



## Wykorzystanie metod prezentacji fagowej do otrzymywania białek o pożądanym właściwościach

Piotr Kwaśnikowski<sup>1</sup>, Joanna Talarek<sup>1</sup>, Marcin Czerwiński<sup>2</sup>,  
Wojciech T. Markiewicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

<sup>2</sup>Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej,  
Polska Akademia Nauk, Wrocław

### Phage display – a new way of selecting proteins with predefined specificities

#### Summary

The display of diverse repertoires of proteins on the surface of filamentous bacteriophage offers a new way of selecting proteins with predefined specificities. The affinity selection process can be carried out due to unique feature of the phage expression system, the direct physical linkage between genotype and phenotype of displayed proteins. Phage displayed libraries of proteins have been successfully used in a number of applications, including selection of monoclonal antibodies, receptor ligands and enzyme inhibitors, cDNA expression, epitope mapping, studies on protein-protein and protein-nucleic acids interactions. The phage display system is also a very decent tool to perform *in vitro* evolution of protein properties. This approach is based on construction and screening of repertoires of mutagenized proteins or protein domains and affinity selection of molecules with most desirable features.

#### Key words:

phage display, phage combinatorial libraries, specific peptides, Fab, *in vitro* evolution.

#### Adres do korespondencji

Wojciech T. Markiewicz,  
Pracownia Chemii  
Biokonjugatów, Instytut  
Chemii Bioorganicznej,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Noskowskiego 12/14,  
61-704 Poznań.

### 1. Wstęp

W nowoczesnej biotechnologii bardzo szerokie zastosowania znajdują peptydy i białka o określonych właściwościach. Ich potencjalne wykorzystanie zależy od zdolności do specyficzne-

go oddziaływania z wybranymi cząsteczkami docelowymi. Krótkie peptydy szeroko wykorzystuje się w badaniach podstawowych, np. do wyszukiwania sekwencji zachowawczych oddziałujących z wybranym ligandem (1,2). Mają one również zastosowanie jako selektywne inhibitory enzymów (3), białek onkogennych (4,5) oraz jako środki przeciwbakteryjne (6,7).

Łatwo sobie wyobrazić, że opracowanie wielu nowych metod terapii, jak i nowych rozwiązań biotechnologicznych, byłoby znacznie łatwiejsze, o ile posiadalibyśmy wiedzę umożliwiającą projektowanie białek o pożądanych właściwościach. Rozwój metod teoretycznych i badań modelowych pozwala sądzić, że w przyszłości racjonalne projektowanie białek będzie możliwe. Obecnie jednak dużo większą popularnością cieszą się metody naśladujące procesy generowania oraz selekcji różnorodności molekularnej zachodzące w układzie odpornościowym.

W organizmach żywych istnieje pula przeciwciał o bardzo różnej specyficzności. Różnorodność ta powstaje w unikatowym procesie dojrzewania mRNA immunoglobulin (8). Każdy organizm posiada zatem naturalną **bibliotekę** przeciwciał, w której potencjalnie mogą występować immunoglobuliny przeciwko dowolnemu antygenowi. Zgodnie z teorią selekcji klonalnej (8,9) w momencie wtargnięcia antygeny do ustroju (immunizacja pierwotna) przeciwciała naturalnej biblioteki podlegają selekcji. W wyniku tej selekcji dochodzi do uruchomienia biosyntezy przeciwciał specyficznie oddziałujących z antygenem. Przy powtórny kontakt z antygenem (immunizacja wtórna), przeciwciała wytworzone w procesie odpowiedzi pierwotnej ulegają modyfikacjom zwiększającym ich powinowactwo do antygeny (dojrzewanie powinowactwa) (8,9). W ostatnich latach opisano w literaturze nową metodę, która umożliwia wyszukiwanie peptydów i białek o specyficznych właściwościach, naśladującą procesy zachodzące w układzie immunologicznym. Polega ona na konstrukcji *in vitro* **białkowych bibliotek kombinatorycznych** (10,11).

## 2. Biblioteki kombinatoryczne białek

Biblioteka kombinatoryczna jest zbiorem cząsteczek o podobnej budowie. Bibliotekę taką bada się pod kątem wyselekcjonowania z niej składników oddziałujących w specyficzny sposób z wybraną cząsteczką akceptorową. Z definicji wynika, że biblioteka kombinatoryczna może być zbudowana z dowolnego typu związków chemicznych. Mogą to być np. biblioteki kombinatoryczne: inhibitorów beta oraz alfa glikozydazy, RNA, syntetycznych tetrapeptydów, białek zbudowanych z D-aminokwasów, czy też biblioteki S-metylotioestrów (12-16).

Podziału kombinatorycznych bibliotek białkowych można dokonać biorąc pod uwagę następujące kryteria biblioteki: 1) kompletność; 2) homogenność; 3) format; 4) odczytanie sekwencji wyselekcjonowanego białka; 5) konstrukcję (17). Biblioteka może być kompletna, czyli zawierać pełną reprezentację wszystkich możliwych struktur białek składających się na bibliotekę danego typu. Biblioteka homogenna składa



się np. z białek zbudowanych z tej samej liczby aminokwasów w odróżnieniu od biblioteki heterogennej, w której znajdują się polipeptydy zbudowane z różnej liczby aminokwasów. Biblioteki kombinatoryczne można również podzielić ze względu na format na: scalone (*integrated*) np. dwuwymiarowe biblioteki (18,19) (*arrays*) i biblioteki rozproszone (*dispersed*). Ostateczna przydatność biblioteki zależy od możliwości odczytania struktury każdego związku znalezionej w procesie jej selekcji (*panning*, *biopanning*). Biblioteki scalone nie wymagają sekwencjonowania, ponieważ przestrzenna lokalizacja związku w bibliotece (współrzędne) określa, z definicji, jego strukturę pierwszorzędową (historia syntezy). W przypadku bibliotek rozproszonych peptydów czy białek odczytywanie struktury wyselekcjonowanych elementów zapoczątkowuje ich bezpośrednie sekwencjonowanie. Chemiczna metoda syntezy jest stosowana na ogół tylko do konstrukcji bibliotek krótkich peptydów (20). Jej podstawową zaletą jest możliwość użycia nienaturalnych aminokwasów do konstrukcji peptydów.

Inne możliwości zapewnia metoda ekspresji DNA kodującego białka biblioteki w odpowiednim układzie biologicznym. Biologiczny nośnik białek biblioteki kombinatorycznej (*library vehicle*) musi posiadać cechy umożliwiające selekcję białek o pożądanym właściwościach. Po pierwsze, modyfikacja jego genomu może być tak przeprowadzona, że białka biblioteki mają postać białek fuzyjnych z wybranym białkiem nośnika. Po drugie, prezentacja białka fuzyjnego na powierzchni nośnika i ekspozycja w stronę środowiska zewnętrznego umożliwia wyszukanie pożądanego białek biblioteki na zasadzie selekcji powinowactwa (*affinity selection*) z wykorzystaniem immobilizowanej cząsteczki akceptorowej. Po trzecie, dzięki zdolności nośnika do replikacji, możliwe jest namnożenie wyszukanego białka biblioteki w celu jego scharakteryzowania. Identyfikacji wyselekcjonowanego białka możemy dokonać dzięki „powiązaniu” **genotypu nośnika z jego fenotypem**. W tym celu, aby poznać strukturę pierwszorzędową wyselekcjonowanego białka należy przesekwencjonować kodujący je rejon genomu nośnika.

Aby białkowa biblioteka kombinatoryczna była skutecznym narzędziem badawczym, muszą być spełnione trzy warunki (17):

1. Musi istnieć wydajna metoda wytworzenia różnorodności molekularnej biblioteki na poziomie DNA. Bardzo ważnym aspektem jest również opracowanie wydajnej metody klonowania DNA kodującego białka biblioteki, zapewniającej jak największe jej zróżnicowanie. Oczywiście jest, że im dłuższe łańcuchy peptydowe wchodzi w skład konstruowanej biblioteki, tym rozmiar biblioteki jest większy. Liczba elementów biblioteki rośnie eksponencjalnie z długością łańcucha peptydowego  $n$  i zależy od liczby aminokwasów  $m$  zgodnie z wzorem  $m^n$ . Na przykładzie heksapeptydów zbudowanych z wszystkich podstawowych aminokwasów białkowych (20) widzimy, że możliwa liczba peptydów o różnych sekwencjach jest olbrzymia i wynosi  $20^6$  czyli  $6,4 \times 10^7$ . W praktyce, biblioteki kompletne, czyli zawierające pełną reprezentację wszystkich możliwych struktur można uzyskać jedynie dla krótkich peptydów.



2. Niezbędne jest opracowanie odpowiedniej metody selekcji, pozwalającej na wyszukanie w bibliotece składników, które specyficznie oddziałują z wybraną cząsteczką akceptorową. Procedura przeszukiwania biblioteki powinna być na tyle elastyczna, żeby umożliwiała również selekcję elementów biblioteki o małej lub dużej specyficzności wobec wybranego liganda.

3. Trzeba dysponować metodą identyfikacji wyselekcjonowanych peptydów biblioteki i poznania ich struktury pierwszorzędowej.

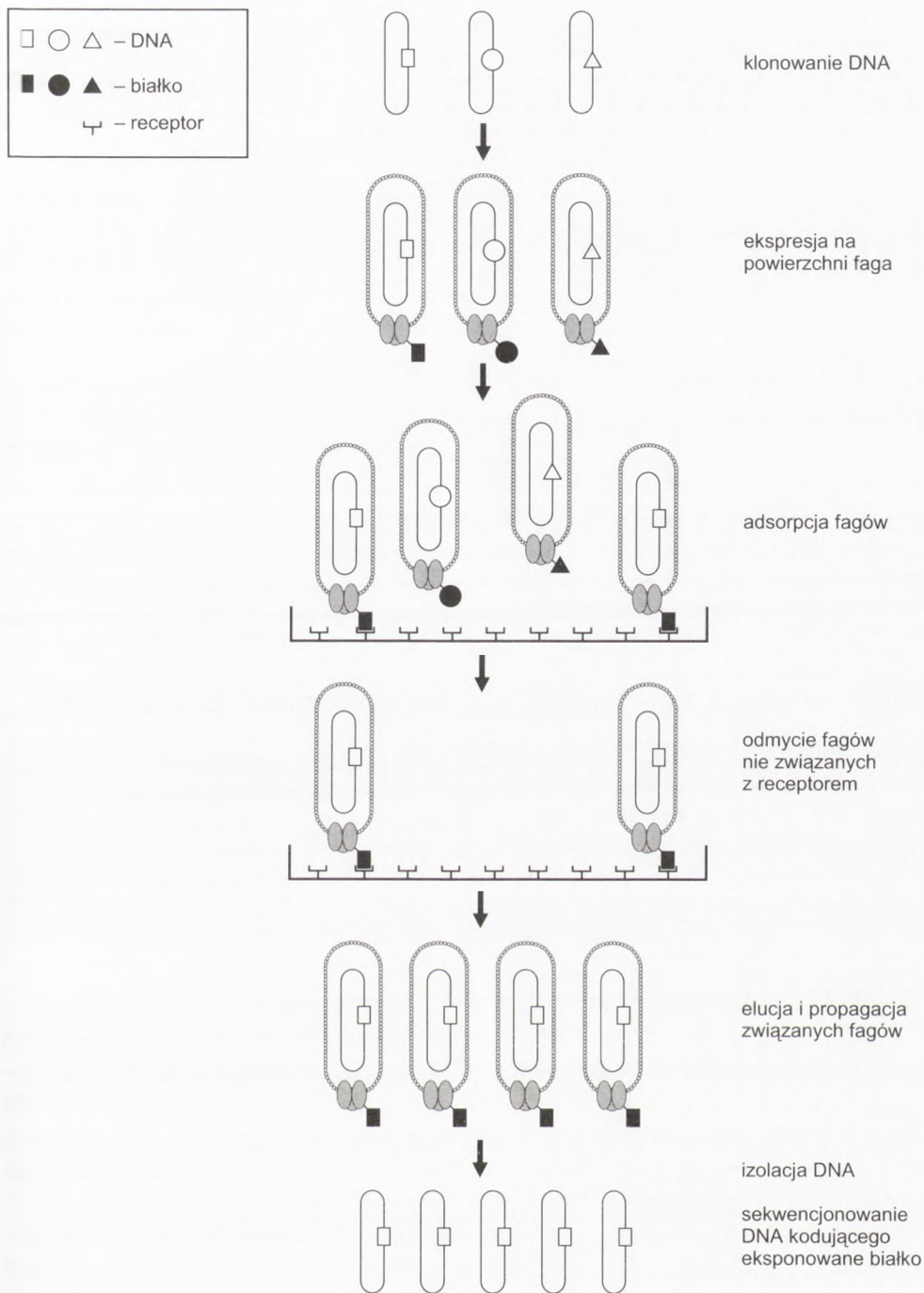
### 3. Fagowe biblioteki ekspresyjne

Nowa metoda, która umożliwia przeszukiwanie białkowych bibliotek kombinatorycznych nosi nazwę **prezentacji fagowej** (*phage display*) (10,20) i wykorzystuje fagi włókienkowate M13 jako nośniki białek. Specyficzną cechą fagowego układu ekspresyjnego jest miejsce klonowania DNA kodującego peptydy lub białka. Elementy biblioteki występują pod postacią białek fuzyjnych z cząsteczkami białek kapsydu i są eksponowane na zewnątrz wirionu, przy czym każdy bakteriofag jest nosicielem tylko jednego rodzaju peptydu.

Selekcja biblioteki polega na adsorpcji fagów z dowolnie wybraną cząsteczką akceptorową. Następnie niespecyficzne fagi zostają odplukane. Natomiast fagi prezentujące peptyd lub białko będące specyficznym ligandem dla akceptora poddaje się propagacji, czyli namnożeniu w *E. coli* w celu przeprowadzenia kolejnej rundy selekcji. Kilukrotne powtórzenie procesu selekcji powoduje, że stopniowo zwiększa się pulę fagów specyficznych w stosunku do pozostałych (20).

Identyfikacja wyselekcjonowanych elementów biblioteki fagowej jest możliwa dzięki „powiązaniu” fenotypu z genotypem: każdy fag jest nosicielem jednego peptydu biblioteki i zawiera DNA kodujące tę cząsteczkę. Propagacja wyselekcjonowanego faga pozwala na uzyskanie DNA kodującego cząsteczkę, której biologiczne właściwości są określone przez jej oddziaływanie z ligandem (20) (rys. 1).

Przy konstruowaniu bibliotek przeciwciał metodą *in vitro* omija się etap immunizacji, co umożliwia otrzymywanie przeciwciał dla antygenów o słabej antygenowości lub/i immunogenności, albo takich, które są toksyczne dla organizmu gospodarza. Jest to duża zaleta wobec tradycyjnych metod uzyskiwania przeciwciał o pożądanej specyficzności, np. metodą hybrydomy (21), gdzie kontrola procesu naturalnej immunizacji jest w znacznym stopniu ograniczona.



Rys. 1. Schemat konstrukcji i selekcji fagowej kombinatorycznej biblioteki białkowej.



## 4. Wektory stosowane do konstrukcji fagowych bibliotek ekspresyjnych

### 4.1. Budowa i cykl biologiczny bakteriofaga M13

Większość wektorów służących do konstruowania bibliotek ekspresyjnych otrzymano wykorzystując genom faga M13 lub jego fragmenty. Bakteriofag M13 należy do fagów włókienkowatych z rodziny *Inoviridae*, zdolnych do infekowania bakterii *E. coli* zawierających koniugacyjny plazmid F. Genom faga M13 jest jednoniciową, kolistą cząsteczką DNA, która składa się z 6407 nukleotydów i zawiera 11 genów (tab. 1) (20).

Tabela 1

Geny i białka faga M13

Gen	Białko	Funkcja
I	PI	morfogeneza
II	PII	replikacja DNA
III	PIII	proces infekcji i morfogeneza
IV	PIV	morfogeneza
V	PV	wiązanie jednoniciowego DNA fagowego
VI	PVI	białko kapsydu
VII	PVII	białko kapsydu
VIII	PVIII	główne białko kapsydu
IX	PIX	białko kapsydu
X	PX	replikacja DNA
XI	PXI	morfogeneza

Wirion faga M13 ma średnicę ok. 6,5 nm i długość ok. 930 nm. Cząsteczka DNA jest zamknięta w cylindrycznym płaszczu białkowym złożonym z ok. 2700 cząsteczek białka pVIII. Na jednym końcu kapsydu znajduje się po 5 cząsteczek białek pVII i pIX, podczas gdy na drugim końcu znajduje się po 5 cząsteczek białek pIII i pVI. Ten koniec wirionu odpowiedzialny jest za wiązanie faga do bakterii za pośrednictwem białka pIII (rys. 2).

Proces infekcji *E. coli* jest inicjowany poprzez przyłączenie faga do pili koniugacyjnych F. Następnie, po stopniowej depolimeryzacji pili, bakteriofag wchodzi w kontakt z błoną bakteryjną. Białka kapsydu zostają wbudowane w błonę bakteryjną, natomiast jednoniciowy genom fagowy ulega przeniesieniu do cytoplazmy. Enzymy bakteryjne podejmują syntezę komplementarnej nici DNA i tym samym ge-



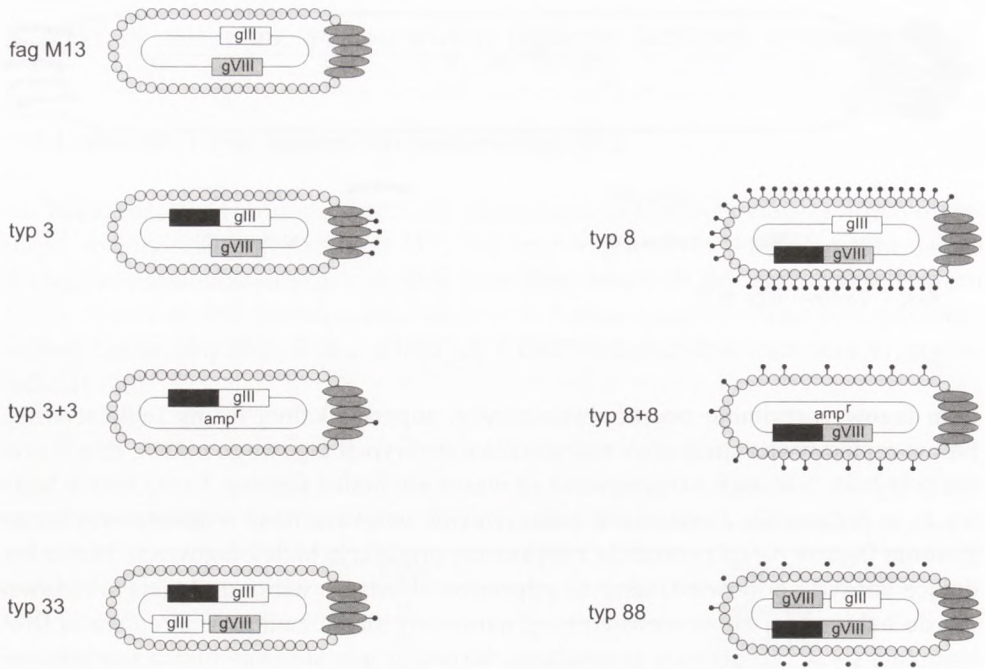
Rys. 2. Budowa faga M13.

nom fagowy przyjmuje postać dwuniciowej, superhelikalnej formy replikatywnej. Forma replikatywna służy jako matryca dla transkrypcji fagowego mRNA, dzięki czemu w wyniku translacji otrzymywane są wszystkie białka fagowe. Część białek fagowych, w połączeniu z enzymami bakteryjnymi zwiększa ilość replikatywnej formy genomu fagowego, co powoduje zwiększoną produkcję białek fagowych. Białka budujące kapsyd i odpowiedzialne za poprawne składanie wirionu ulegają wbudowaniu do bakteryjnej błony wewnętrznej, natomiast białka związane z replikacją DNA kumulują się w cytoplazmie gospodarza. Wówczas gdy stężenie białka specyficznego wobec jednoniciowego DNA fagowego, pV, osiągnie właściwy poziom, wychwytuje ono nowo powstający genom fagowy tworząc kompleks pV-ssDNA. Składanie wirionu zachodzi w miejscach, gdzie obydwie błony bakteryjne znajdują się w bliskim kontakcie. Białko pV stopniowo oddysocjowuje od jednoniciowego DNA i zastępowane jest białkami kapsydowymi. Transfer białek kapsydowych z błony wewnętrznej do powstającej cząstki wirusowej zapewniony jest poprzez białka fagowe odpowiedzialne za składanie wirionu i bakteryjną tioredoksynę. Składanie zachodzi do momentu, w którym cały genom fagowy ulegnie opłaszczeniu, a dojrzały wirus zostanie uwolniony z komórki gospodarza (20).

#### 4.2. Wektory fagowe

Większość wektorów stosowanych do konstruowania bibliotek fagowych umożliwia ekspresję egzogennych peptydów i białek w postaci białek fuzyjnych z białkami pIII lub pVIII faga M13. Ekspresję przeprowadza się po wklonowaniu DNA kodującego badane białko lub peptyd w odpowiednie miejsca genów III lub VIII genomu faga. W wyniku ekspresji takiego fragmentu DNA powstaje białko fuzyjne, w skład którego wchodzi fragmenty C-końcowe białek pIII lub pVIII. Wektory zawierające opisane miejsca klonowania są nazywane odpowiednio wektorami typu 3 i 8 (23). Ze względu na to, że w niektórych przypadkach obecność obcego insertu w białkach pIII lub pVIII może spowodować brak infekcyjności lub zaburzenia w rozwoju faga M13, zaprojektowano wektory zawierające po dwie kopie genów III i VIII: jedna ko-





Rys. 3. Typy wektorów używanych do konstrukcji bibliotek fagowych.

pia służy do klonowania egzogenego DNA, podczas gdy druga zapewnia powstanie natywnej formy białka III lub VIII. Wektory takie są oznaczane symbolami 33 lub 88 (23) (rys. 3).

### 4.3. Wektory fagemidowe

Odrębną klasą wektorów są wektory fagemidowe. Fagemidy są rodzajem plazmidów, które w obecności faga pomocniczego mają zdolność pakowania się do kapsydu faga w postaci jednoniciowego DNA. W przypadku wektorów fagemidowych fragment DNA mający ulec ekspresji wklonowuje się do fagemidu zawierającego kompletne geny III lub VIII lub ich fragmenty. Jeżeli bakterie zawierające taki fagemid zainfekuje się fagiem pomocniczym, którego zdolność do replikacji jest ograniczona (np. VCSM13), to wydzielane cząsteczki faga będą zawierały DNA fagemidu oraz mieszaninę natywnych i zrekombinowanych form białek pIII lub pVIII. Wektory takie są oznaczane symbolami 3+3 lub 8+8 (23) (rys. 3).



Tabela 2

## Rodzaje fagowych wektorów ekspresyjnych

Typ wektora	Wartościowość
3	5
33	0-5
3+3	0-5
8	2700
88	0-2700
8+8	0-2700

Istotnym parametrem wektorów fagowych i fagemidowych jest wartościowość (*valency*) prezentowanej cząsteczki (tab. 2). W zależności od typu wektora może ona wynosić od 0 do 2700 cząsteczek na wirion faga. Wartościowość może mieć wpływ na swoiste „maskowanie” powinowactwa cząsteczek izolowanych z bibliotek fagowych. Spowodowane jest to efektem chelatowania: im więcej cząsteczek fag ekspozuje na powierzchni, tym jest większe prawdopodobieństwo, że rzeczywiste powinowactwo pojedynczej cząsteczki wobec liganda będzie „maskowane” (20).

## 5. Biblioteki peptydowe w fagu M13

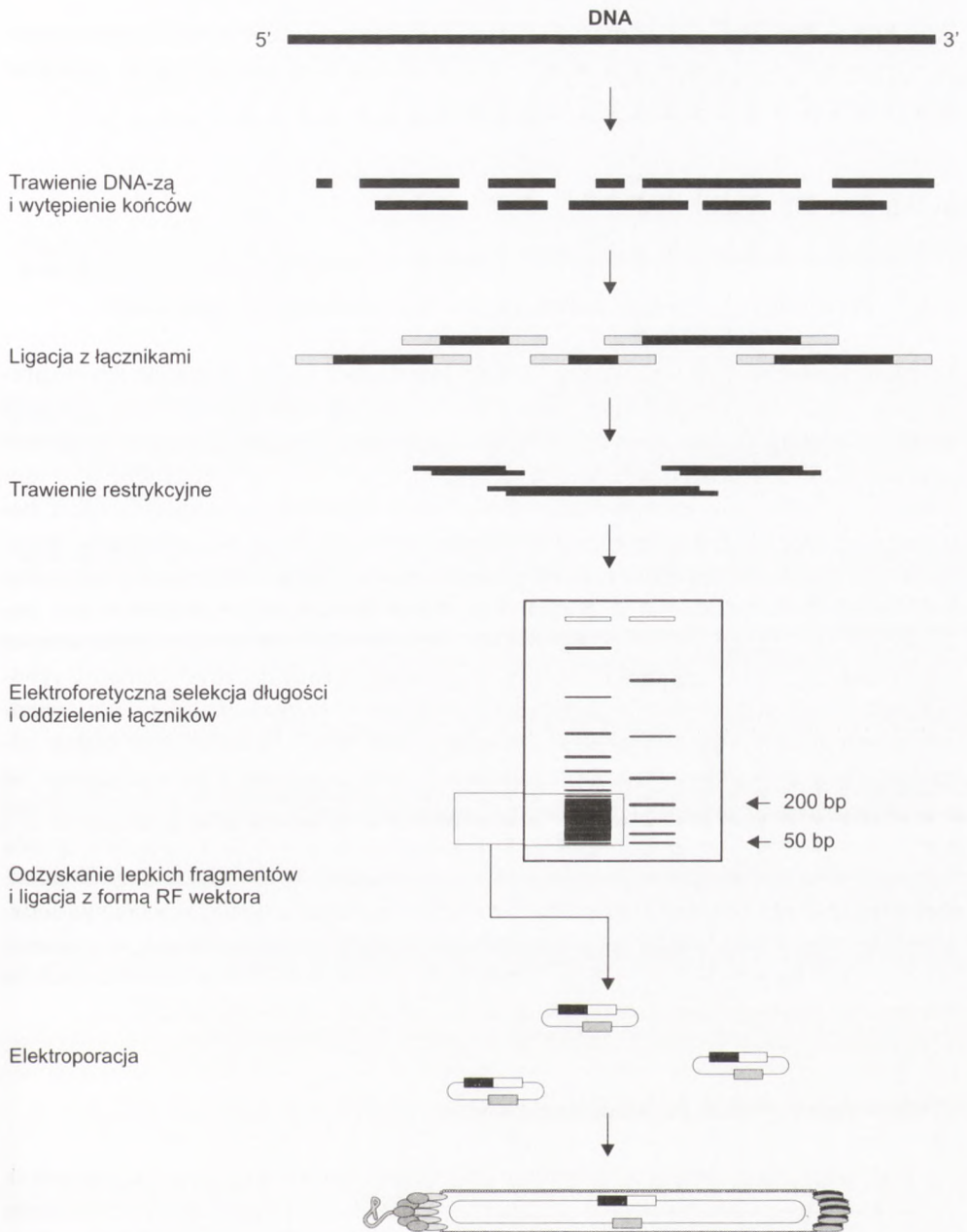
### 5.1. Przypadkowe (*random*) peptydy

Wektory fagowe lub fagemidowe mogą być zastosowane do ekspresji zróżnicowanych peptydów będących potencjalnymi ligandami dla badanych białek (24-26). Bibliotekę fragmentów DNA kodujących peptydy o przypadkowej sekwencji (*random peptides*) otrzymuje się za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), z wykorzystaniem starterów oligonukleotydowych zawierających sekwencję zdegenerowaną (rys. 4).

Amplifikowany DNA po strawieniu odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi zostaje wklonowany do ekspresyjnego wektora fagowego lub fagemidowego. Transformowane przygotowanym konstruktem komórki bakteryjne produkują fagi, prezentujące na powierzchni peptydy jako fuzyjne fragmenty białka pIII lub pVIII. Selekcja biblioteki polega na adsorpcji fagów na podłożu zawierającym unieruchomioną cząsteczkę akceptorową. Odmycie fagów nie wiążących się, a następnie elucja związanych umożliwia otrzymanie frakcji wzbogaconej w fagi prezentujące peptydy rozpoznawane przez dane białko. Wyizolowanie takich fagów pozwala na określenie sekwencji nukleotydowych, kodujących wyszukane peptydy. Metoda ta







Rys. 5. Konstrukcja fagowej biblioteki peptydów będących fragmentami białek.

inne białko umożliwia poznanie sekwencji aminokwasowych wyselekcjonowanych peptydów. Dzięki tej technice możliwe było poznanie immunogennych epitopów wirusa HIV (29) oraz innych wirusów (30,31).

## 6. Fagowe biblioteki białkowe

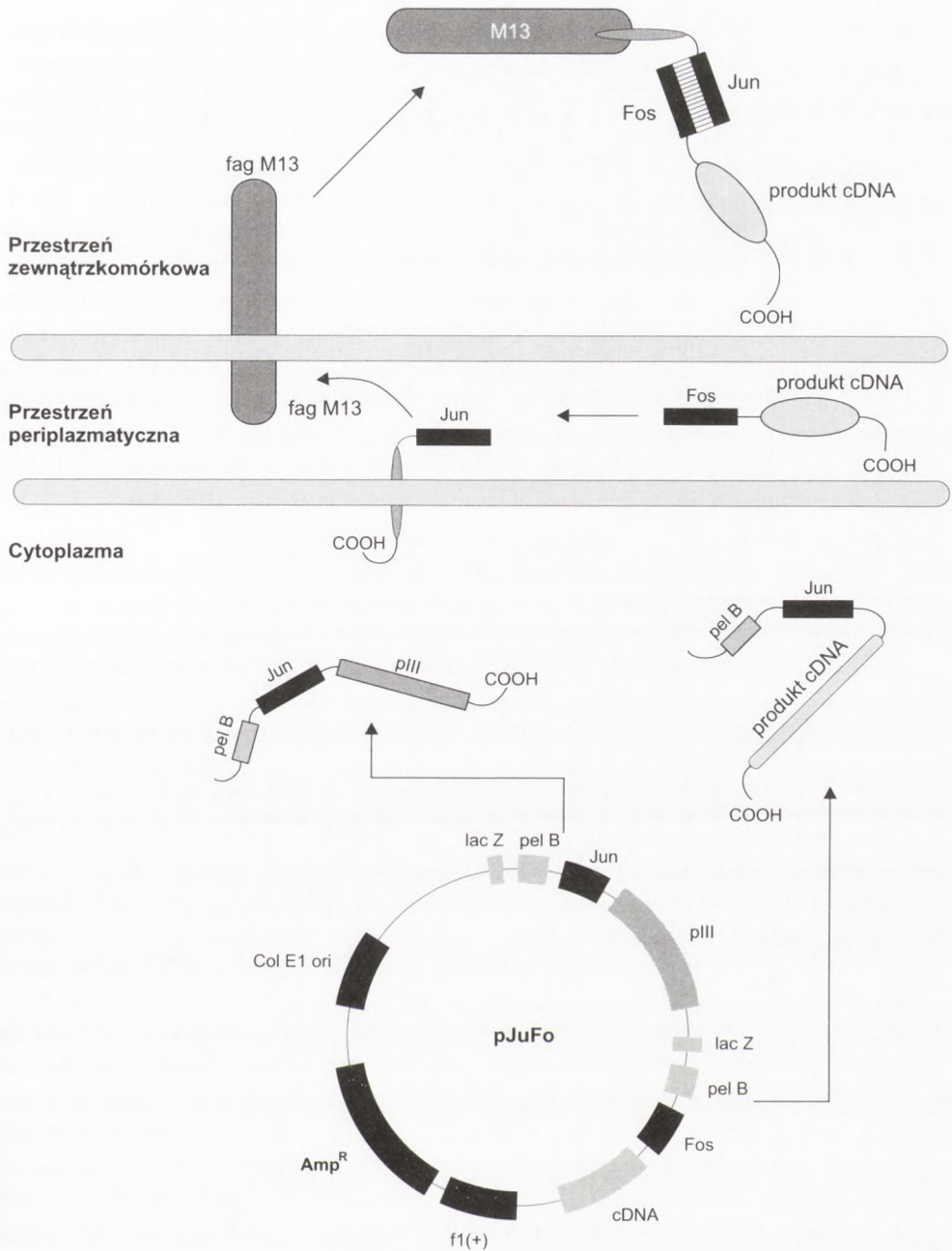
### 6.1. Prezentacja i selekcja białek za pomocą genetycznych pakunków

Metody ekspresyjne wykorzystywane do konstrukcji bibliotek białek, ich ekspresji i ukierunkowanej mutagenetyki znane są pod ogólną nazwą prezentacji i selekcji białek na pakunkach genetycznych **DSPGP** (*display and selection of proteins on genetic packages*) (20). Metoda DSPGP polega na wprowadzeniu dużej różnorodności molekularnej w rejon determinujący (lub potencjalnie determinujący) specyficzność badanego białka wobec wybranej cząsteczki akceptorowej. W wyniku celowo lub przypadkowo wprowadzonych mutacji otrzymuje się pulę białek o zmienionej sekwencji i zmienionych właściwościach; białka te są prezentowane na powierzchni tzw. pakunku genetycznego **GP** (*replicable genetic package*) (20). Pakunkiem genetycznym może być fag M13, komórka (32-33), bądź wytworzony *in vitro* kompleks rybosom:mRNA:powstające białko (34). Adsorpcja prezentowanych białek na odpowiednim ligandzie pozwala wyizolować i namnożyć te, które są nośnikami białek oddziałujących z ligandem. Ustalenie sekwencji nukleotydowej DNA kodującego te białka umożliwia poznanie ich sekwencji aminokwasowej i wyciągnięcie wniosków na temat roli poszczególnych domen lub reszt aminokwasowych w wiązaniu liganda lub receptora. Dzięki zastosowaniu tej metody możliwe było między innymi zidentyfikowanie reszt aminokwasowych biorących bezpośredni udział w wiązaniu ludzkiego hormonu wzrostu do jego receptora (35), reszt uczestniczących w wiązaniu „palca cynkowego” do DNA (36), czy ustalenie, które z reszt aminokwasowych są niezbędne dla wiązania enzymów proteolitycznych z inhibitorami (20).

### 6.2. Fagowy system do klonowania cDNA

Fagowy system ekspresyjny pJuFo (26), który umożliwia wyselekcjonowanie cDNA kodującego interesujące nas białko, został zaprojektowany z wykorzystaniem fagemidowego wektora pComb3. W systemie pJuFo fragmenty białek fos i jun wiążą się ze sobą z dużym powinowactwem na zasadzie „leucynowego zamka błyskawicznego” (*leucine zipper*). Produkt ekspresji cDNA występuje pod postacią białka fuzyjnego z białkiem fos. Kompleks ten zostaje wydzielony do przestrzeni periplazmatycznej, natomiast białko jun ulega ekspresji jako białko fuzyjne z białkiem pIII faga M13 i w efekcie jest prezentowane na powierzchni faga. W przestrzeni periplazma-





Rys. 6. Fagowy system klonowania cDNA.

tycznej białko fuzyjne *jun* wiąże obecne tam białko *fos*, które jest związane z białkowym produktem ekspresji cDNA. Można zatem powiedzieć, że białko *jun*, obecne na powierzchni faga, działa jako swoisty magnes dla produktów ekspresji cDNA, które wiążą się z tym białkiem za pośrednictwem białka *fos*. Istotną zaletą tego systemu jest możliwość ekspresji i izolacji fragmentów cDNA, które zawierają kodony terminacji translacji. Jest to możliwe dzięki temu, że nośnik dla produktu ekspresji cDNA, czyli gen *fos*, jest połączony z 5'-końcem fragmentu cDNA, w związku z czym ewentualna obecność kodonów stop nie ma wpływu na ekspresję genu *fos*, ani pozostałego fragmentu cDNA (rys. 6). Przy odwrotnej orientacji cDNA względem nośnika (gen *fos* przyłączony do 3'-końca cDNA) mogłoby dojść do sytuacji, w której ewentualny kodon terminacji występujący w cDNA poprzedzałby sekwencję kodującą białko *fos*. W takim przypadku przedwczesna terminacja translacji uniemożliwiłaby ekspresję, a tym samym selekcję białka fuzyjnego *fos*-produkt cDNA. System pJuFo został zastosowany m.in. do klonowania alergenów z *Aspergillus fumigatus* (37) i badania oddziaływań aktywnych z odwrotną transkrypcją z wirusa HIV (38).

### 6.3. Biblioteki przeciwciał

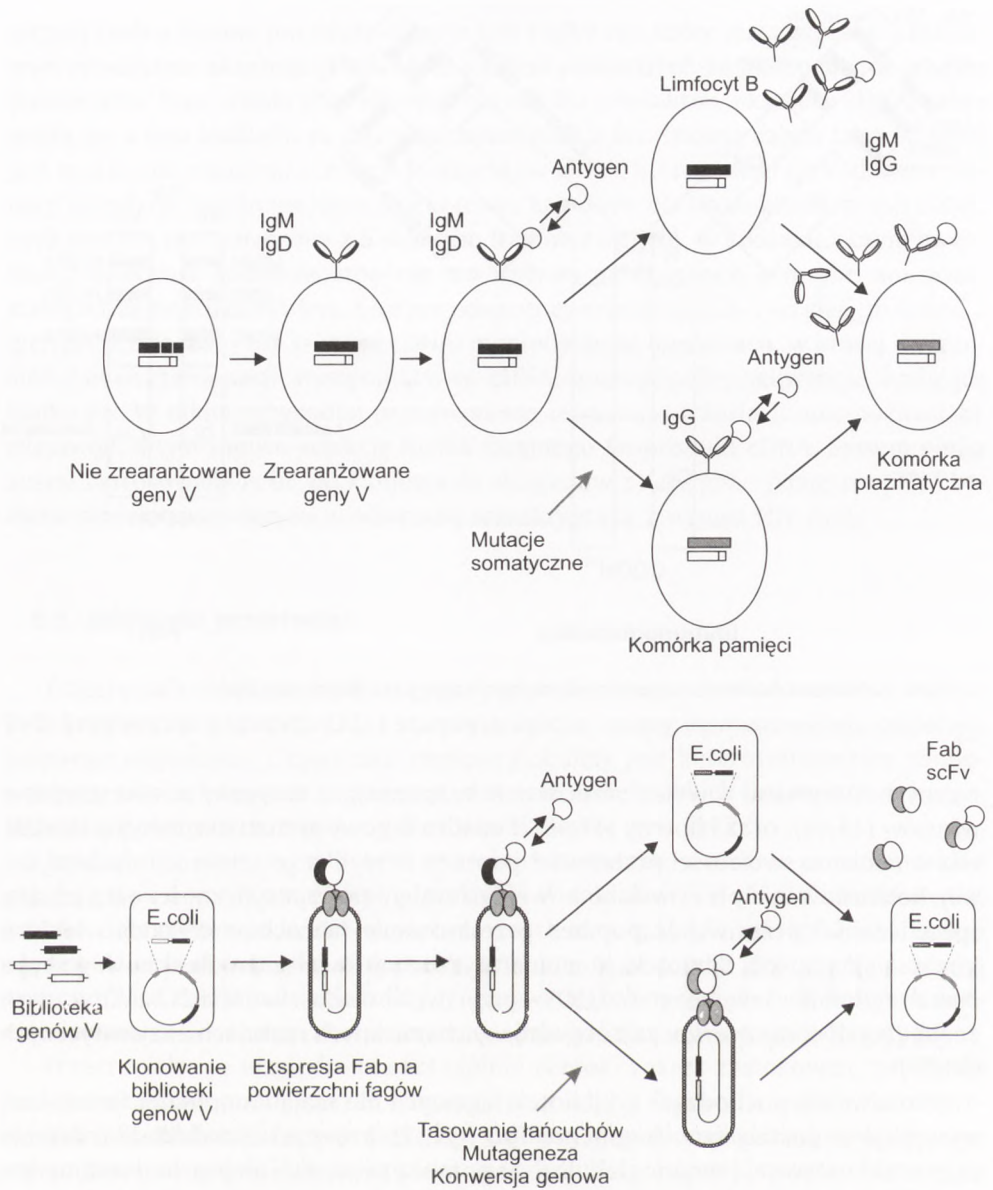
Przeciwciała należą do białek z grupy  $\gamma$ -globulin, obecnych w osoczu krwi wszystkich kręgowców wyższych (22) i stanowią bardzo ważny element układu odpornościowego organizmu. Częsteczką immunoglobuliny jest heterotetramerem zbudowanym z czterech łańcuchów polipeptydowych: dwóch lekkich (Lc) oraz dwóch ciężkich (Hc) połączonych mostkami dwusiarczkowymi (rys. 7) (22).

Łańcuchy Lc mogą występować w dwóch wariantach:  $\kappa$  oraz  $\lambda$ . Łańcuchy lekkie składają się z domeny zmiennej  $V_L$  i stałej  $C_L$ . W zależności od różnic w budowie Hc, przeciwciała można podzielić na pięć głównych klas: IgA, IgD, IgE, IgG i IgM. Łańcuchy ciężkie zbudowane są z domeny zmiennej  $V_H$  i trzech do czterech domen stałych ( $CH_1$ - $CH_4$ ). Immunoglobuliny IgG, powstające w największych ilościach podczas immunizacji wtórnej, charakteryzują się dużym powinowactwem do antygeny.

Przeciwciała, ze względu na szczególnie szeroki zakres zastosowań, należą do białek najczęściej poddawanych ekspresji przy użyciu fagowych wektorów ekspresyjnych (39). Biblioteki fagowe mogą być źródłem monoklonalnych przeciwciał o wysokim powinowactwie lub unikatowej specyficzności. Fagowy system ekspresyjny pozwala na przeszukanie i scharakteryzowanie większej liczby klonów, niż ma to miejsce w przypadku klasycznej metody hybrydomy. W przypadku tej metody istnieje również możliwość pominięcia etapu immunizacji, co jest dużą zaletą w przypadku gdy antygen jest toksyczny dla komórek gospodarza. Spośród licznych zastosowań bibliotek kombinatorycznych przeciwciał otrzymanych z bibliotek kombinatorycznych można wymienić wykorzystanie w terapii i diagnostyce chorób (20), w badaniach nad oddziaływaniem białek z cząsteczkami receptorów komórkowych (40), hormonów (41) czy kwasów nukleinowych (20,42-44). Z bibliotek kombinato-







Rys. 8. Podobieństwo metod konstrukcji i selekcji fagowych bibliotek przeciwciał do mechanizmów odpowiedzi immunologicznej.

monoklonalnych o pełnej długości, konieczne jest przeprowadzenie ekspresji immunoglobulin w eukariotycznym systemie ekspresyjnym (54).

Podobieństwo metod konstrukcji i selekcji fagowych bibliotek przeciwciał do naturalnej odpowiedzi immunologicznej jest szczególnie uderzające (rys. 8). Istota



obydwu procesów jest taka sama, jednakże mechanizmy generowania różnorodności molekularnej, selekcji oraz dojrzewania powinowactwa różnią się w układzie *in vivo* oraz *in vitro*.

W układzie odpornościowym pierwotne zróżnicowanie przeciwciał powstaje dzięki unikatowemu procesowi dojrzewania mRNA immunoglobulin. *In vitro* proces ten może być naśladowany zasadniczo na dwa sposoby.

Po pierwsze, bibliotekę genów kodujących Fab można otrzymać poprzez amplifikację metodą RT-PCR sekwencji kodujących immunoglobuliny, pochodzących z puli mRNA izolowanego ze szpiku kostnego, śledziony lub krwi obwodowej. Startery użyte w odwrotnej transkrypcji i reakcji PCR muszą być komplementarne do konserwatywnych fragmentów genów, tak aby amplifikacja objęła maksymalną liczbę sekwencji kodujących rejony hiperzmiennie CDR (*complementarity determining regions*). Opisane podejście ma istotne ograniczenie w postaci niekompletnej bazy danych genów kodujących immunoglobuliny, na podstawie której projektuje się startery reakcji PCR. Z tej przyczyny otrzymuje się bibliotekę genów stanowiących jedynie niewielką część pierwotnej różnorodności. Do konstrukcji biblioteki można oczywiście użyć mRNA izolowanego z organizmu gospodarza immunizowanego wybranym antygenem. Podejście takie znacznie ułatwia osiągnięcie sukcesu (45). Jest jednak niespójne z jednym z podstawowych założeń metodycznych związanych z konstrukcją fagowych bibliotek przeciwciał, jakim jest ominięcie etapu immunizacji (55).

Drugim sposobem jest metoda **semisyntetyczna**, oparta na reakcji chemicznej randomizacji (*chemical randomisation*) (48). Biblioteka taka ma charakter półsyntetyczny, ponieważ zmienność jest wprowadzana do genu dowolnie wybranego przeciwciała za pomocą zdegenerowanych starterów w reakcji PCR. Randomizacja polega na użyciu oligonukleotydów otrzymanych na drodze chemicznej w formie mieszaniny bardzo wielu sekwencji. Teoretycznie, pojedynczy zmodyfikowany region hiperzmienny stanowiący bibliotekę może dać  $4^n$  klonów ( $n$  długość regionu hiperzmiennego w parach zasad DNA). Wielkość różnorodności zbliżona jest zatem do możliwej w procesie naturalnej immunizacji (48). Również ta metoda posiada pewne ograniczenia. Synteza randomizowanych starterów dłuższych niż 24 nukleotydy obejmująca pełną możliwą różnorodność nie jest trudna. Jednak ze względu na skalę syntezy enzymatycznej, istotnym ograniczeniem jest wydajność ukierunkowanej mutagenyzy przeprowadzanej przy użyciu randomizowanych starterów na matrycy genu modyfikowanego przeciwciała.

Selekcja przeciwciał przy użyciu biblioteki fagowej przypomina proces selekcji jaki zachodzi w układzie odpornościowym (rys. 8). Limfocyty B zawierają zrearranżowane geny kodujące przeciwciała, które jednocześnie prezentowane są na powierzchni limfocyty B. Kontakt z antygenem powoduje pobudzenie i proliferację tych limfocytów B, które rozpoznają dany antygen. Pobudzone przekształcają się następnie w produkujące przeciwciała komórki plazmatyczne. Mutacje somatyczne, które zachodzą w wyniku stymulacji przez antygen, mogą podwyższać powinowactwo przeciwciał wobec antygeny (39,49).



Za pomocą fagowego systemu ekspresyjnego, podobnie jak w układzie odpornościowym możliwa jest selekcja i propagacja tych fagów, które prezentują przeciwciała oddziałujące z wybranym antygenem. Biblioteka genów immunoglobulinowych poddawana jest ekspresji w odpowiednim wektorze. W ten sposób uzyskuje się bibliotekę przeciwciał w fagach, przy czym każda cząsteczka faga prezentująca na swojej powierzchni przeciwciało zawiera kodujący je gen. Wzbogacenie biblioteki następuje w wyniku adsorpcji fagów na immobilizowanym antygenie. Kilkukrotne powtórzenie tej procedury umożliwia otrzymanie przeciwciał o największym powinowactwie wobec antygeny. Istnieje również możliwość „syntetycznego” wprowadzania mutacji do genów immunoglobulinowych i uzyskiwania w ten sposób przeciwciał o podwyższonym powinowactwie lub zmienionej specyficzności (11,56).

Identyfikacji wyselekcjonowanych klonów faga dokonuje się poprzez ich propagację, izolację DNA i sekwencjonowanie genu kodującego prezentowane przeciwciało.

#### **6.4. Wektory stosowane do ekspresji przeciwciał**

W zależności od rodzaju wektora, aktywne domeny przeciwciał mogą ulegać ekspresji w postaci fragmentu Fab (20) lub łańcucha Fv (57). Ponieważ zmienne regiony łańcucha ciężkiego i lekkiego fragmentu Fv mogą nie tworzyć poprawnego heterodimeru, najczęściej stosowane rozwiązanie polega na połączeniu genów kodujących zmienne regiony łańcucha lekkiego i ciężkiego za pomocą DNA kodującego krótki peptyd łączący. Ekspresja tak połączonych genów daje tzw. jednoniciowy łańcuch Fv (*single chain Fv*). Przykładem wektora, który umożliwia ekspresję fragmentu Fab jest pComb3 (20,37), natomiast wektorem dającym ekspresję łańcucha Fv jest PHEN (20).

Do ekspresji bibliotek przeciwciał stosuje się fagi prezentujące na powierzchni łańcuchy immunoglobulinowe jako białka fuzyjne z białkami otoczki faga. Po wyselekcjonowaniu aktywnych klonów, Fab mogą być otrzymane jak białko rozpuszczalne, wydzielane do przestrzeni periplazmatycznej bakterii. Można tego dokonać poprzez wycięcie z wektora pComb3 sekwencji kodującej białko pIII (56,59).

### **7. Ewolucja białek *in vitro***

#### **7.1. Uwagi wstępne**

Najbardziej pożądaną cechą przeciwciał monoklonalnych, z zastosowawczego punktu widzenia, jest jak największa siła oddziaływania immunoglobuliny z antygenem. W większości przypadków powinowactwo przeciwciał wyselekcjonowanych z biblioteki kombinatorycznej nie satysfakcjonuje badacza. Problem ten dotyczy nie



tylko bibliotek przeciwciał, bowiem systemy fagowe wykorzystywano również do ekspresji hormonów (60-61), enzymów i ich inhibitorów (62-64) oraz białek oddziałujących z kwasami nukleinowymi (36,43,65). Dlatego standardem stało się podejmowanie szeregu działań mających na celu zwiększenia specyficzności wyselekcjonowanych białek poprzez naśladowanie zjawisk zachodzących w naturze. Działania te można określić mianem ewolucji białek *in vitro*.

Proces ewolucji przeciwciał *in vitro* posiada szereg cech wspólnych z mechanizmami ewolucyjnymi przyrody. Warunkiem zaistnienia obydwu procesów jest zmienność genetyczna, choć z oczywistych względów sposoby jej powstawania różnią się *in vitro* i *in vivo*. W obydwu przypadkach różnorodność genetyczna poddawana jest presji selekcyjnej. W przyrodzie o przeżywalności decyduje kumulatywny dobór naturalny: jeżeli organizm posiada wszystko co niezbędne do przeżycia, to jego geny zostają przekazane następnemu pokoleniu. W laboratorium kryterium doboru jest cel badawczy; propagacji ulegają te klony fagów, które prezentują białka najlepiej wiążące się z wybranym związkiem akceptorowym.

Pod pewnymi ważnymi względami pojęcie ewolucji białek *in vitro* jest jednak mylące. Po pierwsze, podczas selekcji biblioteki kombinatorycznej pula genetyczna populacji potomnych fagów biblioteki za każdym razem ulega gwałtownemu zawężeniu. Spowodowane jest to tym, że nowe pokolenia fagów biblioteki nie są poddawane działaniu mechanizmów generowania zmienności genetycznej *in vitro*. Mamy zatem do czynienia z kojarzeniem wsobnym, który w przyrodzie jest raczej wyjątkiem niż regułą. Po drugie, w każdym pokoleniu podlegającym selektywnemu namnażaniu fagi potomne oceniane są na podstawie kryterium ich podobieństwa do konkretnego wzorca. Jest nim białko o określonej specyficzności. Natomiast ewolucja żywych organizmów, jak można by przypuszczać, nie posiada żadnego konkretnego celu, a kryterium doboru naturalnego, jak się wydaje, jest chwilowe i dotyczy albo przetrwania, albo bardziej ogólnie, sukcesu reprodukcyjnego.

## 7.2. Techniki ewolucji przeciwciał *in vitro*

Powszechnie stosowaną metodą modyfikowania siły wiązania immunoglobulin jest mutacja punktowa aminokwasów wchodzących w skład rejonów hiperzmiennych (67). Bardzo interesującą techniką jest tak zwane tasowanie łańcuchów (*chain shuffling*) (49). Polega ona na wzajemnej zamianie łańcuchów ciężkich i lekkich. Jej odmianą jest przenoszenie rejonów hiperzmiennych wybranych przeciwciał (CDR *walking*) (42). Za pomocą metody tasowania łańcuchów uzyskano przeciwciała w formie pojedynczego łańcucha polipeptydowego scFv (68), lub przeciwciała biwalentne (*diabodies*) (69). Opisane metody są bardzo skuteczne, ale nie pozwalają na uzyskanie dużej różnorodności wtórnej. Najczęściej stosowanym podejściem jest wprowadzanie zmienności molekularnej do sekwencji kodujących wyselekcjonowane przeciwciała, czyli konstruowanie bibliotek wyższego rzędu (20). Różnorodność takiej



biblioteki można wytworzyć za pomocą niespecyficznego mutageny *in vitro*, np. w mutagennej reakcji PCR (*error-prone* PCR) (49,70-73). Nadzieje na przyszłość daje również metoda przenoszenia kaset sekwencji DNA (*DNA shuffling*) (74), lub całych eksonów (75). Innym sposobem, dającym podobne efekty *in vivo* jest przeprowadzanie ekspresji przeciwciał w mutagennych szczepach *E. coli* (49,73,76).

## 8. Podsumowanie

Fagowe biblioteki kombinatoryczne białek należą do technologii cały czas intensywnie rozwijanych i z ich rozwojem wiążą się duże oczekiwania. Zaproponowano wiele metod ich konstrukcji i selekcji tak, że ich wybór zależy przede wszystkim od potrzeb i wyposażenia laboratoryjnego. Przepuszczalny zakres ich zastosowań może być rozszerzony dzięki bardziej szczegółowemu poznaniu faga M13. Pogłębianie wiedzy dotyczącej powiązań między cyklem życiowym M13, a szlakami metabolicznymi i białkami komórek gospodarza niezbędnymi dla jego replikacji i morfogenezy pozwoliłoby na ulepszenie metod konstrukcji fagowych bibliotek białkowych. W literaturze obserwuje się ostatnio wzrost liczby prac metodycznych opisujących zastosowania bibliotek kombinatorycznych białek. Badania mające na celu opracowanie schematu identyfikacji białek *E. coli* istotnych dla wydajnej ekspresji w fagu M13 mogą być wykorzystane do wyhodowania szczepu *E. coli* zoptymalizowanego pod kątem konstrukcji bibliotek kombinatorycznych (77). System pozwalający na ekspresję kilku peptydów ma powierzchnię jednego faga M13 znalazłby zastosowanie w badaniach nad odpowiedzią immunologiczną i oddziaływań między białkami (78). Przewodzenie dalszych badań pokaże, czy uda się z bibliotek kombinatorycznych białek uczynić jeszcze użyteczniejsze narzędzie w poszukiwaniach nowych cząsteczek białkowych o właściwościach użytkowych lub znajdujących zastosowanie w badaniach podstawowych.

## Literatura

1. Wang S., Raab R. W., Schatz P. J., Guggino W. B., Li M., (1998), *FEBS Lett.*, 427, 103-108.
2. Valadon P., Nussbaum G., Boyd L. F., Margulies D. H., Scharff M. D., (1996), *J. Mol. Biol.*, 261, 11-22.
3. Ferry G., Boutin J. A., Atassi G., Fauchere J. L., Tucker G. C., (1997), *Mol. Divers.*, 2, 135-146.
4. Barnard D., Sun H., Baker L., Marshall M. S., (1998), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247, 176-180.
5. Bottger A., Bottger V., Sparks A., Liu W. L., Howard S. F., Lane D. P., (1997), *Curr. Biol.*, 7, 860-869.
6. Houghten R. A., Appel J. R., Blondelle S. E., Cuervo J. H., Dooley C. T., Pinilla C., (1992), *Biotechniques*, 13, 412-421.
7. Houghten R. A., Pinilla C., Blondelle S. E., Appel J. R., Dooley C. T., Cuervo J. H., (1991), *Nature*, 354, 84-86.
8. Roit I., Brostoff J., Male D., (1998), *Immunologia*, PZWL, Warszawa.
9. Janeway Ch. A., Jr., Travers P., Hunt S., (1997), *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease*, Garland Publishing Ltd., New York.



10. Smith G. P., (1985), *Science*, 228, 1315-1317.
11. Gram H., Marconi L. A., Barbas C. F., III, Collet T. A., Lerner R. A., Kang A. S., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3576-3580.
12. Khan J. A., Gijs L., Berger C., Martin N., Piraprez G., Spinnler H. E., Vulfson E. N., Collin S., (1999), *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3269-3273.
13. Lohse A., Jensen K. B., Lundgren K., Bols M., (1999), *Bioorg. Med. Chem.*, 7, 1965-1971.
14. Bevilacqua J. M., Bevilacqua P. C., (1998), *Biochemistry*, 37, 15877-15884.
15. Wallace A., Koblan K. S., Hamilton K., Marquis-Omer D. J., Miller P. J., Mosser S. D., Omer C. A., Schaber M. D., Cortese R., Oliff A., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 31306-31311.
16. Dooley C. T., Chung N. N., Wilkes B. C., Schiller P. W., Bidlack J. M., Pasternak G. W., Houghten R. A., (1994), *Science*, 266, 2019-2022.
17. Kwaśnikowski P., Markiewicz W. T., (1996), *Biotechnologia*, 32, 162-175.
18. Fodor S. P., Read J. L., Pirrung M. C., Stryer L., Lu A. T., Solas D., (1991), *Science*, 251, 767-773.
19. Maskos U., Southern E. M., (1993), *Nucleic Acids Res.*, 21, 4663-4669.
20. Kay B. K., Winter J., McCafferty J., (1996), *Phage Display of Peptides and Proteins. A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego.
21. Wallace A., Koblan K. S., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 31306-31311.
22. Jakóbsiak M., (1995), *Immunologia*, PIW, Warszawa.
23. Smith G. P., Schultz D. A., Ladbury J. E., (1993), *Gene*, 128, 37-42.
24. Devlin J. J., Panganiban L. C., Devlin P. E., (1990), *Science*, 249, 404-406.
25. Scott J. K., Smith G. P., (1990), *Science*, 249, 386-390.
26. Cwirla S. E., Peters E. A., Barrett R. W., Dower W. J., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6378-6382.
27. Burrett J. B., DeLeo F. R., McDonald C. L., Prigge J. R., Dinauer M. C., Nakamura M., Nauseef W. M., Jesaitis A. J., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 2053-2061.
28. Barban V., Fraysse-Corgier S., Paranhos-Baccala G., Petit M., Manin C., Berard Y., Prince A. M., Mandrand B., Meulien P., (2000), *J. Gen. Virol.*, 81, 2, 461-469.
29. Tsunetsugu-Yokota Y., Tatsumi M., Robert V., Devaux C., Spire B., Chermann J. C., Hirsch I., (1991), *Gene*, 99, 261-265.
30. du Plessis D. H., Romito M., Jordaan F., (1995), *Immunotechnology*, 1, 221-230.
31. Wang L. F., du Plessis D. H., White J. R., Hyatt A. D., Eaton B. T., (1995), *J. Immunol. Methods*, 178, 1-12.
32. Brown S., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 8651-8655.
33. Charbit A., van der W. S., Mimic V., Boulain J. C., Girard M., Hofnung M., (1988), *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 139, 45-58.
34. Mattheakis L. C., Bhatt R. R., Dower W. J., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9022-9026.
35. Clackson T., Wells J. A., (1994), *Trends Biotechnol.*, 12, 173-184.
36. Choo Y., Klug A., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 11168-11172.
37. Cramer R., Blaser K., (1996), *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 110, 41-45.
38. Hottiger M., Gramatikoff K., Georgiev O., Chaponnier C., Schaffner W., Hubscher U., (1995), *Nucleic Acids Res.*, 23, 736-741.
39. Marks J. D., Hoogenboom H. R., Bonner T. P., McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G., (1991), *J. Mol. Biol.*, 222, 581-597.
40. Hawlich H., Frank R., Hennecke M., Baensch M., Sohns B., Arseniev L., Bartsch W., Kola A., Klos A., Kohl J., (1998), *J. Immunol.*, 160, 2947-2958.
41. Dorsam H., Rohrbach P., Kurschner T., Kipriyanov S., Renner S., Braunagel M., Welsch M., Little M., (1997), *FEBS Lett.*, 414, 7-13.
42. Yang W. P., Green K., Pinz-Sweeney S., Briones A. T., Burton D. R., Barbas C. F., III, (1995), *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403.
43. Choo Y., Klug A., (1995), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6, 431-436.
44. Barbas S. M., Ditzel H. J., Salonen E. M., Yang W. P., Silverman G. J., Burton D. R., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 2529-2533.

45. Zebedee S. L., Barbas C. F. III, Hom Y. L., Caothien R. H., Graff R., DeGraw J., Pyati J., LaPolla R., Burton D. R., Lerner R. A., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179.
46. Chen Y. C., Delbrook K., Dealwis C., Mimms L., Mushahwar I. K., Mandecki W., (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1997-2001.
47. Barbas C. F. III, Amberg W., Simoncsits A., Jones T. M., Lerner R. A., (1993), Gene, 137, 57-62.
48. Barbas C. F. III, Bain J. D., Hoekstra D. M., Lerner R. A., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4457-4461.
49. Winter G., Griffiths A. D., Hawkins R. E., Hoogenboom H. R., (1994), Annu. Rev. Immunol., 12, 433-455.
50. Janda K. D., Shevlin C. G., Lerner R. A., (1993), Science, 259, 490-493.
51. Baca M., Scanlan T. S., Stephenson R. C., Wells J. A., (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 10063-10068.
52. Janda K. D., Lo C. H., Li T., Barbas C. F. III, Wirsching P., Lerner R. A., (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 2532-2536.
53. Janda K. D., Lo L. C., Lo C. H. L., Sim M. M., Wang R., Wong C. H., Lerner R. A., (1997), Science, 275, 945-948.
54. Ames R. S., Tornetta M. A., Deen K., Jones C. S., Swift A. M., Ganguly S., (1995), J. Immunol. Methods, 184, 177-186.
55. Lerner R. A., Kang A. S., Bain J. D., Burton D. R., Barbas C. F. III, (1992), Science, 258, 1313-1314.
56. Barbas C. F. III, Burton D. R., (1994), *Cold Spring labor course on monoclonal antibodies from combinatorial libraries*, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA.
57. Nissim A., Hoogenboom H. R., Tomlinson I. M., Flynn G., Midgley C., Lane D., Winter G., (1994), EMBO J., 13, 692-698.
58. Cramer R., Suter M., (1993), Gene, 137, 69-75.
59. Barbas C. F. III, Kang A. S., Lerner R. A., Benkovic S. J., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 7978-7982.
60. Lowman H. B., Bass S. H., Simpson N., Wells J. A., (1991), Biochemistry, 30, 10832-10838.
61. Lowman H. B., Wells J. A., (1993), J. Mol. Biol., 234, 564-578.
62. Huang W., Zhang Z., Palzkill T., (2000), J. Biol. Chem., 275, 14964-14968.
63. Roberts B. L., Markland W., Ley A. C., Kent R. B., White D. W., Guterman S. K., Ladner R. C., (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 2429-2433.
64. Soumillion P., Jespers L., Bouchet M., Marchand-Brynaert J., Sartiaux P., Fastrez J., (1994), Appl. Biochem. Biotechnol., 47, 175-189.
65. Choo Y., Castellanos A., Garcia-Hernandez B., Sanchez-Garcia I., Klug A., (1997), J. Mol. Biol., 273, 525-532.
66. Dawkins R., (1994), *Ślepy zegarmistrz*, PIW, Warszawa.
67. Yang P. L., Schultz P. G., (1999), J. Mol. Biol., 294, 1191-1201.
68. Griffiths A. D., Malmqvist M., Marks J. D., Bye J. M., Embleton M. J., McCafferty J., Baier M., Holliger K. P., Gorick B. D., Hughes-Jones N. C., (1993), EMBO J., 12, 725-734.
69. Holliger P., Prospero T., Winter G., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448.
70. Cain S. A., Ratcliffe C. F., Williams D. M., Harris V., Monk P. N., (2000), J. Immunol. Methods, 245, 139-145.
71. Lin-Goerke J. L., Robbins D. J., Burczak J. D., (1997), Biotechniques, 23, 409-412.
72. Andersson C. I., Holmberg N., Farres J., Bailey J. E., Bulow L., Kallio P. T., (2000), Biotechnol. Bioeng., 70, 446-455.
73. Henke E., Bornscheuer U. T., (1999), Biol. Chem., 380, 1029-1033.
74. Ryu D. D., Nam D. H., (2000), Biotechnol. Prog., 16, 2-16.
75. Fisch I., Kontermann R. E., Finnern R., Schatz P. J., (1996), J. Mol. Biol., 255, 373-386.
76. Greener A., Callahan M., Jerpseth B., (1997), Mol. Biotechnol., 7, 189-195.
77. Bothmann H., Pluckthun A., (1998), Nat. Biotechnol., 16, 376-380.
78. Malik P., Perham R. N., (1997), Nucleic Acids Res., 25, 915-916.