Биомедицинская химия, 2016 том 62, вып. 5, с. 481-495.

ОБЗОРЫ

УДК 577
©Кузьмичева, Белявская

ПЕПТИДНЫЙ ФАГОВЫЙ ДИСПЛЕЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОМЕДИЦИНЕ

Г.А. Кузьмичева[1,2]*, В.А. Белявская[1]

[1]Государственный научный центр вирусологии и биологии "Вектор",
630558 Кольцово, Новосибирская область; эл. почта: kouzmitcheva@yahoo.com
[2]"XBiotech USA", Остин, Ист Риверсайд Драйв, 8201, стр. 4, 78744 Техас, США

В настоящее время пептидный фаговый дисплей является одним из наиболее распространённых методов поиска пептидных лигандов. Пептидные фаговые библиотеки, содержащие миллиарды различных вариантов, служат источником получения пептидов, способных специфично узнавать как различные биологические объекты (белки, вирусы, бактерии, раковые клетки), так и широкий спектр неорганических веществ (металлы, сплавы, полупроводники, токсины, пластиковые поверхности). Успех использования нитчатых бактериофагов в технологиях фагового дисплея кроется в детальной изученности фаговых генома и протеома, тонкого строения фагового капсида, а также в возможностях манипуляций с фаговым геномом без потери жизнеспособности фагов. В настоящем обзоре рассмотрены характерные черты наиболее известных некоммерческих пептидных комбинаторных библиотек различного формата (в частности, ландшафтных библиотек) и их использование в различных областях биотехнологии и биомедицины для: а) идентификации диагностических пептидов против различных патогенов; б) идентификации пептидов, узнающих различные типы раковых клеток; в) использования технологий фагового дисплея в исследованиях интерактомов человека и в создании новых наноматериалов заданной структуры.

Ключевые слова: фаговый дисплей, пептиды, бактериофаги, пептидные фаговые библиотеки, ландшафтные библиотеки

DOI 10.18097/PBMC20166205481

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время пептидный фаговый дисплей является одним из наиболее распространенных методов поиска пептидных лигандов. Пептидные фаговые библиотеки, содержащие миллиарды различных вариантов, служат источником получения пептидов, способных специфично узнавать как различные биологические объекты (белки, вирусы, бактерии, раковые клетки), так и широкий спектр неорганических веществ (металлы и сплавы, полупроводники, токсины, пластиковые поверхности). Успех использования нитчатых бактериофагов в технологиях фагового дисплея кроется в детальной изученности фаговых генома и протеома, тонкого строения фагового капсида, а также в возможностях манипуляций с фаговым геномом без потери жизнеспособности фагов. Некоторые приложения технологий фагового дисплея в поисках пептидов, специфично узнающих различные молекулярные мишени, рассмотрены в данном обзоре.

1. БИОЛОГИЯ НИТЧАТЫХ ФАГОВ

Нитчатые или филаментные бактериофаги *Escherichia coli* (в дальнейшем изложении фаги) относятся к семейству *Inoviridae*, роду *Inovirus* и включают 3 близкородственных вида: f1, fd, и M13, отличающихся друг от друга несколькими аминокислотными заменами в фаговых белках [1-3]. Строение нитчатых фагов показано на рисунке 1. Капсиды фагов представляют собой длинные гибкие полые нанотрубки с высокоупорядоченной белковой структурой, длина капсида около 1 мкм, диаметр – 6-7 нм [4-6]. Капсид образуют 5 различных белков. Основу капсида фага дикого типа составляют 2700 копий короткого (50 аминокислотных остатков) основного белка оболочки p8, копии которого плотно примыкают друг к другу наподобие зёрен в кукурузном початке. При этом приблизительно половина молекулы p8, её N-концевая часть, экспонирована наружу, а C-концевая спрятана

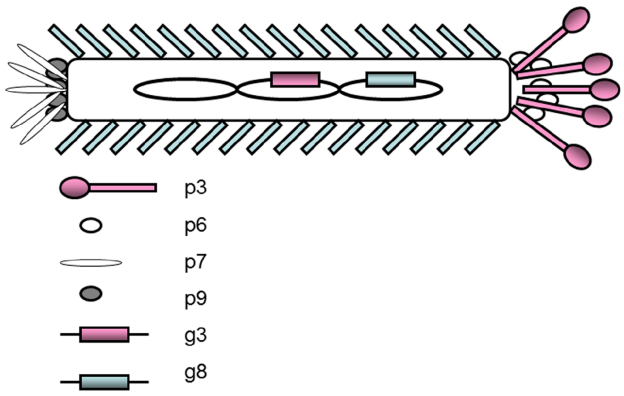

Рисунок 1. Строение филаментных бактериофагов *E coli* (f1, fd, M13). Основное тело капсида составляет белок p8 (2700 копий), на одном конце капсида находятся белки p3 и p6 (5 копий каждого), на другом - белки p7 и p9 (5 копий каждого). Одноцепочечная кольцевая ДНК находится в полости капсида. Гены кодирующие белки p3 (g3) и p8 (g8) обозначены прямоугольниками.

* - адресат для переписки

внутри полой трубки. На одном конце капсида располагаются по 5 копий белков p3 и p6, на другом – по 5 копий белков p7 и p9. Геном фага представлен одноцепочечной кольцевой ДНК, располагающейся в полости капсида, и включает всего 11 генов, пять из которых кодируют белки капсида, два отвечают за репликацию фаговой ДНК, три за самосборку фаговых частиц и секрецию, и один – за связывание с одноцепочечной фаговой ДНК в процессе, предшествующем самосборке фаговых частиц. Размеры фаговой ДНК могут варьировать в значительных пределах, что позволяет получать рекомбинантные фаги, несущие чужеродные гены. При увеличении длины ДНК увеличивается и количество копий белка p8, и, соответственно, длина фаговой частицы.

Жизненный цикл нитчатых фагов показан на рисунке 2. Нитчатые фаги не относятся ни к литическим, ни к лизогенным фагам [7, 8]. В процессе своего размножения они не убивают хозяйскую клетку *E. coli*, а их ДНК не встраивается в бактериальный геном. Нитчатые фаги способны инфицировать только те штаммы *E. coli*, которые несут коньюгативные F-пили и, соответственно, коньюгативные F-плазмиды. При инфицировании бактериальной клетки фаговая частица специфично связывается с кончиком F-пили через белок p3, пиля втягивается, и фаговая частица проникает в периплазматическое пространство клетки через временно образованную пору. В результате комплексного взаимодействия с мембранными белками клетки (TolQ, TolR, TolA) в периплазме фаговый капсид распадается и в цитоплазму попадает только кольцевая одноцепочечная ДНК. В клетке на её основе образуется двухцепочечная репликативная форма (РФ), которая используется для получения дочерних одноцепочечных фаговых ДНК и для наработки мРНК с последующим синтезом фаговых белков. Самосборка и секреция фаговых частиц клеткой является сложным скоординированным процессом, многие детали которого до сих пор остаются неясными. В процессе самосборки и секреции участвуют 5 белков капсида (p7, p9, p8, p3 и p6), 3 белка, отвечающие за самосборку (p1, p4, p11), комплекс одноцепочечной фаговой ДНК с димерами белка p5, ATP и по крайней мере один бактериальный белок – тиоредоксин. Все 5 капсидных белков фага синтезируются в виде предшественников, несущих лидерные последовательности, позволяющие им секретироваться в периплазматическое пространство, где происходит отщепление лидерных последовательностей и встраивание процессированных капсидных белков во внутреннюю мембрану бактериальной клетки. Процесс самосборки происходит на мембране где белки p4, p1, p11 и тиоредоксин образуют временную пору. Если условно обозначить один конец фаговой частицы, где располагаются белки p3 и p6 “головой”, а противоположный конец образованный белками p7 и p9 “хвостом” фага, то при инфицировании фаг взаимодействует с клеткой “головой” вперед, а секретируется “хвостом” вперед. Процесс самосборки и секреции происходит одновременно и включает 3 стадии: инициацию, элонгацию и терминацию. Во время инициации одноцепочечная ДНК фага с расположенными на ней димерами белка p5 подходит к поре открытым участком, называемым сигналом упаковки

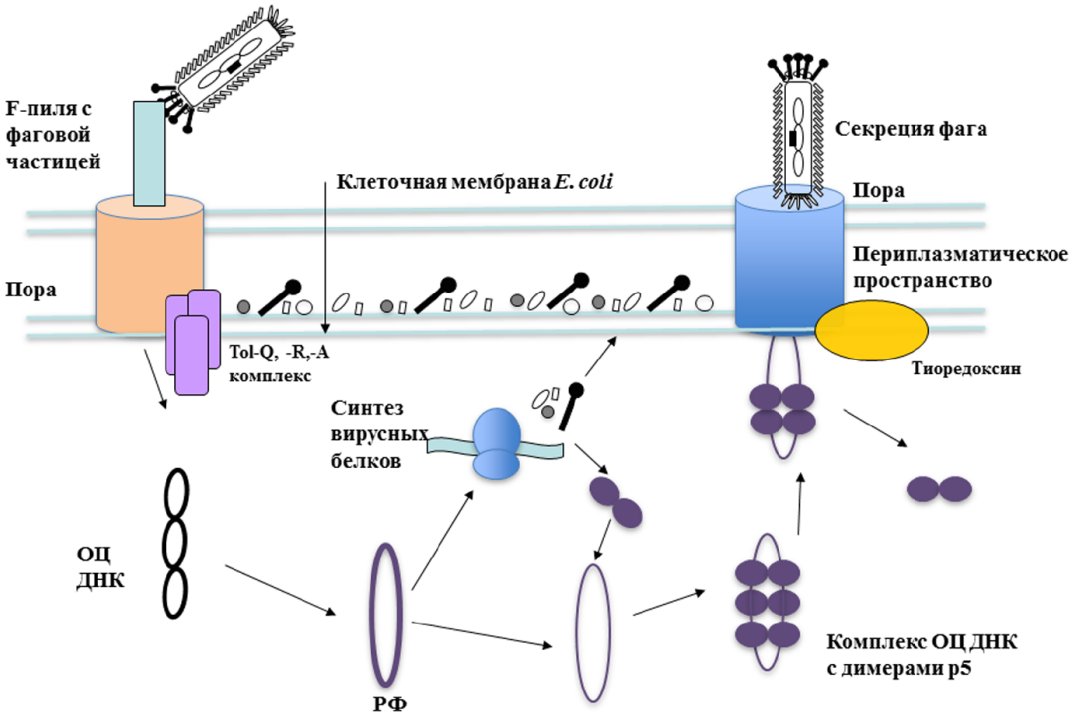

Рисунок 2. Жизненный цикл филаментных фагов. Фаг специфически связывается с кончиком F-пили мужского штамама *E coli* и проникает в периплазматическое пространство клетки. В цитоплазме одцепочечная ДНК фага (ОЦ) превращается в репликативную форму (РФ). После наработки в клетке фаговых белков и ОЦ ДНК происходит упаковка и секреция фаговых частиц из клетки. Подробности в тексте.

(packaging signal). Белки p7 и p9 вместе с несколькими белками p8, располагающимися на внутренней мембране клетки, взаимодействуют с сигналом упаковки и образуют “хвост” фага, который перемещается в пору и продвигается в сторону поверхности бактериальной клетки, в то время как процесс самосборки продолжается. Димерные комплексы белка p5 замещаются в процессе элонгации белками p8, которые образуют высокоупорядоченную структуру вокруг фаговой ДНК, при этом фаговая частица продолжает продвигаться через пору на поверхность бактериальной клетки. На последнем этапе – терминации, присоединением белков p3 и p6 формируется “голова” фага, и полностью сформировавшаяся фаговая частица покидает клетку, не нарушая целостности её мембраны. В результате клетка превращается в фабрику по производству фаговых частиц, при этом скорость её деления замедляется приблизительно вдвое. Детальное описание строения нитчатых бактериофагов, процессов инфицирования, размножения и секреции можно найти в работах [5, 8] а также в книге Barbas с соавт. [7]. Специфическое строение фаговых частиц, механизмы их секреции бактериальной клеткой и возможности существенного манипулирования фаговым геномом без потери жизнеспособности обусловили использование нитчатых фагов в технологии, называемой фаговым дисплеем (phage display).

Развитию пептидного фагового дисплея на нитчатых фагах и его широкому использованию в различных областях биотехнологии и биомедицины значительно способствовало то, что его основатель, Smith, создав различные библиотеки, стал распространять большую часть из них, с соответствующими протоколами, бесплатно, и без каких-либо ограничений для академических исследований [6]. Позже их заменили коммерческие пептидные фаговые библиотеки компании “New England Biolabs”.

2. ФАГОВЫЙ ДИСПЛЕЙ

Фаговый дисплей (ФД) это технология, в основе которой лежит экспонирование чужеродных пептидов или белков на поверхности фаговых частиц в составе одного из химерных белков оболочки. При этом чужеродный фрагмент сохраняет свою исходную способность связываться со своей молекулой-мишенью, а несущий белок продолжает выполнять свои физиологические функции в составе фаговой частицы. Достигается такое экспонирование направленным встраиванием нуклеотидной последовательности, кодирующей чужеродный пептид/белок, в состав соответствующего фагового гена [6-8]. Поскольку чужеродный белок и кодирующая его последовательность находятся в составе одной фаговой частицы, таким образом обеспечивается физическая связь белка и кодирующей его ДНК, что позволяет легко определять структуру данного белка посредством секвенирования соответствующего гена. Фаговые пептидные или белковые библиотеки, представляют собой смесь фагов (10^8-10^9 различных вариантов); при этом каждая фаговая частица несёт свой вариант чужеродного пептида/белка и, соответственно, кодирующий его ген.

По своей функциональной принадлежности в фаговом дисплее различают четыре больших направления: первое – пептидный фаговый дисплей, когда на поверхности фагов экспонированы короткие молекулы, длиной 5-20 аминокислотных остатков; второе – фаговый дисплей антител и их вариабельных фрагментов; третье – фаговый дисплей белков, куда можно отнести все остальные белки, не относящиеся к антителам, а также их функциональные фрагменты; четвертое – протеомный фаговый дисплей, в котором упор делается на изучении протеомов (в частности, протеома человека) с помощью создания библиотек функциональных доменов белков и поиска бинарных белок (пептид)-белковых комплексов.

Основы фагового дисплея были заложены работой Smith, опубликованной в 1985 году [9]. Он продемонстрировал, что фрагмент рестриктазы EcoRI может быть слит с N-концевой частью минорного белка оболочки p3, и в составе такого химерного белка экспонирован на поверхности фаговой частицы. При этом фрагмент рестриктазы сохранял способность специфически связываться с узнающими его антителами. Поскольку белок p3 играет ключевую роль в инфицировании бактериальной клетки, инфекционность полученых рекомбинантных фаговых частиц была снижена, но фаги оставались вполне жизнеспособными; аминокислотная последовательность слитого белка была подтверждена секвенированием соответствующей части фагового генома. В той же работе была разработана стратегия, названная аффинной селекцией или биопэнингом (biopanning), с помощью которой специфичные фаги, присутствующие в мизерных количествах в смеси различных фагов, могут быть отобраны за счёт аффинного связывания с иммобилизованной молекулярной мишенью. В 1990 году была опубликована работа Smith с соавт. [10], в которой разработана идеология использования рандомизованных пептидных фаговых библиотек в фаговом дисплее. Первая пептидная фаговая библиотека состояла из 10^8 различных вариантов. В том же 1990 году в работе McCafferty с соавт. была продемонстрирована возможность экспонирования вариабельных фрагментов антител на поверхности фагов [11] и затем созданы первые библиотеки вариабельных фрагментов антител [12, 13]. В начале 90-х годов прошлого века также была разработана технология фагового дисплея библиотек генных фрагментов для исследования функций белков какого-либо конкретного патогена. Позднее на основе нитчатых фагов были созданы библиотеки генных фрагментов *Mycobacterium tuberculosis* (возбудителя туберкулёза), *Plasmodium falciparum* (возбудителя малярии), *Salmonella typhimurium* (возбудителя сальмонеллеза), *Streptococcus pneumonia* (возбудителя пневмонии), а также цитомегаловируса человека, вируса иммунодефицита человека [14] .

В 90-х годах прошлого века были разработаны системы фагового дисплея на литических бактериофагах, имеющие как ряд преимуществ по сравнению с дисплеем на нитчатых фагах, так и свои специализированные области применения. Краткое описание этих систем будет представлено ниже в отдельной главе данного обзора.

Пептидые рандомизованные библиотеки могут рассматриваться как универсальные и применяться для поиска связывающих пептидных лигандов на любые бактерии, вирусы, раковые клетки, молекулы-мишени органической и неорганической природы. Библиотеки генных фрагментов и кДНКовые библиотеки патогенных микроорганизмов являются более узконаправленными. Однако, любой отобранный из такой библиотеки белок или пептид является частью протеома данного патогена и может быть привязан к определенному гену и его функции. С помощью ген-фрагментных библиотек были определены аминокислотные последовательности иммунодоминантных эпитопов многих белков, тогда как большинство пептидов, отобранных с помощью рандомизованных пептидных библиотек, являются мимотопами, то есть белковыми фрагментами иммитирующими действие иммунодоминантных эпитопов, но не имеющих с ними сходства в аминокислотных последовательностях [8, 14].

3. ФАГОВЫЙ ДИСПЛЕЙ НА ЛИТИЧЕСКИХ ФАГАХ ЛЯМБДА, Т4 И Т7

Фаговый дисплей пептидов и белков на основе нитчатых фагов имеет свои ограничения. Некоторые пептиды и цитоплазматические белки в силу определенного строения не могут пройти через системы секреции бактериальной клетки и, следственно, не могут быть экспонированы на поверхности нитчатых фагов. В этом случае системы фагового дисплея, разработанные на основе литических фагов, имеют явные преимущества, так как фаговое потомство формируется в цитоплазме бактериальной клетки и освобождается путём её лизиса. Наибольшее распространение получили системы дисплея на трёх литических фагах: лямбда, Т4 и Т7. Все литические фаги существенно больше по размерам и имеют более сложное строение по сравнению с нитчатыми фагами. Вирионы литических фагов состоят из головного отдела, часто в форме икосаэдра, и хвоста с прикреплёнными хвостовыми пластинками. Перспективными для дисплея чужеродных пептидов и белков являются как белки головного отдела, так и белки хвостового отдела, несущественные для самосборки и жизнеспособности фага [15].

Для дисплея на фагах Т4 были разработаны системы на основе двух белков: Hoc (highly antigenic outer capsid protein) с молекулярной массой 40 кДа, 160 копий на вирион, и Soc (small outer capsid protein) с молекулярной массой 9 кДа, 960 копий на вирион [16]. Для дисплея использовали как N-концевой, так и С-концевой фрагменты обоих белков; возможно экспонирование двух различных чужеродных белков на Hoc и Soc одновременно. Особенно перспективным оказалось экспонирование на поверхности Т4 различных антигенов. Например, препараты фагов Т4 с экспонированными на их поверхности антигенами бактерий рода *Neisseria*, а также защитного антигена *Bacillus anthracis* при введении в кровяное русло мышей без добавления адъювантов вызывали сильный гуморальный ответ [16-18].

Для дисплея на литических фагах Т7 использовали белок головного отдела фага gp10, представленный 415-450 копиями на один вирион. Для экспонирования чужеродного белка используется С-концевой фрагмент белка gp10. Компанией “Novagen, Merck Biosciences” разработаны векторы и пептидные библиотеки (длиной до 50 аминокислотных остатков) высокой копийности (415 копий на вирион), а также векторы, позволяющие экспонировать более крупные белки длиной около 1200 аминокислотных остатков с копийностью 5-15 копий и 1 копия на вирион [15]. На основе фага Т7 были созданы и успешно использованы в поиске белковых лигандов кДНК-овые библиотеки *Arabidopsis thaliana* и *Plasmodium falciparum* [14].

Для дисплея на литических фагах лямбда использовали белок головного отдела gpD с молекулярной массой 11,4 кДа, 405-420 копий на вирион, и белок из хвостового отдела gpV, с молекулярной массой 28,0 кДа, 192 копии на вирион [19]. Встройка чужеродных фрагментов может осуществляться как в N-концевые, так и С-концевые участки соответствующих генов. При этом, если дисплей коротких пептидов осуществлялся простым клонированием в соответствующий ген, то дисплей больших белковых фрагментов на белках gpD и gpV требовал специальных векторных систем, обеспечивающих создание мозаичных вариантов фагов, несущих на своей поверхности как копии рекомбинантных белков с чужеродными фрагментами, так и копии белков дикого типа. Дисплей на литическом фаге лямбда был успешно использован рядом исследователей для поиска антигенов различных патогенных микроорганизмов. Так были созданы библиотеки кДНК-овых фрагментов *Toxoplasma gondii, Streptococcus pneumoniae*, цитомегаловируса, вируса гепатита С. Библиотеки использовали в аффинной селекции с антителами из сывороток крови соответствующих больных и идентифицировали панели важнейших антигенов, вызывающих сильный гуморальный ответ [19, 20].

Однако, несмотря на некоторые преимущества ФД на основе литических фагов, по сравнению с нитчатыми, эта методология не нашла столь широкого применения, как ФД на нитчатых фагах. Возможно, это произошло в силу ряда причин. Во-первых, с самого начала у исследователей не было свободного доступа к векторам и библиотекам на основе литических фагов, как это было с библиотеками на нитчатых фагах Smith. Создание же представительных фаговых библиотек и их характеризация до сих пор является трудоёмкой

задачей. Во-вторых, системы на нитчатых фагах являются более простыми и дешёвыми в использовании и адаптации к различным задачам, особенно для начинающих исследователей. Системы на нитчатых фагах, например, не требуют специализированных систем упаковки для получения фагового потомства, а также гомологичных или сайт-специфичных систем рекомбинации, необходимых для введения чужеродного генетического материала, характерных для систем на фаге лямбда или фаге T4 [15, 16].

В нашей работе, мы остановимся на пептидном ФД на основе нитчатых фагов, рассмотрим различные варианты пептидных фаговых библиотек, приведём примеры использования пептидного ФД в современных биотехнологических и биомедицинских исследованиях. Фаговый дисплей белков и антител представляют собой огромные области исследований, и в данном обзоре не рассматриваются.

4. АФФИННАЯ СЕЛЕКЦИЯ ПЕПТИДОВ ИЗ ФАГОВЫХ БИБЛИОТЕК (БИОПЭННИНГ)

Схема поиска пептидов высокой аффинности к различным мишеням с помощью метода ФД представлена на рисунке 3. Сначала молекулярную мишень иммобилизуют на твёрдую поверхность. Мишенью могут быть: индивидуальные белки, вирусные частицы, бактериальные или раковые клетки. Для иммобилизации мишеней белковой природы используют различные пластиковые поверхности (ячейки планшетов для иммуноанализа, специальные иммунологические пробирки, а также специально обработанные магнитные микрочастицы). Затем к иммобилизованной мишени добавляют фаговую библиотеку, миллиарды различных вариантов фагов, каждый из которых несет на своей поверхности свой вариант пептида. После инкубации смеси фаги с высокой аффинностью к данной мишени связываются, а остальные остаются в растворе. Затем твёрдая поверхность интенсивно промывается буферным раствором с детергентом, и основная часть фагов смывается. Оставшиеся связанные фаги элюируют растворами с низким (2,2) или высоким значениями pH (10,0), содержащими ту же молекулярную мишень, что была использована для иммобилизации [7] и др. Нитчатые фаги обладают повышенной устойчивостью к таким воздействиям и сохраняют свою жизнеспособность [6]. Элюаты, содержащие селектированные фаги, используют для заражения F^+-штаммов *E. coli* и амплификации. Затем такая обогащенная библиотека используется в следующем раунде селекции. После 4-5 раундов библиотеку рассевают, получают индивидуальные фаговые клоны и анализируют на связывание с молекулярной мишенью. ДНК позитивных вариантов секвенируют и определяют аминокислотные последовательность связывающих

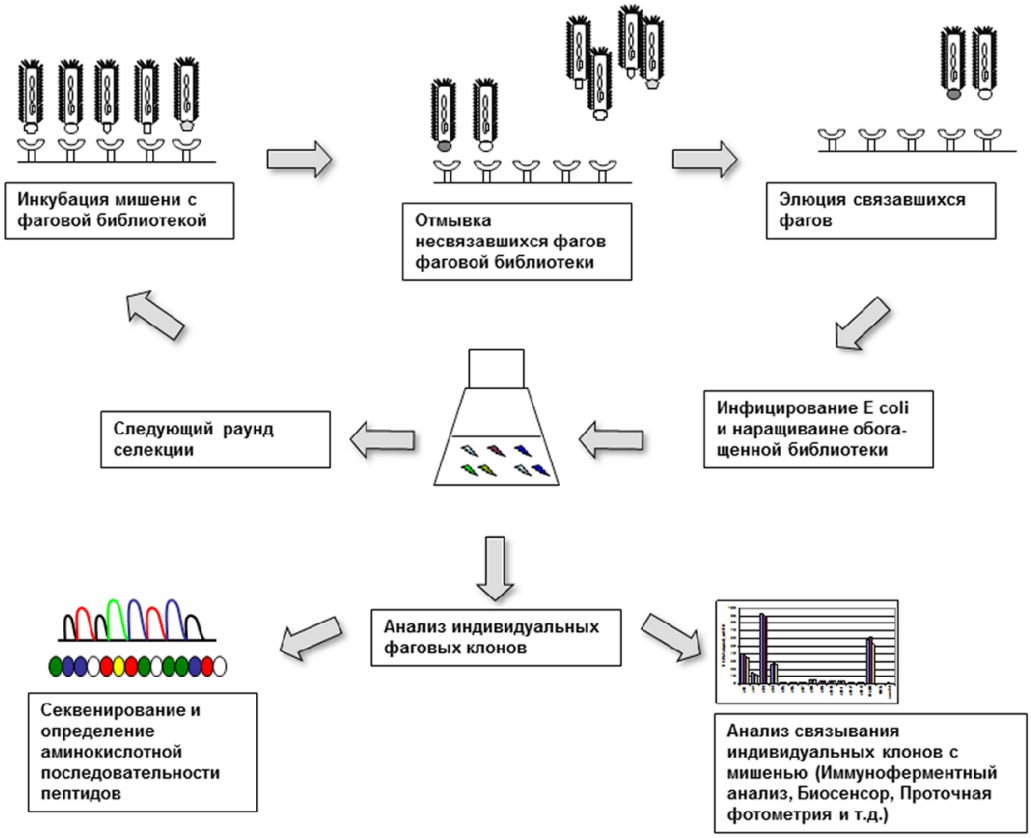

Рисунок 3. Схема метода аффинной селекции (биопэнинга) фагов, специфично связывающих молекулярные мишени. К иммобилизованной мишени добавляют фаговую библиотеку. После отмывания на поверхности остаются фаги, специфично связывающие мишень, которые затем элюируют, размножают и используют в последующих раундах селекции. Индивидуальные клоны анализируют на связывание, ДНК секвенируют и определяют аминокислотные последовательности специфичных пептидов. Подробности в тексте.

пептидов. Обычно это целое семейство пептидов сходного строения, а общие аминокислоты в таком семействе (пептидные мотивы) являются определяющими в аффинном связывании.

5. ФАГОВЫЕ ПЕПТИДНЫЕ БИБЛИОТЕКИ

Рассмотрим более подробно типы комбинаторных пептидных фаговых библиотек. Известно, что любой из пяти фаговых поверхностных белков может быть использован для экспонирования пептидов [7, 8], однако преимущественное распространие получили библиотеки на основе белков p3 и p8 [6, 8, 10]. На рисунке 4 представлены основные типы пептидных библиотек. Они различаются по двум основным параметрам: 1) количеством копий рекомбинантного белка с экспонированным чужеродным белком по отношению к белку дикого типа на одну фаговую частицу; 2) количеством векторных систем, обеспечивающих такое экспонирование. В вариантах 3 и 8 используется только один вектор – геном фага, при этом каждая копия белка p3 или p8 является рекомбинантной и несёт чужеродный пептид. Для белка p3 это 5 копий, а для белка p8 – до 4000 копий на одну фаговую частицу [6]. В вариантах 33 и 88 геном фага несёт две копии генов белков p3 или p8; при этом одна копия дикого типа, другая – рекомбинантная, кодирующая чужеродный пептид. В результате получаются фаги мозаичного типа. В вариантах 3+3 и 8+8 [21, 22] также образуются фаги мозаичного типа, но достигается это совместными действиями двух векторов: фагмиды и фага-помощника. При этом рекомбинантный ген с чужеродным фрагментом располагается на фагмиде – плазмиде, которая несет фрагмент фагового генома, отвечающий за упаковку фагмидной ДНК в фаговую частицу. Белок дикого типа p3 или p8 обеспечивается присутствием фага-помощника (M13KO7 или VCSM13), который имеет дефект в системе репликации собственной ДНК [7]. В результате совместных действий двух векторов в бактериальной клетке образуются фаговые частицы мозаичного типа, ДНК которых преимущественно представлена фагмидной ДНК с чужеродным геном, а количество ДНК фага-помощника снижено на два порядка. В таблице 1 представлены некоторые варианты различных фаговых пептидных библиотек, созданных в разных лабораториях.

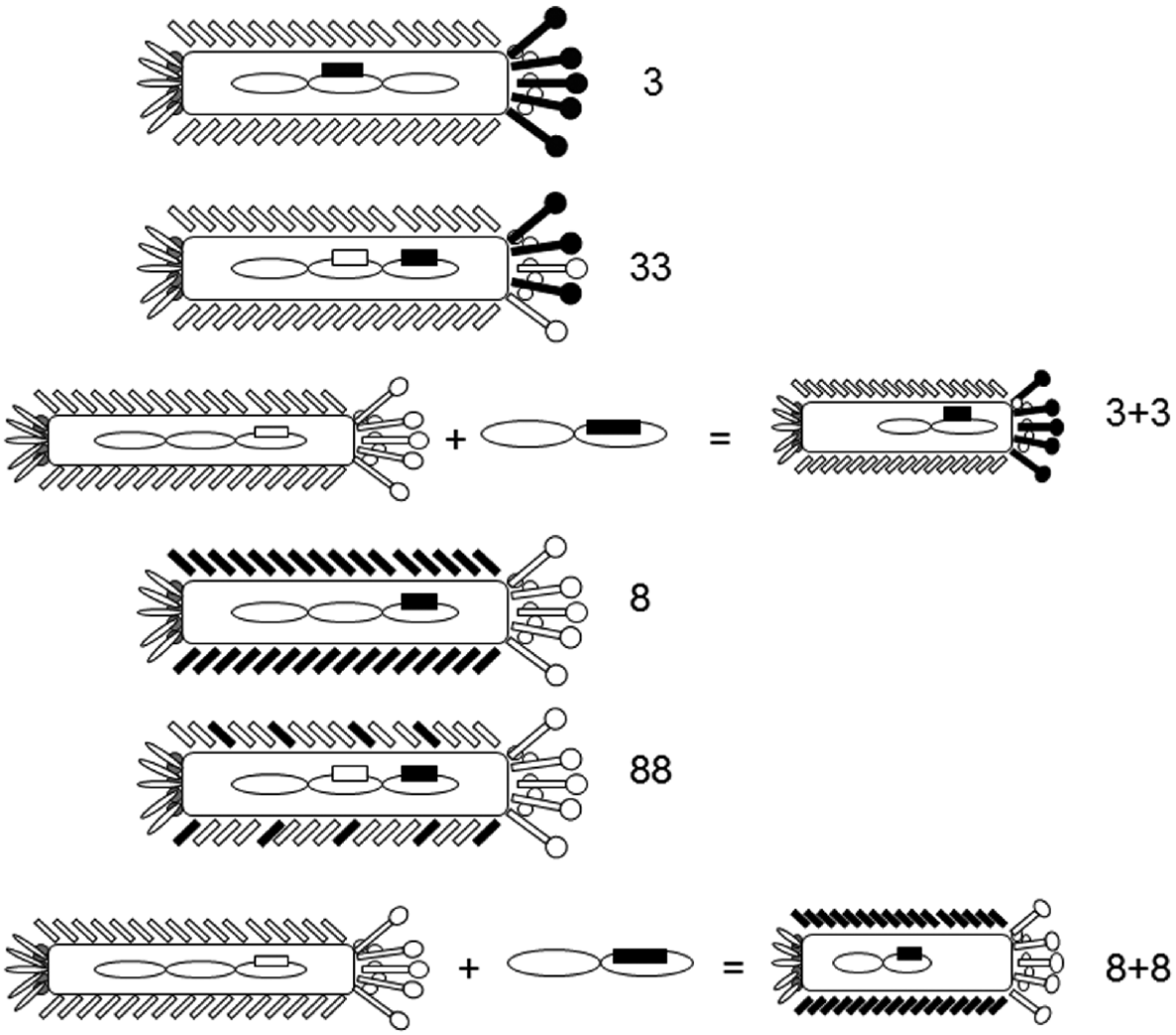

Рисунок 4. Типы фаговых пептидных комбинаторных (рандомизованных) библиотек: варианты 3, 33, 3+3, 8, 88 и 8+8. Рекомбинантные гены и соответственно рекомбинантные поверхностные белки (p3 и p8) выделены чёрным цветом. Подробности в тексте.

Таблица 1. Типы комбинаторных пептидных фаговых библиотек

№	Название библиотеки	Структура пептида	Тип библиотеки	Создана/Литературный источник
1	f3-6	ADGAX6	3	J.K. Scott, G.P. Smith [10]
2	f3-15	ADGAX15	3	G.P. Smith с соавт.*
3	f88-15	X15	88	G.P. Smith с соавт. *
4	f88-Cys0	AX5CCX5	88	G.P. Smith с соавт. *
5	f88-Cys1	AX5CXCX5	88	G.P. Smith с соавт. *
6	f88-Cys2	AX5CX2CX5	88	G.P. Smith с соавт. *
7	f88-Cys3	AX5CX3CX4	88	G.P. Smith с соавт. *
8	f88-Cys4	AX4CX4CX5	88	G.P. Smith с соавт. *
9	f88-Cys5	AX4CX5CX4	88	G.P. Smith с соавт. *
10	f88-Cys6	AX4CX6CX4	88	G.P. Smith с соавт. *
11	f88-LX6	XCX6CX	88	G.P. Smith с соавт. *
12	f8-8	AX_8	8	V. Petrenko с соавт. [19]
13	$PGGX_5GGPG$	$PGGX_5GGPG$	3+3	D.J. Matthews с соавт. [15]
14	f8-9	AX_9	8	G. Kuzmicheva с соавт. [20]
15	Ph.D.™-12	X_{12}	3	New England Biolabs **
16	Ph.D. ™ -C7C	CX_7C	3	New England Biolabs **
17	pVIII-9aa,	X_9	8+8	F. Felici с соавт. [16]
18	pVIII-12aa	X_{12}	8+8	F. Felici с соавт. [16]

Примечание: * - http://www.biosci.missouri.edu/smithGp/
** - https://www.neb.com/products/e8111-phd-12-phage-display-peptide-library

Для успешного поиска пептидов с высокой аффинностью к молекулярным мишеням нужны представительные библиотеки, включающие миллиарды всевозможных пептидов. Их получают клонированием олигонуклеотидов структуры (NNK)n в состав гена поверхностного белка, где n – количество триплетов, N – смесь нуклеотидов A, G, C, T в равных долях, а K – смесь нуклеотидов G и T в равных долях. Такие структуры позволяют кодировать все возможные сочетания 20 аминокислот в пептидах с помощью 32 триплетов, избегать двух стоп-кодонов TAA и TGA, оставляя только один стоп-кодон TAG [7, 10]. Такие пептидные библиотеки получили название комбинаторных или рандомизованных (от английского random – случайный). Для того чтобы каждый теоретически возможный вариант был представлен в 6-мерной пептидной библиотеке, требуется библиотека имеющая не менее 20^6=6,4×10^7 клонов, для 9-мерной библиотеки потребуется уже 20^9=5,12×10^{11} клонов. При современных техниках клонирования создать представительную библиотеку в 10^8-10^9 независимых клонов достаточно легко, а вот уже в 10^{10}-10^{11} клонов – сложно, поэтому пептидные библиотеки, как правило, состоят из 10^8-10^9 независимых клонов, а в смеси, используемой для аффинной селекции пептидов, представлены около 100 копиями каждого варианта.

В 90-х годах прошлого века в лаборатории Smith на основе фагового вектора fd-tet были созданы 12 рандомизованных пептидных библиотек (табл. 1, библиотеки 1-12). Фаг fd-tet имел мутацию, приводящую к его медленному воспроизводству в бактериальной клетке, что уменьшало селективное давление на клетку и сохраняло разнообразие фаговых вариантов. В двух библиотеках чужеродный пептид был представлен 5 копиями в составе минорного белка p3 (вариант 3), одна библиотека была ландшафтного типа, где все 4000 копий мажорного белка p8 несли на N-конце 8-мерный пептид (вариант 8) [6], и 9 библиотек было мозаичного типа (вариант 88): 150 копий пептида (линейного или циклического) были экспонированы на фаговой поверхности в составе рекомбинантного белка p8, тогда как остальные копии p8 были дикого типа. На наш взгляд, библиотеки формата 88 являлись наиболее универсальными и удачными, они стали источником множества биоспецифичных пептидов, полученных разными исследователями, в том числе и нами при картировании группоспецифического гемаглютинирующего домена гликопротеина E-2 альфавирусов [23, 24]. За счёт большого количества копий (150 на вирион) достигалось более сильное (авидное) связывание с мишенью, что облегчало их отбор в раундах аффинной селекции по сравнению с вариантами на основе белка p3. За счёт мозаичности строения капсида пептиды не являлись жёстко ориентированными в структуре капсида. Пептиды, отобранные из библиотек формата 88, успешно связывали молекулярную мишень, находясь как на поверхности фаговой частицы, так и в виде свободных пептидов. Коммерческие аналоги библиотек варианта 88 находятся в стадии разработки.

Две коммерческие рандомизованные пептидные библиотеки (табл. 1, библиотеки 15 и 16) были созданы фирмой “New England Biolabs”. Библиотеки (10^9 независимых клонов каждая) созданы на основе

бактериофага M13 и минорного белка p3. Библиотека Ph.D.™-12 представлена 12-мерным линейным пептидом. В библиотеке Ph.D.™-C7C 7-мерный рандомизованный пептид является циклическим. Из этих двух библиотек получено огромное количество пептидных лигандов: иммунодоминантные эпитопы различных белков [25, 26]; пептиды, обладающие антимикробной активностью [27] пептиды специфично связывающие материалы неорганической природы [28], пептиды узнающие клетки различных тканей и злокачественных опухолей [29, 30] и т.д.

6. ЛАНДШАФТНЫЕ ПЕПТИДНЫЕ ФАГОВЫЕ БИБЛИОТЕКИ И ОБЛАСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

На основе вектора fd-tet Петренко и соавт. скоструировали 8-мерную пептидную библиотеку (10^8 уникальных клонов), получившую название ландшафтной [31]. В ландшафтных фагах практически вся фаговая поверхность работает как связывающий ландшафт, при этом сила связывания с мишенью существенно возрастает за счёт авидности. В 8-мерной ландшафтной библиотеке (рис. 4) каждый клон несет свой 8-мерный пептид в составе химерного белка p8, в количестве 4000 копий на вирион. За счёт вставки чужеродного фрагмента длина каждой молекулы p8 в 8-мерной билиотеке увеличена с 50 аминокислотных остатков до 55 (в ней три аминокислоты EGE в начале белка p8 заменены 8-мерной рандомизованной последовательностью). В рамках программы создания и использования ландшафтных библиотек с более длинными пептидами Петренко с соавт. сконструировали новый вектор f8-6 [32]. В этом векторе нуклеотидный фрагмент, кодирующий аминокислотный тример EGE заменён на структуру, включающую аминокислоту E, за которой следуют два стоп-кодона. В несупрессорном штамме вектор f8-6 мог существовать только в виде фагмиды, но не давал фагового потомства. Kuzmicheva и соавт. на основе вектора f8-6 путём замещения короткого ДНК-фрагмента, несущего два стоп-кодона на фрагмент, кодирующий рандомизованный пептид, создали представительную 9-мерную ландшафтную библиотеку [32] с разнообразием в 3×10^8 клонов. Общая длина рекомбинантного белка p8 также составляла 55 аминокислотных остатков (4 аминокислоты EGED в начале белка p8 были заменены рандомизованной 9-мерной последовательностью). В отличие от 8-мерной библиотеки, в новой 9-мерной библиотеке не было даже минимальных количеств фагового варианта без встройки, который, не имея дополнительной нагрузки в виде чужеродного пептида, мог бы иметь селективные преимущества при амплификации библиотек между раундами аффинной селекции [32]. Обе ландшафтные библиотеки были успешно использованы в разнообразных проектах по поиску специфичных лигандов, связывающих бактериальные клетки, споры, раковые клетки и различные белки [31-38].

Ландшафтные библиотеки являются специализированными, они имеют свои области применения и ограничения. Путём секвенирования большого числа клонов было установлено, что распределение каждой из 20 аминокислот по длине пептида не является полностью случайным и равномерным [32]. В данных библиотеках отсутствовали цистеиновые остатки, снижено количество аминокислотных остатков гидрофобных аминокислот триптофана и фенилаланина, наблюдалось преимущественное расположение в определённых участках остатков негативно заряженных аминокислот (аспарагиновой и глютаминовой). Все это свидетельствует о том, что ландшафтные библиотеки не являются полностью рандомизированными и что структура экспонируемых пептидов влияет на жизнеспособность и скорость разомножения ландшафтных фагов.

Полученные из ландшафтных библиотек пептиды лучше всего работают в составе фаговой частицы. Поскольку белки p8 упакованы очень плотно в составе капсида и тесно примыкают друг к другу, в ландшафтных фагах экспонированные пептиды имеют значительную конформационную жёсткость. Это означает, что во многих случаях, связываясь в составе фаговой частицы, они перестают связываться со своей мишенью в виде свободного пептида или в составе не-фагового белка-носителя. Например, из 8-мерной ландшафтной библиотеки был получен фаг 1G40, несущий пептид DTFAKSMQ [33]. Фаг 1G40 связывал бета-галактозидазу с константой диссоциации Kd=30 нМ. Та же аминокислотная последовательность DTFAKSMQ в виде свободного пептида не связывала бета-галактозидазу. В работе Kuzmicheva et al. [33] было показано, что одни мутации в середине основного белка оболочки p8 (районе 12-19-ой аминокислот) усиливают связывание фага, несущего DTFAKSMQ пептид с бета-галактозидазой, а другие мутации – полностью подавляют такое связывание. Кроме того попытки этих авторов клонировать пептид LTVSPWY для получения ландшафтного фага окончились неудачей, такие фаги просто не выживали (Кузьмичева и др., неопубликованные данные). Пептид LTVSPWY, связывающий онкомаркер ErbB2, был отобран из библиотеки на основе белка p3 [39]. Наилучшее применение, на наш взгляд, ландшафтные библиотеки и ландшафтные фаги имеют там, где мишень представляет собой протяжённую и упорядоченную структуру с повторяющимися элементами. Это может быть поверхность спор, бактериальных и эукариотических клеток, полимерные материалы, а также поверхности материалов неорганической природы (металлов, их оскидов, сплавов и т.д.), то есть там, где фактически связываются две поверхности. Опыт работы с ландшафтными библиотеками привёл нас к концепции создания и параллельного использования в селекции разделенных (SPLIT) рандомизованных ландшафтных библиотек [33, 36]. Каждая такая библиотека будет отличаться от других определенным набором мутаций в области 12-19 аминокислот белка p8, что в свою очередь ведёт к изменению в составе и распределении рандомизованных пептидов, расположенных в N-концевой части молекулы p8. Более того, может

быть создана принципиально новая библиотека, несущая сразу два рандомизованных участка: один – в самом начале гена белка p8, как в 8-мерной и 9-мерной библиотеках, а второй – в области 12-19-ой аминокислот белка p8. Сочетание двух рандомизированных последовательностей в составе белка p8, таким образом, приведет к значительному увеличению функционального разнообразия библиотек ландшафтных фагов. Исходный вектор f8-6 имеет аминокислотную последовательность DSLQASAT в области 12-19-ой аминокислот белка p8. Как первый шаг в создании новых библиотек нами были сконструированы векторы, кодирующие следующие аминокислотные последовательности в этой области: DSLHGQAM, DELTVAAN, EDLSAMAG, QELSIQAE, EELESIAN, EELTLEAH. Векторы были опробованы в клонировании нуклеотидных фрагментов, кодирующих определенные пептиды с известной связывающей активностью [36].

7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕПТИДНОГО ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В данном коротком обзоре мы не в состоянии описать все разнообразие использования ФД в биотехнологии и биомедицинских исследованиях. Остановимся лишь на некоторых направлениях, которые, на наш взгляд, являются наиболее значимыми и интересными: 1) идентификация мимотопов и иммунодоминантных эпитопов белков для иммунодиагностики и создания субъединичных вакцин, 2) получение пептидов, узнающих бактериальные и вирусные патогены; 3) идентификация пептидов, специфично узнающих клетки раковых опухолей; 4) идентификация пептид-связывающих мотивов в интерактомных исследованиях; 5) идентификация пептидов, узнающих различные вещества неорганической природы (токсины, взрывчатые вещества, металлы, полупроводниковые материалы, пластиковые поверхности и т.д.). Выбор стратегии поиска специфических пептидов и, соответственно, пептидных библиотек как их источника, в большой степени обусловливается их дальнейшим применением. Пептиды могут быть использованы в различных форматах: в виде свободных пептидов природного строения; химически модифицированных пептидов, несущих различные функциональные группы (радиоактивно меченые изотопы, флюорофорные группы); в виде фаговых частиц с экспонированными на поверхности пептидами (то есть в том формате в котором они были исходно получены или измененном формате, но на основе нитчатых бактериофагов и их белков); и в составе химерных белков не-фаговой природы.

7.1. Идентификация мимотопов и иммунодоминантных эпитопов белков для иммунодиагностики и создания субъединичных вакцин

С помощью пептидного фагового дисплея были идентифицированы иммунодоминантные эпитопы различных белков патогенных микроорганизмов, а также найдено большое количество мимотопов, пептидов структурно имитирующих иммунодоминантные эпитопы белков но не имеющие сходства в аминокислотных последовательностях [40-43].

В работе Kuzmicheva et al. [40], выполненной в лаборатории Smith, авторы идентифицировали диагностические пептиды, которые могут быть в дальнейшем использованы для иммунодиагностики боррелиоза, заболевания вызываемого патогенной бактерией *Borrelia burgdorferi*, передаваемой человеку при укусе заражёнными клещами. Болезнь коварна тем, что не всегда легко диагностируется и, если не было проведено своевременной терапии антибиотиками, переходит в хроническую форму, вызывая сердечную недостаточность, артриты, хронические дерматиты, часто сопровождаясь синдромом хронической усталости и приводящую в тяжёлых случаях к инвалидности. Для поиска пептидов для иммунодиагностики боррелиоза были использованы 12 различных пептидных рендомизованных библиотек на основе фагового вектора fd-tet (табл. 1). Для получения максимального разнообразия клонов каждая библиотека была использована отдельно. В качестве молекулярных мишеней были использованы смеси антител, полученных из сывороток человеческой крови трёх групп: первую группу представляли положительные антитела из сывороток больных с доказанным диагнозом заболевания, вторую – антитела из сывороток здоровых людей и третью – антитела из сывороток крови больных ревматоидным и псориатическим артритом. Третья группа содержала антитела, которые часто давали иммуно-перекрестные реакции с первой группой. Для получения диагностических пептидов использовали следующую тактику. Сначала из библиотек убирали все варианты, которые связывались с пластиковыми поверхностями, затем – с антителами второй и третьей групп, а потом на таких истощённых библиотеках проводили селекцию пептидов, связывающих позитивные антитела, специфичные для больных боррелиозом. В результате были идентифицированы 12 специфичных пептидов из различных библиотек, из них 4 пептида (YPKESPPRLNAPWYQ, PKSSCTQNPILCAILS, QKDFACKHCKLPSP и YREACTNGKCFVLK) в иммуноферментном анализе распознавали все 10 сывороток больных с различными формами боррелиоза, использованных в данной работе, и не давали иммуноперекрестных реакций, как в тесте с сыворотками здоровых людей, так и с сыворотками больных различными формами артрита, имеющими неинфекционную этиологию. Идентифицированные пептиды обладали способностью к специфическому узнаванию как в составе фаговых частиц, так и в виде химически синтезированных пептидов (Кузьмичева и др., неопубликованные данные). Все пептиды являлись мимотопами, то есть имитировали иммунодоминантные эпитопы бактериальных белков *B. burgdorferi*, но не имели сходства в аминокислотных последовательностях. Аналогичная схема была использована Manhani

и соавт. [41] для получения мимотопов при разработке специфичного и чувствительного иммунологического теста, позволяющего определять на основе анализа крови активный цистицеркоз головного мозга, вызванного личинками свиного цепня. В работе Gazaryan и соавт. [42] была найдена серия пептидов с общим мотивом K(L/P/V)GDP(R/K)/L, которые узнавали антитела, циркулирующие в крови животных больных псевдобешенством. Как известно, экономический ущерб от этого заболевания огромен, особенно в развивающихся странах.

В исследованиях Тумановой и соавт. [42, 43] были найдены пептиды-имитаторы эпитопа белка gp41 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), узнаваемого нейтрализующими антителами. Некоторыми исследователями было показано, что фаги, несущие мимотопы, в дальнейшем, при иммунизации лабораторных животных, индуцировали антитела, связывающие белки самого патогена [44].

7.2. Получение диагностических и терапевтических пептидов, узнающих бактериальные и вирусные патогены

Во многих работах в качестве мишеней были использованы бактериальные клетки, споры или вирусные частицы. Из библиотек формата 8 и 8+8 были найдены фаги с высоким потенциалом их дальнейшего использования в качестве узнающих элементов в биосенсорах. Преимуществом использования в биосенсорах фагов по сравнению со специфическими антителами является: во-первых, повышенная устойчивость фагов к воздействию высоких температур, низких и высоких pH, солей [6, 34, 35], во-вторых, плотность узнающих элементов на единицу полезной площади в фагах существенно увеличена – до 4000 на одну фаговую частицу длиной один микрон. Так, Carnazza и соавт. [45], используя две комбинаторные библиотеки формата 8+8, получили пептиды, узнающие мембранные белки *Pseudomonas aeruginosa* – бактерии, вызывающей многие инфекции человека, включая прогрессирующие хронические респираторные инфекции у больных муковисцидозом. Авторы использовали faг, несущий множественные копии пептида QRKLAAKLT, в качестве узнающего элемента в кварцевых биосенсорах. В работах Petrenko и соавт. [31-38], включающих и наши собственные исследования, проведённые на 8-мерной и 9-мерной ландшафтных фаговых библиотеках, были найдены фаги, специфично узнающие бактерии *Salmonella typhimurium* (DRPSPNTV, VPQQDKAQ, VTPPQSSS, VNYDDMTST), споры *Bacillus cereus* (EKHPELRG, EKLPLSQT, ASPNLHRE) – бактерий вызывающих пищевые отравления (Кузьмичева и др., неопубликованные данные), а также споры *Bacillus anthracis* (EPRLSPHS, ASRPMPVS, AGTNGQSQ DPDTQGRM, DPNARSDL, DTSTEARA) – бактерий, вызывающих сибирскую язву. Идентифицированные ландшафтные фаги несли 4000 копий специфического пептида на одну фаговую частицу в составе поверхностного белка p8, в этом случае фаговая частица целиком становилась связывающей единицей. В дальнейшем ландшафтные фаги были успешно использованы как узнающие элементы в биосенсорах для определения патогенных бактерий (*S. typhimurium*, пептид VTPPTQHQ) и спор (*B. anthracis*, пептид EPRLSPHS) [34, 35].

Во многих случаях найденные с помощью фагового дисплея пептиды, специфично связывающие поверхность бактериальных клеток, обладали антибактериальной активностью. Часть из них обладала катионными свойствами за счёт большого количества положительно заряженных аминокислотных остатков. Так, Tanaka и соавт. [27] обнаружили катионный пептид KPRQHNRPLRHK, обладающий антибактериальными свойствами: он связывался с отрицательно заряженными мембранами бактериальных клеток, что приводило к образованию пор и лизису бактериальных клеток. В работе Rao с соавт. [46] был идентифицирован другой катионный пептид – RLLFRKIRRLKR, который обладал существенной антибактериальной активностью в отношении грам-отрицательных бактерий, он снижал количество бактерий *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa* в плазме крови на 5 порядков. В тоже время он не показывал гемолитических свойств и не обладал цитотоксичностью в отношении эукариотических клеток. Пептид KQRTSIRATEGCLPS, найденный в работе Bishop-Hurley и соавт. [47], показывал высокоспецифичную бактерицидную активность на панели клинических изолятов *H. influenza*. В то же время он не действовал на ряд грам-положительных (*E. faecalis*, *S. aureus*) и грам-отрицательных бактерий (*P. aeruginosa*, *S. enterica*).

7.3. Идентификация диагностических и терапевтических пептидов, узнающих клетки раковых опухолей

Подробное изложение успехов применения пептидного ФД в этой области, а также проблем и способов их решения, можно найти в обзоре Deutscher [48]. За всё время существования метода ФД (почти 30 лет) были найдены пептиды, узнающие раковые клетки опухолей молочной железы, простаты, яичников, головного мозга, рака легких, пищевода, желудка, печени, поджелудочной железы, тонкого и толстого кишечника, шейки матки и др. [48-57]. Некоторые из них приведены в таблице 2. Полученные пептиды использованы в двух основных направлениях: 1) развитии новых контрастных агентов для локализации опухолей *in vivo* и их мониторинга при различных видах терапии, 2) специфические пептиды были использованы для адресной доставки противораковых средств для уменьшения токсичности последних в отношении здоровых тканей и органов. Для дальнейшего применения данных пептидов важно учитывать возможность сохранения их связывающих свойств вне фаговой частицы, то есть в виде свободных пептидов, либо в составе других белков-носителей, липосом, радиоактивных или контрастирующих агентов. В качестве мишеней используют очищенные белки-онкогены, культуры раковых клеток или биопсийные препараты опухолей (ФД *in situ*) [48]. Pascualini и соавт. разработали

Таблица 2. Пептидные лиганды, связывающие раковые клетки и онкогенные белки

Типы раковых клеток/ онкогенных белков	Связывающий пептид	Литературный источник
Клетки рака молочной железы	VPWMEPAYQRFL	[31]
ErbB-2	MARSGL, MARAKE, MSRTMS, KCCYL	[31]
Клетки рака простаты	GPAHCKRTISQCQTNE, IAGLATPGWSHWLAL, IPLVVPLGGSCK	[31]
Клетки рака головного мозга	MYPWTEPSYLSN	[33], [34]
Клетки рака поджелудочной железы	CKAAKN	[35]
Клетки рака пищевода	RALAHPRDHPDL, ATCSMLLSRNEA	[36]
Клетки рака яичников	WSGPGVWGASVK	[37], [38]
Клетки рака щитовидной железы	EDYELMDLLAYL	[31]
Клетки немелкоклеточного рака лёгких	EHMALTYPFRPP, TDSILRSYDWTY	[39]

подход, получивший название ФД *in vivo* [32, 49, 50], который впоследствии был применён во многих лабораториях. Фаговые библиотеки вводили в кровяное русло лабораторных животных, несущих определённый тип привитой раковой опухоли; опухоли затем извлекали и элюировали фаги, специфически связывающие раковые клетки [48, 50, 54].

Приведём лишь несколько примеров успешного получения и использования онко-специфичных пептидов. В работе Chang и соавт. [56] был идентифицирован пептид TDSILRSYDWTY, связывающийся с клетками немелкоклеточного рака лёгких. Экспериментальный препарат, где данный пептид был использован для адресной доставки липосом, несущих доксорубицин, увеличивал эффективность хемотерапии немелкоклеточного рака лёгких и выживаемость лабораторных мышей. В работе Perea и соавт. [57] был найден циклический пептид CIGB-300, связывающий клетки рака шейки матки. Препарат на основе данного пептида хорошо зарекомендовал себя в клинических испытаниях на людях (31 человек); он хорошо переносился пациентами и подавлял рост опухолей. Противораковые пептидные препараты могут представлять альтернативу традиционно используемым антителам и имеют ряд преимуществ: за счёт своих малых размеров пептиды легче проникают в клетки и ткани, эффективно выводятся организмом и не вызывают иммунологических реакций [48].

7.4. Пептидный фаговый дисплей в исследованиях интерактомов

Пептидный фаговый дисплей успешно применяется в интегративной и сравнительно новой области биомедицины – в постгеномных исследованиях интерактомов, в частности, интерактома человека [58-61]. Интерактомом в постгеномных исследованиях называется часть протеома, включающая все виды взаимодействий между белковыми компонентами в данной клетке данного организма. По предварительным оценкам, интерактом человека включает более чем 130000 бинарных белок (пептид)-белковых(пептидных) взаимодействий (protein-protein interactions (PPIs)), основную часть которых ещё предстоит открыть и изучить [58]. PPIs являются особенно важными для осуществления клеточных функций и проявления дисфункций. Бинарные PPIs по своем характеру чрезвычайно разнообразны, и отличаются по показателям устойчивости (стабильные/транзиторные), по характеру силы связи (низко-/высокоаффинные), по протяжённости физически взаимодействующих пептидных участков, а также по частоте встречаемости в белках (единичные/множественные). Связывающие пептидные мотивы, как правило, имеют протяжённость менее 10 аминокислотных остатков и локализованы в нестурктурированных участках белковых молекул. По данным биоинформатики, они обнаруживаются более чем у 35% белков человека [58]. В настоящее время в биоинформатическом ресурсе линейных эукариотических мотивов (eukaryotic linear motif (ELM)) насчитывается не менее 2400 мотивов, которые могут быть потенциальными связывающими сайтами доменов различных белков [58, 59, 61]. Именно такого типа взаимодействия возникают во время ключевых клеточных процессов транскрипции, трансляции, особенно на модификационных стадиях, таких как фосфорилирование, ацетилирование и метилирование. Примером наиболее часто встречающихся пептид-связывающих доменов человеческого протеома являются PDZ-домены связывающие С-концевые фрагменты белков, а также CH_2-домены, взаимодействующие с фосфорилированными пептидными мотивами [58, 61].

Пептидный фаговый дисплей идеально подходит для идентификации линейных пептидных мотивов, участвующих во взаимодействии белковых молекул. При этом в стратегии поиска таких пептидных мотивов возможно применение как комбинаторных библиотек (с последующим поиском идентифицированных пептидных лигандов в белковых базах данных), так и узконаправленных библиотек перекрывающихся пептидов, созданных на основе конкретных белков. Приведём только один пример такого рода исследований. В работе Ivarsson и соавт. [61] предлагается подход, который объединяет биоинфоматику, использование коммерческих наборов перекрывающих геном олигонуклеотидов и пептидный фаговый дисплей. На первом этапе была создана библиотека

олигонуклеотидов, кодирующих все возможные короткие мотивы данного протеома. Затем с использованием этих олигонуклеотидов и коммерческих наборов (в частности “244k microarray chips” (“Agilent”)) авторы проводили ПЦР, получали двунитевые фрагменты, которые клонировали в один из генов поверхностного белка фага для последующей презентации пептидных мотивов [61]. Селекция фагов из полученных библиотек проводилась на целевых белках, получаемых разными методами. Успешность предлагаемого подхода авторы продемонстрировали на примере создания двух фаговых библиотек, включающих С-концевые короткие мотивы протеомов человека и вируса, с последующей селекцией фагов на полноразмерном сигнальном белке Scribble (beta-PIX, plakofillin-4, guanylate cyclase soluble subunit alpha-2). Так, в частности было подтверждено взаимодействие PDZ-доменов белка Scribble с С-концевым фрагментом белка Tax-1 Т-лимфотропного вируса человека, а также открыты новые вирусные лиганды, взаимодействующие с PDZ-доменами данного белка. Такой подход является весьма перспективным для исследования различных интерактомов, и в частности – интерактома человека.

Особую важность в изучении интерактома представляет решение проблемы минимального узнавания в системе лиганд-белок. В случае PPIs, когда в качестве лиганда выступает пептид, “единица узнавания” представлена мотивом из трёх аминокислотных остатков [58]. Для ДНК-пептидного интерактома нам удалось показать, что с помощью пептидного ФД возможно дискриминировать однонуклеотидные различия, но только в случае их “неспаренности”, причём независимо от контекста мутации в ДНК. Такие однонуклеотидные “mismatch-неспаренности” были смоделированы *in vitro* с помощью гомо- и гетеро дуплексов с несколькими ошибочно спаренными основаниями [60]. Образование *in vivo* таких ошибочно-спаренных оснований предшествует процессам репарации, исправляющим генные ошибки. При неэффективной репарации происходит накопление таких мутаций в геноме, что может приводить к канцерогенезу. Для ранней диагностики и терапии онкозаболеваний трудно переоценить важность разработки методов, позволяющих идентифицировать подобного рода мутации неизвестной локализации в геноме. Применение ФД даст новый импульс для углубления исследований в этом направлении, так как позволит дискриминировать любую неизвестную мутацию путём образования искусственно создаваемого из фрагментированной геномной ДНК пула гомо- и гетеродуплексов (с мутациями), с последующим обогащением последних с помощью фагов, ранее отселектированных на модельных гетеродуплексах.

Следует отметить, что достаточно большое количество связей в интерактоме (по разным данным от 30 до 40%) являются транзиторными и низкоаффинными. Возможно именно из-за транзиторности такие связи являются наиболее значимыми для многих клеточных функций [58]. Технологии фагового дисплея позволяют идентифицировать не только высокоаффинные, но и низкоаффинные лиганды путём изменения условий аффинной селекции на более щадящие на ранних этапах селекции, а потом сегрегации популяций полученных пептидов по их аффинности. В этом отношении ФД обладает существенными преимуществами перед методами получения и анализа пептид-белковых комплексов с помощью аффинной очистки и сопряжённой масс-спектрометрии, где слабые комплексы не регистрируются и поэтому просто выпадают из анализа [58, 61].

7.5. Пептидные лиганды для построения новых наноматериалов

Поскольку в основе технологий пептидного ФД лежит поиск пептидных лигандов по принципу их аффинности, можно априори предположить, что в представительной пептидной библиотеке присутствуют варианты, связывающие не только биоорганические мишени, но и самые разнообразные вещества неорганической природы, включая различные твёрдые поверхности. Потребность в подобных пептидных лигандах возросла многократно с развитием нанотехнологий и синтезом новейших наноматериалов упорядоченной структуры. Подробный перечень достижений в этой области можно найти в обзоре Seker и Demir [62]. Отметим несколько наиболее интересных примеров из этого направления. В таблице 3 представлены некоторые пептиды, связывающие различные металлы, сплавы и оксиды металлов, парамагнитные материалы (FePt, CoPt) [62-64], полупроводниковые материалы (GaAs, ZnS, CdS) [65, 66], полистирол [67]. Для поиска пептидов, связывающих металлы, их окислы или сплавы, пептидные библиотеки либо наносили на соответствующие поверхности, либо инкубировали с мелкодисперсными порошками. Полученные фаги затем использовали в качестве центров кристаллизации при получении наночастиц и монокристаллов того же вещества [62]. В случае экспонирования пептидов на фаговой поверхности в составе белка p8, получали нановолокна определённого размера с наночастицами, расположенными вдоль длинной оси фага. При дальнейшей высокотемпературной (350°C) обработке, органическая часть выгорала. В результате были получены полностью неорганические нановолокна определённой структуры. Так, используя фаги, несущие два функциональных пептида на поверхности p8, были получены гибридные нановолокна, состоящие из кобальта и золота [63]. Аналогичная техника была успешно использована для получения полупроводниковых монокристаллов [65, 66]. Первоначально из библиотек формата p3 авторы идентифицировали 2 пептида, связывающие ZnS (CNNPMHQNC и VISNHAESSRRL). Путём клонирования получали варианты фагов, несущие множественные копии данных пептидов в составе белка p8. Фаги помещали в водный раствор $ZnCl_2$, добавляли водный раствор Na_2S. После “созревания” смеси были получены нановолокна, в которых расположение монокристаллов ZnS соответствовало расположению копий белка p8 в фаге.

Таблица 3. Пептидные лиганды, связывающие различные неорганические вещества

Материал	Связывающий пептид	Литературный источник
Серебро (Ag)	AYSSGAPPMPPF, IRPAIHIIPISH, WSWRSPTPHVVVT	[45]
Золото (Au)	VSGSSPDS, LKAHLPPSRLPS, TGTSVLIATPYV	[45]
Оксид железа Fe_3O_4	LSTVQTISPSNH	[45-47]
Платина (Pt)	CPTSTGQAC, CTLHVSSYC	[45-47]
Кобальт (Co)	HSVRWLLPGAHP, KLHSSPHTLPVQ	[46]
Сплав железа и платины (Fe-Pt)	HNKHLPSTQPLA, SVSVGMKPSPRP, VISNHRESSRPL	[45-47]
Палладий (Pd)	QQSWPIS, NFMSLPRLGHMH, SVTQNKY, SPHPGPY, HAPTPML	[45-47]
Нержавеющая сталь (Fe)	MTWDPSLASPRS, ATIHDAFYSAPE, NLNPNTASAMHV	[45-47]
Полупроводниковые материалы		
ZnS, CdS, PbS	CNNPMHQNC, VISNHAESSRRL, SLTPLTTSHLRS, QNPIHTH, CTYSRLHLC	[48], [49]
Полистирол	RPTR	[50]

Следует отметить, что большинство исследований по поиску пептидов, связывающих вещества неорганической природы, было выполнено с использованием коммерческих библиотек фирмы “New England Biolabs” – Ph.D-12 и C7C, в которых пептиды экспонированы в составе минорного белка p3 в количестве только 5 копий на фаговую частицу. Для того, чтобы получить нановолокна авторам приходилось переклонировать соответствующие фрагменты в векторные системы 8+8. Очевидно, что библиотеки ландшафтного формата 8 имели бы ряд преимуществ в таких исследованиях, поскольку количество пептидов на одну фаговую частицу в них первоначально составляет 4000 на вирион. К сожалению, ландшафтные библиотеки пока остаются недоступными для широкого применения, но есть надежды на появление их коммерческих вариантов в ближайшем будущем.

При работе с библиотеками практически любого типа в ходе аффинной селекции зачастую идентифицируются фаги, специфично связывающие пластиковые поверхности: поверхности микропробирок, чашек Петри или иммунологических планшетов. Многие из таких пептидов имеют общий аминокислотный мотив RPTR. Пептид RPTR, специфично связывающийся с полистиреновыми поверхностями культуральных сосудов для клеточных культур, был “слит” с интегрин-связывающим пептидом GRGDS [68]. Таким гибридным пептидом обрабатывали поверхности культуральных сосудов, что приводило к увеличению адгезивности клеточных культур и увеличению скорости их размножения. Многие инертные материалы можно обрабатывать с помощью бифункциональных фагов или бифункциональных пептидов и иммобилизовать таким образом на их поверхности необходимые функциональные группы и реагенты [62].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование пептидного фагового дисплея, как комбинаторного метода, привело к открытию огромного множества биоспецифичных лигандов пептидной природы, успешно использующихся в самых различных областях современной биотехнологии, нанотехнологии и биомедицины. Для дальнейшего успешного применения ФД несомненно требуется создание коммерческих библиотек самого различного формата. При использовании схем аффинной селекции существенную пользу приносит первоначальная негативная селекция. При этом из библиотек убирается наибольшее количество неспецифических вариантов, например, пептидов, связывающих общие полисахаридные компоненты бактериальных клеток, клеточные мембраны эукариотических клеток, пластиковые поверхности, а также белки, используемые в качестве блокирующих агентов. Полезным для успешной идентификации разнообразных лигандов является параллельное использование сразу нескольких библиотек, получение коллекций мутантов и дополнительные раунды селекции для идентификации пептидов с более высокой аффинностью. Всё это позволит находить самые разнообразные биоспецифичные пептидные лиганды, клиническое использование которых в будущем будет только возрастать.

Авторы выражают благодарность профессору G.P. Smith (University of Columbia, Missouri, USA) и профессору В.А. Петренко (Auburn University, Auburn, Alabama, USA) за возможность работать в их лабораториях и поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hofschneider P.H., Preuss A.* (1963) J. Mol. Biol., **7**, 450-451.
2. *Hoffmann-Berling H., Duerwald H., Beulke I.* (1963) Z. Naturforsch. B., **18**, 893-898.
3. *Loeb T.* (1960) Science, **131**, 932-933.
4. *Straus S.K., Scott W.R., Symmons M.F., Marvin D.A.* (2008) Eur. Biophys. J., **37**, 521-527.
5. *Marvin D.A., Symmons M.F., Straus S.K.* (2014) Prog. Biophys. Mol. Biol., **114**, 80-122.
6. *Smith G.P., Petrenko V.A.* (1997) Chem. Rev., **97**, 391-410.

7. *Barbas C.F. III, Barton D.R., Silverman G.J. (eds.)* (2001) Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 736 p.
8. *Rakonjac J., Bennett N.J., Spagnuolo J., Gagic D., Russel M.* (2011) Curr. Issues Mol. Biol., **13**, 51-76.
9. *Smith G.P.* (1985) Science., **228**, 1315-1317.
10. *Scott J.K., Smith G.P.* (1990) Science, **249**, 386-390.
11. *McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J.* (1990) Nature, **348**, 552-554.
12. *Barbas C.F. 3rd, Kang A.S., Lerner R.A., Benkovic S.J.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 7978-7982.
13. *Kang A.S., Jones T.M., Burton D.R.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**,11120-11123.
14. *Kügler J., Zantow J., Meyer T., Hust M.* (2013) Viruses., **5**, 2531-2545.
15. *Bratkovic T.* (2010) Cell Mol. Life Sci., **67**(5), 749-767.
16. *Gamkrelidze M., Dabrowska K.* (2014) Arch. Microbiol., **196**, 473-479.
17. *Qin L., Fokine A., O'Donnell E., Rao V.B., Rossmann M.G.* (2010) J. Mol. Biol., **395**, 728-741.
18. *Shivachandra S.B., Li Q., Peachman K.K., Matyas G.R., Leppla S.H., Alving C.R., Rao M.R.B.* (2007) Vaccine, **25**, 1225-1235.
19. *Beghetto E., Gargano N.* (2011) Molecules, **16**, 3089-3105.
20. *Guglietta S., Beghetto E., Spadoni A., Buffolano W., Del Porto P., Gargano N.* (2007) Microbes Infect., **9**(2), 127-133.
21. *Matthews D.J., Wells J.A.* (1993) Science, **260**, 1113-1117.
22. *Felici F., Luzzago A., Folgori A., Cortese R.* (1993) Gene., **128**, 21-27.
23. *Кузьмичева Г.А., Кувшинов В.Н., Разумов И.А., Иванисенко В.А., Ерошкин А.М., Мишин В.П., Орешкова С.Ф., Локтев В.Б., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С.* (1997) Докл. акад. наук, **352**, 113-116.
24. *Кузьмичева Г.А., Кувшинов В.Н., Разумов И.А., Иванисенко В.А., Ерошкин А.М., Мишин В.П., Ушакова Т.А., Локтев В.Б., Ильичев А.А.* (1997) Мол. генетика микробиол. вирусол., **4**, 25-29.
25. *Rowley M.J., Scealy M., Whisstock J.C., Jois J.A., Wijeyewickrema L.C., Mackay I.R.* (2000) J. Immunol., **164**, 3413-3419.
26. *Dieltjens T., Willems B., Coppens S., Van Nieuwenhove L., Humbert M., Dietrich U., Heyndrickx L., Vanham G., Janssens W.J.* (2010) Virol. Methods, **169**, 95-102.
27. *Tanaka T., Kokuryu Y., Matsunaga T.* (2008) Appl. Environ. Microbiol., **74**, 7600-7606.
28. *Whaley S.R., English D.S., Hu E.L., Barbara P.F., Belcher A.M.* (2000)Nature, **405**, 665-668.
29. *Chamarthy S.P., Jia L., Kovacs J.R., Anderson K.R., Shen H., Firestine S.M., Meng W.S.* (2004) Mol. Immunol., **41**, 741-749.
30. *Kelly K.A., Bardeesy N., Anbazhagan R., Gurumurthy S., Berger J., Alencar H., Depinho R.A., Mahmood U., Weissleder R.* (2008) PLoS Med., **5**(4):e85.
31. *Petrenko V.A., Smith G.P., Gong X., Quinn T.* (1996) Protein Eng., **9**, 797-801.
32. *Kuzmicheva G.A., Jayanna P.K., Sorokulova I.B., Petrenko V.A.* (2009) Protein Eng. Des. Sel., **22**, 9-18.
33. *Kuzmicheva G.A., Jayanna P.K., Eroshkin A.M., Grishina M.A., Pereyaslavskaya E.S., Potemkin V.A., Petrenko V.A.* (2009) Protein Eng. Des. Sel., **22**, 631-639.
34. *Huang S., Yang H., Lakshmanan R.S., Johnson M.L., Wan J., Chen I.H., Wikle H.C. 3rd, Petrenko V.A., Barbaree J.M., Chin B.A.* (2009) Biosens. Bioelectron., **24**, 1730-1736.
35. *Olsen E.V., Sorokulova I.B., Petrenko V.A., Chen I.H., Barbaree J.M., Vodyanoy V.J.* (2006) Biosens. Bioelectron., **21**, 1434-1442.
36. *Kuzmicheva G.A., Eroshkin A.M., Potemkin V.A., Jayanna P.K., Petrenko V.A.* (2008) Proceeding of the Nanotechnology Conference and Trade Show. NSTI-Nanotech 2008, ISBN 978-1-4200-8504-4 Vol. 2, 446-448
37. *Gillespie J.W., Gross A.L., Puzyrev A.T., Bedi D., Petrenko V.A.* (2015) Front Microbiol., **6**, 628.
38. *Jayanna P.K., Bedi D., Deinnocentes P., Bird R.C., Petrenko V.A.* (2010) Protein Eng. Des. Sel., **23**, 423-430.
39. *Shadidi M., Sioud M.* (2003) FASEB J., **17**, 256-268.
40. *Kouzmitcheva G.A., Petrenko V.A., Smith G.P.* (2001) Clin. Diagn. Lab. Immunol., **8**,150-160.
41. *Manhani M.N., Ribeiro V.S., Cardoso R., Ueira-Vieira C., Goulart L.R., Costa-Cruz J.M.* (2011) Parasite Immunol., **33**(6), 322-329.
42. *Туманова О.Ю., Кувшинов В.Н., Орловская И.А.. Проняева Т.Р., Покровский А.Г., Ильичев А.А., Сандахчиев Л.С.* (2003) Мол. биол., **37**, 556-560.
43. *Туманова О.Ю., Кувшинов В.Н., Ильичев А.А., Некрасов Б.Г., Иванисенко В.А., Козлов А.П., Сандахчиев Л.С.* (2001) Мол. биол., **35**, 146-151.
44. *Gazarian K., Gazarian T., Betancourt J.I., Alonso Morales R.A.* (2011) Vet. Microbiol., **154**, 29-36.
45. *Carnazza S., Foti C., Gioffrè G., Felici F., Guglielmino S.* (2008) Biosens. Bioelectron., **23**, 1137-1144.
46. *Rao S., Mohan K.V., Atreya C.D.* (2013) PLoS One, **8**(2), e56081.
47. *Bishop-Hurley S.L., Schmidt F.J., Erwin A.L., Smith A.L.* (2005) Antimicrob. Agents Chemother., **49**(7), 2972-2978.
48. *Deutscher S.L.* (2010) Chem. Rev., **110**, 3196-3211.
49. *Pasqualini R., Ruoslahti E.* (1996) Mol. Psychiatry, **1**, 423.
50. *Loi M., Di Paolo D., Soster M., Brignole C., Bartolini A., Emionite L., Sun J., Becherini P., Curnis F., Petretto A. et al.* (2013) J. Control Release, **170**, 233-241.
51. *Fu B., Zhang Y., Long W., Zhang A., Zhang Y., An Y., Miao F., Nie F., Li M., He Y., Zhang J., Teng G.* (2014) Biotechnol. Lett., **36**, 2291-2301.
52. *Valetti S., Maione F., Mura S., Stella B., Desmaële D., Noiray M., Vergnaud J., Vauthier C., Cattel L., Giraudo E., Couvreur P.* (2014) J. Control Release, **192**, 29-39.
53. *Zhang Z.F., Shan X., Wang Y.X., Wang W., Feng S.Y., Cui Y.B.* (2014) J. Cardiothorac. Surg., **9**, 76-83.
54. *Ma C., Yin G., Yan D., He X., Zhang L., Wei Y., Huang Z.* (2013) J. Pept. Sci., **19**, 730-736.
55. *Pu X., Ma C., Yin G., You F., Wei Y.* (2014) Biochem. Biophys. Res. Commun., **443**, 858-863.
56. *Chang D.K., Lin C.T., Wu C.H., Wu H.C.* (2009) PLoS One., **4**, e4171, 1-11.
57. *Perea S.E., Reyes O., Baladron I., Perera Y., Farina H., Gil J., Rodriguez A., Bacardi D., Marcelo J.L., Cosme K. et al.* (2008) Mol. Cell Biochem., **316**, 163-167.
58. *Sundell G.N., Ivarsson Y.* (2014) Biomed. Res. Int., **2014**, 176-172.
59. *Dinkel H., van Roey K., Sushama Michael S.* (2014) Nucleic Acids Res., **42**, D259–D266.
60. *Denisov S.G., Beliavskaia V.A., Voevoda M.I.* (2001) Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol., **2**, 19-24.
61. *Ivarsson Y., Arnold R., McLaughlin M., Nim S., Joshi R., Ray D., Liu B., Teyra J., Pawson T., Moffat J., Li S.S., Sidhu S.S., Kim P.M.* (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **111**, 2542-2547.
62. *Seker U.O., Demir H.V.* (2011) Molecules, **16**, 1426-1451.
63. *Nam K.T., Kim D.W., Yoo P.J., Chiang C.Y., Meethong N., Hammond P.T., Chiang Y.M., Belcher A.M.* (2006) Science., **312**, 885-888.
64. *Lower B.H., Lins R.D., Oestreicher Z., Straatsma T.P., Hochella M.F. Jr., Shi L., Lower S.K.* (2008) Environ. Sci. Technol., **42**, 3821-3827.

65. *Mao C., Flynn C.E., Hayhurst A., Sweeney R., Qi J., Georgiou G., Iverson B., Belcher A.M.* (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 6946-6951.
66. *Mao C., Solis D.J., Reiss B.D., Kottmann S.T., Sweeney R.Y., Hayhurst A., Georgiou G., Iverson B., Belcher A.M.* (2004) Science, **303**, 213-217.
67. *Sanghvi A.B., Miller K.P., Belcher A.M., Schmidt C.E.* (2005) Nat. Mater., **4**, 496-502.

Поступила: 30. 08. 2016.
Принята к печати: 29. 09. 2016.

PEPTIDE PHAGE DISPLAY IN BIOTECHNOLOGY AND BIOMEDICINE

G.A. Kuzmicheva[1,2], V.A. Belyavskaya[1]

[1]Research Center of Virology and Biotechnology Vector,
Koltsovo, Novosibirsk region, 630558 Russia; e-mail: kouzmitcheva@yahoo.com
[2]XBiotech USA, Austin, TX, USA

To date peptide phage display is one of the most common combinatorial methods used for identifying specific peptide ligands. Phage display peptide libraries containing billions different clones successfully used for selection of ligands with high affinity and selectivity toward wide range of targets including individual proteins, bacteria, viruses, spores, different kind of cancer cells and variety of nonorganic targets (metals, alloys, semiconductors etc.) Success of using filamentous phage in phage display technologies relays on the robustness of phage particles and a possibility to genetically modify its DNA to construct new phage variants with novel properties. In this review we are discussing characteristics of the most known non-commercial peptide phage display libraries of different formats (landscape libraries in particular) and their successful applications in several fields of biotechnology and biomedicine: discovery of peptides with diagnostic values against different pathogens, discovery and using of peptides recognizing cancer cells, trends in using of phage display technologies in human interactome studies, application of phage display technologies in construction of novel nano materials.

Key words: phage display, peptides, bacteriophages, random peptide phage libraries, landscape libraries