricción para incorporación de PIII.

En el esquema se grafica la distribución de los diferentes componentes de la secuencia polifuncional. BglII, sitio de corte de enzima de restricción; p-Lac, promotor Lac, p-T7, promotor T7, O-lac, operador Lac; RBS-SD, secuencia de unión al ribosoma-shine

dalgarno; PelB, secuencia de exportación al periplasma de la pectato liasa B de *Erwinia carotovora*; SMC, sitio de múltiple clonamiento; SUE, secuencia e unión a estreptavidina; HindIII, sitio de corte de enzima de restricción.

Figura 2: Esquema de la secuencia polifuncional.



En la secuencia polifuncional se encuentra un sitio de múltiple clonamiento con un amplio número de enzimas que permite la incorporación de las secuencias con las cuales se desea construir la genoteca.

Además se incorporó entre la secuencia de unión a estreptavidina (SUE) y el sitio de inserción de la proteína PIII, un codón de término ámbar, que permite el término de la traducción en la mayoría de las cepas de *E. coli*, sin embargo en ciertas cepas como las ER2738, cepa usualmente usada para

producción de bacteriófagos, este codón es interpretado como un codón codificante para glutamina. Esto permite que dependiendo en la cepa de *E.coli* que se expresa la proteína acoplada a SUE pueda expresarse en presencia o ausencia de la proteína PIII. Por último esta secuencia esta flaqueada por los sitios de corte para las enzimas BglII y HindIII para ser subclonada en diferentes vectores.

La secuencia polifuncional fue sintetizada y clonada en el plásmido pMA por el servicio GeneArt de Invitrogen.

Construcción del Vector pFG-SBP

Para la construcción del fagómido era necesario introducir la secuencia polifuncional en un plásmido que contenga todos los componentes necesarios para conformar un fagómido funcional. Para ello se procedió a clonar la secuencia polifuncional en el plásmido pcDNA3.1 (-) ya que este presenta una secuencia de replicación del fago M13, un cassette de resistencia a ampicilina y un origen de replicación bacteriano.

El análisis de los clones obtenidos se realizó por análisis de restricción con la enzima PstI, debido a que la tanto el vector como la secuencia polifuncional poseen un sitio de corte, si el plásmido purificado posee el inserto en el sentido correcto debiera producir dos fragmentos de ADN de 3300 y 1600 pares de bases. El plásmido

El ADN plasmidial de 5 clones, productos de la ligación de la secuencia polifuncional con pcDNA 3.1 (-) fue cortado con la enzima PstI. En los clones con

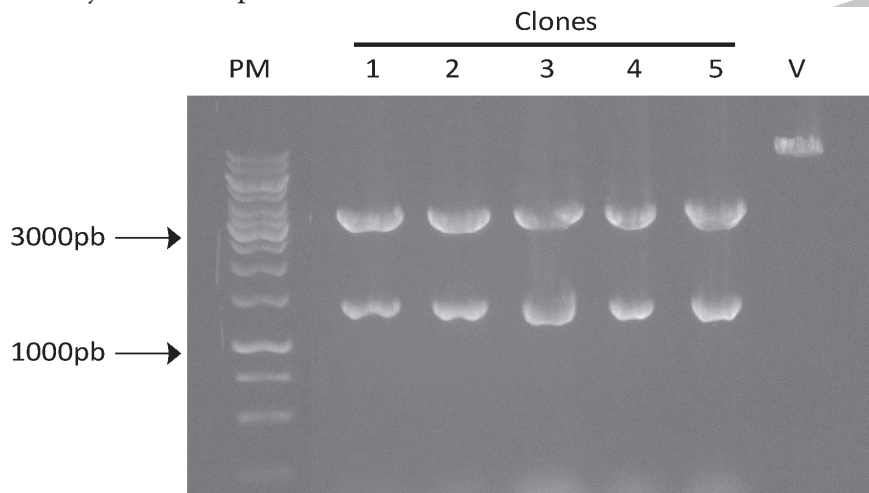
pcDNA3.1 (-) sin inserto debiera producir una sola banda de 5427 pares de bases. En la Figura 3 se grafica el análisis de restricción del ADN plasmidial de los clones obtenidos cortados con la enzima de PstI, como se puede observar todos los clones del 1 al 5 poseen la secuencia polifuncional. De esta manera se obtuvo el fagómido pcDNA-PS.

A fin de tener un fagómido para ser usado en la construcción de genotecas de tipo PIII fue necesario incorporar la secuencia codificante para el extremo C-terminal de la proteína PIII en el vector. Por ello la misma fue amplificada a partir del genoma de M13KO7, por PCR usando una enzima de alta fidelidad y primers que incluyen los sitios de restricción BamHI e HindIII.

En la Figura 4 se observa la presencia de una banda de aproximadamente

la secuencia polifuncional se esperan bandas de 3300 y 1600 pares de bases PM, Marcador de Peso Molecular, V, pcDNA3.1.

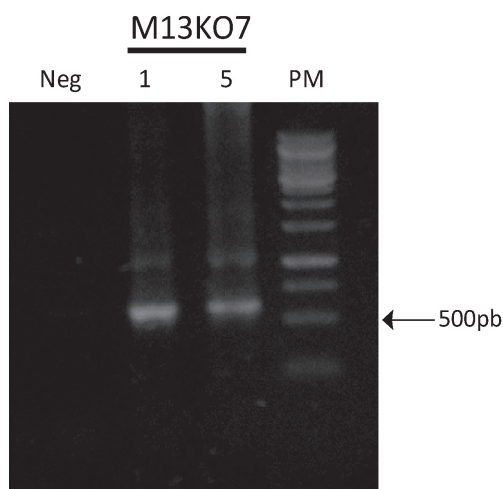
Figura 3: Tamizaje de clones pcDNA-PS.



El genoma del fago M13KO7 fue amplificado usando los primers la Tabla 1, utilizando 1 y 5 μ L de genoma. Se observa una banda de 605 pares de

bases correspondiente al extremo C-terminal de PIII. Neg, mix de PCR sin genoma; PM, Marcador de peso molecular.

Figura 4: Amplificación de PIII.



605 pares de bases correspondiente al producto de esta amplificación.

El gen PIII posteriormente fue clonado en pcDNA-PS entre los sitios BamHI e HindIII para dar el vector fagómido deseado pFG-SBP. A fin de determinar la presencia de PIII en el vector se realizó un PCR de las colonias obtenidas a partir de las ligaciones.

En la Figura 5 se observa que todos los clones poseen una banda correspondiente al peso de la proteína PIII, no observándose la misma en el control negativo, de esta manera se confirma la presencia de los PIII en el fagómido.

CONCLUSIÓN

En este trabajo usando una aproximación de diseño, síntesis y herramientas básicas de biología molecular se

ha logrado obtener un nuevo vector de tipo fagómido para ser usado en la construcción GEBs que permitan la fácil extrapolación de las moléculas seleccionadas como herramientas analíticas, utilizando la molécula estreptavidina como sistema de detección.

BIBLIOGRAFÍA

SMITH, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228(4705), 1315-7.

BAR, H., YACOBY, I. & BENHAR, I. 2008. Killing cancer cells by targeted drug-carrying phage nanomedicines. *BMC Biotechnology* 14, 1-14.

BRADBURY, A. R. & MARKS, J. D. 2004. Antibodies from phage an-

- tibody libraries. *J Immunol Methods* 290(1-2), 29-49.
- MAO, C., GEORGIU, G., IVERSON, B. Y BELCHER, A. M. 2012.** Virus-Based Toolkit for the Directed Synthesis of Magnetic and Semiconducting Nanowires. *Earth Science* 213.
- MERZLYAK, A. Y LEE, S.-W. 2006.** Phage as templates for hybrid materials and mediators for nanomaterial synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 246-252.
- POUL, M.-A. Y MARKS, J. D. 1999.** Targeted Gene Delivery to Mammalian Cells by Filamentous Bacteriophage. 203-211.
- RAKONJAC, J. Y BENNETT, N. J. 2009.** Filamentous Bacteriophage : Biology , Phage Display and Nanotechnology Applications. *Horizon*, 51-76.
- MAO, C., LIU, A. Y CAO, B. 2009.** Virus-based chemical and biological sensing. *Angew Chem Int Ed Engl* 48(37), 6790-810.
- BARBAS, C. F. 2001.** Phage display : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MCCAFFERTY, J., GRIFFITHS, A. D., WINTER, G. Y CHISWELL, D. J. 1990.** Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348(6301), 552-4.
- BRADBURY, A., VELAPPAN, N., VERZILLO, V., OVECKA, M., CHASTEEN, L., SBLATTERO, D., MARZARI, R., LOU, J., SIEGEL, R. Y PAVLIK, P. 2003.** Antibodies in proteomics II: screening, high-throughput characterization and downstream applications. *Trends Biotechnol* 21(7), 312-7.
- BREKKE, O. H. Y SANDLIE, I. 2003.** Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* 2(1), 52-62.
- BRENNAN, D. J., O'CONNOR, D. P., REXHEPAJ, E., PONTEN, F. Y GALLAGHER, W. M.** Antibody-based proteomics: fast-tracking molecular diagnostics in oncology. *Nat Rev Cancer* 10(9), 605-617.
- QI, H., LU, H., QIU, H.-J., PETRENKO, V. Y LIU, A. 2012.** Phagemid Vectors for Phage Display : Properties , Characteristics and Construction. *Journal of Molecular Biology* 417, 129-143.
- KEEFE, A. D., WILSON, D. S., SEELIG, B. Y SZOSTAK, J. W. 2001.** One-Step Purification of Recombinant Proteins Using a Nanomolar-Affinity Streptavidin-Binding Peptide, the SBP-Tag. *Protein Expression and Purification* 23(3), 440-446.
- LAMLA, T. Y ERDMANN, V. A. 2004.** The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 33(1), 39-47.
- SKERRA, A. Y SCHMIDT, T. G. 2000.** Use of the Strep-Tag and

streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol* 326, 271-304.

VILLALOBOS, A., NESS, J. E., GUSTAFSSON, C., MINSHULL, J. Y GOVINDARAJAN, S. 2006. Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC Bioinformatics* 7, 285.

WELCH, M., VILLALOBOS, A., GUSTAFSSON, C. Y MINSHULL, J. Designing genes for successful protein expression. *Methods Enzymol* 498, 43-66.

DAVIS, W. LAITINEN, O. H., HYTONEN, V. P., NORDLUND, H. R. Y KULOMAA, M. S. 2006. Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell Mol Life Sci* 63(24), 2992-3017.

HUANG, Y., CHIANG, C. Y., LEE, S. K., GAO, Y., HU, E. L., DE YOREO, J. Y BELCHER, A. M. 2005. Programmable assembly of nanoarchitectures using genetically engineered viruses. *Nano Lett* 5(7), 1429-34.