

Celem niniejszego projektu jest wykorzystanie techniki „phage display” do wyselekcjonowania bakteriofaga/peptydu wiążącego białko C-reaktywne (CRP) - markera procesu zapalnego w organizmie człowieka - i zastosowaniu go do odróżnienia rodzaju infekcji wirusowej od bakteryjnej.

CRP jest jednym z białek tzw. ostrej fazy. Jego podwyższone stężenie we krwi świadczy o stanie zapalnym w organizmie człowieka. Badanie CRP jest istotne przy monitorowaniu i diagnozowaniu wielu chorób np. układu krążenia lub autoimmunologicznych. Ponadto badanie poziomu CRP we krwi jest niezmiernie istotne przy odróżnieniu rodzaju infekcji wirusowej od bakteryjnej. **Taka informacja jest kluczowa szczególnie w dobie postępującej antybiotykooporności.** Niestety, aktualnie dostępny na rynku test wykorzystywany do pomiaru CRP jest dość drogi, a przez to nie dla wszystkich dostępny. Dlatego wydaje się możliwe zwiększenie dostępności do tego typu testów poprzez obniżenie ich ceny produkcji. Proponowany projekt może stanowić częściowe rozwiązanie tego problemu poprzez zidentyfikowanie nowych, tańszych receptorów wiążących CRP. Te z kolei w przyszłości mogą zostać wykorzystane do tworzenia szybkich, czułych i tanich testów diagnostycznych. Generalnie działanie testów diagnostycznych polega na pomiarze stężeń charakterystycznych markerów chorobowych. Do przygotowania warstwy receptorowej testów, której zadaniem jest wyłapanie wybranych markerów z próbki, a która decyduje jednocześnie o czułości i selektywności takiego testu, wykorzystywane są np. przeciwciała, i tak też jest w przypadku testu CRP. Niestety produkcja przeciwciał jest droga, trudna i skomplikowana, bo wymaga immunizacji zwierząt, a ich specyficzność i odporność na czynniki zewnętrzne jest/bywa ograniczona. **Rozwiązaniem tego problemu mogłoby być wytwarzanie sztucznych przeciwciał - związków organicznych (np. peptydów) odpowiedzialnych za wiązanie określonych cząstek/markerów lecz posiadających mniej skomplikowaną budowę niż klasyczne przeciwciała.** Związki te są tańsze, prostsze w produkcji, bardziej stabilne, porównywalnie czułe - a nawet czulsze - na badane cząsteczki niż klasyczne przeciwciała. W ciągu ostatniej dekady coraz częściej jako sztuczne przeciwciała wykorzystywane są cząstki bakteriofagów (fagów). Fagi to wirusy bakteryjne, licznie występujące w środowisku naturalnym (w liczbie szacowanej na od 10^{30} do 10^{32} cząstek). Wykorzystywane są one w biologii molekularnej jako cząstki modelowe i to właśnie dzięki nim udowodniono, że DNA zawiera informację genetyczną. Współcześnie znajdują zastosowanie m.in. w analizie środowiskowej jako wskaźniki zanieczyszczenia wody lub medycynie jako alternatywa dla terapii antybiotykowej. Bakteriofagi można również wykorzystać do detekcji cząstek - dzięki zastosowaniu metody „phage display”.

W ramach projektu zidentyfikowane zostaną nowe receptory wiążące CRP przy wykorzystaniu techniki „phage display”. Technika ta, znana w biologii molekularnej, została również zaadaptowana do tworzenia sztucznych przeciwciał. Spośród kilku odmian tej metody, w niniejszym projekcie planowane jest zastosowanie wersji wykorzystującej biblioteki fagowe – tj. gotowe preparaty zawierające mieszaninę dużej liczby (rzędu miliardów) różnorodnych wariantów bakteriofagów. Polega ona na selekcjonowaniu, takich klonów (odmian fagów), na powierzchni których występują peptydy posiadające powinowactwo do określonego markera. Wyselekcjonowane peptydy wykazujące największą selektywność oraz efektywność wiązania CRP scharakteryzowane zostaną przy użyciu technik biologicznych i fizykochemicznych. W tym celu nowe receptory osadzone zostaną na odpowiednio zmodyfikowanym podłożu. Gdy podłoże z warstwą sztucznych przeciwciał zostanie zanurzone w próbce zawierającej cząsteczki CRP, część z nich zostanie wyłapana przez te przeciwciała. Schwyte w ten sposób cząsteczki CRP wywołają zaś zmianę mierzonego sygnału elektrycznego lub optycznego podłoża modyfikowanego warstwą sztucznych przeciwciał umożliwiając pomiar stężenia CRP w badanych próbkach. Wyniki badań pokazują, że przy wykorzystaniu techniki „phage display” możliwe jest zidentyfikowanie fagów/peptydów wiążących markery chorobowe (*Biotech&Bioeng.*, 105 (2010) 678, *J. Biotech.*, 187 (2014) 43). Takie peptydy, po zsekwencjonowaniu i zsyntetyzowaniu, mogą być wykorzystane do przygotowania warstwy receptorowej, która umożliwi czułą oraz selektywną detekcję badanych markerów (*Anal. Chem.*, 82 (2010) 8235, *Anal. Sci.*, 31 (2015) 699). Te spostrzeżenia przyczyniły się do podjęcia proponowanej tematyki badawczej.

Analiza opisanych zagadnień pozwoli odpowiedzieć na pytanie, czy wyselekcjonowane peptydy/bakteriofagi będą wykazywać większe powinowactwo do CRP niż przeciwciała oraz czy możliwe będzie rozróżnienie, w oparciu o nie, między infekcją wirusową a bakteryjną. Chęć znalezienia odpowiedzi na to pytanie przyczyniła się również do podjęcia proponowanej tematyki badawczej. Opisane badania pozwolą na poszerzenie podstawowej wiedzy zarówno z zakresu tworzenia oraz projektowania nowych platform sensorycznych przy wykorzystaniu nowych receptorów, jak również z zakresu biologii molekularnej w szczególności dotyczącej bakteriofagów i techniki „phage display”. Nowe peptydy wiążące CRP, zidentyfikowane podczas realizacji tego projektu, mogą być alternatywą dla przeciwciał i stanowić trzon do konstrukcji nowych, stabilnych, tanich oraz selektywnych platform sensorycznych.