



Bibliotecas Apresentadas em FAGOS

Fotos e ilustrações cedidas pelos autores

Phage Display Libraries

Marcelo de Macedo Brígido

Prof. Dr., Grupo de Imunologia Molecular – UnB
Lab. Biologia Molecular / departamento de
Biologia Celular
brigido@unb.br

Andréa Queiroz Maranhão

Profa. Dra., Grupo de Imunologia Molecular – UnB
Lab. Biologia Molecular / departamento de
Biologia Celular
andreaqm@unb.br

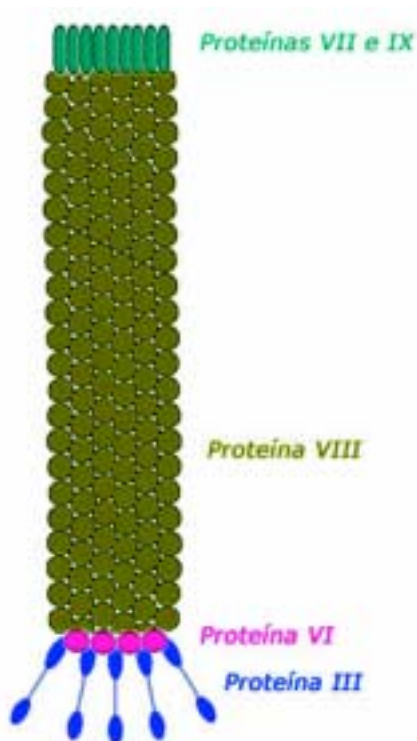


Figura 1 - Organização estrutural de uma partícula viral do bacteriófago M13 (Kischenko *et al.*, 1994, com modificações). O vírion tem cerca de 9.300 Å de comprimento e 65 Å de diâmetro. A extremidade do vírus, que é montada primeiro (distal), é recoberta por cinco cópias de p7 (33 resíduos de aminoácidos) e cinco moléculas de p9 (32 resíduos de aminoácidos). A extremidade proximal, que é montada por último, possui cinco cópias de p6 (113 resíduos de aminoácidos) e cinco de p3 (406 resíduos de aminoácidos). Entre as duas extremidades o DNA circular e de fita simples (ssDNA) é recoberto por milhares de cópias de p8 (50 resíduos de aminoácidos)

Durante os últimos anos, uma nova perspectiva da Biologia Molecular tem atraído diversos grupos de pesquisadores: o desenvolvimento de novas biomoléculas com o objetivo de se obter fármacos, vacinas e outras drogas de interesse biotecnológico. A grande maioria dos processos biológicos envolve contatos entre superfícies macromoleculares (enzima-substrato, receptores-efetores, proteínas - ácidos nucleicos, etc.) que são resultantes das forças físico-químicas características dessas superfícies contactantes. Dessa forma, pode-se afirmar que a evolução molecular se manifesta pela busca do aprimoramento de tais interações, seja no intuito de favorecê-las ou não, mas procurando sempre a manutenção do equilíbrio do sistema vivo. Na natureza, esse fenômeno ocorre como um processo de tentativas e erros, onde subpopulações de variantes da população primordial são selecionadas, positiva ou negativamente. Assim, a evolução molecular natural é um processo que demanda longos períodos de tempo, uma vez que a seleção é exercida sob um pequeno número de variantes (Kenan *et al.*, 1994).

Atualmente é possível aplicar, em laboratório, métodos que visem a dirigir artificialmente a evolução molecular em função de objetivos pré-determinados. Em oposição aos mecanismos naturais, as metodologias realizadas *in vitro* abreviam o tempo requerido, selecionando populações moleculares compostas pelo maior número possível de variantes. Uma das metodologias mais empregadas atualmente é a construção de bibliotecas conformacionais, que são definidas como

uma população de ligantes em potencial, composta por (bio)moléculas de formas variantes. Cada membro da biblioteca apresenta uma forma distinta, que determinará a capacidade de interação deste com uma molécula-alvo. Quanto maior for o número de formas representadas na biblioteca, mais facilmente será encontrado um ligante afim (Posner *et al.*, 1994).

Vários tipos de bibliotecas conformacionais foram descritos, com a utilização de diversas estratégias; entre essas, destacam-se aquelas sintetizadas quimicamente, como as de oligonucleotídeos e de peptídeos fixos ou em solução (revisadas por Kenan *et al.*, 1994), e as produzidas em sistemas vivos, como as leveduras, bactérias ou bacteriófagos filamentosos (revisadas por Scott, 1993).

Bacteriófagos Filamentosos

Os fagos filamentosos (M13, f1, fd, entre outros) pertencem à família Inoviridae de bacteriófagos e possuem como material genético DNA fita simples (ssDNA). A infecção viral ocorre via *pilus* sexual de células bacterianas gram negativas que apresentam o gene desta fimbria especial codificado pelo plasmídeo **F**. A liberação das partículas virais, que são produzidas a cada ciclo se realiza a partir da extrusão do DNA através da membrana. Em nenhum destes dois processos ocorre lise celular.

A partícula viral esquematizada na figura 1 é composta pelo genoma viral e por cinco proteínas estruturais. No capsídeo do fago estão presentes as proteínas p3, p6, p8, p7 e p9. No fago selvagem, encontram-se cerca de 2.800

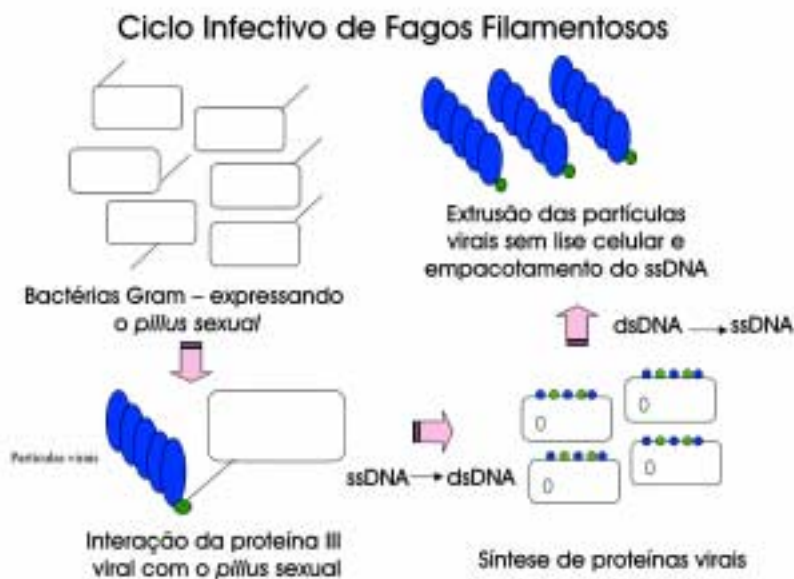


Figura 2 - Esquemática do ciclo infeccioso de bacteriófagos filamentosos. Os fagos filamentosos infectam células de bactérias Gram negativas através da interação de p3 adesinas do *pilius* sexual. Após este contato inicial, o DNA fita simples entra dentro da célula e é convertido a DNA fita dupla ou RFDNA. Ao assumir essa conformação, a síntese de proteínas virais se dá utilizando-se a maquinaria celular. As novas partículas virais são montadas a partir da extrusão do DNA fita simples pela membrana celular, onde estão localizadas as proteínas virais estruturais (Webster, 2000)

cópias da proteína 8 (p8), que formam o corpo do capsídio cilíndrico e flexível. Nas extremidades desse capsídio encontram-se de três a cinco cópias das demais proteínas estruturais. A extremidade distal contém as proteínas p7 e p9, enquanto que a proximal é composta pelas proteínas codificadas pelo gene 3 (p3) e pela proteína p6. O diâmetro da partícula viral é de cerca de 65 Å e o seu comprimento depende do tamanho do genoma encapsulado, sendo que cada nucleotídeo do ssDNA confere 1,435 Å de comprimento ao ser envolvido por p8, e as proteínas minoritárias contribuem com cerca de 175 Å. (Makowski, 1993).

A incorporação de proteínas exógenas na superfície dos fagos filamentosos faz-se fusionando-se esses peptídeos com proteínas estruturais das partículas virais. As duas principais proteínas utilizadas para esse fim são a proteína p8 e a p3.

O ciclo infeccioso dos fagos filamentosos (figura 2) é iniciado pela ligação da proteína p3 à extremidade dos *pili*

da célula bacteriana. Em seguida, ocorre a internalização do ssDNA viral (denominado fita +), que atua como molde para a síntese da fita complementar (denominada -) dentro da hospedeira, originando um DNA de fita dupla, correspondente à forma replicativa (RFDNA). O RFDNA é capaz de dirigir a sua replicação, a produção de ssDNA, bem como a síntese de mRNA viral, utilizando-se, para tanto, da maquinaria enzimática da hospedeira.

Os vírions formados são montados pela extrusão do ssDNA através do envelope bacteriano, sem lisar a célula ou impedir sua divisão. Após atravessar a membrana, o DNA viral passa a ser revestido pelas proteínas estruturais, completando assim a montagem da partícula viral, que é então liberada para o sobrenadante da cultura (Smith & Scott, 1993).

A principal proteína estrutural utilizada para a apresentação de proteínas é a proteína 3. Responsável pela adesão da partícula viral ao *pili* sexual, o produto do gene III dos fagos filamen-

tosos corresponde à maior das proteínas estruturais, com uma massa molecular de cerca de 42 kDa na sua forma madura. Essa proteína é sintetizada sob a forma de um precursor contendo peptídeo sinal, que é clivado durante a passagem através da membrana. A proteína 3 (p3) associa-se ao capsídio viral através de 23 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos próximos à extremidade C-terminal. O produto do gene III contém ainda dois arranjos repetitivos do motivo Ser-Gly-Gly-Gly ou Ser-Glu-Gly-Gly-Gly, localizados a 70 e a 215 resíduos de aminoácidos da extremidade N-terminal. Esses arranjos são responsáveis pela aparente flexibilidade da molécula (Makowski, 1993)

Em 1984, Crissman e Smith estabeleceram o papel funcional dos domínios amino e carboxi de p3, sendo a porção N-terminal requerida para a infectividade viral, enquanto que a C-terminal desempenha papel na morfogênese das partículas. Em 1985, Smith mostrou que era possível inserir um gene inteiro entre os dois domínios de p3 e que esta ainda era capaz de manter ambas as funções. Mais surpreendente ainda era o fato de que a seqüência exógena era incorporada à partícula viral e apresentada de forma acessível ao reconhecimento molecular. Isso demonstrava que determinantes antigênicos, presentes na proteína exógena fusionada à p3 eram apresentados na superfície da partícula viral. Esses trabalhos levaram à proposição de que bibliotecas conformacionais de peptídeos ou mesmo de proteínas poderiam ser construídas por meio da manipulação do gene III, assim como do gene VIII de bacteriófagos filamentosos (Smith, 1993).

Outra possibilidade de apresentação é utilizar-se do principal constituinte do capsídio de fagos filamentosos, a proteína p8. Essa proteína tem uma forma cilíndrica e é composta por 50 resíduos de aminoácidos. Também é sintetizada como uma pré-proteína a partir da expressão do gene VIII. Quando ancorada à membrana celular pelo peptídeo sinal, expõe o seu domínio C-terminal para o periplasma. À medida que ocorre a extrusão do DNA viral, p8 vai sendo incorporada no vírion emergente. No vírus, a porção C-terminal aparece próxima ao ssDNA, enquanto a N-terminal, dotada de grande

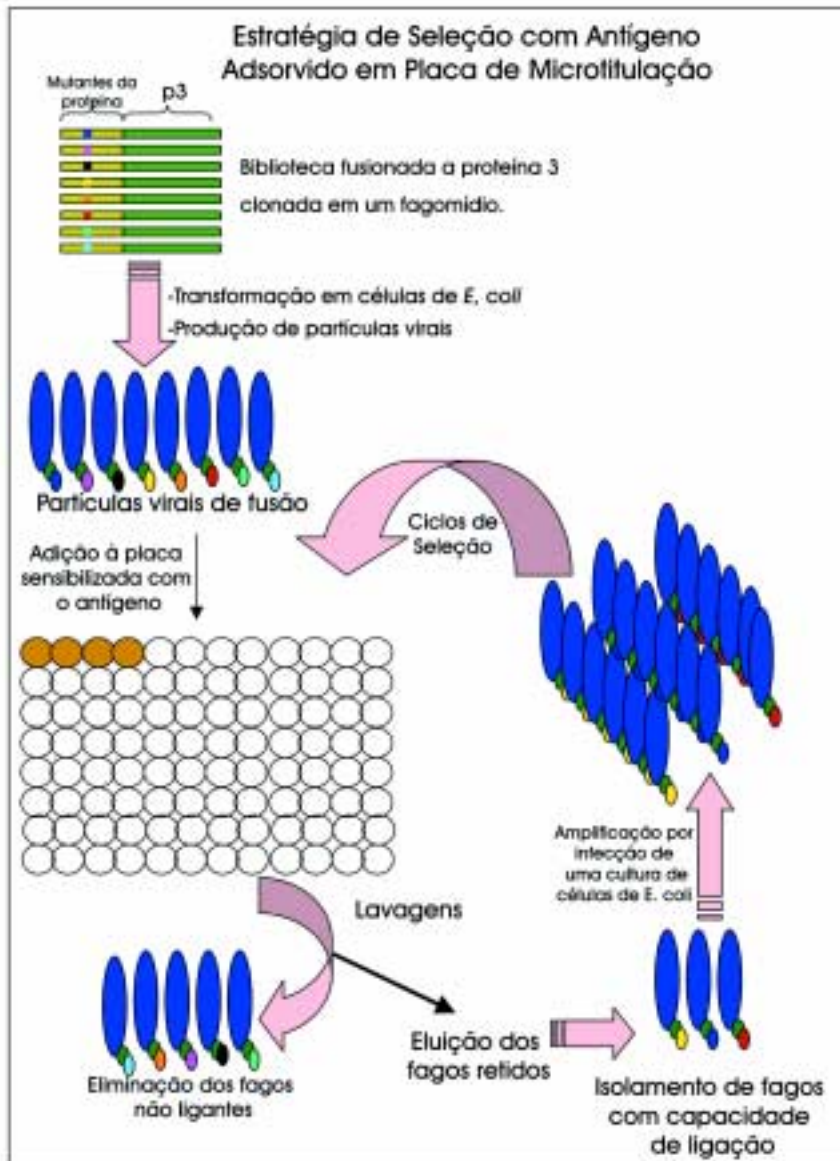


Figura 3 - Seleção de ligantes de uma biblioteca utilizando-se o antígeno adsorvido em placa de microtitulação. Bibliotecas de formas variantes do gene de interesse são obtidas e clonadas em fagomídios para incorporação do peptídeo ao capsídio viral. As partículas virais de fusão apresentando a biblioteca são produzidas e colocadas em contato com ao antígeno fixado a um suporte. Sucessivas lavagens são realizadas e os fagos remanescentes são eluídos da placa e amplificados por meio de infecção de células bacterianas

flexibilidade, fica exposta ao solvente, sendo essa última aquela que é manipulada para apresentar peptídeos exógenos (Smith & Scott, 1993).

Inicialmente acreditava-se que apenas bibliotecas de peptídeos (de, no máximo, 6 a 8 resíduos de aminoácidos) podiam ser apresentadas pela proteína VIII. Isso é válido nos sistemas de apresentação onde todas as proteínas 8 são de fusão, não existindo

misturas com proteínas selvagens. Polipeptídeos de maior massa molecular podem ser apresentados ao longo do capsídio do bacteriófago, fusionados a p8, desde que p8 selvagem (em torno de 80%) seja fornecida ao sistema. Esse tipo de construção pode ser alcançado quando fagomídios são utilizados (a proteína selvagem é sintetizada a partir do genoma do fago auxiliar), ou quando os vetores virais apresen-

tam duas cópias do gene viii, uma selvagem e uma de fusão (Webster, 2000).

Apresentando Peptídeos na Superfície dos Fagos

A possibilidade de expressão de uma proteína de fusão no capsídio de fagos, de maneira acessível ao reconhecimento por um ligante, abriu o caminho para a construção de bibliotecas conformacionais apresentadas na superfície dessas partículas virais. Os vírus, cujos genomas são manipulados de forma a apresentarem em seus capsídios o polipeptídeo exógeno fusionado com uma de suas proteínas estruturais, são denominados fagos de fusão.

Nas bibliotecas construídas em fagos filamentosos, a seleção de formas, com maior ou menor afinidade, por um ligante alvo é feita misturando-se fagos de fusão, produzidos e liberados para o sobrenadante de cultura de células infectadas, com a molécula reconhecida pelo peptídeo recombinante fixa em um suporte. A figura 3 mostra um esquema onde uma placa de microtitulação foi recoberta com um ligante; em seguida, incubaram-se fagos de fusão apresentando uma biblioteca de formas de peptídeo exógeno fusionadas à proteína 3. Durante os procedimentos de lavagem, os fagos capazes de reconhecer o ligante com o qual a placa foi sensibilizada, são retidos. Os fagos selecionados podem ser obtidos através de condições de eluição que desfavoreçam a ligação desses com a molécula presa ao suporte, e após a sua amplificação por meio de infecção de células de *E. coli*, os fagos selecionados podem ser utilizados em novos ciclos de seleção. A cada procedimento de seleção, formas mais afins do peptídeo exógeno são obtidas, ocorrendo o processo de maturação da afinidade (Lowman & Wells, 1993).

Devido às diferenças nas quantidades de p3 e p8 presentes nas partículas virais de fusão, as bibliotecas apresentadas no contexto da proteína 8 são ditas multi ou polivalentes, uma vez que várias cópias da proteína de interesse são incorporadas ao capsídio dos fagos, e aquelas que se utilizam de p3 são denominadas monovalentes, em virtude da presença de, no máximo,

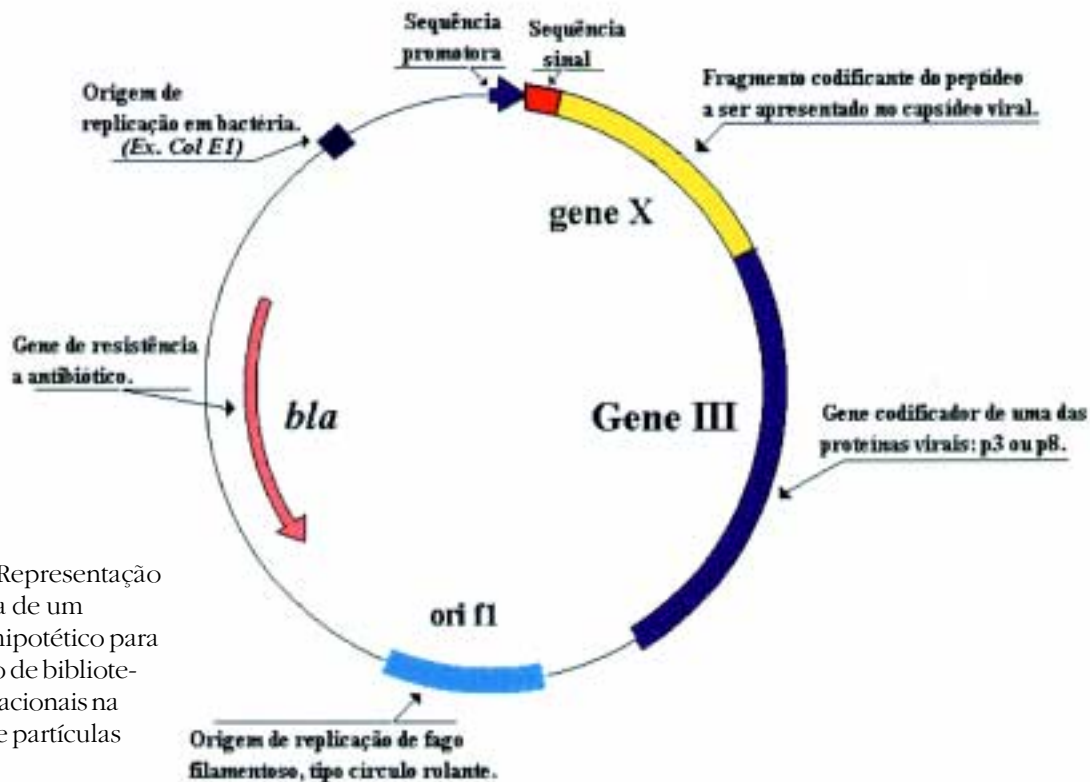


Figura 4 - Representação esquemática de um fagomídeo hipotético para a construção de bibliotecas conformacionais na superfície de partículas virais

três cópias das proteínas de fusão. Essas diferenças nas quantidades podem ser exploradas em momentos distintos da seleção de bibliotecas: pode-se assegurar seleção de formas de menor afinidade, utilizando-se bibliotecas multivalentes e, em seguida, submetê-las a um refinamento da afinidade em sistemas monovalentes (Wells, 1996).

Vetores

Tanto o gene VIII quanto o gene III vêm sendo utilizados para a expressão de bibliotecas conformacionais em bacteriófagos filamentosos. Diversas estratégias têm sido descritas para a manipulação desses genes com vistas à obtenção de sistemas eficientes para a expressão das bibliotecas (Smith, 1993). Uma das formas encontradas para se superar os problemas de manipulação do DNA viral foi a utilização de fagomídeos, que são plasmídios que possuem, além da origem de replicação ativa em *E. coli*, a origem de replicação fagos filamentosos, que contém todos os elementos para a síntese da fita complementar e replicação viral, bem como o sinal de empacotamento do DNA fita simples. Nesses sistemas, células transformadas com o

fagomídeo são infectadas por um fago auxiliar (*helper*), que contém todos os genes do bacteriófago filamentososo, permitindo o resgate do fagomídeo sob a forma de partícula viral. Durante a infecção viral, o ssDNA proveniente dos fagomídeos é revestido por proteínas estruturais preferencialmente ao ssDNA originado pelo *helper*. Isso ocorre porque os fagos *helper* apresentam mutações na seqüência que forma o grampo, as quais dificultam o empacotamento de seu próprio material genético (Webster, 2000).

O fagomídeo construído para apresentação de bibliotecas conformacionais na superfície de fagos filamentosos é manipulado de forma a expressar os diversos peptídeos quiméricos, fusionados a um dos genes III ou VIII. Quando ocorre a infecção com o fago auxiliar, os capsídios são montados contendo misturas de p3 ou p8 selvagem (codificadas pelo auxiliar), e proteínas quiméricas (expressas a partir de um dos genes III ou VIII fusionados, contidos no fagomídeo), gerando uma progênie de fagos de fusão. Nas células reinfetadas por esses fagos de fusão, os fagomídeos podem ser obtidos sob a forma de plasmídios bacterianos (fita dupla - RFDNA) podendo assim ser amplificados, purificados e

novamente manipulados (Breitling *et al.*, 1991).

A utilização de fagomídeos, como vetores para a construção de bibliotecas tem sido bastante difundida (Dübel *et al.*, 1993). A maior vantagem desse sistema é a possibilidade do gene da proteína de fusão se propagar na forma de um plasmídeo. Dependendo do promotor utilizado, esse gene pode ser amplificado de forma regulada até o momento da infecção com o fago auxiliar, reduzindo o número de mutantes selecionados negativamente. Os fagomídeos transformam *E. coli* de forma mais eficiente que o RFDNA e a partícula viral formada a partir de seu ssDNA, de menor tamanho que a originada pelos vetores do tipo fago, é mais estável, dissociando-se menos facilmente dos ligantes imobilizados (Breitling *et al.*, 1991).

O esquema geral de um fagomídeo utilizado para a produção de bibliotecas na superfície de bacteriófagos filamentosos está representado na figura 4. Dentre os elementos constituintes mais importantes, destacam-se: as origens de replicação de *E. coli* e de fagos, o gene que confere resistência a antibiótico, o promotor que dirige a transcrição do gene de fusão e a seqüência líder responsável pela citolo-

Tabela 1 - Exemplos de Utilização de Bibliotecas Apresentadas em Fagos

Biblioteca	Finalidade / Espécie Molecular	Referência
Pequenos Peptídeos Randômicos (até 20 resíduos de aminoácidos, sendo de 6 a 8 randômicos)	Mapeamento de sítios enzimáticos	Cheadle et al. , 1994
	Mapeamento de Epitopos	Hoess et al. , 1995; Wang et al. , 1995
	Agonistas e antagonistas de biomoléculas	Smith et al. , 1993; South et al. , 1995
	Identificação de mimotopos	Folgori et al. , 1994
	Peptídeos ligantes a ácidos nucleicos	Wu et al. , 1995
	Peptídeos com potencial para vacinação	Stoute et al. , 1995
	Endereçamento endotelial	Pasqualini & Rouslahti, 1996
Grandes Polipeptídeos	Receptores celulares	Scarseli et al. , 1993; Robertson, 1993
	Enzimas: β -lactamase tripsina	Soumillion et al. , 1994 Corey et al. , 1993
	Inibidores de Proteases	Roberts et al. , 1992
	Inibidores da coagulação sangüínea	Pannekoek et al. , 1993
	Domínio de ligação ao HIV do CD4 humano	Abrol et al. , 1994
	Hormônios	Lowan & Wells, 1993
	Anticorpos: Fab scFv	Zebedee et al. , 1992; Maranhão & Brígido, 2000; Ward, 1993
	Humanização de Anticorpos	Wang et al. , 2000
	Proteínas obtidas a partir de bibliotecas de cDNA	Barth et al. , 2000
	Construção de fatores transcricionais	Beerli et al. , 2000
	Estabilização de Proteínas	Chakravarty et al. , 2000

calização do produto de fusão.

As origens de replicação são seqüências gênicas que são reconhecidas pela maquinaria celular ou viral para produzir cópias do fagomídio. A origem de *E. coli* mais usada nos vetores já construídos é a *colE1*, derivada dos plasmídios tipo pUC, responsável pelo alto número de cópias do fagomídio na célula, em sua forma plasmidial (dupla fita). A origem de fago corresponde à região intergênica encontrada no genoma dos vírus. Essa seqüência é capaz de, com o auxílio das enzimas celulares, transformar o fagomídio de ssDNA (forma infectante, empacotada no capsídeo viral) em forma replicativa e vice-versa (Allen Jr. et al., 1993). Assim, quando a célula contendo o fagomídio é infectada pelo fago auxiliar para a produção de partículas virais, ocorre a replicação do DNA plasmidial pelo mecanismo de círculo rolante, dando origem ao DNA fita simples, que migra para a membrana celular para ser revestido por proteínas do capsídeo.

As seqüências promotoras utilizadas para dirigir a síntese do produto de fusão nos vetores têm sido as mais diversas. Acredita-se que a estequiometria entre proteínas de fusão e proteínas selvagens seja um importante fator na estabilidade da partícula viral

apresentadora de proteínas exógenas (Posner **et al.**, 1994). Dessa forma, a utilização de promotores muito fortes, como os virais, deve ser evitada a menos que esses possam ser mantidos sob repressão até o momento da produção da partícula viral recombinante.

As seqüências codificadoras para o peptídeo sinal são responsáveis pelo encaminhamento da proteína de fusão para a membrana celular. Deve-se ressaltar que a translocação total através da membrana celular não ocorre, uma vez que o domínio C-terminal de p3 permanece inserido nesse compartimento celular até que o produto de fusão seja incorporado ao capsídeo do vírion emergente (Breitling **et al.**, 1991). Entre as seqüências líderes descritas, a mais usada é a *pelB* (Hoogenboom **et al.**, 1991).

Vantagens sobre outros sistemas de seleção.

Quando comparadas às bibliotecas de expressão construídas em sistemas como λ gt11, os sistemas utilizando fagos filamentosos apresentam várias vantagens. A primeira delas é que fagos filamentosos não lisam as células infectadas, o que possibilita a separação de partículas virais do conteúdo intracelular, eliminando-se assim mui-

to da reatividade cruzada com proteínas celulares. Assim, enquanto a varredura de clones em sistemas tradicionais (que lisam as células) requer o ligante puro (Rapoport **et al.**, 1995), tal não é exigido quando são utilizadas bibliotecas apresentadas na superfície de partículas virais. Bibliotecas construídas na superfície de fagos já foram capazes de ser selecionadas até pela interação do fago de fusão com superfícies de células em cultura, e mesmo diante da complexidade de formas presentes nesse tipo de superfície-alvo, as partículas foram capazes de interagir com o ligante específico (Meulemans **et al.**, 1994; Edwards, **et al.**, 2000).

Outra característica importante é que essa nova metodologia utiliza os mais rápidos protocolos de seleção já descritos, e possibilita a varredura de até 10^8 clones por ciclo de seleção. Esse método é mais rápido porque o sobrenadante das culturas infectadas, contendo de 10^{10} a 10^{13} clones por mL, pode ser utilizado diretamente para a seleção. Essa utilização prescinde da transferência para membranas, que, além de limitar o número de clones (limitação de área) do filtro, é um processo extremamente trabalhoso.

O alto número de variantes gerados nas bibliotecas apresentadas na super-

fície do capsídio de fagos permite a mutação randômica simultânea de até 6 códons de aminoácidos, possibilitando que as (~2x10⁶) formas possam ser submetidas a ciclos de seleção de uma só vez (Lowman & Wells, 1993). Vale a pena ressaltar que, ao se isolar o fago através do fenótipo (capacidade de ligação a uma molécula-alvo) apresentado em seu capsídio, isola-se também o genótipo codificador dessa característica. Isso ocorre uma vez que o ssDNA do fagomídio ou fago de fusão é empacotado no capsídio da partícula que apresenta o peptídeo exógeno.

Apesar das vantagens aqui apresentadas, existem alguns relatos que apontam problemas na utilização desses sistemas de expressão/seleção. O primeiro problema diz respeito à instabilidade observada em bibliotecas que apresentam alguns tipos de anticorpos, e, além disso, há autores que consideram que o passo de amplificação, que envolve uma transfecção viral, possa ser um empecilho (Rapoport **et al.**, 1995). Outros relatam também problemas de crescimento celular nas culturas que expressam a proteína de fusão, o que poderia ocasionar uma relativa tendenciosidade da biblioteca, que passaria a expressar, preferencialmente, as formas mais toleradas pela bactéria (Kenan **et al.**, 1994). A despeito desses problemas as bibliotecas apresentadas em fagos (*phage display libraries*), em conjunto com o procedimento de seleção (*biopanning*), são uma metodologia consagrada na literatura. Diversos exemplos delas e seus principais resultados estão listados na Tabela I.

Outros fagos também já foram utilizados para apresentação de proteínas exógenas em seus capsídios: baculovírus (Lindley **et al.**, 2000), bacteriófago λ (Zhang **et al.**, 2000) e vírus da hepatite B (Kratz **et al.**, 1999). Alguns ajustes também foram propostos. Entre esses, destaca-se a utilização de bibliotecas fusionadas à porção infectiva da proteína III, acoplando-se assim a seleção de ligantes com capacidade infectante da partícula selecionada (Krebber **et al.**, 1997), a regulação da expressão com a utilização de diferentes promotores (Huang **et al.**, 2000), a obtenção de mutantes de pVIII para melhorar a expressão de grandes polipeptídeos (acima de 100 kDa) de forma multivalente (Sidhu **et al.**, 2000) além da otimização

de métodos de seleção utilizando-se a superfície de células em cultura como alvo da seleção (Watters **et al.**, 1997; Edwards, **et al.**, 2000).

Entre os trabalhos que se utilizam dessa técnica com aplicabilidade e potencial terapêutico, destaca-se o estudo de endereçamento de tumores. Esse estudo vem sendo explorado por experimentos de seleção *in vivo*, utilizando-se bibliotecas de peptídeos expressas na superfície de bacteriófagos filamentosos (Pasqualini & Ruoslahti, 1996; Johns **et al.**, 2000). As bibliotecas são injetadas por via intravenosa na cauda de camundongos e, após a sua circulação na corrente sanguínea, o animal é sacrificado e os seus órgãos são retirados. Os fagos que conseguiram romper a barreira endotelial são obtidos desses órgãos e caracterizados. A partir desses estudos, várias aplicações envolvendo químico e radioterapia específicas têm sido propostas. Além disso, busca-se a associação entre os peptídeos expressos em fagos e aqueles presentes na superfície de células tumorais metastáticas visando ao desenho de drogas capazes de impedir a migração e, conseqüentemente, a metástase.

Outro campo importante que se abriu nos últimos anos foi a possibilidade de se desenharem fatores transcricionais totalmente *in vitro* a partir de bibliotecas de *zinc fingers* e de seleção com diferentes oligonucleotídeos. Esses experimentos resultaram no isolamento de domínios protéicos capazes de reconhecer seqüências específicas de DNA. Utilizando-se essas proteínas artificiais, selecionadas por *Phage Display*, já foi possível ligar e desligar genes *in vivo* de plantas (Beerli **et al.**, 2000).

Resumidamente, pode-se dizer que as bibliotecas conformacionais - apresentadas no capsídio de fagos filamentosos - têm emergido como poderoso instrumento em diversas áreas de pesquisa, desde as mais básicas, como o estudo de estruturas biomoléculas, até à obtenção e o desenho de novos fármacos e vacinas contra diferentes doenças (Medynski, 1994).

Bibliotecas combinatórias de anticorpos

Uma das moléculas mais utilizadas

para a construção de bibliotecas em fagos filamentosos são as imunoglobulinas. Os anticorpos são proteínas envolvidas na resposta imune a agentes infecciosos e são investigados sistematicamente por seu envolvimento na homeostase do organismo vertebrado e por seu potencial biotecnológico. A utilização de anticorpos na medicina terapêutica e na propedêutica vem crescendo nos últimos anos e certamente terão um grande impacto na medicina deste novo século.

Os anticorpos são obtidos *in vivo* por um processo de seleção natural induzida pela presença do imunógeno acompanhado por linfócitos, gerando anticorpos de alta afinidade a um dado antígeno. É exatamente esse mecanismo de seleção *in vitro* que chamou a atenção dos pesquisadores no sentido de adaptar anticorpos às bibliotecas combinatórias em fago. Assim como os anticorpos, que são selecionados *in vivo* por um imunógeno externo, os fagos são selecionados *in vitro* por um ligante. Essa analogia entre os dois processos foi inicialmente comentada por Winter e seus colegas, em 1992 (Hoogenboom & Winter, 1992) e, desde lá, a obtenção de anticorpos recombinantes nos sistemas apresentados em fagos tem sido cada vez mais freqüente. Neste sentido admite-se que os anticorpos recombinantes obtidos por apresentação em fago seriam representativos da resposta imune. Esse conceito é, no entanto, falho, pois não considera que o processo de seleção em fago seja influenciado por outros parâmetros muito distintos daqueles encontrados no organismo. Por outro lado, com um sentido pragmático, a obtenção de anticorpos com especificidade e afinidade compatíveis àqueles obtidos *in vivo* é possível.

O desempenho do reagente obtido quanto a sua capacidade de reconhecimento do antígeno depende de dois fatores fundamentais: o tamanho da biblioteca inicial, isto é, a capacidade de representar o repertório do animal imunizado; e o procedimento de seleção utilizado. Várias estratégias têm sido utilizadas para se alcançar esse êxito e elas se baseiam em obter uma biblioteca inicial de tamanho igual ou superior ao repertório imune (em torno de 10⁷), buscando melhor eficiência de transformação e de amplificação

dos genes variáveis dos anticorpos.

Os anticorpos maduros são o resultado da combinação de genes variáveis que são associados em um processo, do qual resulta uma alta variabilidade. Essa combinação de genes associada à maturação de afinidade permite aos anticorpos uma capacidade de ligação a um número ilimitado de formas. Sendo assim, uma biblioteca de anticorpos representativa contém formas ligantes a um número virtualmente ilimitado de antígenos.

Em nosso grupo de trabalho, adaptamos bibliotecas de anticorpos em fago para explorar questões básicas (Maranhão & Brígido, 2000) e para obtenção de reagentes com aplicação biotecnológica. Com um viés acadêmico, utilizamos essa técnica para comparar a seleção de famílias de genes variáveis por determinado antígeno, com a resposta imune *in vivo*. Tentamos, com isso, observar se, fora do contexto *in vivo*, conseguiríamos observar uma tendência na associação de certos antígenos com anticorpos derivados de determinadas famílias de genes variáveis. Caso haja alguma associação, teremos uma forte evidência de como o antígeno seleciona o repertório observado *in vivo*. Por outro lado, bibliotecas combinatórias estão sendo utilizadas para selecionar anticorpos de alta afinidade específicos para detectar antígenos de tumor ósseo. A partir do repertório natural de pacientes com osteosarcoma, procuramos encontrar anticorpos que auxiliem o diagnóstico dessa doença e que possam ser eventualmente utilizados na terapêutica como agentes anti-tumorais. Estamos também atuando na área de biotecnologia agrônoma, onde procuramos desenvolver anticorpos eficientes na neutralização de enzimas de nematóides envolvidas na infestação de determinados tipos de cultivos. A idéia é introduzir genes sintéticos, codificadores desses anticorpos, no genoma de hortaliças no intuito de se obterem plantas transgênicas, que, produzindo o anticorpo neutralizante, tornem-se resistentes aos parasitas.

Perspectivas

O estudo da tecnologia de apresentação de bibliotecas combinatórias na superfície de bacteriófagos, que data

de 17 anos, já mostrou o seu potencial na produção de novas formas com capacidade ligante a um grande número de moléculas. Espera-se que nos próximos anos essa técnica venha a representar uma técnica corriqueira de ampla divulgação entre os pesquisadores. Nesse contexto, torna-se importante ressaltar que essa técnica complementa a atual onda de projetos genômicos, onde se gera um grande volume de informação, mas com pouca interpretação em nível fenotípico. Com a técnica de apresentação em fago, podemos agora testar genes de interesse em grande escala, na busca de um conjunto de proteínas que interagem, e que vem sendo chamado de interatoma. A busca desses interatomas promete expandir os limites criados com os projetos genômicos e permitem agora inferir acerca de como esses genes se relacionam, explicando o indivíduo fenotipicamente. Nesse contexto, a técnica de apresentação em fago poderá ser amplamente utilizada. Portanto, espera-se, que nos próximos anos, venhamos a considerar um papel corriqueiro a técnica de apresentação em fago.

Referências Bibliográficas

Abrol, S., Sampath, A., Arora, K. & Chaudhary, V. K. (1994). Construction and characterization of M13 bacteriophages displaying gp 120 binding domains of human CD4. *Indian J. Biochem. & Biophys.*, **31**: 302-309

Allen Jr., G. C., Dixon, N. E. & Kornberg, A. (1993). Strand switching of replicative DNA helicase promoted by the *E. coli* primosome. *Cell*, **74**: 713-722.

Barth, S., Weidenmüller, M.K., Schmidt, M.F.G. & Engert, A. (2000). Combining phage display and screening of cDNA expression libraries: a new approach for identifying the target antigen of an scFv preselected by phage display. *J. Mol. Biol.*, **301**: 751-757

Beerli, R.R., Dreier, B. & Barbas III, C.F. (2000). Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 1495-1500.

Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Fuchs, P., Braunagel, M., Klewin-

ghaus, I. & Little, M. (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene*, **104**: 147-153.

Chakravarty, S., Mitra, N., Queitsch, I., Suroliá, A., Varadarajan, R. & Dübel, S. (2000). Protein stabilization through phage display. *FEBS Letters*. **476**: 296-300.

Cheadle, C., Ivanchenko, Y., South, V., Searfoss, G. H., French, S., Howk, R., Ricca, G. A. & Jaye, M. (1994). Identification of a Src SH3 domain binding motif by screening a random phage display library. *J. Biol. Chem*, **269**: 24034-24039.

Corey, D. R., Shiau, A. K., Yang, Q., Janowski, B. A. & Craik, C. S. (1993). Trypsin display on the surface of bacteriophage. *Gene*, **128**: 29-36.

Crisman, J. W. & Smith, G. P. (1984). Gene III protein of filamentous phages: evidence for a carboxi-terminal domain with a role in morphogenesis. *Virology*, **132**: 445-455.

Dübel, S., Breitling, F., Fuchs, P., Braunagel, M., Klewinghaus, I. & Little, M. (1993). A family of vectors for surface display and production of antibodies. *Gene*, **128**: 97-101.

Edwards, B.M., Main, S.H., Cantone, K.L., Smith, S.D., Warford, A. & Vaughan, T.J. (2000). Isolation and tissue profiles of a large panel of phage antibodies binding to the human adipocyte cell surface. *J. Immunological Meth.* **245**: 67-78.

Folgori, A., Tafi, R., Meola, A., Felici, F., Galfré, G., Cortese, R., Monaci, P. & Nicosia, A. (1994). A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J.*, **13**: 2236-2243.

Hoess, R. H., Mack, A. J., Walton, H. & Reilly, T. M. (1994). Identification of a structural epitope by using a peptide library displayed on filamentous bacteriophage. *J. of Immunol.*, **153**: 724-729.

Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P. & Winter, G. (1991). Multisubunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic. Acids. Res.*, **19**: 4133-4137.

Hoogenboom, H. R. & Winter, G. (1992). By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic reperto-

- res of germline V_H gene segments rearranged *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, **227**: 381-388.
- Huang, W., McKevitt, M. & Palzhill, T. (2000). Use of the arabinose P_{bad} promoter for tightly regulated display of proteins on bacteriophage. *Gene*. **251**:187-197
- Jhons, M., George, A.J.T. & Ritter, M.A. (2000). In vivo selection of sFv from phage display libraries. *J. Immunological Meth.* **239**:137-151.
- Kenan, D. J., Tsai, D. E. & Keene, J. D. (1994). Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries. *Trends Biochem. Sci.*, **19**: 57 - 63.
- Kishchenko, G., Batliwala, H. & Makowski, L. (1994). Structure of a foreign peptide displayed on the surface of bacteriophage M13. *J. Mol. Biol.*, **241**: 208-213.
- Kratz, P.A.; Böttcher, B. & Nassal, M. (1999). Native phage display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:1915-1920.
- Krebber, C., Spada, S., Desplanq, D., Krebber, A., Ge, L. & Plünckthum, A. (1997). Selectively-infective phage (SIP): a mechanistic dissection of a novel *in vivo* selection for protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **268**:607-618.
- Lindley, K.M., Su, J-L., Hodges, P.K., Wisley, G.B., Bledsoe, R.K., Condrey, J.P., Winegar, D.A., Hutchins, J.T. & Kost, T. A. (2000). Production of monoclonal antibodies using recombinant baculovirus displaying gp64-fusion proteins. *J. Immunological Meth.* **234**:123-135
- Lowman, H. B. & Wells, J. A. (1993). Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *J. Mol. Biol.*, **234**: 564-578.
- Maranhão, A.Q. & Brígido, M.M. (2000). Expression of anti-Z-DNA single chain variable fragment on the filamentous phage surface. *Braz. J. Medical Biological Res.* **33**: 569-579.
- Makowski, L. (1993). Structural constraints of the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages. *Gene*, **128**: 5-11.
- Medynski, D. (1994). Phage Display: all dressed up and ready to role. *Trends Biochem. Sci.*, **12**: 1134-1136.
- Pannekoek, H., van Meijer, M., Schleef, R. R., Loskutoff, D.J. & Barbas, C. F. (1993). Functional display of human plasminogen-activator inhibitor 1 (PAI-1) on phages: novel perspectives for structure-function analysis by error-prone DNA synthesis. *Gene*, **128**: 135-140.
- Pasqualini, R & Ruoslahti, E. (1996). Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature* **380**:364-366.
- Posner, B., Smiley, J., Lee, I. & Benkovic, S. (1994). Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. *Trends Biochem. Sci.*, **19**: 145-150.
- Rapoport, B., Portolano, S. & McLachlan, S. M. (1995). Combinatorial libraries: new insights into human organ specific autoantibodies. *Immunol. Today*, **16**: 43-49.
- Roberts, B. L., Markland, W., Ley, A. C., Kent, R. B., White, D. W., Guterman, S. K. & Ladner, R. C. (1992). Direct evolution of a protein: selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 2429-2433.
- Robertson, M. W. (1993). Phage and *Escherichia coli* expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor alpha-subunit ectodomain. *J. Biol. Chem.*, **268**: 12736-12743.
- Scarseli, E., Esposito, G. & Traboni, C. (1993). Display of functional domains of the human high affinity IgE receptor on the M13 phage surface. *FEBS Lett.*, **329**: 223-226.
- Scott, J. (1993). Discovering peptide ligands using epitope libraries. *Trends Biochem. Sci.*, **17**: 241-245.
- Sidhu, S.S., Weiss, G.A. & Wells, J.A. (2000). High copy display of large proteins on phage for functional selections. *J. Mol. Biol.* **296**:487-495.
- Smith, G. P. (1993). Surface display and peptide libraries. *Gene*, **128**: 1-2.
- Smith, G. P. & Scott, J. K. (1993). Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Meth. Enzimol.*, **217**: 228-257.
- Soumillion, P., Jespers, L., Bouchet, M., Marchand-Brynaert, J., Winter, G. & Fastrez, J. (1994). Selection of β -lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. *J. Mol. Biol.*, **237**: 415-422.
- South, V., Searfoss, G. H., French, S., Cheadle, C., Murray, E., Howk, R., Jaye, M. & Ricca, G. A. (1994). Identification of novel peptide antagonist for von Willebrand factor binding to the platelet glycoprotein Ib receptor from a phage epitope library. *Thrombosis and Haemostasis*, **73**: 144-150.
- Stoute, J. A., Ballou, W. R., Kolodny, N., Deal, C. D., Wirtz, R. A. & Lindler, L. E. (1995). Induction of humoral immune response against *Plasmodium falciparum* by immunization with synthetic peptide mimotopes whose sequence was derived from screening a filamentous phage epitope library. *Infect. Immun.*, **63**: 934-939.
- Wang, L. F., Du Pleiss, D. H., White, J. R., Hyatt, A. D. & Eaton, B. T. (1995). Use of a gene-target phage display random epitope library to map an antigenic determinant on the blue-tongue virus outer capsid protein VP5. *J. Immunol. Meth.*, **178**: 1-12.
- Ward, E.S. (1995). VH shuffling can be used to convert a Fv fragment of anti-hen egg lysozyme specificity to one that recognizes a T cell receptor V α . *Molecular Immunology*, **32**:147-156.
- Watters, J.M., Telleman, P. & Junghans, R.P. (1997). An optimized method for cell-based phage display panning. *Immunotechnology* **3**: 21-29.
- Webster, R. (2000) Filamentous Phage Biology. *In Phage Display Libraries: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Wells, J.A. (1996). Hormone mimicry. *Science* **273**: 449-450.
- Wu, H., Yang, W. P. & Barbas, C. F. (1995). Building zinc fingers by selection: toward a therapeutic application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 344-348.
- Zebedee, S. L., Barbas, C. F., Hom, Y. L. & Caothien, R. H. (1992). Human combinatorial antibody libraries to hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 3175-3179.
- Zhang, Y., Pak, J.W., Maruyama, I.N., & Machida, M. (2000). Affinity selection of DNA binding proteins displayed on bacteriophage λ . *J. Biochem.* **127**:1057-1063. 