

9.3: Przykłady i zastosowanie w praktyce

- 1) Po krótkim wprowadzeniu do metody „phage display” można przejść do omówienia przykładów zastosowania tej technologii w praktyce.
 - i) Technika „phage display” ma szerokie spektrum zastosowań. Może być wykorzystywana w celu podnoszenia wydajności enzymów, do analizy proteomu lub w poszukiwaniu nowych leków bądź receptorów dla leków. Nie są to oczywiście wszystkie możliwości wykorzystania tej metody.
- 2) Pierwszą kwestią, na którą warto zwrócić uwagę jest optymalizacja funkcji enzymów. W wielu gałęziach współczesnego przemysłu używa się szerokiej gamy enzymów różnego pochodzenia. Enzymy te oryginalnie produkowane są przez organizmy w konkretnym celu i w określonych warunkach środowiskowych. W związku z tym ich wykorzystanie w innych warunkach nie zawsze daje pożądane rezultaty (mniejsza aktywność, niższa stabilność, brak aktywności względem wybranego substratu). Dzięki metodzie „phage display” możliwe jest wyselekcjonowanie enzymów o większej zdolności wiązania substratu, wyższej aktywności i stabilności termicznej.
 - i) Najczęstszym problemem przy wprowadzaniu enzymów do przemysłu jest brak ich stabilności. Przykładowo, enzym cytoplazmatyczny, pracujący w temp. 37°C, zastosowany w procesie technologicznym, wymagającym temperatury 50°C zwykle staje się niestabilny i denaturuje. Metoda „phage display” umożliwia stworzenie biblioteki mutagenizowanych enzymów i ekspresję ich na białku 3 (w przypadku faga M13). Na etapie przyłączania, w trakcie procesu biopanningu (selekcji swoistości), większość fagów nie będzie w stanie przyłączyć się do substratu ekspresjonowanego enzymu w temp. 50°C, ponieważ enzym ten ulega denaturacji. Jedynie fagi ekspresjonujące enzym, który uformuje stabilną strukturę w podwyższonej temperaturze będą mogły poprawnie połączyć się z substratem i zostaną namnożone w następnych etapach biopanningu. Dzięki sekwencjonowaniu genomu namnożonych fagów można poznać sekwencję genu kodującego enzym o pożądanych właściwościach
 - ii) Poważnym problemem towarzyszącym wykorzystywaniu enzymów w przemyśle jest ich niska oporność na proteolizę. Na szczęście metoda „phage display” również tutaj okazuje się przydatna. W tym przypadku tworzona jest biblioteka cząstek fagowych, w których poszukiwany enzym ekspresjonowany jest jako białko fuzyjne, zlokalizowane w środku białka 3. Następnie wszystkie elementy biblioteki poddawane są działaniu odpowiednich proteaz. Tylko te fagi, których białko 3 przetrwa w całości (zachowa N-koniec) będą zdolne do interakcji z pilusem F bakterii. A zatem enzymatyczna wstawka, która okaże się oporna na działanie proteaz, zagwarantuje konkretnemu elementowi biblioteki możliwość namnożenia w trakcie biopanningu. Sekwencja DNA amplifikowanych fagów będzie zawierała informację na temat budowy pożądanego enzymu.
- 3) Metoda „phage display” umożliwia także podniesienie aktywności katalitycznej enzymów. Poniżej przytoczony zostanie przykład inżynierii metaloenzymów, które

wymagają atomu metalu do prawidłowego funkcjonowania. W poniższym przykładzie wykorzystano popularny enzym z grupy β -laktamaz.

- i) W pierwszym etapie utworzona zostaje biblioteka, w której zmutagenizowany gen β -laktamazy łączony jest z genem kodującym 3 białko faga M13. Następnie wszystkie elementy bibliotek traktowane są czynnikiem chelatującym, który usuwa wszystkie atomy metali ze środowiska reakcji. W ten sposób enzym jest inaktywowany, jednak zachowuje zdolność do połączenia z substratem (pierwsza selekcja odrzuca enzymy, które utraciły zdolność wiązania substratu). Po usunięciu wadliwych elementów biblioteki, do środowiska wprowadzone zostają jony metali i rozpoczyna się selekcja pozytywna. Formy enzymu o wyższej aktywności rozcinają substrat znacznie wydajniej, toteż fagi eksponujące najbardziej aktywny enzym, namnażają się najszybciej i najłatwiej wyizolować je z mieszaniny.
 - ii) Po dwóch rundach biopanningu, możliwe jest wyizolowanie enzymu nawet 60-krotnie bardziej aktywnego, niż wyjściowy. Technika ta może być wykorzystywana do poprawy wydajności wielu różnych metaloenzymów.
- 4) Badania proteomiczne to kolejna dziedzina zastosowania metody „phage display”. Działanie wielu białek zależy od interakcji z innymi białkami. Niestety w wielu przypadkach białka uczestniczące w tych interakcjach pozostają nieznane. Aby znaleźć takie nieznane białko, konieczne jest stworzenie obszernej biblioteki, do której budowy wykorzystuje się wszystkie sekwencje cDNA (lub ORF) danego proteomu. Biblioteki te kodują praktycznie wszystkie białka, jakie mogą być ekspresjonowane w danej komórce (oczywiście każdy element biblioteki ekspresjonuje inne białko). W przypadku tego rodzaju zastosowania, poszukiwane białka ekspresjonowane są w obrębie białka 8 faga M13. Selekcja swoistości (biopanning) w tym wypadku polega na wprowadzeniu „przynęty” (np. znanego enzymu, którego koenzym jest poszukiwany). Fagi eksponujące poszukiwane białko zostaną „wzbogacone” znanym białkiem, występującym w mieszaninie reakcyjnej. Sekwencjonowanie wyizolowanych fagów pozwoli poznać szukanego białka lub ułatwi jego identyfikację innymi technikami.
- 5) Ostatnim przykładem zastosowania techniki „phage display” jest poszukiwanie peptydów zdolnych do przekraczania bariery krew-mózg. Zadanie to jest istotne w kontekście projektowania nowych leków, ponieważ duża część leków nie przenika tej bariery. Bariera krew-mózg obecna jest wokół naczyń krwionośnych wewnątrz mózgu. Sąsiadujące ze sobą komórki śródbłonna tworzą ścisłe, tzw. „barierowe” połączenie, które formuje ciągłą powierzchnię uniemożliwiającą wyciek krwi do mózgu oraz utrudnia przenikanie wielu leków (stwarza to realny problem przy poszukiwaniu leków na Alzheimera). Bariera ta jest przepuszczalna tylko dla niektórych składników odżywczych oraz niewielkich białek. Dlatego też jedynym rozwiązaniem, pozwalającym na transport leków do mózgu jest skoniugowanie ich z niewielkimi peptydami, mającymi zdolność przenikania bariery krew-mózg. System „phage display” umożliwia znalezienie takich peptydów.
- i) W celu wyselekcjonowania odpowiednich peptydów, tworzona jest biblioteka fagów ekspresjonujących losowo 12-aminokwasowe peptydy na swojej powierzchni. Aby znaleźć peptydy przenikające barierę krew-mózg, selekcję

swoistości (biopanning) należy przeprowadzić *in vivo*. W tej technice biblioteka fagowa wstrzykiwana jest do żyły ogonowej u myszy. Od momentu aplikacji fagi przemieszczają się w układzie krążenia gryzonia przez określony czas (od kilku minut do kilku godzin). Po tym czasie myszy są uśmiercane, a z ich mózgów izoluje się fagi, ekspresjonujące odpowiedni peptyd.

6) Po czterech cyklach biopanningu *in vivo*, wyizolowano 20 peptydów, z których 12 posiadało tę samą sekwencję.

i) Odnaleziony w ten sposób peptyd został skoniugowany z nanocząsteczką i oznakowany metką fluorescencyjną, a tak przygotowany koniugat wstrzyknięto ponownie myszy. Obrazowanie *in vivo* ukazuje zdolność do przenikania bariery krew-mózg przez zaprojektowaną cząsteczkę. Pierwsze dwie myszy stanowią kontrolę, z kolei myszy trzeciej i czwartej podano koniugat w różnych stężeniach. Rycina wyraźnie wskazuje akumulację oznakowanego fluorescencyjnie koniugatu wewnątrz mózgu badanych myszy. W ten sposób, dzięki metodzie „phage display” udało się stworzyć peptyd, który umożliwił transport leku przez barierę krew-mózg.

Powyższe przykłady obrazują jak wszechstronne może być zastosowanie techniki „phage display” w biotechnologii i w jak łatwy sposób praktycznie wykorzystać biblioteki fagowe.

7) Więcej informacji na temat metody „phage display” oraz przykładów jej zastosowania można znaleźć w publikacjach wymienionych poniżej.