

Librerie di peptidi su batteriofagi come sistema sperimentale per lo studio delle interazioni molecolari

Paola Fortugno, Fabrizio Ferrè e Franco Felici

Kenton Labs Centro Ricerche Farmacologia, IRCCS S.Lucia via Ardeatina 306, 00179 Roma (Italy) Tel. +39 06 51501520 - Fax. +39 06 51962706 e-mail: felici@obelix.bio.uniroma2.it

L'interazione tra molecole è un passo essenziale nella maggior parte dei processi biologici. Negli ultimi anni, la generazione di librerie molto vaste (composte di 10^7 - 10^8 varianti) di peptidi esposti sulla superficie di batteriofagi filamentosi ha fornito un potente strumento per l'identificazione e l'isolamento di ligandi per una data molecola tramite un approccio combinatoriale [1]. Queste librerie sono state costruite mediante il clonaggio di oligonucleotidi di sequenza casuale nei geni codificanti per le proteine capsidiche di batteriofagi filamentosi [2,3]. In questo modo, ogni diverso peptide è esposto su una particella fagica differente e da ciò quindi deriva che i peptidi esposti su fago hanno l'utilissima proprietà di essere fisicamente associati alla loro informazione genetica corrispondente. Utilizzando una data molecola come "target" è possibile purificare per affinità, dalla miscela estremamente eterogenea che costituisce la libreria, quelle particelle fagiche ricombinanti che espongono sulla loro superficie sequenze peptidiche in grado di legarsi a questa molecola. La sequenza di questi peptidi così selezionati può essere rapidamente ed efficientemente ricavata mediante il sequenziamento del DNA che è incapsidato nelle stesse particelle fagiche [4]. La strategia di selezione appena descritta è stata applicata a molti differenti sistemi ligando/ligato, portando all'identificazione di nuove sequenze peptidiche, le quali non necessariamente somigliano a quelle naturali (ovvero a quelle dei ligandi originali), tuttavia mostrano una analoga specificità di legame; sono state perfino isolate sequenze peptidiche in grado di mimare molecole non proteiche [5]. La suddetta complessità delle librerie di peptidi su batteriofagi però, pur essendo sufficiente a selezionare ligandi specifici, è di molti ordini di grandezza inferiore a quella necessaria a contenere tutte le possibili varianti di una sequenza amminoacidica di lunghezza paragonabile ad un dominio proteico, ad esempio per una sequenza di 20 amminoacidi le teoriche possibili combinazioni sono circa 10^{26} , per una di 30 oltre 10^{39} . Risulta quindi evidente che la costruzione e la manipolazione di una libreria teoricamente "completa" di strutture proteiche casuali è improponibile. Una soluzione praticabile può essere quella di generare diversità mediante cicli successivi di mutagenesi e selezione, mimando in pratica quello che avviene naturalmente nel processo di evoluzione biologica. Le tecnologie di manipolazione genetica possono permettere di accelerare questo processo, in maniera che generazioni composte da molti milioni di mutanti possono essere prodotte e selezionate in cicli molto rapidi. Il nostro lavoro è stato diretto a mettere a punto la strumentazione biologica (librerie e vettori) e le metodologie (protocolli mirati di mutagenesi e selezione) per dimostrare che un tale approccio all'ingegneria proteica mediante tecniche di evoluzione molecolare è effettivamente possibile.

Bibliografia:

1. A. Tramontano and F. Felici. Exploring molecular recognition by combinatorial and rational approaches. In: Protein engineering in industrial biotechnology, Ed. L. Alberghina; Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, (in press)
2. J.K. Scott and G.P. Smith. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249:386-390 (1990)
3. F. Felici, L. Castagnoli, A. Musacchio, R. Jappelli and G. Cesareni. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J Mol Biol* 222:301-310 (1991)
4. F. Felici, A. Luzzago, P. Monaci, A. Nicosia, M. Sollazzo and C. Traboni. Peptide and protein display on the surface of filamentous bacteriophage. *Biotechnology Annual Review, Elsevier Science BV* 1:149-183 (1995)
5. A. Phalipon, A. Folgori, J. Arondel, G. Sgaramella, P. Fortugno, R. Cortese, P.J. Sansonetti and F. Felici. Induction of anti-carbohydrate antibodies by phage library-selected peptide mimics. *Europ*

