

Technologia „phage display”

(Slide 1)

Metoda „phage display” używana jest do szeroko pojętego badania interakcji pomiędzy białkami (lub peptydami), a różnymi ligandami lub innymi białkami. W metodzie tej wykorzystywane są specjalne biblioteki fagowe, w których badane białka lub peptydy ekspresjonowane są w obrębie strukturalnych białek powierzchniowych bakteriofaga (najczęściej faga filamentarnego M13). Ekspozowane na powierzchni cząstek fagowych białka mogą być testowane pod kątem różnych czynników (np. siły wiązania substratu, aktywności enzymatycznej lub stabilności w danym środowisku). Informacja genetyczna na temat każdego wariantu badanego białka zawarta jest w genomie używanego w bibliotece faga, toteż proste sekwencjonowanie DNA pozwala na jego szybką identyfikację. W ten sposób możliwe jest wyselekcjonowanie białka o najkorzystniejszych właściwościach i bezbłędne powiązanie jego fenotypu z genotypem.

(Slide2)

Podstawą działania metody „phage display” jest fuzja peptydów lub białek badanych oraz powierzchniowych białek strukturalnych bakteriofaga (w przypadku faga M13 najczęściej jest to białko 3 lub 8). Opracowano trzy różne systemy ekspresji badanych protein przez bakteriofaga. W pierwszym z nich, wektor fagowy zawiera unikalną sekwencję kodującą odpowiednie białko strukturalne kapsydu, dzięki której, w wyniku insercji, każda kopia białka płaszczka ekspresjonuje wstawiony element (badane białko lub peptyd). System ten nazywany jest systemem 3 lub 8 (w zależności od białka wirusowego wykorzystanego do fuzji). Drugi typ wektorów fagowych zawiera dwie kopie sekwencji kodującej białko płaszczka, a insercja sekwencji badanego białka następuje tylko w jednej z tych kopii. W rezultacie cząstka fagowa ekspresjonuje zarówno białko natywne, jak i białko fuzyjne (zawierające wstawkę). Ten typ systemu ekspresji określany jest jako 33 lub 88. Trzeci system ekspresji jest najbardziej skomplikowany, ponieważ zawiera dwa składniki: fagmid (plazmid zawierający kopię sekwencji fagowego białka strukturalnego z wstawioną sekwencją badanego białka oraz sekwencją sygnałową, umożliwiającą pakowanie wirusowego DNA do pustego kapsydu), a także bakteriofaga pomocniczego (fag M13 pozbawiony sekwencji sygnałowej koniecznej do poprawnego składania wirionów). W momencie, gdy komórka gospodarza posiadająca fagmid zostaje zainfekowana fagiem pomocniczym, dochodzi do namnażania dwóch rodzajów cząstek fagowych – natywnych i ekspresjonujących badane białka / peptydy. System ten określany jest jako 3+3 lub 8+8.

(Slide 3)

Bardzo ważnym krokiem w trakcie pracy z technologią „phage display” jest prawidłowe skonstruowanie biblioteki. Metoda ta jest niezwykle wszechstronna, jednak techniki tworzenia bibliotek różnych wariantów badanych białek, z grubsza można podzielić na trzy kategorie. Pierwsza kategoria zakłada wygenerowanie losowych mutacji w naturalnie występującym białku lub peptydzie. W tym przypadku do przygotowania biblioteki wykorzystuje się fizyczne lub chemiczne mutageny, szczepy mutacyjne (szczepy *E. coli* pozbawione systemów naprawy DNA i wprowadzające losowe zmiany do klonowanych

plazmidów) lub technikę „error-prone PCR” (PCR w warunkach stymulujących polimerazę Taq do popełniania błędów). Druga kategoria wykorzystuje metody pozwalające na generowanie losowych zmian tylko w konkretnych regionach białek. Metody te nazywane są ukierunkowanymi i wykorzystują one losowo generowane, syntetyczne oligonukleotydy, które następnie wprowadza się do wybranych genów przy użyciu PCR lub bezpośredniego klonowania.

(Slide 4)

Celem trzeciej kategorii bibliotek nie jest wygenerowanie losowych sekwencji, a raczej połączenie w nowych konfiguracjach sekwencji już istniejących. Techniki te określane są mianem konfiguracyjnych.

(Slide 5)

W momencie, gdy biblioteka badanych białek zostanie stworzona, może ona zostać poddana testowaniu, które zwykle polega na wieloetapowej selekcji. W trakcie kolejnych etapów ekspozycji, warianty białek (lub peptydów) wykazujące silniejsze wiązanie do immobilizowanego w fazie stałej receptora, są selekcjonowane. Proces ten nazywany jest biopanningiem. W selekcji tego typu, ligand lub substrat, rozpoznawany przez badane białko, jest unieruchomiony na powierzchni wyścielonej streptawidyną (np. płytką titracyjną). Mieszanina bakteriofagów ekspresjonujących wszystkie białka z danej biblioteki wprowadzana jest na przygotowaną wcześniej powierzchnię. Te z wirusów, które połączą się z unieruchomionym na tej powierzchni receptorem (lub substratem) pozostaną związane w fazie stałej, podczas gdy fagi ekspresjonujące pozostałe elementy biblioteki ulegną wypłukaniu. Związane na powierzchni bakteriofagi, zawierające białko o pożądanym właściwościach, są następnie ekstrahowane i namnażane na komórkach *E. coli*. Namnożone bakteriofagi poddaje się kolejnym cyklom biopanningu w celu uzyskania satysfakcjonującego miana (jeden cykl zwiększa miano od 20 do 1000 razy). Po kilku cyklach biopanningu, DNA wyizolowanych fagów poddaje się sekwencjonowaniu w celu poznania dokładnej sekwencji białka o najkorzystniejszych właściwościach.

(Slide 6)

Metoda „phage display” jest niezwykle obiecującą i wszechstronną techniką, pozwalającą na równoczesne testowanie tysięcy wariantów peptydów lub białek pod kątem zwiększonej wytrzymałości, aktywności lub siły wiązania. Technologia ta umożliwia ulepszanie białek nie tylko na poziomie interakcji białko-ligand, ale również tworzenie nowych interakcji na poziomie białko-białko lub białko-DNA. Duża wydajność i relatywnie prosta procedura, czyni z metody „phage display” użyteczną technikę w badaniach podstawowych i aplikacyjnych. Technologia ta okazuje się być szczególnie przydatna w badaniach klinicznych, w kontekście generowania przeciwciał rekombinowanych oraz identyfikacji peptydów o dużym znaczeniu klinicznym.