



Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



„BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk

Profilowanie serologiczne populacji ludzkiej i identyfikacja epitopów antygenów bakteriofagowych najczęściej rozpoznawanych przez przeciwciała wybranych klas.

Katarzyna Gembara

Praca doktorska wykonana w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Promotor: prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska
prof. dr hab. Wojciech Witkiewicz

Wrocław, 2022



Politechnika Wrocławska



Uniwersytet
Wrocławski



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU

Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Serological profiling of human population and identification of epitopes in bacteriophage antigens most frequently recognized by specific antibodies of selected classes.

Materiały zawarte w niniejszej pracy zostały częściowo opublikowane w:

Gembara K., & Dąbrowska K. (2021). Phage-specific antibodies. Current opinion in biotechnology, 68, 186–192. doi: 10.1016/j.copbio.2020.11.011.

oraz przedstawione na międzynarodowych konferencjach naukowych:

Gembara K., Harhala M., Rybicka I., Witkiewicz W., Dąbrowska K. (2022). Serological profiling of humans and identification of epitopes in bacteriophages recognized by specific antibodies. Viruses of Microbes (VoM) 2022: The Latest Conquests on Viruses of Microbes, abstract book p. 507, 18-22.07.2022, Guimarães, Portugalia.

pogrubieniem oznaczono nazwisko autora niniejszej rozprawy

Badania przedstawione w niniejszej pracy były realizowane w ramach projektów:

Projekt Narodowego Centrum Badań i Rozwoju współfinansowany z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach działania 3.2 Studia doktoranckie Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, POWR.03.02.00-I037/16-00, 01.04.2018-30.09.2023, „BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”

oraz

Grant Narodowego Centrum Nauki OPUS 18 nr 2019/35/B/NZ7/01824 „PhageScan: identyfikacja epitopów bakteriofagowych mających istotne znaczenie dla zdrowia człowieka”.

Pragnę serdecznie podziękować

Pani Profesor Krystynie Dąbrowskiej

za okazaną życzliwość, wszechstronną pomoc oraz cenne uwagi i wiedzę przekazywaną w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy

Panu Profesorowi Wojciechowi Witkiewiczowi

za otrzymaną pomoc i możliwość prowadzenia badań z wykorzystaniem unikalnego materiału ludzkiego pochodzącego z biobanku Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu

Współpracownikom

za otrzymaną pomoc podczas wykonywania badań i analizy wyników do niniejszej pracy oraz miłą atmosferę pracy

Najbliższym

za wyrozumiałość, wsparcie i ciągłą motywację do dalszego rozwoju

Spis treści

Spis rysunków	11
Spis tabel.....	13
Spis załączników.....	14
Spis zastosowanych skrótów.....	15
1. Wstęp.....	19
1.1 Phage display	19
1.2 Bakteriofag T7: struktura i biologiczne właściwości.....	20
1.3 VirScan -nowe narzędzie do profilowania serologicznego.....	27
1.3.1 VirScan jako użyteczne narzędzie do profilowania serologicznego-przykłady zastosowania.....	29
1.4 Bakteriofagi jako naturalny składnik mikrobiomu	32
1.5 Interakcje fagów z układem odpornościowym	38
1.5.1 Rodzaje przeciwciał indukowanych przez bakteriofagi	39
1.5.2 Białka fagowe jako immunogeny	41
1.5.3 Współpraca elementów odporności wrodzonej z przeciwciałami specyficznymi do fagów	42
1.5.4 Czy przeciwciała specyficzne do fagów mogą wpływać na wyniki terapii fagowej?.....	43
2. Cel pracy	47
3. Materiały	48
3.1 Startery PCR.....	48
3.2 Wektor.....	49
3.3 Media hodowlane	49
3.4 Surowice ludzkie	50

3.5	Bufory	51
3.6	Odczynniki	52
3.7	Zestawy do badań	53
3.8	Materiały laboratoryjne.....	55
3.9	Aparatura i akcesoria.....	56
4.	Metody	58
4.1	Projektowanie biblioteki oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych (wg Xu i in., 2015, zmodyfikowano)	58
4.2	Reakcja amplifikacji biblioteki oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych metodą PCR (wg Thermo Fisher Scientific, zmodyfikowano)	60
4.3	Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych z wykorzystaniem zestawu QIAquick (wg QIAGEN)	61
4.4	Elektroforeza DNA (wg Sambrook i Russell 2001, zmodyfikowano).....	62
4.5	Pomiar stężenia DNA (wg instrukcji użytkownika spektrofotometru DeNovix DS.-11).....	62
4.6	Reakcja enzymatyczna z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych DNA (wg Thermo Fisher Scientific, zmodyfikowano)	63
4.7	Reakcja enzymatyczna z wykorzystaniem enzymu ligazy DNA (wg A&A Biotechnology i Novagen, zmodyfikowano)	63
4.8	Przygotowanie banków bakteryjnych (wg procedury ustalonej w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów IITD PAN).....	64
4.9	Reakcja pakowania genomu bakteriofaga T7 <i>in vitro</i> (wg Novagen, zmodyfikowano).....	64
4.10	Amplifikacja zrekombinowanej biblioteki faga T7 (wg Novagen, zmodyfikowano).....	65

4.11	Koncentracja i wymiana medium płynnego lizatu zrekombinowanej biblioteki faga T7 (wg procedury ustalonej w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów IITD PAN).....	66
4.12	Oznaczanie miana bakteriofagów (wg procedury ustalonej w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów IITD PAN).....	68
4.13	Reakcja immunoprecypitacji, czyli strącanie epitopów reaktywnych za pomocą swoistych przeciwciał występujących w surowicach ludzkich poddanych profilowaniu serologicznemu (wg Xu i in., 2015 oraz Invitrogen, zmodyfikowano).....	69
4.14	Reakcja amplifikacji metodą PCR materiału DNA bakteriofagów T7 pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji (wg Thermo Fisher Scientific, zmodyfikowano).....	71
4.15	Reakcja przyłączenia indeksów (barkodów DNA) do zamplifikowanego materiału DNA bakteriofagów T7 pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji metodą PCR niezbędnych do sekwencjonowania metodą NGS (wg Thermo Fisher Scientific, zmodyfikowano).....	72
4.16	Oczyszczanie biblioteki dsDNA do sekwencjonowania metodą NGS (wg Beckman Coulter, zmodyfikowano).....	73
4.17	Pomiar stężenia biblioteki dsDNA do sekwencjonowania metodą NGS (wg Promega).....	75
4.18	Seqwencjonowanie DNA metodą NGS (wg Illumina, zmodyfikowano i Genomed).....	76
4.19	Analiza danych uzyskanych po sekwencjonowaniu DNA metodą NGS.....	78
4.20	Opis zidentyfikowanych epitopów bakteriofagów (wg NCBI oraz BLAST).....	80
5.	Wyniki.....	81
5.1.	Zamplifikowana biblioteka oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych.....	81
5.2.	Przygotowanie do klonowania biblioteki oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych.....	82

5.3.	Klonowanie biblioteki oligonukleotydów do wektora T7Select415-1 i konstrukcja biblioteki rekombinowanych bakteriofagów T7 prezentujących na swojej powierzchni oligopeptydy bakteriofagowe	83
5.4.	Przygotowanie biblioteki zrekombinowanego bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagowych do immunoprecypitacji.....	84
5.5.	Strącanie epitopów bakteriofagowych w wyniku reakcji immunoprecypitacji ..	85
5.6.	Izolacja materiału genetycznego z immunoprecypitowanej części biblioteki zrekombinowanego bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagowych i przygotowanie uzyskanego materiału do sekwencjonowania DNA metodą NGS.	85
5.7.	Sekwencjonowanie immunoprecypitowanej części biblioteki zrekombinowanego bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagowych (metodą NGS)	88
5.8	Charakterystyka zidentyfikowanych reaktywnych oligopeptydów bakteriofagów	91
5.8.1	Geograficzna analiza bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych rozpoznanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach.....	92
5.8.2	Analiza bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych rozpoznanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach pod kątem cyklu infekcyjnego bakteriofaga, z którego pochodzi zidentyfikowany oligopeptyd	100
5.8.3	Analiza bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych rozpoznanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach pod względem bakteryjnego gospodarza bakteriofaga, z którego pochodzi zidentyfikowany oligopeptyd ...	101
5.8.4	Analiza bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych rozpoznanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach pod względem źródła izolacji bakteriofaga, z którego pochodzi zidentyfikowany oligopeptyd	104

5.8.5	Analiza bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych rozpoznanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach pod względem białek fagowych, z których pochodzi zidentyfikowany oligopeptyd	105
5.8.6	Analiza bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych rozpoznanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach pod względem zidentyfikowanych sekwencji homologicznych	107
6.	Dyskusja.....	109
7.	Wnioski	118
8.	Streszczenie	119
9.	Summary	121
10.	Załączniki.....	122
	Załącznik nr 1	122
	Załącznik nr 2	122
	Załącznik nr 3	124
	Załącznik nr 4.....	124
	Załącznik nr 5.....	133
	Załącznik nr 6.....	133
	Załącznik nr 7.....	133
11.	Literatura.....	134

Spis rysunków

- Rysunek 1.** Etapy metody VirScan.
- Rysunek 2.** Fagi jako antygeny T-zależne.
- Rysunek 3.** Mapa wektora T7Select415-1b.
- Rysunek 4.** Układ prążków i długości fragmentów DNA markera mas GeneRuler DNA Ladder Mix.
- Rysunek 5.** System do zagęszczania lizatów fagowych stworzony w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów IITD PAN.
- Rysunek 6.** Schemat prób badanych i kontroli zastosowanych w reakcji strącania epitopów bakteriofagowych za pomocą swoistych przeciwciał występujących w surowicach ludzkich.
- Rysunek 7.** Etapy oczyszczania dsDNA z wykorzystaniem kulek magnetycznych Agencourt AMPure.
- Rysunek 8.** Przykładowy oligonukleotyd przygotowany do klonowania do wektora faga T7.
- Rysunek 9.** Obraz elektroforetyczny przedstawiający produkt reakcji amplifikacji biblioteki oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych.
- Rysunek 10.** Obraz elektroforetyczny przedstawiający przygotowaną do klonowania bibliotekę oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych.
- Rysunek 11.** Wygląd łysek tworzonych przez zrekombinowanego bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagowych. Posiew redukcyjny gospodarza (*E.coli*) dla bakteriofaga T7.
- Rysunek 12.** Lokalizacja przykładowego oligonukleotydu bakteriofagowego w sekwencji wektora T7Select415-1.

- Rysunek 13.** Obraz elektroforetyczny przedstawiający produkty reakcji amplifikacji materiału DNA bakteriofagów T7 pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji (a) oraz produkty reakcji przyłączenia indeksów (barkodów DNA) do zaplifikowanego materiału DNA bakteriofagów T7 pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji (b).
- Rysunek 14.** Przykładowy raport wygenerowany na serwerze urządzenia NextSeq (Illumina) po sekwencjonowaniu DNA metodą NGS.
- Rysunek 15.** Procentowy udział zidentyfikowanych oligopeptydów bakteriofagowych pochodzących z bakteriofagów prezentujących lityczny lub lizogenny cykl infekcyjny.
- Rysunek 16.** Specyficzność bakteriofagów z których pochodziły sekwencje oligopeptydowe najczęściej rozpoznawane przez badane surowice. Określono częstość procentową identyfikacji specyficzności fagów do poszczególnych gatunków bakterii (odczyt globalny- populacja polska i USA łącznie).
- Rysunek 17.** Źródła izolacji bakteriofagów, z których pochodziły zidentyfikowane sekwencje oligopeptydów rozpoznane przez swoiste przeciwciała występujące we wszystkich badanych surowicach bez względu na pochodzenie geograficzne.
- Rysunek 18.** Białka bakteriofagowe, z których pochodziły zidentyfikowane sekwencje oligopeptydów rozpoznane przez swoiste przeciwciała występujące we wszystkich badanych surowicach bez względu na pochodzenie geograficzne.

Spis tabel

- Tabela 1.** Budowa bakteriofaga T7 i funkcje białek tworzących jego strukturę.
- Tabela 2.** Przykłady wykorzystania metody phage display opartej na bakteriofagu T7.
- Tabela 3.** Stany chorobowe, w których zaobserwowano inny skład fageomu niż obserwowany u osób zdrowych.
- Tabela 4.** Istotne informacje i niewiadome dotyczące przeciwciał swoistych dla fagów.
- Tabela 5.** Kodony *Escherichia coli* zastosowane w bibliotece oligonukleotydowej przygotowanej w niniejszej pracy.
- Tabela 6.** Miana odpłukiwanych po każdym etapie oraz odzyskanych w etapie elucji bakteriofagów.
- Tabela 7.** Stężenie biblioteki dsDNA poddanej sekwencjonowaniu metodą NGS.
- Tabela 8.** Lista oligopeptydów bakteriofagowych rozpoznanych przez przeciwciała klasy IgG przynajmniej w 30% badanych surowic – populacja polska.
- Tabela 9.** Lista oligopeptydów bakteriofagowych rozpoznanych przez przeciwciała klasy IgG przynajmniej w 30% badanych surowic – populacja USA.

Spis załączników

- Załącznik nr 1** Spis wyników eksperymentów badawczych z użyciem bakteriofagów, skupiających się na produkcji przeciwciał po podaniu fagów (*systematic review data extration*) [opublikowano w: Gembara & Dąbrowska, 2021; plik w formacie .xlsx dołączony w wersji elektronicznej do niniejszej pracy]*
- Załącznik nr 2** Zgoda Komisji Bioetycznej na wykorzystanie ludzkich surowic do badań naukowych
- Załącznik nr 3** Sekwencje zaprojektowanych oligonukleotydów bakteriofagowych syntetyzowanych przez firmę Agilent [plik w formacie .xlsx dołączony w wersji elektronicznej do niniejszej pracy]*
- Załącznik nr 4** Indeksy (barkody DNA) do sekwencjonowania DNA metodą NGS (Illumina)
- Załącznik nr 5** Lista zidentyfikowanych reaktywnych epitopów bakteriofagów [plik w formacie .xlsx dołączony w wersji elektronicznej do niniejszej pracy]*
- Załącznik nr 6** Wieloaspektowa charakterystyka zidentyfikowanych reaktywnych epitopów bakteriofagów [plik w formacie .xlsx dołączony w wersji elektronicznej do niniejszej pracy]*
- Załącznik nr 7** Wieloaspektowa charakterystyka zidentyfikowanych reaktywnych epitopów bakteriofagów wraz z ich sekwencjami homologicznymi [plik w formacie .xlsx dołączony w wersji elektronicznej do niniejszej pracy]*

*Załączniki przygotowane w języku angielskim w celu zachowania zgodności z formatem danych użytym w źródłowych bazach danych oraz w odpowiednich publikacjach źródłowych.

Spis zastosowanych skrótów

(k)Da	(kilo) Dalton
AFM	(z ang. acute flaccid myelitis) ostre zwiotczające zapalenie rdzenia kręgowego
AIDS	(z ang. acquired immunodeficiency syndrome) zespół nabytego niedoboru odporności
anty-CTL	(z ang. anti-cytotoxic T lymphocyte) przeciwciała przeciwko cytotoksycznym limfocytom T
APC	(z ang. antigen presenting cell) komórka prezentująca antygen
AVARDA	(AntiViral Antibody Response Deconvolution Algorithm) wielomodułowy pakiet oprogramowania do analizy zbiorów danych VirScan
BAL	(z ang. bronchoalveolar lavage) popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe
BLAST	(ang. Basic Local Alignment Search Tool) narzędzie informatyczne do przyrównywania sekwencji
BSA	(z ang. bovine serum albumin) surowicza albumina wołowa
CD4+	(z ang. cluster of differentiation 4+) kompleks różnicowania 4+
cDNA	(z ang. complementary DNA) komplementarny DNA
CFA	(z ang. complete Freund's adjuvant) kompletny adjuwant Freund'a
COVID-19	(z ang. coronavirus disease 2019) choroba koronawirusowa 2019
CpG	regiony w genomie o podwyższonej zawartości dinukleotydów 5'-CpG-3'
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	(z ang. deoxyribonucleic acid) kwas deoksyrybonukleinowy
dsDNA	(z ang. double-stranded DNA) dwuniciowe DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	(z ang. ethylenediaminetetraacetic acid) kwas etylenodiaminotetraoctowy

ELISA	(z ang. enzyme-linked immunosorbent assay) test immunoenzymatyczny
FcRn	(z ang. Neonatal Fc receptor) noworodkowy receptor Fc
FMDV	(z ang. Foot-and-mouth disease virus) wirus pryszczycy
GeneBank	bioinformatyczna baza danych zawierająca zbiór genowych sekwencji nukleotydowych (NCBI)
gp	(z ang. Gene product) produkt genu
H1N1	podtyp wirusa grypy typu A zawierający podjednostki H1 i N1
H3N2	podtyp wirusa grypy typu A zawierający podjednostki H3 i N2
HIV	(z ang. human immunodeficiency virus) ludzki wirus niedoboru odporności
Hoc	(z ang. highly antigenic outer capsid protein) silnie-antygenowe zewnętrzne białko kapsydu T4
HSV-1	(z ang. herpes simplex virus 1) wirus opryszczki pospolitej 1
IBBR	(z ang. Institute for Bioscience and Biotechnology Research) Instytut Badań Biologicznych i Biotechnologicznych
IgA	(z ang immunoglobulin A) immunoglobulina typu A
IgD	(z ang immunoglobulin D) immunoglobulina typu D
IgE	(z ang immunoglobulin E) immunoglobulina typu E
IgG	(z ang immunoglobulin G) immunoglobulina typu G
IgG1	(z ang immunoglobulin G1) immunoglobulina typu G1
IgG2	(z ang immunoglobulin G2) immunoglobulina typu G2
IgM	(z ang immunoglobulin M) immunoglobulina typu M
Igs	(z ang immunoglobulins) immunoglobuliny
IgY	(z ang immunoglobulin Y) immunoglobulina typu Y
IITD PAN	Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk

INF-γ	interferon gamma
LB	(z ang. Luria-Bertani broth) pożywka płynna do hodowli bakterii
M	marker masy DNA do elektroforezy żelowej
MCP	(z ang. major capsin protein) główne białko kapsydu
MHC I	(z ang. major histocompatibility complex class I) cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klasy I
MOI	(z ang. multiplicity of infection) liczba cząsteczek wirusa w przeliczeniu na jedną komórkę bakteryjną dodana podczas infekcji
MR	(z ang. mineralocorticoid receptor) receptor mineralokortykoidowy
mRNA	(z ang. messenger RNA) matrycowy RNA
NCBI	(z ang. National Center for Biotechnology Information) Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej
NGS	(z ang. next-generation sequencing) sekwencjonowanie nowej generacji
OD₆₀₀	(z ang. optical density 600) gęstość optyczna mierzona przy fali o długości 600 nm
ORF	(z ang. open reading frame) otwarta ramka odczytu
PB1	nazwa bakteriofaga atakującego bakterie <i>Pseudomonas</i>
PBS	(z ang. phosphate buffered saline) buforowany roztwór soli fizjologicznej
PCR	(z ang. polymerase chain reaction) łańcuchowa reakcja polimerazy
PFU	(z ang. plaque forming unit) jednostka tworząca łyśinkę
pH	(z ang. potential of hydrogen lub power of hydrogen) ilościowa skala kwasowości i zasadowości roztworów wodnych związków chemicznych, ujemny logarytm stężenia jonów wodorowych (H ⁺)
PhageScan	technologia do badania interakcji pomiędzy wirusami bakteryjnymi a układem odpornościowym

POChP	przewlekła obturacyjna choroba płuc
RefSeq	(z ang. Reference Sequence) ogólnodostępna baza danych nukleotydowych sekwencji referencyjnych i ich produktów białkowych (NCBI)
rpm	(z ang. revolutions per minute) obroty na minutę
rRNA	(z ang. ribosomal RNA) rybosomalny, rybosomowy RNA
RTD	(z ang. routine test dilution) standardowa metoda rozcieńczeniowa
Sars-CoV-2	(z ang. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) koronawirus zespołu ostrej niewydolności oddechowej 2
scFv	(z ang. single-chain variable fragment) jednołańcuchowy fragment zmienny
ssDNA	(z ang. single stranded DNA) jednoniciowy DNA
TBE	Tris-boran-EDTA
TBST	(z ang. tris buffered saline + tween 20) sól fizjologiczna buforowana Trisem z dodatkiem Tweenu 20
TLR 9	(z ang. Toll-like receptor 9) receptor Toll-podobny 9
Tris	2-amino-2-hydroksymetylo-propan-1,3-diol
UniProt	(z ang. Universal Protein Resource) ogólnodostępna baza danych dotycząca sekwencji białkowych
UV-VIS	bliski ultrafiolet-obszar widzialny
VirScan	technologia do badania interakcji pomiędzy wirusami eukariotycznymi a układem odpornościowym [Xu i in., 2015]
VLP	(z ang. virus-like particle) cząsteczki wirusopodobne

1. Wstęp

1.1 Phage display

Opracowana ponad 30 lat temu technologia prezentowania obcych elementów peptydowych na wirionach fagowych nazywana „phage display” to technika molekularna, w której bakteriofag jest modyfikowany w taki sposób, aby na swojej powierzchni prezentował obce peptydy lub białka. Te peptydy lub białka są połączone z jednym z białek płaszcza fagowego. Popularnym przykładem białek prezentowanych na powierzchni faga mogą być fragmenty przeciwciał, takie jak jednołańcuchowe fragmenty zmienne (scFv) [Sioud, 2019; Tan i in., 2016]. Najczęściej, aby osiągnąć ten efekt, egzogenne sekwencje DNA będące przedmiotem zainteresowania są wprowadzane w określone miejsce w sekwencji nukleotydowej genomu faga, która koduje jedno z białek płaszcza faga, tak, aby mogła powstać fuzja białka fagowego i obcego elementu. Kiedy nastąpi infekcja bakterii-gospodarza przez faga, rozpoczyna się ekspresja genomu fagowego, a uzyskana fuzja jest wbudowywana w strukturę wirionu, co pozwala na pojawienie się obcego elementu na powierzchni faga [Jaroszewicz i in., 2021].

Metoda phage display znalazła szerokie zastosowanie ponieważ opiera się na fakcie, iż genotyp i fenotyp faga są fizycznie powiązane- oznacza to, że określając dokładną sekwencję genomu, w tym sekwencję włączonych do niego obcych elementów, możemy jednoznacznie określić, jakie obce białko/peptyd znalazły się na konkretnej części fagowej. Powiązanie genotypowo-fenotypowe jest więc wykorzystywane do selekcji określonych klonów (np. selekcji w kierunku zdolności do wiązania z wybranym celem molekularnym), a następnie natychmiastowej identyfikacji sekwencji aminokwasowej poszczególnych czynników wiążących (prezentowanych peptydów lub białek) poprzez sekwencjonowanie DNA wstawek w genomie faga [Jaroszewicz i in., 2021]. Phage display jest więc używany do tworzenia bibliotek, które mogą zawierać nawet ponad 10^{10} różnych wariantów fagów. Wielkoskalowe biblioteki bakteriofagowe mogą być przechowywane przez długi czas, ze względu na dużą odporność bakteriofagów. Metoda ta pozwala uniknąć indywidualnej syntezy lub klonowania i ekspresji genów dla wielu różnych peptydów (np. fragmentów przeciwciał), a następnie oczyszczania i analizy każdego konkretnego konstruktu pojedynczo [Jaroszewicz i in., 2021; Arap, 2005; Marintcheva, 2017].

Jako metoda pozwalająca na tworzenie wielkoskalowych bibliotek, phage display to wysokowydajna technologia przesiewowa, która pozwala na poszukiwanie białek i peptydów zdolnych do wiązania celu molekularnego będącego przedmiotem zainteresowania badacza. Pomimo istnienia innych metod *in vitro*, takich jak prezentacja na powierzchni drożdży, prezentacja rybosomalna, prezentacja puromycynowa to metoda prezentacji fagowej ze względu na swoje zalety: dużej zdolności przesiewowej, masowej produkcji w prostych hodowlach mikrobiologicznych i prostoty użycia jest szeroko stosowana w bioinżynierii i biomedycynie, zwłaszcza w opracowywaniu nowych technik w diagnostyce i terapii, gdzie prowadzona jest selekcja ludzkich przeciwciał i peptydów wiążących np. komórki nowotworowe.

Wraz z pojawieniem się technologii sekwencjonowania następnej generacji metoda phage display stała się jeszcze potężniejszym i bardziej popularnym narzędziem do odkrywania i opracowywania leków, ponieważ identyfikacja wariantów aktywnych (wiązących) w oparciu o powiązanie genotypowo-fenotypowe jest coraz łatwiejsza i wydajniejsza [Liu i in., 2020; Sioud 2019]. Ze względu na szerokie zastosowanie techniki phage display, połowa Nagrody Nobla w dziedzinie chemii za rok 2018 została przyznana dwóm naukowcom będącym twórcami phage display. Otrzymali ją George P. Smith oraz Sir Gregory P. Winter za opracowanie i zastosowanie techniki phage display w odkrywaniu i izolacji przeciwciał [Anand i in., 2021; Barderas, 2019]. Odkrycie zrewolucjonizowało rozwój chemii i biofarmaceutyków oraz stworzyło podwaliny pod nowe odkrycia dotyczące przeciwciał, mapowanie epitopów i selekcję powinowactwa [Jaroszewicz i in., 2021]. Dzięki zastosowaniu technologii phage display ludzkie przeciwciała monoklonalne mogą być produkowane bez immunizacji [Sioud, 2019].

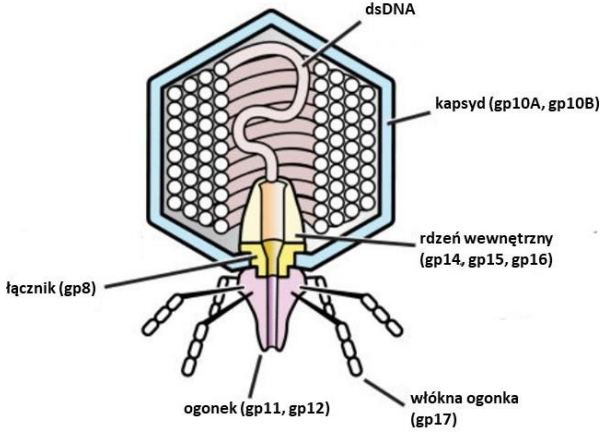
1.2 Bakteriofag T7: struktura i biologiczne właściwości

Bakteriofagi znajdują szerokie zastosowanie jako wektory genetyczne ze względu na swoją prostą strukturę oraz mało złożony genom [Tan i in., 2016]. Najczęściej stosowanymi systemami prezentacji fagowej są systemy oparte o fagi filamentowe (M13, fd, f1). Jednak szczegółowe poznanie struktury, genetyki i cykli życiowych niektórych innych bakteriofagów

dało podstawę do budowy systemów prezentacji fagowej z ich wykorzystaniem [Jaroszewicz i in., 2021]. Jednym z takich bakteriofagów jest fag T7.

Bakteriofag T7 należący do rodziny *Podoviridae* został opisany w 1945 roku jako jeden z siedmiu fagów replikujących się w *Escherichia coli*. Bakteriofag T7 zawiera materiał genetyczny w formie liniowego dwuniciowego DNA o długości 39 937 pz upakowanego w ikozaedrycznym kapsydzie o średnicy 60 nm. DNA tego faga koduje ok. 50 białek, w tym sześć białek głównych: gp10A, gp10B, gp8, gp11, gp12 oraz gp17 kodujących odpowiednio: główne białko kapsydu, mniejsze białko kapsydu, białko łączące, białka ogonka oraz białka włókna ogonka. Oba białka gp11 i gp12 tworzą ogonek o długości 29 nm, który umożliwia wiązanie faga T7 do komórki gospodarza czyli bakterii *E. coli*. W wypadku użycia tego faga jako platformy phage display, białka fuzyjne są prezentowane na C-końcu głównego białka kapsydu (gen 10), który obejmuje gp10A (344 aminokwasy) i gp10B (397 aminokwasów). Gp10A i gp10B są produktami genu 10 i w normalnych warunkach ulegają ekspresji w stosunku 9:1. Gp10B jest wynikiem przesunięcia ramki odczytu na końcu ramki kodującej gp10A. Proporcja gp10A i gp10B może zmieniać się w zależności od warunków, jednak nie wpływa to na aktywność faga. Pozostałe białka tworzące strukturę bakteriofaga T7 oraz ich funkcje zostały przedstawione w Tabeli 1. Prezentacja dużej liczby białek fuzyjnych (tj. 415 kopii) na całej powierzchni kapsydu koreluje z dużą wydajnością klonowania i pakowania, co przekłada się na dużą wydajność biblioteki T7 phage display [Anand i in., 2021; Deng i in., 2018; Jaroszewicz i in., 2021].

Tabela 1. Budowa bakteriofaga T7 i funkcje białek tworzących jego strukturę.

	Białko	Funkcja
 <p data-bbox="375 795 798 840"><i>Na podstawie Serwer i in., 2008.</i></p>	gp10A, gp10B	budowa kapsydu
	gp8	łączenie ogonka z kapsydem
	gp11, gp12	budowa ogonka
	gp17	budowa włókien ogonka
	gp14, gp15, gp16	tworzenie szlaku przez zewnętrzną błonę komórki bakteryjnej, po początkowym etapie infekcji

1.2.1 Zalety systemu phage display T7

Wektory bakteriofagów filamentowych cechują się ograniczoną zdolnością klonowania, która w przypadku bakteriofaga M13 wynosi <1500 pz, a ich genom wykazuje znacznie mniejszą stabilność po wstawieniu obcego DNA. W przeciwieństwie do tego, zrekombinowany bakteriofag T7 jest bardzo stabilny nawet przy wstawkach obcych genów powyżej 3000 pz, co umożliwia konstrukcję dużych bibliotek [Jaroszewicz i in., 2021; Deng i in., 2018; Deutscher, 2019]. Jest to związane z dużą różnicą wielkości tych genomów, fagi M13 i T7 mają (odpowiednio) genomy wielkości ok. 6400 pz oraz ok. 40 000 pz.

W porównaniu do M13, zalety T7 jako wektora dotyczą również faktu, iż T7 mnoży się szybko i tworzy łyaski w ciągu 3 godzin, co oszczędza czas podczas klonowania i przeszukiwania bibliotek [Deng i in., 2018]. Lityczny mechanizm propagacji faga T7 ułatwia prezentację dużego polipeptydu lub nawet białka, co w przypadku faga M13 jest wyzwaniem lub czasami nie jest niemożliwe. Jest to związane z jego Nielityczną propagacją, czyli eksportem wszystkich składników cząsteczki faga przez wewnętrzną błonę bakteryjną. W związku z tym tylko białka, które nadają się do takiego eksportu mogą być prezentowane na kapsydzie faga M13 [Danner i in., 2001; Yue i in., 2022]. Kolejną zaletą bakteriofaga T7 jest jego stabilność w trudnych warunkach środowiskowych (np. wysoka temperatura, niskie pH) [Jaroszewicz

i in., 2021]. Konstrukcja bibliotek faga T7 ma także wiele zalet technologicznych, które związane są z szeroką dostępnością niezbędnych odczynników, szybkością wykonania procedury, przy jednoczesnych niewielkich wymaganiach sprzętowych. Wszystkie te zalety powodują, że bakteriofag T7 jako platforma phage display był wykorzystywany w licznych badaniach i przyczynił się do wielu odkryć naukowych (Tabela 2).

1.2.1 Ograniczenia systemu phage display T7

Mimo wielu zalet metoda T7 phage display ma również ograniczenia. W wypadku białek eukariotycznych ważne modyfikacje potranslacyjne, takie jak: fosforylacja, glikozylacja, prenylacja oraz dostosowywanie końca C i N, nie mogą być prezentowane na bakteriofagu T7, co związane jest z ograniczeniami wynikającymi z biologii gospodarza [Deng i in., 2018; Jaroszewicz i in., 2021]. Bardzo duże, skomplikowane, wielodomenowe i związane z błoną białko prawdopodobnie nie będzie prawidłowo prezentowane na powierzchni faga T7. Ponadto, w wypadkach, kiedy nie zostanie zastosowane projektowane klonowanie w ustalonych miejscach restrykcyjnych, dwie trzecie egzogennych genów w bibliotekach T7 jest wstawianych z genem białka płaszczka faga poza ramką odczytu, co skutkuje wyświetleniem losowych fragmentów peptydów, które nie są kodowane przez dołączony gen [Piggott i Karuso 2016]. Prezentacja fagowa T7 jest zależna od ekspresji genów w żywych komórkach gospodarza (*E. coli*) co związane jest z ograniczeniami jeśli ekspresjonowane i prezentowane mają być toksyczne białka lub peptydy [Deng i in., 2018].

Warto jednak podkreślić, że wiele z tych teoretycznych ograniczeń prezentacji cząsteczek na bakteriofagu T7 jest w praktyce nieistotnych ze względu na bardzo dużą liczbę cząsteczek fagowych, które można otrzymać w małej objętości próbki [Jaroszewicz i in., 2021; Piggott i Karuso, 2016]. Na przykład, typowy lizat faga T7 zawiera 10^{12} klonów na ml, więc nawet jeśli tylko 0,1% klonów zawiera użyteczne białka, to wciąż jest to więcej niż potrzebna pojemność biblioteki do prezentacji typowego genomu eukariotycznego z doskonałym pokryciem [Piggott i Karuso, 2016].

Tabela 2. Przykłady wykorzystania metody phage display opartej na bakteriofagu T7.

Bibliografia	Cel prowadzonych badań	Prezentowana biblioteka	Wyniki/Wnioski
T7 jako system do selekcji genetycznej <i>in vitro</i>			
Danner i Belasco, 2001,	Selektywna amplifikacja faga T7, który prezentuje na swojej powierzchni konkretne białka wiążące RNA.	Biblioteka cDNA ludzkiego płuca (wielkość biblioteki: 1.2×10^7 niezależnych klonów).	Phage display T7 można wykorzystać do szybkiego i selektywnego klonowania praktycznie każdego białka, które wiąże się ze znanym elementem regulatorowym RNA, w tym z tymi, które wiążą się z niskim powinowactwem lub które muszą konkurować o wiązanie z innymi białkami.
T7 jako nośnik szczepionek przeciwnowotworowych lub profilaktycznych			
Shadidi i in., 2008	Ekspresja kilku antygenów nowotworowych na powierzchni faga T7 i sprawdzenie odpowiedzi immunologicznej u myszy po podaniu doustnym modyfikowanego faga T7.	Biblioteka cDNA przygotowana z linii komórek rakowych.	Wywołanie specyficznej odpowiedzi immunologicznej (hamowanie wzrostu guza i przerzutów) u myszy BALB/c po immunizacji doustnej zmodyfikowanym fagiem T7 prezentującym na swojej powierzchni antygeny nowotworowe. Metody proteomiczne mogą identyfikować antygeny nowotworowe prezentowane na fagach, co może stanowić skuteczną strategię dla szczepionek. Macierze fagów prezentujących antygeny nowotworowe mogą być przydatne jako test przesiewowy (oparty na surowicy) do wykrywania kilku antygenów nowotworowych.
Wong i in., 2013	Prezentacja epitopu VP1 wirusa pryszczycy na bakteriofagu T7 i sprawdzenie odpowiedzi immunologicznej u bydła zaszczepionego rekombinowaną cząsteczką faga T7.	Biblioteka immunodominującego regionu białka kapsydu VP1 wirusa pryszczycy (FMDV z ang. foot-and-mouth disease virus) (brak informacji o wielkości biblioteki).	Immunodominujący region białka kapsydu VP1 wirusa pryszczycy (FMDV) uległ fuzji z bakteriofagiem T7 i został wyekspresjonowany na powierzchni białka kapsydu bakteriofaga T7. Rekombinowane białko o masie około 42 kDa wykryto za pomocą przeciwciała monoklonalnego anti-T7-tag w analizie Western blot. Fagowy test ELISA wykazał, że surowice bydła zaszczepione oraz dodatnie reagowały znacząco z rekombinowaną cząsteczką faga T7.

T7 jako nośnik antygenów wykorzystywanych w diagnostyce chorób			
Talwar i in., 2015	Opracowanie biblioteki fagów T7 do wykrywania sarkoidozy i gruźlicy przez panel nowych antygenów.	Biblioteka cDNA pochodząca z mRNA wyizolowanego z komórek BAL otrzymanych po płukaniu oskrzelowo-pęcherzykowym i leukocytów pacjentów z sarkoidozą.	Zidentyfikowanie 50 klonów faga T7, które rozróżniają gruźlicę, sarkoidozę i zdrową kontrolę. Zsekwencjonowano 10 najlepszych klonów specyficznych dla sarkoidozy i gruźlicy, przeszukano homologie w publicznej bazie danych i ujawniono unikalne epitopy i mimotopy w każdej grupie. Po raz pierwszy pokazano, że screening immunologiczny biblioteki dostarczonej od pacjentów z sarkoidozą rozróżnia antygeny sarkoidozy i gruźlicy. Nowe markery mogą poprawić diagnostykę sarkoidozy i gruźlicy oraz mogą pomóc w opracowaniu lub ocenie szczepionki przeciw gruźlicy.
T7 jako nośnik cząsteczek stymulujących odpowiedź immunologiczną			
Pouyanfard i in., 2012	Indukcja ochronnych odpowiedzi epitopów anty-CTL (MHC I) przeciwko komórkom raka piersi HER-2 pozytywnym prezentowanym na zmodyfikowanym fagu T7.	Syntetyczne DNA kodujące białko p66 i białko p66x2.	Splenocyty wyizolowane od myszy immunizowanych zmodyfikowanymi fagami odpowiedziały na ponowną stymulację p66 wytwarzając znaczną odpowiedź IFN- γ . Poziomy produkcji cytokin były wyższe niż w komórkach wyizolowanych od myszy immunizowanych p66 zemulgowanym w silnym adjuwancie CFA. Praca wykazała, że powtarzalna prezentacja immunogennych peptydów przy pomocy metody T7 phage display czyni z niej obiecującą technologię przewycięzania tolerancji immunologicznej w celu wytworzenia silnej przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Technologia T7 phage display określona została jako wysoce wydajna platforma do prezentacji peptydów, która jest bardzo immunogenna i promuje wychwyt przez APC, czego nie można powiedzieć o peptydach (szczepionkach peptydowych), które są słabo immunogenne i wymagają włączenia silnego adiuwantu w celu wygenerowania odpowiedzi specyficznej dla antygeny.
T7 jako narzędzie do badania oddziaływań molekularnych			
Yang i in., 2014	Identyfikacja nowych białek oddziaływujących z receptorami mineralokortykoidowymi (MR) z wykorzystaniem technologii T7 phage display.	Biblioteka cDNA ludzkiego serca oraz biblioteka cDNA pochodzenia nerkowego.	Metoda phage display została wykorzystana do przeszukiwania tkankowo-selektywnych bibliotek cDNA pod kątem białek oddziałujących z potencjalnie nowymi koregulatorami mineralokortykoidowymi. Zidentyfikowano trzydzieści peptydów wiążących MR, z których wybrano trzy do dalszej charakteryzacji m.in. na podstawie ich lokalizacji jądrowej i ich interakcji z innymi białkami oddziałującymi z MR. Uzyskane w badaniu wyniki podkreślają użyteczność metody do szybkiego i czułego badania przesiewowego białek wiążących MR.

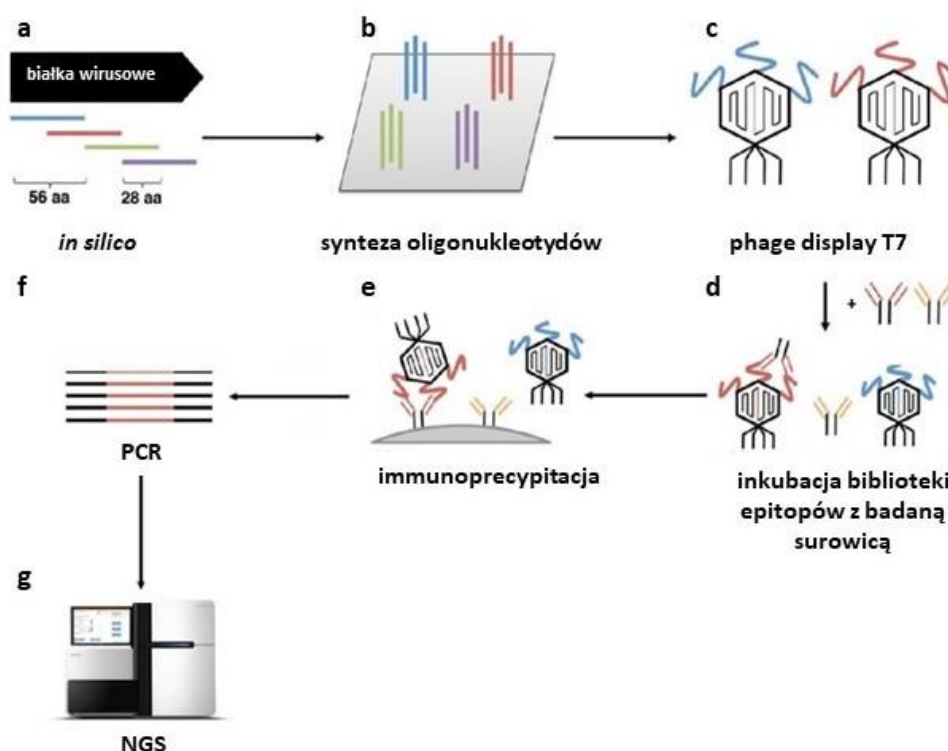
			Wykazano, że eukariotyczny czynnik przedłużenia 1A1, białko 1 rozpoznające specyficzne struktury i białko 6 krzyżowo komplementarne naprawiające się pod wpływem promieniowania rentgenowskiego mogą być potencjalnymi koaktywatorami MR, których aktywność jest zależny od liganda, kontekstu komórkowego i promotora genu docelowego.
T7 jako narzędzie do wykrywania antygenów i epitopów			
Hashemi i in., 2012	Sprawdzenie odpowiedzi immunologicznej u myszy po immunizacji nanocząsteczkami bakteriofaga T7 niosącego na swojej powierzchni cząsteczki peptydu M2e.	Syntetyczne DNA kodujące peptyd M2e.	Prezentacja ektodomeny białka M2 wirusa grypy A na powierzchni faga T7 oferuje wydajną i ekonomiczną możliwość indukowania krzyżowej odporności przeciwko grypie typu A opartej o M2e. Immunizacja myszy T7-M2e (bez adjuwantu) wywołała odpowiedzi przeciwciał swoistych dla M2e w surowicy, których ilość była podobna do tej wywoływanej przez peptyd podawany w adiuwancie Freund. Porównywalne odpowiedzi IgG skierowane przeciwko kapsomerom faga T7 indukowano po szczepieniu dzikim typem T7 lub T7-M2e. Immunizacja T7-M2e indukowała zrównoważone ilości przeciwciał IgG1 i IgG2a, a przeciwciała te specyficznie rozpoznawały natywne M2 na powierzchni komórek ssaków zakażonych wirusem grypy A. Częstość limfocytów T wydzielających IFN- γ indukowanych przez nanocząstki T7-M2e była porównywalna do tych wywoływanych przez peptyd M2e emulgowany w adiuwancie Freund. Ponadto myszy immunizowane T7-M2e były chronione przed śmiertelną prowokacją wirusem H1N1 lub H3N2, co sugeruje indukcję heteropodtypowej odporności w badanym modelu mysim.
Xu i in., 2015	Profilowanie serologiczne populacji ludzkiej z wykorzystaniem syntetycznego ludzkiego wiromu.	Syntetyczne DNA kodujące peptydy wirusów eukariotycznych (2×10^5 reprezentacji każdego klonu bakteriofaga T7)	Opracowanie wysokoprzepustowej techniki VirScan służącej do badania interakcji między wirusem eukariotycznym a układem odpornościowym. Metoda ta polega na analizie przeciwciał przeciwwirusowych przy użyciu immunoprecypitacji i masowego równoległego sekwencjonowania DNA biblioteki bakteriofagów T7 prezentujących peptydy obejmujące cały proteom wszystkich ludzkich wirusów. Przetestowane zostało ponad 10^8 interakcji przeciwciało-peptyd u 569 ludzi na czterech kontynentach, prawie podwajając liczbę wcześniej ustalonych epitopów wirusowych.

1.3 VirScan -nowe narzędzie do profilowania serologicznego

Ludzki wirus ma duży wpływ na ludzkie zdrowie i odporność. Jednak tradycyjne metody wykrywania infekcji wirusowych i odpowiedzi przeciwwirusowej ze strony układu odpornościowego mają ograniczoną przepustowość i zasięg. W badaniu opublikowanym w Science, Xu i in. (2015) opisali wysokowydajną metodę kompleksowej analizy przeciwciał przeciwwirusowych, która może znacznie poszerzyć badania wirusom. Metoda, nazwana VirScan, wykorzystuje nowatorskie podejście pozwalające na kompleksowe profilowanie serologiczne populacji, czyli identyfikację przeciwciał specyficznych do wirusów przy użyciu syntetycznego ludzkiego wirusa. Xu i in. zastosował bibliotekę bakteriofagową zawierającą peptydy reprezentujące wirusy eukariotyczne i z jej wykorzystaniem przeprowadził immunoprecypitację połączoną z sekwencjonowaniem nowej generacji. Było to możliwe dzięki zaawansowanej technologii syntezy oligonukleotydów opartej o tzw. uwalniane mikromacierze DNA, a uzyskana w ten sposób biblioteka oligonukleotydów została sklonowana do systemu phage display i umożliwiła prezentację bakteriofagową peptydów wirusowych, w tym peptydów z 206 gatunków wirusów odpowiadających 1000 różnym szczepom, o których wiadomo, że zakażają ludzi.

Ważnym etapem VirScan jest sekwencjonowanie nowej generacji, ponieważ to dzięki niemu można określać sekwencje DNA kodujące peptydy rozpoznawane przez przeciwciała w próbkach krwi badanych osób. Ta kombinacja podejść serologicznych i opartych na sekwencjonowaniu jest wysokoprzepustową metodą badania interakcji między ludzkim układem odpornościowym a wirusem. Co więcej, ponieważ VirScan wykorzystuje syntetyczny wirus do wykrywania przeciwciał przeciwko wirusom, nie tylko wykrywa niedawne lub obecne infekcje wirusowe u danej osoby, ale do pewnego stopnia umożliwia odtworzenie skumulowanej historii infekcji wirusowych i szczepień (przeciwwirusowych) w ciągu życia danej osoby [Xu i in., 2015; Burnham i McAdam, 2016]. W pracy przetestowano ponad 10^8 oddziaływań przeciwciało-peptyd u 569 ludzi na czterech kontynentach, niemal podwajając liczbę wcześniej poznanych epitopów wirusowych. Wykryte zostały przeciwciała rozpoznające średnio 10 gatunków wirusów eukariotycznych na jedną badaną osobę i 84 gatunki u co najmniej dwóch testowanych osób. Chociaż wskaźniki narażenia na specyficzne wirusy były niejednorodne w populacjach, odpowiedzi przeciwciał były ukierunkowane na te same lub bardzo podobne „publiczne epitopy” dla każdego wirusa, co sugeruje, że mogą one

efektywnie wzbudzać przeciwciała. VirScan to nowatorskie i wysokoprzepustowe podejście do badania interakcji między wirusem a układem odpornościowym [Xu i in., 2015]. Poszczególne etapy metody VirScan zostały przedstawione i opisane na Rysunku 1.



Rysunek 1. Etapy metody VirScan: **a**) projektowanie sekwencji oligonukleotydów kodujących fragmenty białek wirusowych w oparciu o informacje dostępne w bazach danych, **b**) synteza oligonukleotydów w oparciu o tzw. uwalniane mikromacierze DNA, **c**) klonowanie zsyntetyzowanych oligonukleotydów do genomu bakteriofaga T7 (phage display) w celu przygotowania biblioteki bakteriofagów eksponujących potencjalne epitopy wirusów eukariotycznych, **d**) inkubacja biblioteki epitopów z badaną surowicą, **f**) immunoprecypitacja- strącanie epitopów za pomocą swoistych przeciwciał występujących w surowicach ludzkich poddanych profilowaniu serologicznemu, **f**) izolacja i amplifikacja pozyskanego w wyniku immunoprecypitacji materiału DNA (PCR), **g**) sekwencjonowanie NGS w celu określenia immunoprecypitowanych epitopów wirusów eukariotycznych [zmodyfikowane na podstawie Xu i in., 2015]

1.3.1 VirScan jako użyteczne narzędzie do profilowania serologicznego- przykłady zastosowania

Hasan i in. (2021) ocenili związek między otyłością a występowaniem w organizmie pacjenta szerokiej gamy wirusów, za pomocą kompleksowej analizy opartej na metodzie VirScan. Analizie zostały poddane próbki surowicy zarówno dorosłych jak i dzieci z Kataru (osoby szczupłe oraz otyłe). Nie stwierdzono związku pomiędzy obecnością określonych wirusów a otyłością w populacji pediatrycznej. Odmienne wyniki uzyskano dla populacji osób dorosłych, gdzie wyniki sugerują, że otyłość Katarczyków może być związana z większą częstością występowania infekcji wirusem opryszczki, w szczególności HSV-1 (wirus opryszczki pospolitej 1). Ponadto wysoka częstość występowania przeciwciał przeciwko epitopom peptydowym HSV-1 i -2 w populacji otyłych sugeruje, że te peptydy wirusowe mogą wpływać na przebieg adipogenezy. W badaniach zastosowano rozszerzoną bibliotekę phage display (2×10^{10} PFU) prezentującą w sumie 115 753 peptydów wirusowych [Hasan i in., 2021].

Liu i in. (2020) zademonstrowali, w jaki sposób historia infekcji wirusowych, rozpoznana na podstawie próbek krwi ludzkiej i analizy przeciwciał przeciwwirusowych VirScan może posłużyć do stworzenia sygnatury ekspozycji na ludzkie wirusy określającej wczesne stadium raka wątrobowokomórkowego. Sygnatura identyfikowała zagrożonych pacjentów z rakiem przed postawieniem diagnozy klinicznej; była lepsza od metody opartej na określaniu stężeniu białka wytwarzanego przez komórki rakowe- alfa-fetoproteiny [Liu i in., 2020].

Użyteczność wysokowydajnej metody VirScan została przetestowana w obserwacji kohorty biorców przeszczepów, co zostało opisane przez Isnarda i in. (2019) Do badania włączono 45 biorców przeszczepu nerki i przeprowadzono profilowanie serologiczne badanej populacji i identyfikację epitopów ludzkich wirusów najczęściej rozpoznawanych przez przeciwciała znajdujące się w surowicy pacjentów w dniu 0 i +365 . Wykryto odpowiedzi przeciwciał na 39 z 206 gatunków wirusa obecnych w bibliotece VirScan, średnio 12 gatunków wirusa na próbkę. Wykazano, że przeciwwirusowa odporność humoralna nie jest istotnie zmieniana przez badane schematy immunosupresyjne, w tym leczenie rytuksymabem. Testy ELISA wykonane w dniu 0 dla sześciu gatunków wirusa wykazały zgodność z zastosowaną

technologią VirScan bliską 100%, a zakażenie wirusowe udokumentowane metodą PCR stwierdzono u czterech z pięciu pacjentów przebadanych metodą VirScan. Uzyskane wyniki wskazują, że VirScan oferuje bezprecedensową możliwość testowania i monitorowania infekcji wirusowej po przeszczepie w oszczędny i łatwy sposób. Użyta w badaniach biblioteka peptydów wiromu składała się z 93 904 różnych 56-aminokwasowych peptydów zawartych w proteomach 206 gatunków wirusów [Isnard i in., 2019].

Metoda VirScan znalazła swoje zastosowanie w ocenie potencjalnego związku pomiędzy ekspozycją na określone wirusy a postępującą demencją i przewlekłym stanem zapalnym, w ramach Programu Nierozpoznanych Chorób (USA, Narodowy Instytut Zdrowia). VirScan ujawnił obecność przeciwciał specyficznych do wirusa dengi w płynie mózgowo-rdzeniowym, niewykrywalnych w surowicy. Autorzy podkreślają użyteczność kompleksowej metody profilowania przeciwciał w diagnostyce zapalenia mózgu o nieznanym etiologii [Johnson i in., 2019].

Badania nad ostrym wiotkim zapaleniem rdzenia kręgowego (AFM) prowadzone przez Schuberta i in. (2019) oparte były również o metodę VirScan. Badacze skonstruowali bibliotekę bakteriofagów T7 prezentującą 481 966 nakładających się peptydów pochodzących ze wszystkich znanych kręgowców oraz arbowirusów, których sekwencje zostały pobrane z baz danych UniProt i RefSeq. Przy pomocy metody VirScan zidentyfikowano wysokie poziomy przeciwciał specyficznych dla enterowirusów innych niż polio w płynie mózgowo-rdzeniowym, dostarczając tym samym wskazania na rolę Enterowirusów innych niż polio w etiologii AFM [Schubert i in., 2019].

Pou i in. (2019) wykorzystali metodę VirScan do globalnego profilowania przeciwciał matczyńskich IgG na 93 904 różne epitopy wirusowe z 206 różnych wirusów u 78 noworodków (wcześniaków i urodzonych w terminie) podczas ich pierwszych trzech miesięcy życia. Otrzymane wyniki pokazują, że skrajnie wcześniaki i dzieci urodzone w terminie są wyposażone w porównywalną odporność bierną na wirusy po urodzeniu, z repertuarem podobnym do ich matek i skoncentrowanym na określonym zestawie epitopów immunodominujących, chociaż w niższych stężeniach bezwzględnych i w konsekwencji krótszym okresie półtrwania. Wykazano również, że determinanty stężenia przeciwciał różnią się między wirusami, co sugeruje, że inne cechy cząsteczek IgG, takie jak izotypy, modyfikacje potranslacyjne i wiązanie z noworodkowym FcRn odpowiedzialnym za przenoszenie

odporności humoralnej na płód, mogą mieć znaczenie i powinny być dalej badane w przyszłości. Odkrycia te mają znaczenie dla zrozumienia podatności na choroby zakaźne, opracowywania szczepionek i planowania szczepień u noworodków [Pou i in., 2019].

Metoda VirScan wykorzystana została również do głębokiego profilowania serologicznego 232 pacjentów cierpiących na COVID-19 i porównania do 190 prób kontrolnych sprzed pandemii COVID-19. Wyniki ujawniły ponad 800 epitopów w proteomie SARS-CoV-2, w tym 10 epitopów prawdopodobnie rozpoznawanych przez przeciwciała neutralizujące. Co ważne, ujawniono znaczące korelacje między nasileniem COVID-19 a historią ekspozycji na wirusy i ogólną siłą odpowiedzi przeciwciał na przebyte infekcje. Osoby z cięższą postacią COVID-19 wykazywały silniejszą i szerszą odpowiedź na SARS-CoV-2, słabszą odpowiedź przeciwciał na wcześniejsze infekcje i większą częstość występowania przeciwciał swoistych dla cytomegalowirusa i wirusa opryszczki pospolitej 1, na co prawdopodobnie wpływ miały współzmiennie demograficzne. Wśród hospitalizowanych pacjentów wykazano, że mężczyźni wytwarzają silniejszą odpowiedź przeciwciał dla SARS-CoV-2 niż kobiety [Shrock i in., 2020].

Metoda VirScan w ostatnich latach wykorzystana została również do analizy selekcji klonów przeciwciał przeciwwirusowych u bliźniąt [Venkataraman i in., 2022], zidentyfikowania i określenia długofalowego wpływu przebytej odry na układ odpornościowy, a także pozwoliła na ponowne wykazanie znaczenia powszechnych szczepień [Mina i in., 2019]. Metodą VirScan porównano reaktywność i specyficzność przeciwciał u osób zakażonych HIV, z uwzględnieniem indukowanej leczeniem supresji wirusa i lub jej braku [Kammers i in., 2021]. Ponadto metoda VirScan wykorzystana została również do wygenerowania profilu antygenowego rozpoznawanego w ostrej odpowiedzi immunologicznej wywołanej enterowirusem A71 [Leon i in., 2020], a także badania odpowiedzi immunologicznej po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych, co może mieć potencjalny wpływ na prawidłowy dobór dawców lub monitorowanie pacjentów po przeszczepie [Ignacio i in., 2019].

Powstał już nawet wielomodułowy pakiet oprogramowania do analizy zbiorów danych VirScan- AVARDA (AntiViral Antibody Response Deconvolution Algorithm), który prawdopodobnie znajdzie szerokie zastosowanie w epidemiologii i diagnostyce chorób zakaźnych [Monaco i in., 2022].

Podsumowując, epitopy wirusów eukariotycznych są dobrze rozpoznane, do czego w dużym stopniu przyczyniło się opracowanie technologii VirScan, a bazy zidentyfikowanych epitopów zostały ostatnio znacząco powiększone dzięki jej zastosowaniu [Xu i in., 2015]. Zastosowana technologia pozwoliła na identyfikację specyficznych przeciwciał, które rozpoznają charakterystyczne epitopy wirusów i tym samym dają pewien wgląd w historię kontaktu jednostek z wirusami eukariotycznymi, a także częstość ich występowania na poziomie populacji.

1.4 Bakteriofagi jako naturalny składnik mikrobiomu

Bakteriofagi (fagi) są zróżnicowana grupa wirusów bakteryjnych infekujących bakterie, stanowią znaczący składnik mikrobiomu ssaków [Van Belleghem i wsp., 2018]. Wiele analiz metagenomicznych ludzkich mikrobiomów wskazuje na występowanie licznych fagów, których jest na ogół więcej niż wirusów eukariotycznych. Zostało to wykazane w metagenomicznej analizie mikrobioty płuc, pochwy, skóry, jamy ustnej i jelit [Navarro i wsp., 2017]. Fagi wykryto również w próbkach klinicznych takich jak płyn otrzewnowy i mocz [Brown-Jaque i wsp., 2016]. Fagi mają zdolność przekraczania warstwy komórek nabłonka, przedziałów pęcherzykowych i cytozolowych komórek eukariotycznych. Transcytoza bakteriofagów jest naturalnym i wszechobecnym procesem, który dostarcza mechanistycznego wyjaśnienia występowania fagów w organizmie [Nguyen i in., 2017]. W modelu mysim wykazano nawet przemieszczanie fagów z krwi ciężarnej samicy do tkanek płodowych [Srivastava i in., 2004].

Podczas gdy większość badań historycznie koncentruje się na praktycznym wykorzystaniu fagów do celów terapeutycznych i biotechnologicznych, dziedzina wiedzy obejmująca tzw. naturalne „społeczności” fagowe, np. w jelitach, jest stosunkowo nowa, a informacje o fagach są nadal często pomijane w metagenomowych i metatranskryptomowych bibliotekach drobnoustrojów [Townsend i in., 2021]. Bakteriofagi są obecne w jelicie ludzkim w co najmniej takiej samej liczbie jak bakterie. Mimo tego faktu, badania nad fageomem jelitowym są znacznie mniej zaawansowane niż zrozumienie wpływu bakteryjnej części mikrobiomu jelitowego na zdrowie człowieka [Fitzgerald i in., 2021]. Zbiorowiska fagowe są

ważnym składnikiem mikrobiomu, obejmując zarówno bakteriofagi, jak i fagowe elementy genetyczne zintegrowane z genomem bakteryjnym (profagi); fagi charakteryzują się zdolnością modyfikacji bakteryjnej części mikrobiomu oraz zdolnością do udziału w poziomym transferze genów gospodarza [Chen i in., 2021].

Wiadomo, że możliwe jest zastosowanie bakteriofagów w leczeniu chorób wywołanych dysbiozą bakteryjną. Takie zastosowanie fagów byłoby porównywalne ze stosowaniem probiotyków lub prebiotyków, ponieważ fagi mogą pośrednio promować wzrost pożytecznych bakterii w przewodzie pokarmowym poprzez usuwanie niepożądanych konkurentów [Fernández i in., 2021]. Fageom człowieka rozwija się od urodzenia, jest głównie pochodzenia matczynego, szybko rozwija się w odpowiedzi na wiele czynników środowiskowych, dietetycznych oraz indukcji profagów z bakteryjnej frakcji mikrobiomu, która również rozwija się dynamicznie. Początkowo fageom jest mało zróżnicowany i odpowiada populacjom bakterii tworzącym mikrobiom. Warto podkreślić zmiany różnorodności w składzie fageomu zachodzące w ciągu pierwszych dwóch tygodni życia. Fageom jelitowy niemowlęcia początkowo zdominowany jest przez fagi *Caudovirales*, następnie w wieku około dwóch i pół roku populacja zdominowana zostaje przez bakteriofagi z rodziny *Microviridae*. Fageom jelitowy dorosłego człowieka wykazuje powrót do populacji z dominacją *Caudovirales* ale z obecnością *Microviridae*, chociaż istnieje duży stopień zróżnicowania międzypersonicznego. Ta międzypersoniczna różnorodność wydaje się być stymulowana czynnikami środowiskowymi. W późniejszym okresie życia mikrobiom jelitowy zmniejsza swoją różnorodność, co prawdopodobnie może mieć wpływ na zdolności funkcjonalne fageomu. Niedawne badania wykazały, że zarówno *CrAssphage* i *Microviridae* były dwiema najbardziej stabilnymi populacjami rodzin wirusów jelitowych, co może wskazywać na ich potencjalną rolę jako części stanowiącej tzw. rdzeń fageomu [Townsend i in., 2021].

Prowadzone w ostatnich latach badania zidentyfikowały rozszerzone populacje fagów zarówno u zdrowych niemowląt jak i u pacjentów z chorobą zapalną jelit, co sugeruje odmienną aktywność fagów podczas poszczególnych faz rozwoju osobniczego i w określonych stanach chorobowych [Lawrence i in., 2019]. Przykłady stanów chorobowych związanych z zaburzeniami fageomu zostały przedstawione w Tabeli 3.

Wiele badań wykazało wysoki poziom swoistości i stabilności w czasie poszczególnych fageomów jelitowych, a także ich specyficzne zmiany w kohortach chorobowych, idące

równoległe ze zmianami w mikrobiomie bakteryjnym [Fitzgerald i in., 2021]. Na przykład, cukrzyca typu 2 jest złożoną chorobą metaboliczną, która powoduje zmiany w mikrobiomie jelitowym, zaobserwowano też różnice pomiędzy fageomem osób zdrowych i chorych. Chen i in. (2021) w swoich badaniach skupili się na zmianach w fageomie zewnątrzkomórkowym i omówili możliwe korelacje tych zmian z występowaniem cukrzycy typu 2. Badania wykonane zostały w oparciu o sekwencjonowanie 16S rRNA w celu identyfikacji bakteriofagów po izolacji VLP (cząstek wirusopodobnych) z próbek kału. W grupie osób z cukrzycą typu 2 populacja fagów jelitowych była inna niż w grupie kontrolnej bez cukrzycy. Liczebność fagów swoistych dla gospodarzy *Enterobacteriaceae* znacznie wzrosła w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo stwierdzono, że grupa ośmiu fagów odróżniała pacjentów z cukrzycą typu drugiego od osób z grupy kontrolnej bez cukrzycy [Chen i in., 2021]. Należy jednak podkreślić, że na dzień dzisiejszy nie ma żadnych dowodów na to, że zmiany w składzie fageomu są przyczyną rozwoju różnego rodzaju chorób, w tym cukrzycy typu 2. W związku z tym, że jest to początek badań nad fageomem, nie znana jest jeszcze korelacja pomiędzy składem fageomu a różnymi jednostkami chorobowymi. Nie wiemy co przeważa i co było pierwsze, czy są to zmiany w składzie fageomu, które wywołują choroby, czy może to skutkiem danej jednostki chorobowej oraz powiązanej terapii (w tym farmakologicznej) są specyficzne zmiany w składzie fageomu charakterystyczne dla danej jednostki chorobowej. Przy leczeniu wielu chorób stosowane są leki mające drastyczny wpływ na mikrobiom bakteryjny, co w konsekwencji może powodować zmiany w składzie fageomu.

U pacjentów ze spektrum autyzmu zaobserwowano zmiany w składzie mikrobiomu jelitowego, które charakteryzowały się zmniejszoną bioróżnorodnością i zmianami w liczebności bakterii beztlenowych, które potencjalnie przyczyniają się do nasilenia choroby. Wiadome jest, że fageom jelitowy zmienia się w dzieciństwie i możliwe jest, że dysbioza jelitowa w dzieciństwie może przyczynić się do rozwoju lub nasilenia zaburzeń ze spektrum autyzmu, a także kilku innych zaburzeń psychicznych. Zidentyfikowano również kilka fagów mogących stanowić biomarkery w badaniach nad ludzkimi zaburzeniami psychicznymi. Na przykład fag *Lactobacillus* φadh występuje częściej w mikrobiomie jamy ustnej i gardła u pacjentów ze schizofrenią. Zaburzenia psychiczne są niezwykle złożone, a ich bezpośrednie przyczyny wciąż pozostają nieznane. Z aktualnych doniesień naukowych wynika, że fagi, jako część większej „społeczności” mikrobiomu jelitowego prawdopodobnie będą wykazywać

korelacje w tym zakresie, ale właściwe zrozumienie przyczyn będzie możliwe dopiero wraz z przyszłymi badaniami [Townsend i in., 2021].

Zakażenie wirusem HIV jest bardzo złożonym stanem chorobowym o poważnych konsekwencjach ogólnoustrojowych dla pacjenta, nawet przy stosowaniu leków przeciwretrowirusowych. Interakcja mikrobiomu jelitowego, składników krwi i układu odpornościowego podczas stanu zakażenia wirusem HIV może powodować trudności podczas prowadzonych badań nad tym stanem chorobowym. Wydaje się, że fagi mogą odgrywać rolę w prognozowaniu postępu choroby i wpływać na odpowiedź na zastosowaną terapię. Dinh i in. (2015) oraz Zilberman-Schapira i in. (2016) szczegółowo opracowali przegląd mechanizmów za pomocą których HIV zmienia mikroflorę jelitową i sposób w jaki populacja drobnoustrojów jelitowych moduluje zróżnicowane reakcje na zakażenie. Monaco i in. (2016) nie wykazali znaczących różnic w bogactwie i różnorodności fagów obecnych w mikroflorze osób zarażonych wirusem HIV oraz u osób zdrowych (kontrola). Badania nad udziałem fagów w infekcji HIV związane są z faktem bezpośredniego oddziaływania fagów z komórkami układu odpornościowego. Osocze pacjentów z HIV/AIDS było zdominowane przez fagi i bakterie podobne do tych znajdujących się w ludzkich jelitach, podczas gdy zdrowe kontrole nie wykazywały wykrywalnych fagów w ich wiromie cyrkulującym w surowicy. Duża część wiromu osocza osób z HIV składała się z fagów *Enterobacteria* i *Pseudomonas*. Sugerowano, że fagi i bakterie wyciekają z jelit podczas zakażenia wirusem HIV i przemieszczają się do tkanek układowych [Townsend i in., 2021].

Gogokhia i in. (2019) w swoich badaniach wykazali, że bakteriofagi mogą indukować odpowiedź immunologiczną nabłonka wpływając tym samym na zdrowie ludzi i zwierząt. Zauważyli oni indukcję odporności gospodarza podczas eksperymentalnego leczenia nowotworu wywołanego przez bakterie i postanowili sprawdzić, czy bakteriofagi zmieniają odpowiedź immunologiczną. Leczenie bakteriofagami myszy wolnych od drobnoustrojów doprowadziło do ekspansji komórek odpornościowych w jelitach. Bakteriofagi *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Bacteroides* oraz sam fagowy DNA stymulowały IFN- γ poprzez aktywację szlaku zależnego od TLR9. Receptor ten obecny na komórkach dendrytycznych pozwala na rozpoznanie bakteriofagów przez te komórki, ponieważ wykrywa niemetylowane wyspy CpG charakterystyczne dla prokariotycznego DNA. Następnie mediuje stymulację komórek T CD4+ do wytwarzania IFN- γ . Zauważono, że pacjenci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego

reagujący na przeszczep mikrobioty kału mieli zmniejszoną liczbę fagów w porównaniu z osobami nieodpowiadającymi na leczenie. Śluzówkowy IFN- γ dodatkowo korelował z poziomem bakteriofagów. Bakteriofagi pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego indukowały więcej IFN- γ w porównaniu ze zdrowymi osobnikami [Gogokhia i in., 2019]. Cytokiny takie jak IFN- γ są uważane za główne czynniki stymulujące nadmierną odpowiedź immunologiczną w tej jednostce chorobowej. Odpowiedź ta prowadzi do masywnej infiltracji leukocytów i uszkodzenia błony śluzowej jelit [Langer i in., 2019].

Wiele prac wykazało już, że mikrobiom jelitowy ma ważny związek z rozwojem nadciśnienia. Badania te jednak były związane z badaniem tylko bakterii jelitowych. Han i in. (2018), przeanalizowali 196 prób danych metagenomicznych dotyczących składu wiromu kału w populacji chińskiej wśród osób zdrowych, ze stanem przednadciśnieniowym oraz nadciśnieniem. Autorzy zidentyfikowali 397 taksonów wirusowych składających się głównie z bakteriofagów we wszystkich badanych próbach. Uzyskane wyniki wykazały istnienie związku między składem ludzkiego wiromu (w tym fageomu) jelitowego a nadciśnieniem oraz pomogły w zaproponowaniu biomarkerów, potencjalnie użytecznych w diagnozie nadciśnienia na wczesnym etapie. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano, że wszystkie badane próby dzieliły się na dwa rodzaje: pierwszy, gdzie dominował bakteriofag Erwinia phiEaH2 oraz drugi, gdzie dominował *Lactococcus* 1706. Autorzy spekulują, iż obfitość tych dwóch fagów może być związana z rozwojem nadciśnienia [Han i in., 2018].

Tabela 3. Stany chorobowe, w których zaobserwowano inny skład fageomu niż obserwowany u osób zdrowych

STAN CHOROBY	BIBLIOGRAFIA
Przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP)	Gregory i in., 2018
Bakteryjne zapalenie pochwy	Jakobsen i in., 2020
Zakażenie dróg moczowych	Santiago-Rodriguez i in., 2015
Cukrzyca typu pierwszego	Tetz i in., 2019
Cukrzyca typu drugiego	Ma i in., 2018 Chen i in., 2020 Harstra i in., 2015 Park i in., 2019
Otyłość dziecięca i zespół metaboliczny	Bikel i in., 2021
Przewlekłe infekcje płuc wywołane <i>Pseudomonas aeruginosa</i> i antybiotykooporność w mukowiscydozie	Burgener i in., 2019
Rak jelita grubego	Handley i Devkota, 2019 Hannigan i in., 2018
Choroba Crohna	Lepage i in., 2008 Perez-Brocal i in., 2015 Norman i in., 2015 Wagner i in. 2013 Fernandes i in., 2019
Zaburzenia psychiczne (w tym zaburzenia ze spektrum autyzmu)	Lim i in., 2016 Shervin i in, 2016 Dickerson i in., 2017
Wrzodziejące zapalenie okrężnicy	Lepage i in. 2008 Zuo i in., 2019 Gogokhia i in., 2019
Zakażenie ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV)	Li in., 2012
Nadciśnienie tętnicze	Han i in., 2018
Choroby sercowo-naczyniowe	Jie i in., 2017 Han i in., 2018

1.5 Interakcje fagów z układem odpornościowym

Układy immunologiczne ludzi i zwierząt wystawione na działanie substancji obcej (antygeny) odpowiadają produkcją białek ochronnych: przeciwciał (immunoglobuliny, Igs). Ta specyficzna reakcja ma kluczowe znaczenie w obronie organizmu przed patogenami i toksynami, ale różnorodność nieznanymi zagrożeń sprawia, że układ odpornościowy reaguje „na wszelki wypadek” nawet na niepatogenne obiekty, takie jak bakteriofagi (fagi). Przeciwciała specyficzne do wirionów fagowych obserwowano wielokrotnie, zarówno u zwierząt traktowanych fagami, jak i u ludzi [Dąbrowska i in., 2019]. Przeciwciała specyficzne do fagów zaobserwowano również u osób które nigdy nie były celowo traktowane fagiem (np. w formie terapii fagowej), ponieważ fagi, będąc wszechobecne w środowisku i w naturalnych mikrobiomach (fageom), wnikają do ciała i stymulują układ odpornościowy [Van Belleghem i in., 2018; Hajek i in., 1967; Kucharewicz-Krukowska i Ślopek, 1987; Reyes i in., 2012; Rubinstein i in., 2000].

Przeciwciała są elementem odporności nabytej, która wymaga czasu i odpowiedniej ekspozycji aby układ odpornościowy „nauczył się” specyficznego rozpoznawania i reagowania na obce antygeny. Zazwyczaj jednak wynikająca z tego zdolność do neutralizowania obcych obiektów jest spektakularna. Głównymi efektorami odporności nabytej są limfocyty (komórki T i komórki B), które są zdolne do tworzenia różnych swoistych receptorów do rozpoznawania antygenów. Przeciwciała są wytwarzane przez komórki B, podczas gdy specyficzne dla antygeny komórki pomocnicze T mogą dostarczać sygnały stymulujące różnicowanie komórek B w komórki wydzielające przeciwciała. Zależny od komórek T typ odpowiedzi ma fundamentalne znaczenie dla powstawania pamięci immunologicznej i zachowania długotrwałej zdolności do rozpoznawania obcych epitopów i odpowiedzi na nie [Turner i in., 2020]. Wiriony fagowe zazwyczaj składają się z wielu białek pokrywających kwas nukleinowy; białka te niosą zróżnicowane epitopy. Fagi jako antygeny białkowe spełniają biochemiczną charakterystykę typowych antygenów T-zależnych [Rubinstein i in., 2000; Pyun i in., 1989; Smith i in., 2014; Nonoyama i in., 1993; Witherspoon i in., 1981].

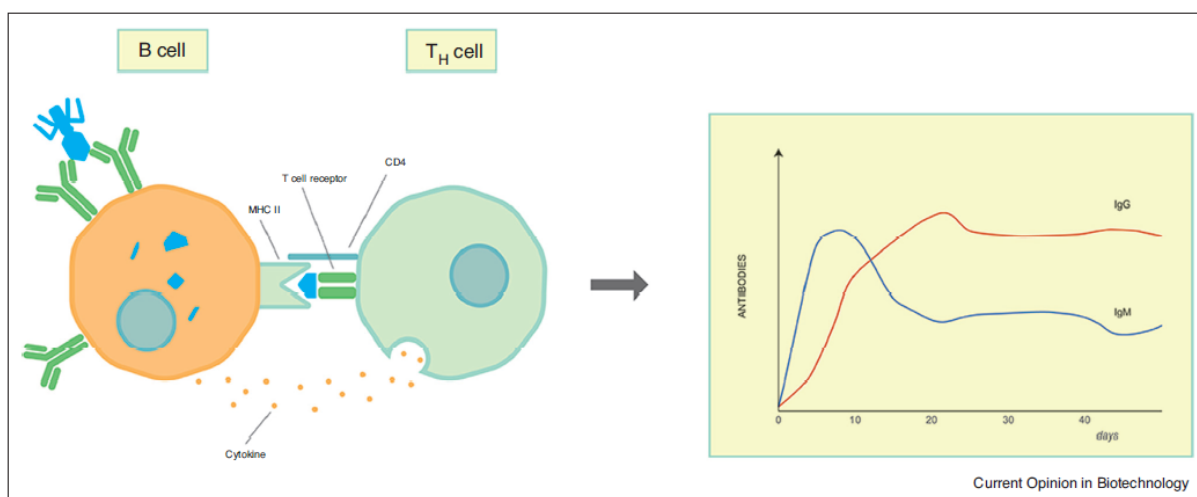
1.5.1 Rodzaje przeciwciał indukowanych przez bakteriofagi

Różne klasy (izotypy) i podklasy przeciwciał określają biologiczną rolę przeciwciał i skutki (dla danego organizmu) ich powstania. Indukcja IgM, a następnie IgG w surowicy krwi oraz wydzielanie IgA na powierzchni błony śluzowej to najczęstszy „właściwy” sposób odpowiedzi, który pozwala na skuteczną neutralizację patogenu lub toksyny, do którego te przeciwciała wykazują specyficzność. IgM i IgG są ważne dla neutralizacji ogólnoustrojowej. IgA stanowi barierę immunologiczną na powierzchni błony śluzowej. Typowo, bakteriofagi najpierw indukują swoiste IgM jako pierwotną odpowiedź na pierwsze podanie lub naturalny kontakt z fagiem. Później, szczególnie po wielokrotnym podaniu (-ach), obserwuje się wzrost swoistych IgG [Majewska i in., 2019; Żaczek i in., 2016; Uhr i in., 1962; O’Neil i in., 1988]. Wykazano również sekrecję fagowo-specyficznego IgA na powierzchni błony śluzowej, której towarzyszył wzrost IgA w krążeniu ogólnoustrojowym [Majewska i in., 2019; Dąbrowska i in., 2014; Pescovitz i in., 2011; Majewska i in., 2015]. Schemat ten może różnić się szczegółami w zależności od konkretnych warunków doświadczalnych, a szczególnie IgM lub IgA mogą wystąpić na niższym poziomie i pozostać niewykrywalne pomimo późniejszego wykrywania IgG o wysokim powinowactwie. Zatem ogólna kinetyka, która obejmuje bardzo skuteczne przełączanie klas (na IgG) jest zgodna z kinetyką opisaną dla wielu innych antygenów T zależnych, na przykład szczepionek lub innych (Rysunek 2) [Rubinstein i in., 2000; Pyun i in., 1989; Smith i in., 2014; Nonoyama i in., 1993]. Zależność tworzenia się przeciwciał rozpoznających fagi od aktywności limfocytów T wykazano u myszy po tymektomii [Snippe i in., 1976] oraz u ludzi poddanych leczeniu preparatami niszczącymi tymocyty, co skutkowało upośledzeniem wytwarzania przeciwciał antyfagowych [Witherspoon i in., 1981]. Nie można wykluczyć udziału innych typów odpowiedzi, być może również niezależnej od limfocytów T [Ochsenbein i in., 1999], ale mechanizmy te nie zostały wystarczająco poznane w wypadku fagów.

Podklasy przeciwciał fagowo-specyficznych obserwowane u ludzi, którym wstrzyknięto faga phiX174 (*Microviridae*) obejmowały głównie IgG1 i IgG2, a następnie IgG3, podczas gdy IgG4 było wykrywalne tylko po wielokrotnym podaniu fagów (trzykrotne immunizacje) [Pyun i in., 1989], (w niektórych przypadkach nadal trudno wykrywalne) [Pyun i in., 1989; Shearer i in., 2001]. U myszy, którym wstrzyknięto mieszaninę *Myoviridae*, zaobserwowano wzrost całkowitego (niespecyficznego dla faga) poziomu IgG2 w surowicy

(IgG4 nie było oceniane) [Rouse i in., 2020]; ponieważ przełączenie klasy na IgG2 jest w szczególności indukowane przez antygeny polisacharydowe, obserwacja wzrostu IgG2 po podaniu preparatu fagowego może sugerować pewien wpływ pozostałości hodowli bakteryjnej w preparatach.

Badania nad potencjalną indukcją przeciwciał klasy IgE przez fagi są ciągle bardzo skąpe, mimo, że IgE może wskazywać na nadwrażliwość i sugeruje alergię na docelowe antygeny. Zatem badanie na obecność antyfagowego IgE powinno być elementem oceny bezpieczeństwa bakteriofagów. Tymczasem IgE jest badane w kontekście bakteriofagów bardzo rzadko. We wszystkich takich przypadkach nie zaobserwowano IgE specyficznych do faga, w niektórych przypadkach nawet pomimo stosowania adiuwantów promujących IgE [Pyun i in., 1989; Wojtyła i in., 2017]. Cha i in. (2018) zaobserwowali u myszy niewielki wzrost całkowitego IgE (do 20%) (swoistość nie została określona) po traktowaniu fagami, bez odnotowania żadnych skutków fizjologicznych. Warto zauważyć, że ludzie oraz pozostałe ssaki mają te same typy przeciwciał (IgM, IgG, IgA, IgD, IgE), ale różnią się one na przykład od ptaków (IgM, IgY i IgA) lub innych zwierząt znacznie słabiej rozwiniętą swoistą odpowiedzią humoralną.



Rysunek 2. Fagi jako antygeny T-zależne. Limfocyty T stymulują limfocyty B do różnicowania się w komórki wydzielające przeciwciała, tak więc wytwarzanie IgM i IgG specyficznych dla fagów u osobników eksponowanych na fagi jest powszechne [Gembara & Dąbrowska, 2021].

1.5.2 Białka fagowe jako immunogeny

Fagi nie są prostymi antygenami. Są to złożone struktury złożone z wielu białek, z których każde posiada wiele potencjalnych epitopów. Dlatego tak zwane przeciwciała „specyficzne dla faga” są raczej sumą odpowiedzi na różne białka faga (przeciwciała są więc wtedy poliklonalne). Możliwe jest opracowanie przeciwciał, które specyficznie rozpoznają epitop na wybranym białku (monoklonalne) [Kurochkina i in., 2006], ale nie dzieje się tak w przypadku leczenia ludzi lub zwierząt kompletnymi wirionami fagowymi, ani w wypadku ekspozycji na naturalnie propagujące np. w jelicie i krążące w organizmie bakteriofagi. Bezpośrednia neutralizacja faga jest możliwa, gdy przeciwciała (monoklonalne lub poliklonalne) wiążą się z białkami fagowymi kluczowymi dla infekcji fagowej komórki bakteryjnej, np. zapobiegając wiązaniu faga do powierzchni bakterii [Jerne i in., 1956; Ledebøer i in., 2002]. Jednak przeciwciała wiążące inne miejsca wirionów mogą inicjować pośrednią neutralizację faga przez inne elementy układu immunologicznego, dlatego nie powinny być uważane za obojętne (szczegóły w podrozdziale: Współpraca elementów odporności wrodzonej z przeciwciałami specyficznymi do fagów).

Różne białka strukturalne jednego faga mogą różnić się immunogennością, oznacza to, że niektóre białka indukują wysokie poziomy IgG swoistych dla białek, podczas gdy inne nie. Wysoka immunogenność może być powiązana z dużą liczbą kopii białka w wirionie, gdy osobnik jest traktowany całymi wirionami. Na przykład główne białka kapsydu (MCP) lub główne białka ogona zostały opisane jako bardzo skuteczne induktory IgG [Dąbrowska i in., 2014]. Jest to zgodne z zależnością skuteczności indukcji przeciwciał od zastosowanej dawki antygeny. Jednak niektóre mniej liczne białka również okazały się immunogenne. Na przykład białko Hoc w fagu T4 skutecznie indukuje specyficzne przeciwciała, chociaż liczba kopii białka Hoc w każdym wirionie jest 6 razy niższa niż w przypadku MCP. Co więcej, odpowiedź specyficzna dla Hoc znacznie bardziej obniżała efektywność eksperymentalnej terapii fagowej u myszy niż odpowiedź specyficzna dla MCP [Dąbrowska i in., 2014; Majewska i in., 2015]. Warto podkreślić, że białko Hoc jest silnie eksponowanym białkiem, co może przyczynić się do tego efektu. Do tej pory nie wykryto molekularnych determinant wysokiej immunogenności Hoc.

Strukturalne białka fagowe mogą być podobne lub identyczne między różnymi szczepami fagowymi, co sprawia, że przeciwciała indukowane przez jednego faga mogą reagować krzyżowo z innym (podobnym) fagiem. Reakcje krzyżowe mogą skutkować krzyżową neutralizacją i zakłócać terapeutyczne wykorzystanie faga. Ma to ważne konsekwencje. Naturalne przeciwciała specyficzne dla fagów (wywołane przez naturalny kontakt z fagodem) występują u ludzi i zwierząt, które nigdy nie były poddawane fagoterapii, więc mogą neutralizować potencjalne fagi terapeutyczne. Skala tej neutralizacji różni się znacznie między typami fagów [Dąbrowska i in., 2014; Hodyra-Stefaniak i in., 2020,]. Prawdopodobieństwo reakcji krzyżowych przeciwciał może różnić się w zależności od typu/grupy fagów. Obserwacje te mogą stanowić kluczowe rozważania przy projektowaniu terapii fagowej, ponieważ wysoce podobne fagi mogą być neutralizowane krzyżowo przez specyficzną odpowiedź immunologiczną, co potencjalnie utrudniałoby wielokrotne terapeutyczne zastosowanie fagów [Kucharewicz-Krukowska i Śłopek, 1987; Dąbrowska i in., 2014; Hodyra-Stefaniak i in., 2020]. Jerne i Avengo (1956) i Jerne (1956) postulowali, że tylko część przeciwciał specyficznych dla fagów może być neutralizująca. Zatem indywidualna identyfikacja immunogennych białek w wirionach fagowych wraz z indywidualną oceną ich zdolności do indukowania przeciwciał neutralizujących fagi wydaje się być kluczowa dla zrozumienia w jaki sposób określony fag (lub grupa fagów) oddziałuje z układem odpornościowym oraz jak ta odpowiedź wpływa na faga [Hodyra-Stefaniak i in., 2020].

1.5.3 Współpraca elementów odporności wrodzonej z przeciwciałami specyficznymi do fagów

Specyficzna odpowiedź immunologiczna, w tym przeciwciała, nie jest odrębnym sposobem odpowiedzi immunologicznej, ale raczej wzmacnia ona i rozszerza nieswoiste, wrodzone funkcje układu odpornościowego. Przeciwciała mogą bezpośrednio celować w antygeny, ale mogą również wpływać na reakcję innych elementów układu odpornościowego, takich jak: fagocytoza i układ dopełniacza. Dzieje się tak głównie poprzez ułatwianie fagocytozy antygenów opsonizowanych przeciwciałami lub aktywację układu dopełniacza przeciwciałami, które zwiążą się z obcymi epitopami, na drodze klasycznej ścieżki aktywacji [Gruenheid i in., 2003; Maloney i in., 2020]. Zarówno fagocytoza, jak i kaskada

dopełniają przyczyniają się do usuwania fagów *in vivo* [Hajek i in., 1967; Hajek i in., 1969; Hodyra-Stefaniak i in., 2015; Barfoot i in., 1989]. Ich wzmocnienie przeciwciałami, w tym nieneutralizującymi, może dalej wpływać na farmakokinetykę, biodostępność i potencjał przeciwbakteryjną faga [Dąbrowska i in., 2019; Dąbrowska i in., 2014; Hodyra-Stefaniak i in., 2015; Hajek i in., 1966; Sokoloff i in., 2000].

1.5.4 Czy przeciwciała specyficzne do fagów mogą wpływać na wyniki terapii fagowej?

Przeciwciała mogą potencjalnie wpływać na terapię fagową na trzy główne sposoby: (1) istniejące wcześniej naturalne przeciwciała mogą zmniejszać lub zapobiegać skuteczności terapeutycznej faga, (2) szybka indukcja przeciwciał specyficznych dla terapeutycznego faga podczas leczenia może zmniejszyć lub uniemożliwić sukces terapeutyczny lub (3) przeciwciała specyficzne do fagów indukowane przez pierwsze podanie bakteriofagów mogą utrudniać kolejne podanie, gdy stosuje się tego samego lub bardzo podobnego faga. Niestety, żaden z nich nie został zbadany na tyle dokładnie, aby dostarczyć twarde dowody do sprecyzowania jasnych i uniwersalnych wniosków. Co do pierwszego problemu z istniejącymi wcześniej (przed terapią) naturalnymi przeciwciałami, nie ma danych eksperymentalnych, które mogłyby powiązać profile serologiczne leczonych pacjentów z potencjalnym sukcesem lub niepowodzeniem terapii fagowej *in vivo*. Jednak stwierdzona zdolność ludzkich surowic (od osób, które nigdy nie były poddawane fagoterapii) do neutralizacji fagów *ex vivo* silnie sugeruje, że istniejące przeciwciała mogą zmniejszać biodostępność faga [Kucharewicz-Krukowska i Ślopek, 1987; Dąbrowska i in., 2014; Hodyra-Stefaniak i in., 2020]. Być może wpływ istnienia tych przeciwciał na fagi terapeutyczne jest nadal niedoceniony.

Co ciekawe, podczas terapeutycznego zastosowaniu fagów u ludzi nie zawsze można było zaobserwować oczekiwane tworzenie się przeciwciał [Bruttin i Brussow, 2015; Hodyra-Stefaniak i in., 2020] lub bywa ono raczej słabe i nie ma wpływu na skuteczność fagów w kontrolowaniu infekcji bakteryjnej u pacjentów [Żaczek i in., 2016; Łusiak-Szelachowska i in., 2017; Bochkareva i in., 2019]. Jest to zgodne z faktem, że skuteczna swoista odpowiedź immunologiczna wymaga dostatecznej ilości czasu i odpowiedniej dawki. Zwłaszcza w terapiach eksperymentalnych u ludzi doustne podawanie fagów może wiązać się z dość

niskimi stężeniami ogólnoustrojowymi fagów i zapobiec silnej aktywacji specyficznej odpowiedzi na fagi. W modelach zwierzęcych zaobserwowano nieimmunogenne podanie doustne bakteriofagów [Denou i in., 2009] a także „okna terapeutyczne”, gdy na przykład fagi podawane w wodzie do picia lub wstrzykiwane dootrzewnowo indukowały znaczne poziomy swoistych przeciwciał dopiero po tygodniach lub nawet miesiącach [Majewska i in., 2019; Majewska i in., 2015; Denou i in., 2009; Clark i in., 2002]. Fag wstrzyknięty w celu eksperymentalnego leczenia infekcji *Pseudomonas* indukował specyficzne przeciwciała wiele dni po okresie niezbędnym dla skutecznego wyleczenia [Wang i in., 2006; Wang i in., 2006]. Zatem szybka indukcja przeciwciał swoistych dla terapeutycznego faga podczas leczenia nie wydaje się być głównym problemem w pierwszych terapeutycznych zastosowaniach faga.

Skutki odpowiedzi układu odpornościowego na wielokrotne podawanie fagów nie były badane u ludzi poddanych terapii fagowej. Nieterapeutyczny fag phiX174 u ludzi po podaniu wtórnym (lub kolejnym) indukował przeciwciała skuteczniej i szybciej niż po podaniu pierwotnym [Ochs i in., 1971]. Doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych wykazały, że przeciwciała swoiste dla fagów indukowane *in vivo* po pierwszym podaniu zmniejszały ilość aktywnych fagów w krwioobiegach po drugim (lub kolejnym) podaniu. W wielu przypadkach przeciwciała swoiste dla fagów miały na nie wyraźnie niszczący wpływ [Bradley i in., 1963; Hodyra-Stefaniak i in., 2015; Nelstrop i in., 1968; Huff i in., 2003; Huff i in., 2002]. W ramach przeglądu systematycznego „Phage-specific antibodies” [Gembara i Dąbrowska 2021] powstało zestawienie publikacji dotyczące indukcji przeciwciał przez bakteriofagi, które obejmuje 174 prace, a z nich wyekstrahowane syntetyczne dane na temat wyników eksperymentów badawczych z użyciem bakteriofagów, skupiających się na produkcji przeciwciał po podaniu fagów. Przygotowane zestawienie zostało dołączone do niniejszej pracy jako Załącznik nr 1.

Nasza wiedza na temat przeciwciał fagowych jest wciąż bardzo ograniczona (Tabela 4), a głównym ograniczeniem dla sformułowania ogólnych wniosków jest ogromna różnorodność fagów. Fagi różnią się morfologią i biochemią (np. ssDNA vs dsDNA). Nadal nie jest jasne, jak daleko można uogólnić obserwacje dotyczące jednego typu faga na inne typy fagów. Niektóre intensywnie badane fagi są stosowane lub proponowane jako fagi terapeutyczne (np. fagi z rodziny PB1), inne nie są związane z możliwymi zastosowaniami terapeutycznymi (np. phiX174). Niemniej jednak, odpowiedź immunologiczna swoista dla faga i pamięć

immunologiczna są uważane za potencjalnie utrudniające terapię fagową. Wraz z rozwojem kolekcji terapeutycznych fagów, identyfikacja epitopów specyficznych dla faga może być ważną częścią charakterystyki fagów, uzupełniając dobrze znaną charakterystykę zakresu gospodarzy i badania przesiewowe pod kątem potencjalnie niepożądanych genów w genomach fagowych.

Tabela 4. Istotne informacje i niewiadome dotyczące przeciwciał swoistych dla fagów

ZNANE	NIEZNANE/PRZYSZŁE KIERUNKI BADAWCZE
Fagi są immunogenne i indukują specyficzną odpowiedź układu odpornościowego, w tym przeciwciała specyficzne do fagów.	Fagi są niezwykle zróżnicowane- jak dalece można uogólnić obserwacje dotyczące jednego faga na inne typy fagów?
Większość doniesień wskazuje na indukcję IgM i IgG swoistych dla faga.	<p>Jakie są typowe podklasy przeciwciał specyficznych do fagów?</p> <p>Jak często IgE swoiste dla fagów mogą być indukowane przez fagi naturalne lub terapeutyczne?</p> <p>Czy IgD odgrywa jakąkolwiek rolę w kształtowaniu farmakokinetyki fagów <i>in vivo</i>?</p>
Wytwarzanie przeciwciał specyficznych do fagów było upośledzone u myszy poddanych tymektomii i u ludzi poddanych leczeniu preparatami blokującymi tymocyty, co wskazuje na T-zależny tryb odpowiedzi immunologicznej.	<p>W jaki sposób antygeny pochodzące z fagów są przetwarzane i prezentowane przez układ odpornościowy?</p> <p>W jakim stopniu i w jaki sposób odpowiedź niezależna od limfocytów T przyczynia się do indukcji przeciwciał swoistych dla faga ?</p>
Fagi składają się z wielu białek zawierających wiele epitopów; tak więc przeciwciała specyficzne do fagów są w rzeczywistości sumą odpowiedzi na różne białka faga.	Czy możliwe jest zidentyfikowanie typowych epitopów fagowych, szczególnie tych, które są wysoce immunogenne i predysponują faga do bycia dobrze widocznym dla układu odpornościowego?
Przeciwciała indukowane przez jednego faga mogą reagować krzyżowo z innym fagiem.	Czy inne mikroorganizmy (wirusy, bakterie) są w stanie indukować przeciwciała, które reagują krzyżowo z fagami? Czy antygeny eukariotyczne mogą wywoływać reakcje krzyżowe przeciwciał z fagami?

2. Cel pracy

Jak dotąd nie ma danych ani nie została ustalona metodologia umożliwiająca prześledzenie historii ekspozycji na fagi w życiu człowieka, a w szczególności nie są znane typowe epitopy fagowe, które są najczęściej rozpoznawane przez ludzki układ odpornościowy. Warto podkreślić, że w jednym fagu można znaleźć wiele różnych białek oraz istnieje również niezwykle duża różnorodność między fagami, z trudną do oszacowania liczbą możliwych epitopów. Dlatego też w niniejszej pracy podjęta została tematyka profilowania serologicznego, czyli identyfikacji epitopów antygenowych, w tym przypadku epitopów bakteriofagowych rozpoznawanych przez układ immunologiczny na poziomie populacji. Ze względu na dobrze znane i często demonstrowane w literaturze kluczowe znaczenie przeciwciał klasy IgG dla farmakokinetyki i biodostępności fagów, w tym dla powodzenia terapeutycznego stosowania różnych szczepów fagowych, w niniejszej pracy podjęłam problem identyfikacji epitopów fagowych najczęściej rozpoznawanych przez przeciwciała klasy IgG.

Epitopy takie są dobrze rozpoznane w wypadku wirusów eukariotycznych, a bazy epitopów zostały rozszerzone dzięki zastosowaniu technologii VirScan. Technologia ta umożliwiła identyfikację epitopów antygenowych wirusów eukariotycznych dla których w wybranej grupie pacjentów występują specyficzne przeciwciała. Warto podkreślić, iż Virscan nie zawierał epitopów pochodzących z fagów i nigdy dotąd nie dokonano identyfikacji epitopów fagowych. Stanowi to szczególną „lukę” w dotychczas zgromadzonej wiedzy, zarówno w dziedzinie badań nad bakteriofagami, jak i nad układem odpornościowym człowieka.

Celem niniejszej pracy jest identyfikacja oligopeptydów pochodzenia bakteriofagowego najczęściej rozpoznawanych przez przeciwciała klasy IgG na poziomie populacji, z użyciem prób pochodzących od zdrowych dawców reprezentujących populację polską oraz USA, samodzielnie wykonanej biblioteki phage display, immunoprecypitacji oraz identyfikacji sekwencji kodującej epitopy metodą NGS. Oczekiwany rezultatem projektu jest utworzenie pierwszej bazy zidentyfikowanych epitopów bakteriofagowych (immunogennych grup fagowych i immunogennych białek bakteriofagowych) w kontekście całych puli fagowych (fageomów) występujących w organizmach ludzkich. Pozwoli to określić na jakie fagi i białka szczególnie często występuje specyficzna odpowiedź immunologiczna u ludzi. Analiza

statystyczna i identyfikacja korelacji pomiędzy populacjami w aspekcie geograficznym oraz płci pozwoli na identyfikację epitopów częściej rozpoznawanych w badanych subpopulacjach oraz na analizę zbiorczą populacji i poszukiwanie trendu. Umożliwi to zarysowanie historii ekspozycji na fagi w badanych grupach, a w dalszej perspektywie pozwoli na dostarczenie kluczowych informacji dla spersonalizowanej terapii fagowej, umożliwiając np. wybór tylko takich fagów, które z mniejszym prawdopodobieństwem mogą być neutralizowane przez przeciwciała pacjentów.

3. Materiały

3.1 Startery PCR

Sekwencja startera „forward” (5' → 3') stosowanego w reakcji amplifikacji biblioteki oligonukleotydów (Agilent):

GATCACATTCGGTAGCACACTGGAATTCTTCTTCTTCT

Sekwencja startera „reverse” (5' → 3') dla stosowanego w reakcji amplifikacji biblioteki oligonukleotydów (Agilent):

TGTGCACAAGTAACCACGAGCAAGGATAAGCTTCA

Sekwencja startera „forward” (5' → 3') stosowanego w reakcji amplifikacji materiału DNA bakteriofagów T7 pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji:

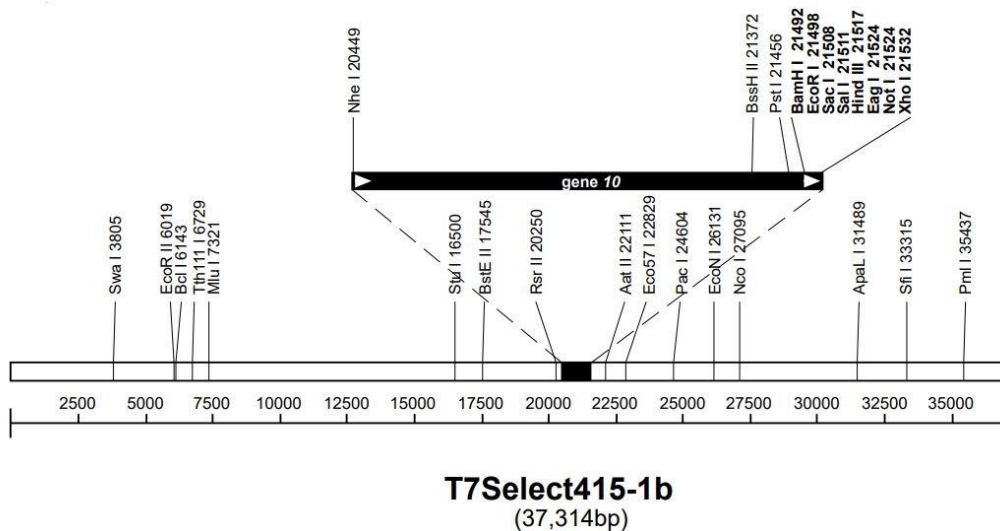
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGATCCGAATTCTTCTTCTTCT

Sekwencja startera „reverse” (5' → 3') stosowanego w reakcji amplifikacji materiału DNA bakteriofagów T7 pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji:

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTAACTAGTTACTCGAGTGCG
G

Indeksy (barkody DNA) do sekwencjonowania (set A, set B, set C, set D) –Załącznik nr 4.

3.2 Wektor



Rysunek 3. Mapa wektora T7Select415-1b dostarczonego w zestawie T7Select® 415-1 Cloning przez firmę Novagen.

Punkty orientacyjne sekwencji T7Select415-1b:

- 10B miejsce startu translacji 20446
- polilinker, miejsce wielokrotnego klonowania - *Bam*HI: poz. 21492, - *Xho*I: poz. 21532

3.3 Media hodowlane

Agarki (LB-agar), pH 7,4 (Pracownia Chemii Ogólnej IITD):

Pepton 4 g/l

Ekstrakt mięsny 0,4 g/l

Enzymatyczny hydrolyzaty kazeiny 5,4 g/l

Ekstrakt drożdżowy 1,7 g/l

NaCl 3,5 g/l

Agar 14 g/l

Podłoże do płytek fagowych, pH 7,4 (Pracownia Chemii Ogólnej IITD)

NaCl 5 g/l

Na₂HPO₄ 3 g/l

Hydrolizat kazeiny 10 g/l

Wyciąg mięsny 3 g/l

Agar 12 g/l

Podłoże płynne LB-broth high salt, pH = 7,5 (Sigma-Aldrich):

Enzymatyczny ekstrakt kazeiny 10 g/l

Ekstrakt drożdżowy 5 g/l

NaCl 10 g/l

3.4 Surowice ludzkie

Do doświadczeń użyto surowic pozyskanych od 200 zdrowych dorosłych dawców ochotników pochodzących z Polski oraz USA, zarówno mężczyzn jak i kobiet. Pobranie 100 próbek krwi od zdrowych dawców pochodzących z Polski przeprowadzono na podstawie zgody nr KB/ nr 2/rok 2017 (Załącznik nr 2) wydanej przez Komisję Bioetyczną przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu. Surowice od 100 osób pochodzących z USA zostały pozyskane komercyjnie we współpracy z prof. D. C. Nelsonem (IBBR, University of Maryland, MD, USA).

3.5 Bufory

Bufor TBE (skład na litr):

Tris 10,089 g/l (Sigma-Aldrich)

H₃BO₃ 5,90 g/l (Sigma-Aldrich)

EDTA 0,935 g/l (Sigma-Aldrich)

Orange DNA Loading Dye (Fermentas):

Tris-HCl 10 mM (pH 7.6)

Orange G 0,15%

Xylene cyanol FF 0.03%

Glicerol 60%

EDTA 60 mM

PBS bez jonów Mg²⁺ i Ca²⁺ (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN (skład na litr)):

Na₂HPO₄ bezwodny 0,91738 mg/l

KCl 200,0 mg/l

KH₂PO₄ 200,0 mg/l

NaCl 8,0 g/l

Na₂HPO₄·12H₂O 2,9 mg/l

Phage Extraction Buffer:

Tris-HCl 20 mM (pH 8,0) (Sigma-Aldrich)

NaCl 100 mM (POCH)

MgSO₄ 60 mM (Merck-KGaA)

Wash Buffer:

Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) (Sigma-Aldrich)

NaCl 150 mM (POCH)

Tween-20 0,1% (BIO-RAD)

TBST z 3% BSA:

Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) (Sigma-Aldrich)

NaCl 138 mM (POCH)

KCl 2,7 mM (AppliChem)

Tween-20 0,05% (BIO-RAD)

BSA 3% (Sigma-Aldrich)

3.6 Odczynniki

Agaroza w tabletkach (Thermo Fisher Scientific)

Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter)

Biblioteka oligonukleotydów syntetyzowana *de novo* metodą drukowania nukleotydów (Agilent)

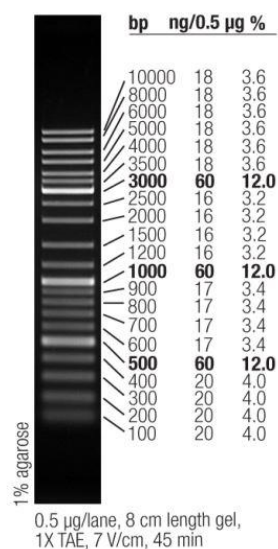
Bromek etydyny (VWR)

Dynabeads protein A (Invitrogen)

Dynabeads protein G (Invitrogen)

Etanol do biologii molekularnej (Sigma-Aldrich)

GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use – marker mas DNA (Thermo Fisher Scientific)
(Rysunek 4)



Rysunek 4. Układ prążków i długości fragmentów DNA markera mas GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific)

Glicerol (AppliChem)

H₂O dejonizowana mQ (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN)

H₂O destylowana (Pracownia Chemii Ogólnej IITD PAN)

H₂O do biologii molekularnej, wolna od rybonukleaz i deoksyrybonukleaz (Sigma)

Izopropanol do biologii molekularnej (Sigma-Aldrich)

NaOH (POCH)

3.7 Zestawy do badań

Phusion Blood Direct PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, nr kat. F175S): Phusion Blood Direct PCR Master Mix (2x), EDTA 50 mM (pH 8.0), MgCl₂ 50 mM, 100% DMSO, universal control primer mix, woda wolna od nukleaz, O'GeneRuler Express DNA Ladder – zestaw do reakcji amplifikacji metodą PCR materiału DNA bakteriofagów T7 pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji

Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, nr kat. F565S):
Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (2x), 100% DMSO, woda wolna od nukleaz
(2x) – zestaw do reakcji amplifikacji PCR

Zestaw FastDigest *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific, nr kat. FD0274): FastDigest *EcoRI*,
10x FastDigest Buffer, 10x FastDigest Green Buffer – zestaw do reakcji restrykcji DNA

Zestaw FastDigest *HindIII* (Thermo Fisher Scientific, nr kat. FD0504): FastDigest *HindIII*,
10x FastDigest Buffer, 10x FastDigest Green Buffer – zestaw do reakcji restrykcji DNA

Zestaw Liga5™ (A&A Biotechnology, nr kat. 1108-25): enzym Liga5™, bufor Liga5™, woda
jałowa – zestaw do reakcji ligacji

Zestaw NextSeq 500/550 Mid Output v2 (300 Cycles) (Illumina, nr kat. 15057939), NextSeq
Resuspension Buffer (RSB) + PhiX Control (Illumina, nr kat. 15041963), NextSeq Accessory
Box v2 (Illumina, nr kat. 15058251), NextSeq 500/550 Mid Output Flow Cell Cartridge v2.5
(Illumina, nr kat. 20022409), NextSeq 500/550 Buffer Cartridge v2 (Illumina, nr kat.
15057941), IDT ® for Illumina® DNA/RNA UD Indexes Set A (96 Indexes , 96 Samples)
(Illumina, nr kat. 20027213 (ANALITYK)), IDT ® for Illumina® DNA/RNA UD Indexes Set
B (96 Indexes , 96 Samples) (Illumina, nr kat. 20027214 (ANALITYK)), IDT ® for Illumina®
DNA/RNA UD Indexes Set C (96 Indexes , 96 Samples), (Illumina, nr kat. 20027215
(ANALITYK)), IDT ® for Illumina® DNA/RNA UD Indexes Set D (96 Indexes , 96 Samples)
(Illumina, nr kat. 20027216 (ANALITYK)) – Zestawy do sekwencjonowania metodą NGS

Zestaw QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN, nr kat. 28106T): PB Buffer, sodium acetate
3 M (pH 5.0), QIAquick column, collection tube, PE Buffer, EB Buffer 10 mM Tris·Cl (pH
8.5), Loading Dye – zestaw do oczyszczania DNA

Zestaw QuantiFluor® dsDNA (Promega, nr kat. E2671): 20x TE Buffer (pH 7.5),
QuantiFluor®dsDNA Dye, Lambda DNA Standard 100 µg/ml – zestaw do oznaczania stężenia
dsDNA

Zestaw T7Select® 415-1 Cloning (Novagen, nr kat.70015-3): T7Select415-1 *EcoRI/HindIII*
Vector Arms 5 µg, T7Select Control Insert 0.2 pmol, T7 Packaging Extracts (6x), T7Select
Packaging Control DNA 1 µg, BL21 Glycerol Stocks 0.2 ml, T7SelectUP Primer 500 pmol,

T7SelectDOWN primer 500 pmol – zestaw do konstrukcji biblioteki oligopeptydów w systemie T7 metodą phage display

3.8 Materiały laboratoryjne

Butelki Duran 100 ml, 500 ml, 1000 ml z gwintem GL45 (DWK Life Sciences)

Chusteczki bezpyłowe (Kimtech)

Filtry strzykawkowe Millex PES 33 mm, średnica porów 0,22 μm (Merck Millipore)

Folie uszczelniająca do płytek PCR (Thermo Fisher Scientific)

Kolby do hodowli szklane przegrodowe (POCH)

Końcówki do pipet automatycznych (10, 200, 1000 μl , 5 ml) (Sarstedt)

Maty zatyczkowe do płytek PCR (Thermo Fisher Scientific)

Papierki wskaźnikowe pH Dosatest (VWR)

Parafilm (Heathrow Scientific)

Płytki 96-dołkowe do PCR (Thermo Fisher Scientific)

Płytki 96-dołkowe MicroWell, Nunc (Thermo Fisher Scientific)

Płytki do hodowli bakterii (płytki Petriego) (Sarstedt)

Probówki cienkościenne 0,5 ml do pomiarów fluorymetrycznych (Promega)

Probówki jałowe typu falcon (10, 15, 50 ml) (Sarstedt)

Probówki typu Eppendorf (0,2 ml; 1,5 ml) (Eppendorf)

Probówki typu Eppendorf Biopur (1,5 ml) (Eppendorf)

Rynienki polistyrenowe do pipety wielokanałowej (Corning)

Statywy chłodzące na probówki (SSIbio)

Statywy na probówki (VWR)

Strzykawki 3-częściowe jałowe, końcówka Luer Lock (igła nakręcana) (50 ml) (BD Plastipak)

UV-Küvette mikro (Merck)

Zestawy do filtracji próżniowej, filtry PES Rapid-Flow MF 75 Nalgene , średnica porów 0,45 μm i 0,22 μm (Thermo Fisher Scientific)

Zlewki laboratoryjne (VitLab)

3.9 Aparatura i akcesoria

2-portowa i 4-portowa zakrętka do butelki GL45 (VWR)

Chłodziarko-zamrażarka (LG A Class)

Chłodziarko-zamrażarka (Samsung A Class)

Chłodziarko-zamrażarka (Siemens A⁺ Class)

Ciśnieniomierz, zaciski do wężyków (Castorama)

Fluorymetr (Promega Quantus)

Inkubator z wytrząsaniem (Heidolph UNIMAX 1010 INKUBATOR 1000)

Inkubator z wytrząsaniem (Infors HT AG CH-4103 Bottmingen)

Inkubator z wytrząsaniem (Infors HT Minitron)

Kołyska (Heidolph Polymax 1040)

Komora laminarna (Esco Class II BSC)

Komora z transiluminatorem do wizualizacji i dokumentacji żeli G:BOX wraz z oprogramowaniem (Syngene)

Kuchenka mikrofalowa (LG)

Kuchenka mikrofalowa (Zelmer)

Manometr (WIKA EN 837-1)

Miernik pH (Mettler Toledo Fe-20 FiveEasy TM pH)

Mieszadło magnetyczne (IKA color squid)

Mieszadło magnetyczne (IKA RTC Classic)

Mieszadło magnetyczne (VWR VS-C4)

Moduł filtrujący Hollow Fiber (SpectrumLabs.com MidiKros)

Pipety automatyczne (0,5-10, 2-20, 10-100, 20-200, 100-1000 µl, 1-5 ml, wielokanałowa 20-200, 30-300 µl) (Eppendorf)

Płytki 96-dołkowa do magnetycznej separacji (New England BioLabs #S1511S)

Pompa perystaltyczna (LEADFLUID BT100L YZ15)

Pompa perystaltyczna (VWR FastLoad)

Sekwencjonator II generacji (Illumina NextSeq 550)

Serwer obliczeniowy (IITD PAN)

Spektrofotometr (Amersham Biosciences Ultrospec 10)

Spektrofotometr/fluorometr (DeNovix DS-11)

Termocykler (Eppendorf Mastercycler nexus GX2)

Termomikser (BIOSAN TS-100C Thermo Shaker)

Termomikser (Eppendorf ThermoMixer C)

Wytrząsarka typu *vortex* (Biosan Bio vortex V1)

Wytrząsarka typu *vortex* (IKA MS 3 basic)

Wytrząsarka typu *vortex* (IKA Vortex 1)

Waga (OHAUS Ranger 3000)

Waga (OHAUS Valor 5000)

Wężyki do pomp perystaltycznych (Watson Marlow)

Wirówka (Eppendorf Centrifuge 5804 R)

Wirówka (Eppendorf Mini Spin plus)

Wirówka (Eppendorf Mini Spin)

Wirówka (Sigma Laboratory Centrifuges 3K30)

Zamrażarka o temperaturze zamrażania do -80°C (GRAM bioline BioUltra UL 570)

Zestaw do elektroforezy poziomej (AA Hoefer)

4. Metody

4.1 Projektowanie biblioteki oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych (wg Xu i in., 2015, zmodyfikowano)

Biblioteka oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych została zaprojektowana w laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów przez bioinformatyka mgr inż. Marka Harhalę na podstawie pracy Xu i in., 2015. W tym celu przeszukano bazę danych Genbank (NCBI) w zakresie wszystkich dostępnych genomów fagowych (data dostępu: 01.06.2018 r.). Do dalszych badań wybrano anotowane otwarte ramki odczytu (ORF), które były opisane słowami kluczowymi: 'structural', 'tail', 'decoration', 'capsid', 'scaffold', 'baseplate', 'coat', 'virion', 'structure', ale nie zawierały słów kluczowych: 'initiator', 'chaperone', 'maturation protease', 'morphogenesis'. Numery dostępu białek zostały wykorzystane jako nazwy wybranych białek. Sekwencje odnalezionych białek, które spełniały założenia (słowa kluczowe) zostały pobrane z bazy danych, a następnie zostały wirtualnie podzielone na oligopeptydy o długości 56 aminokwasów, z założeniem, że kolejne sekwencje w danym białku nakładają się w zakresie 28 aminokwasów, tak aby ostatni oligopeptyd z danego białka stanowił 56 aminokwasów na końcu C. Operację tę wykonano z wykorzystaniem skryptu w języku programowania Python (pakiet BioPython do pracy z danymi biologicznymi). Powtarzające się sekwencje oligopeptydów zostały usunięte z tworzonej biblioteki. Reprezentatywne sekwencje oligopeptydów zostały przetłumaczone odwrotnie w kodony DNA (sekwencje nukleotydowe) zoptymalizowane pod względem efektywności ekspresji informacji genetycznej w *Escherichia coli* (Tabela 5). Wybrano najczęściej występujące kodony. Miejsca restrykcyjne usunięto poprzez wprowadzenie neutralnych mutacji punktowych (ang. *silent mutation*).

Tabela 5. Kodony *Escherichia coli* zastosowane w bibliotece oligonukleotydowej przygotowanej w niniejszej pracy.

Nazwa aminokwasu	Skrót jednoliterowy	Kodon
Alanina	A	GCG
Cysteina	C	TGC
Kwas asparaginowy	D	GAT
Kwas glutaminowy	E	GAG
Fenylalanina	F	TTC
Glicyna	G	GGC
Histydyna	H	CAT
Izoleucyna	I	ATC
Lizyna	K	AAA
Leucyna	L	CTG
Metionina	M	ATG
Asparagina	N	AAC
Prolina	P	CCG
Glutamina	Q	CAG
Arginina	R	CGT
Seryna	S	TCT
Treonina	T	ACC
Walina	V	GTG
Tryptofan	W	TGG
Tyrozyna	Y	TAT

Do końca 5' każdej sekwencji oligonukleotydowej dodano odpowiednie sekwencje homologiczne (adaptery) dla startera „forward” (5' → 3') stosowanego w reakcji amplifikacji biblioteki oligonukleotydów, miejsce restrykcyjne dla enzymu *EcoRI* oraz sekwencję kodującą łącze serynowe (4S) w celu zwiększenia lokalnej rozpuszczalności produktu białkowego i ograniczenie w ten sposób niepożądanych interakcji pomiędzy poszczególnymi domenami: GGTAGCACACTGGAATTCTCTCTTCTTCT. Do końca 3' kodonu STOP każdej sekwencji oligonukleotydowej dodano miejsce restrykcyjne dla enzymu *HindIII* oraz sekwencję

homologiczną (adaptera) dla startera „reverse” (sekwencja komplementarna i odwrócona względem sekwencji wyjściowej) stosowanego w reakcji amplifikacji biblioteki oligonukleotydów: TGAAGCTTATCCTTGCTCGTGGTTAC. Adaptery do końca 5' i 3' dodano w celu utworzenia sekwencji oligonukleotydowych o długości 222 par zasad. Sekwencje zaprojektowanych oligonukleotydów (Załącznik nr 3) w formacie FASTA zostały przekazane jako wzorzec dla syntezy, która została przeprowadzona w technologii SurePrint (Agilent).

4.2 Reakcja amplifikacji biblioteki oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych metodą PCR (wg Thermo Fisher Scientific, zmodyfikowano)

Przygotowano mieszaninę do reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w probówkach o pojemności 200 μ l mieszając w odpowiednich ilościach następujące reagenty:

Mieszanina starterów: forward (20 μ M) i reverse (20 μ M)	1,25 μ l
Matryca (biblioteka oligonukleotydów)	1,00 μ l
(zgodnie z procedurą 4.1)	
100% DMSO	1,50 μ l
Woda do biologii molekularnej	21,25 μ l
Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix	25,00 μ l
	$V_{\text{reakcji}}=50 \mu\text{l}$

Etapy oraz czas trwania reakcji:

1. denaturacja wstępna	4 min. 30 sekund	98°C	
2. denaturacja właściwa	20 sekund	98°C	x 30
3. połączenie starterów z komplementarnymi sekwencjami	20 sekund	57°C	
4. reakcja polimeryzacji	30 sekund	72°C	

5. wydłużenie końcowe	10 min.	72°C
6. przechowywanie	∞	10°C

Reakcję amplifikacji prowadzono w termocyklerze Eppendorf Mastercycler nexus GX2. Jako matrycy do powielania genów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych użyto biblioteki oligonukleotydów dostarczonej przez firmę Agilent. Produkt reakcji amplifikacji metodą PCR oczyszczono (procedura 4.3) i naniesiono na żel agarozowy. Przeprowadzono elektroforezę (procedura 4.4). Oznaczono stężenie otrzymanego produktu przeprowadzonej reakcji amplifikacji metodą PCR (procedura 4.5).

4.3 Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych z wykorzystaniem zestawu QIAquick (wg QIAGEN)

Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych odbywało się zgodnie z instrukcją producenta. W celu pozbycia się pozostałości po przeprowadzonej reakcji PCR (w kolejnym kroku reakcji restrykcji), otrzymane DNA połączono z 5 objętościami buforu wiążącego PB, zawierającego wysokie stężenie chlorowodoru guanidyny oraz izopropanolu. Mieszaninę dokładnie wymieszano i całość naniesiono na minikolumnę z wypełnieniem krzemionkowym, umieszczoną w probówce dostarczonej w zestawie, przeznaczoną do oczyszczania DNA. Wirowano przez 60 sekund przy 13 000 rpm. Minikolumnę wyjęto w probówce, wylano przesącz i umieszczono ponownie kolumnę w probówce. Dodano 750 µl buforu płuczącego PE (poufny skład) i wirowano przez 60 sekund, 13 000 rpm. Następnie wylano przesącz i ponownie umieszczono minikolumnę w probówce, wirowano 60 sekund przy 13 000 rpm w celu pozbycia się resztek buforu płuczącego. Minikolumnę przeniesiono do nowej probówki typu Eppendorf Biopur (1,5 ml) i dodano na środek membrany 30 µl buforu do elucji EB, zawierającego 10 mM Tris-Cl (pH 8,5), inkubowano przez 1 minutę w temperaturze pokojowej w celu elucji DNA ze złoża kolumny. Następnie całość wirowano 1 minutę, 13 000 rpm, minikolumnę usunięto.

4.4 Elektroforeza DNA (wg Sambrook i Russell 2001, zmodyfikowano)

Sporządzono 1,4% (standardowo) lub 3% (dla najwyższej rozdzielczości/najdokładniejszego rozdziału prążków) roztwór agarozy (agarozą w tabletkach) w 1x stężonym buforze TBE, podgrzano do wrzenia. W zależności od potrzebnej grubości żelu z 24 studzienkami (rozdział próbek po amplifikacji metodą PCR lub rozdział próbek po reakcji enzymatycznej z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych) odmierzano odpowiednio 50 ml lub 250 ml sporządzonego roztworu agarozy w 1x stężonym TBE. Roztwór agarozy lekko ostudzono poprzez mieszanie na mieszadle magnetycznym, dodano 2 μ l bromku etydyny. Mieszaninę wylano do formy, włożono grzebień w celu utworzenia studzienek i pozostawiono żel do zatężenia. Następnie wyciągnięto grzebień, a formę przełożono do aparatu i zalano 1x stężonym buforem TBE. Do 4 μ l badanej próbki dodano 4 μ l barwnika obciążającego (Orange DNA Loading Dye). Do pierwszej studzienki naniesiono 4 μ l markera (GeneRuler DNA Ladder Mix), a do pozostałych, badane próby. Elektroforezę prowadzono ok. 40 min przy napięciu elektrycznym 140 V. Zdjęcia żelu po elektroforezie DNA wykonano w komorze z transluminatorem do wizualizacji i dokumentacji żeli G:BOX z wykorzystaniem oprogramowania Syngene.

4.5 Pomiar stężenia DNA (wg instrukcji użytkowania spektrofotometru DeNovix DS.-11)

Naniesiono za pomocą pipety 1 μ l buforu do elucji EB (zgodnie z procedurą 4.3) w celu kalibracji aparatu. Następnie przy pomocy chusteczek bezpyłowych oczyszczono powierzchnię dedykowaną do nałożenia próbki. Nałożono 1 μ l badanej próbki DNA o nieznanym stężeniu. Pomiar stężenia DNA w próbce urządzenie wykonywało na podstawie detekcji UV-VIS mierząc absorbancję przy długości fali: 230 nm, 260 nm, 280 nm a następnie odpowiednio przeliczając stężenie.

4.6 Reakcja enzymatyczna z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych DNA (wg Thermo Fisher Scientific, zmodyfikowano)

W celu utworzenia „lepkich” końców amplifikowanej biblioteki oligonukleotydów przygotowano w probówce typu Eppendorf Biopur (1,5 ml) mieszaninę reakcyjną do reakcji restrykcji:

Bufor10xFB	6,0 μ l
DNA po oczyszczeniu (zgodnie z procedurą 4.3)	0,8 μ g
Enzym restrykcyjny FastDigest <i>EcoRI</i>	3,0 μ l
Enzym restrykcyjny FastDigest <i>HindIII</i>	3,0 μ l
Woda do biologii molekularnej	uzupełniono do 60 μ l
	$V_{\text{reakcji}}=60 \mu\text{l}$

Reakcję prowadzono w Termomikserze (Eppendorf ThermoMixer C) przez 45 minut w 37°C, bez mieszania. Następnie oczyszczono produkt reakcji restrykcji (procedura 4.3). Próbkę naniesiono na żel agarozowy. Przeprowadzono elektroforezę (zgodnie z procedurą 4.4). Oznaczono stężenie otrzymanego produktu przeprowadzonej reakcji amplifikacji metodą PCR (procedura 4.5).

4.7 Reakcja enzymatyczna z wykorzystaniem enzymu ligazy DNA (wg A&A Biotechnology i Novagen, zmodyfikowano)

W celu sklonowania amplifikowanej biblioteki oligonukleotydów z utworzonymi „lepkimi końcami” po trawieniu enzymami restrykcyjnymi *EcoRI* i *HindIII* do wektora T7Select415-1b (wektor dostarczony w zestawie T7Select® 415-1 Cloning przez firmę Novagen zawiera już „lepkie końce”, jest po restrykcji z wykorzystaniem enzymów *EcoRI/HindIII*) w miejscu *EcoRI/HindIII* przygotowano w probówce typu Eppendorf Biopur (1,5 ml) następującą mieszaninę reakcyjną do reakcji ligacji:

T7Select415-1 <i>EcoRI/HindIII</i> Vector Arms	1,00 μ l
DNA po reakcji restrykcji (zgodnie z procedurą 4.6)	0,06 pmol
Bufor Liga 5™	1,25 μ l
Enzym Liga 5™	0,25 μ l
Woda do biologii molekularnej	uzupełniono do 5 μ l
	$V_{\text{reakcji}}=5 \mu\text{l}$

Reakcję prowadzono w Termomikserze (Eppendorf ThermoMixer C) przez 3 godziny w 20°C, bez mieszania. Ilość potrzebnego DNA do reakcji obliczono z wykorzystaniem kalkulatora dostępnego pod adresem: <https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation> (dostęp w dniu 03.02.2019 r.) wpisując stężenie oraz liczbę par zasad DNA użytego do reakcji ligacji.

4.8 Przygotowanie banków bakteryjnych (wg procedury ustalonej w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów IITD PAN)

Pobrano 20 μ l bakterii *Escherichia coli* BL21 dostarczonych w zestawie T7 Select® 415-1 Cloning przez firmę Novagen i hodowano przez noc w 50 ml płynnego podłożu LB w 37°C z wytrząsaniem 210 rpm. Następnie 500 μ l hodowli bakteryjnej umieszczono w jałowej probówce typu Eppendorf wraz z 500 μ l jałowego 50% glicerolu. Sporządzone banki bakteryjne umieszczono w – 20°C.

4.9 Reakcja pakowania genomu bakteriofaga T7 *in vitro* (wg Novagen, zmodyfikowano)

Produkt reakcji ligacji o objętości 5 μ l dodano bezpośrednio do rozmrożonego wcześniej na statywie chłodzącym T7 Packaging Extracts o objętości 25 μ l. Mieszaninę ostrożnie zamieszano za pomocą końcówki pipety. Reakcję prowadzono w termomikserze (Eppendorf ThermoMixer C) przez 2 godziny w 22°C, uruchamiając delikatne mieszanie (300 rpm) na 1-2 minuty co ok. 20 minut. Reakcję pakowania zatrzymano dodając 270 μ l sterylnego medium LB. Mieszaninę delikatnie zamieszano za pomocą końcówki pipety. Pobrano 10 μ l

otrzymanej mieszaniny i oznaczono miano faga w celu określenia liczby wytworzonych rekombinantów (procedura 4.11).

4.10 Amplifikacja zrekombinowanej biblioteki faga T7 (wg Novagen, zmodyfikowano)

Przygotowano prehodowlę bakterii *Escherichia coli* BL21 będącej gospodarzem dla bakteriofaga T7: do 50 ml płynnego LB dodano 20 μ l bakterii *Escherichia coli* BL21 z przygotowanych wcześniej banków bakteryjnych (procedura 4.8). Prehodowlę prowadzono w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem 220 rpm przez całą noc. Następnego dnia rano odświeżono nocną prehodowlę bakterii *Escherichia coli* BL21. Do 50 ml płynnego podłoża LB dodano 500 μ l nocnej prehodowli bakterii *Escherichia coli* BL21. Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 240 rpm przez ok. 2 godziny aż do uzyskania OD₆₀₀ w zakresie 0,7-1,0. Następnie do hodowli bakteryjnej *Escherichia coli* BL21 dodano 290 μ l płynnego lizatu zrekombinowanych bakteriofagów T7 (procedura 4.9). Amplifikację prowadzono w 37°C z wytrząsaniem ok. 250 rpm przez ok.3 godziny, aż do momentu obserwowania lizy komórek gospodarza, t.j. bakterii *Escherichia coli* BL21. Zamplifikowany lizat zrekombinowanej biblioteki faga T7 wirowano przez 10 minut w 4°C przy 8000 \times g w celu pozbycia się resztek komórek gospodarza. Otrzymany supernatant przeniesiono do sterylnej probówki tyłu falcon o objętości 50 ml a następnie do sterylnej strzykawki o pojemności 50 ml. Supernatant filtrowano przy użyciu filtrów strzykawkowych Millex PES 33 mm o średnicy porów 0,22 μ m do sterylnej probówki typu falcon o objętości 50 ml. Pobrano 10 μ l przefiltrowanego namnożonego lizatu zrekombinowanej biblioteki faga T7 w celu oznaczenia miana (procedura 4.11). Część otrzymanego lizatu przełożono do probówek typu Eppendorf (1,5 ml) po 1 ml i przechowywano w -80°C jak banki namnożonego lizatu zrekombinowanej biblioteki faga T7. Pozostałą część przygotowanej biblioteki faga T7 przechowywano w 4°C.

W celu uzyskania większej ilości płynnego lizatu zrekombinowanej biblioteki faga T7 wykonano następujące kroki. Przygotowano prehodowlę bakterii *Escherichia coli* BL21: do 50 ml płynnego LB dodano 20 μ l bakterii *Escherichia coli* BL21 z przygotowanych wcześniej banków bakteryjnych (procedura 4.8). Prehodowlę prowadzono w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem 220 rpm przez całą noc. Następnego dnia rano odświeżono nocną prehodowlę

bakterii *Escherichia coli* BL21. Do 300 ml płynnego podłoża LB dodano 3 ml nocnej prehodowli bakterii *Escherichia coli* BL21. Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 180 rpm przez ok. 2 godziny aż do uzyskania OD₆₀₀ w zakresie 0,7-1,0. Liczbę komórek bakteryjnych w roztworze obliczono korzystając z poniższego wzoru:

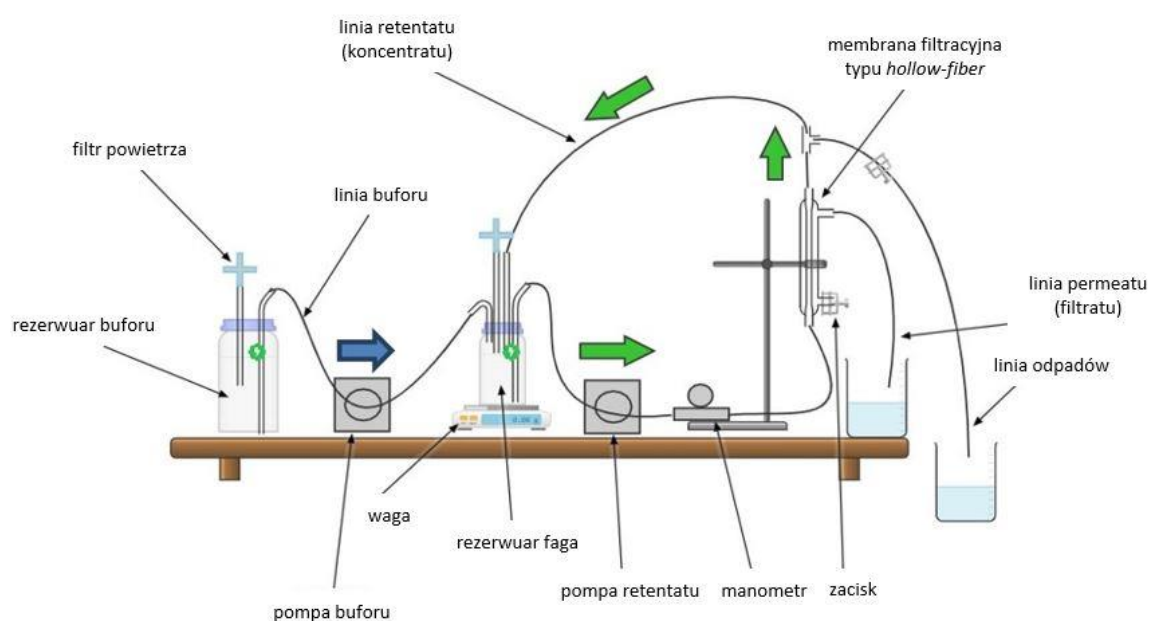
$$OD_{600} \times \frac{2 \times 10^8 \text{ komórek/ml}}{0.5 \times OD_{600}} \times \text{objętość hodowli [ml]} = \text{całkowita liczba komórek}$$

Kultury bakteryjne infekowano biblioteką bakteriofagową o MOI pomiędzy 0,001 – 0,01 (np. 100-1000 komórek na każdą cząstkę fagową PFU). Dodano odpowiednią objętość lizatu biblioteki bakteriofagowej (opisanej w poprzedzającym akapicie). Zamplifikowany lizat zrekombinowanej biblioteki faga T7 wirowano przez 10 minut w 4°C przy 8000 × g w celu pozbycia się resztek komórek gospodarza. Otrzymany supernatant przeniesiono do zestawu do filtracji próżniowej, filtrowano przez filtry o średnicy porów 0,22µm. Pobrano 10 µl przefiltrowanego namnożonego lizatu zrekombinowanej biblioteki faga T7 w celu oznaczenia miana (procedura 4.11). Następnie lizat poddano zagęszczaniu z wykorzystaniem systemu hollow-fiber (procedura 4.11). System ten umożliwił również wymianę płynnej pożywki hodowlanej LB, w której zawieszona była zrekombinowana biblioteka faga T7, na Phage Extraction Buffer (Xu i in., 2015). Przygotowaną bibliotekę faga T7 przechowywano w 4°C.

4.11 Koncentracja i wymiana medium płynnego lizatu zrekombinowanej biblioteki faga T7 (wg procedury ustalonej w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów IITD PAN)

Namnożona biblioteka bakteriofaga T7 (procedura 4.10) została skoncentrowana min. 10 razy z wykorzystaniem rozwiniętej w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów metody z wykorzystaniem membrany filtracyjnej typu *hollow-fiber* (optymalizację metody przeprowadziła mgr Izabela Rybicka). Przed rozpoczęciem procesu zagęszczania pobrano 10 µl przefiltrowanego lizatu zrekombinowanej biblioteki faga T7 w celu oznaczenia miana (procedura 4.11). Po zakończonym procesie koncentracji pobrano 10 µl skoncentrowanego

lizatu zrekombinowanej biblioteki faga T7 w celu oznaczenia miana (procedura 4.12). W kolejnym kroku zmieniono płynną pożywkę LB, w której zawieszona była namnożona i skoncentrowana biblioteka bakteriofaga T7, na Phage Extraction Buffer dedykowany do procesu immunoprecypitacji (procedura 4.12, Xu i in., 2015). Otrzymany preparat fagowy filtrowano przy użyciu filtrów strzykawkowych Millex PES 33 mm o średnica porów 0,22 μm do sterylnej probówki typu falcon o objętości 50 ml. Zagęszczoną bibliotekę bakteriofaga T7 zawieszoną w Phage Extraction Buffer przechowywano w 4°C do czasu immunoprecypitacji.



Rysunek 5. System do zagęszczania lizatów fagowych stworzony w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów IITD PAN. Zieloną strzałką zaznaczono kierunek przepływu lizatu fagowego. Niebieską strzałką zaznaczono kierunek przepływu nowego buforu (Phage Extraction Buffer), w którym została zawieszona zrekombinowana zagęszczona biblioteka bakteriofagów T7 [Rysunek pochodzi z procedury ustalonej w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów IITD PAN przez Izabelę Rybicką, 2021].

4.12 Oznaczanie miana bakteriofagów (wg procedury ustalonej w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów IITD PAN)

Miano bakteriofagów oznaczano dwoma metodami: (a) metodą testu standardowych rozcieńczeń (RTD) i (b) metodą płytek dwuwarstwowych.

a. Metoda testu standardowych rozcieńczeń (wg Rees i in., 2015, zmodyfikowano)

Bakterie *Escherichia coli* BL21 hodowano w podłożu płynnym LB przy 230 rpm przez ok. 3 godziny w temperaturze 37°C. Następnie 1 ml hodowli bakteryjnej naniesiono i rozprowadzono na całej powierzchni płytki Petriego z podłożem stałym do płytek fagowych. Płytkę pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Przygotowano szereg rozcieńczeń badanego preparatu bakteriofagowego w podłożu płynnym LB. Rozcieńczenia nakropiono na poszczególne sektory płytki z wysianymi wcześniej bakteriami. Inkubowano przez 7 godzin w temperaturze 37°C, a następnie w 22°C do następnego dnia. Policzono powstałe łysinki i wyznaczono miano bakteriofaga wyrażone w jednostce [PFU/ml] (liczba cząstek fagowych na mililitr) zgodnie ze wzorem:

$$\text{miano} \left[\frac{\text{PFU}}{\text{ml}} \right] = \text{liczba łysinek} \times \frac{1}{\text{rozcieńczenie}} \times \frac{1}{\text{nakropiona objętość faga [ml]}}$$

b. Metoda płytek dwuwarstwowych (Gratia 1936 opisana przez Adamsa 1959, zmodyfikowano)

Przygotowano szereg rozcieńczeń badanego preparatu bakteriofagowego oraz płynną hodowlę bakteryjną *Escherichia coli* BL21 w 50 ml LB, którą wytrząsano przy 230 rpm przez 3 godziny w 37°C. Do probówek z 0,7% płynnym agarem o temperaturze 42°C dodano 100 µl zawiesiny bakteryjnej oraz preparat bakteriofagowy w ustalonej objętości. Zawartość probówki

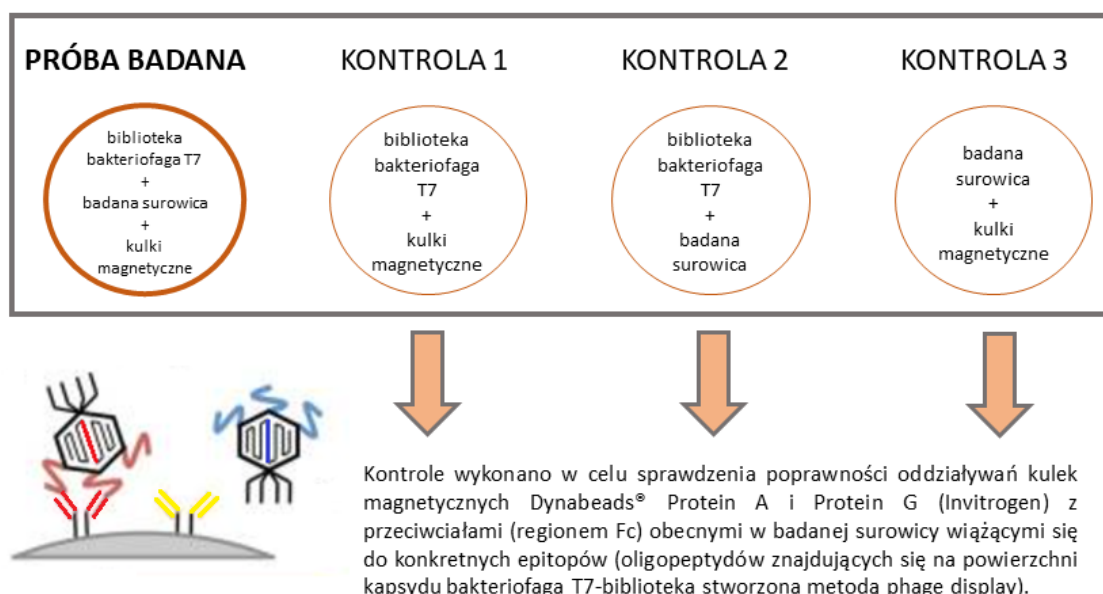
wymieszano na wytrząsarce typu *vortex*, wylano na powierzchnię płytek Petriego z podłożem stałym do płytek fagowych i inkubowano przez 7 godzin w temperaturze 37°C, a następnie w 22°C do następnego dnia. Policzono powstałe łyseki i wyznaczono miano bakteriofaga wyrażone w jednostce [PFU/ml] (liczba cząstek fagowych na mililitr) zgodnie ze wzorem:

$$\text{miano } \left[\frac{\text{PFU}}{\text{ml}} \right] = \text{liczba łysek} \times \frac{1}{\text{rozcieńczenie}} \times \frac{1}{\text{objętość dodanego faga [ml]}}$$

4.13 Reakcja immunoprecypitacji, czyli strącanie epitopów reaktywnych za pomocą swoistych przeciwciał występujących w surowicach ludzkich poddanych profilowaniu serologicznemu (wg Xu i in., 2015 oraz Invitrogen, zmodyfikowano)

Do dołków płytki 96-dołkowej nałożono 300 µl roztworu 3% BSA w TBST. Płytkę inkubowano przez noc w 4°C z wytrząsaniem 40 rpm. Następnego dnia usunięto zawartość dołków płytki 96-dołkowej poprzez odwrócenie płytki a następnie płytkę osuszono ręcznikiem laboratoryjnym. Do dołków płytki 96-dołkowej nałożono bibliotekę bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni oligopeptydy bakteriofagowe (zgodnie z Xu i in., 2015, 2×10⁵ reprezentacji każdego klonu biblioteki bakteriofaga T7 prezentującego na powierzchni swojego kapsydu inny oligopeptyd bakteriofagowy (wielkość biblioteki oligopeptydów wynosiła 2,8×10⁵, czyli bibliotekę o łącznym mianie 5,6×10¹⁰ PFU na jedną badaną próbę surowicy)) oraz badaną surowicę (1 µl). Zawartość każdego dołka uzupełniono Phage Extraction Buffer do objętości 250 µl i mieszano 4 razy pipetą o objętości 100 µl w celu dobrego wymieszania surowicy i biblioteki fagowej. Płytkę inkubowano przez noc w 4°C z wytrząsaniem 50 rpm. Kolejnego dnia rano do każdego dołka płytki 96-dołkowej dodano kulki magnetyczne do immunoprecypitacji: 10 µl Dynabeads Protein A oraz 10 µl Dynabeads Protein G (Dynabeads Protein A i Protein G łączą się w różny sposób z regionem Fc przeciwciał). Zawartość dołków zamieszano 5 razy pipetą automatyczną o objętości 100 µl. Płytkę inkubowano przez 4 godziny w 4°C z wytrząsaniem 50 rpm. Po inkubacji płytkę 96-dołkową umieszczono na statywie magnetycznym i pobrano próbki (20 µl) startowe w celu

określenia ilości inkubowanej biblioteki fagowej (procedura 4.11). Następnie ze wszystkich dołków płytki 96-dołkowej odciągnięto za pomocą pipety automatycznej całą zawartość i wyrzucono. Płytkę zdjęto ze statywu magnetycznego i nalano 140 μ l Wash Buffer kierując strumień z końcówki pipety automatycznej na kulki, ale ich nie dotykając. Następnie dodano kolejne 140 μ l Wash Buffer i wymieszano każdy z dołków 5 razy lub więcej, jeżeli kulki stanowiły "nierozdzielalną masę". Płytkę pozostawiono na ok. 30 sek. poza statywem magnetycznym a następnie wstawiono na statyw magnetyczny i odczekano aż dołki będą przejrzyste i kulki magnetyczne powędrują na ściankę dołka (w kierunku magnesu). Pobrano po 20 μ l próbki na miano (w celu określenia ilości odpływających, niewiążących się bakteriofagów T7 (procedura 4.11)), a następnie odebrano całą zawartość dołków i wyrzucono. Nalano 2x140 μ l Wash Buffer zgodnie z wytycznymi opisanymi powyżej i całą procedurę powtórzono łącznie 5 razy. Po ostatnim płukaniu odebrano zawartość dołków (płytkę 96-dołkową umieszczono na statywie magnetycznym) i kulki magnetyczne zawieszono w 60 μ l wody do biologii molekularnej (płytkę 96-dołkową umieszczono poza statywem magnetycznym) w celu elucji bakteriofagów rozpoznanych i związanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach. Kulki magnetyczne bardzo dokładnie wymieszano za pomocą pipety automatycznej. Następnie z odpowiednich dołków pobrano próbkę na miano (20 μ l) w celu określenia ilości biblioteki fagowej rozpoznanej przez przeciwciała obecne w badanych surowicach (procedura 4.11). Kontrole techniczne wykonane w doświadczeniu zostały zaprezentowane na rysunku nr 6. Płytki 96-dołkowe z odzyskanymi epitopami rozpoznanymi przez przeciwciała występujące w badanych surowicach poddanych profilowaniu serologicznemu przechowywano w -20°C .



Rysunek 6. Schemat prób badanych i kontroli technicznych zastosowanych w reakcji strącania epitopów bakteriofagowych za pomocą swoistych przeciwciał występujących w surowicach ludzkich [zmodyfikowano na podstawie Xu i in., 2015].

4.14 Reakcja amplifikacji metodą PCR materiału DNA bakteriofagów T7 pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji (wg Thermo Fisher Scientific, zmodyfikowano)

Przygotowano mieszaninę do reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) na płytce 96-dołkowej o pojemności roboczej dołka 200 μ l mieszając w odpowiednich ilościach następujące reagenty:

Mieszanina starterów: <i>forward</i> (20 μ M) i <i>reverse</i> (20 μ M)	0,10 μ l
Matryca (materiał DNA bakteriofagów T7) (zgodnie z procedurą 4.12)	9,02 μ l
EDTA 50 mM	0,88 μ l
Phusion Blood Direct PCR Master Mix	10 μ l
	$V_{\text{reakcji}}=20 \mu\text{l}$

Etapy oraz czas trwania reakcji:

1. denaturacja wstępna	4 min. 30 sekund	98°C	
2. denaturacja właściwa	10 sekund	98°C	x 25
3. połączenie starterów z komplementarnymi sekwencjami	20 sekund	62°C	
4. reakcja polimeryzacji	30 sekund	72°C	
5. wydłużenie końcowe	10 min.	72°C	
6. przechowywanie	∞	10°C	

Reakcję amplifikacji prowadzono w termocyklerze Eppendorf Mastercycler nexus GX2. Jako matrycy do powielania genów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych użyto bakteriofagów T7 pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji. Produkt reakcji amplifikacji naniesiono na żel agarozowy. Przeprowadzono elektroforezę (procedura 4.4).

4.15 Reakcja przyłączenia indeksów (barkodów DNA) do zamplifikowanego materiału DNA bakteriofagów T7 pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji metodą PCR niezbędnych do sekwencjonowania metodą NGS (wg Thermo Fisher Scientific, zmodyfikowano)

Przygotowano mieszaninę do reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) na płytce 96-dółkowej o pojemności roboczej dołka 200 µl mieszając w odpowiednich ilościach następujące reagenty:

Mieszanina indeksów (barkodów DNA)	0,50 µl
(odpowiedni dołek na płytce (set A/B/C/D Illumina, Załącznik nr 4)	
Matryca (materiał DNA bakteriofagów T7)	2,00 µl
(zgodnie z procedurą 4.14)	
EDTA 50 mM	0,88 µl
Woda do biologii molekularnej	6,62 µl

Phusion Blood Direct PCR Master Mix	10 μ l
	$V_{\text{reakcji}}=20 \mu\text{l}$

Etapy oraz czas trwania reakcji:

1. denaturacja wstępna	3 min.	72°C	
2. denaturacja właściwa	30 sekund	95°C	x 12
3. połączenie starterów z komplementarnymi sekwencjami	10 sekund	95°C	
4. reakcja polimeryzacji	30 sekund	55°C	
5. wydłużenie końcowe	30 sekund	72°C	
6. przechowywanie	5 min.	72°C	

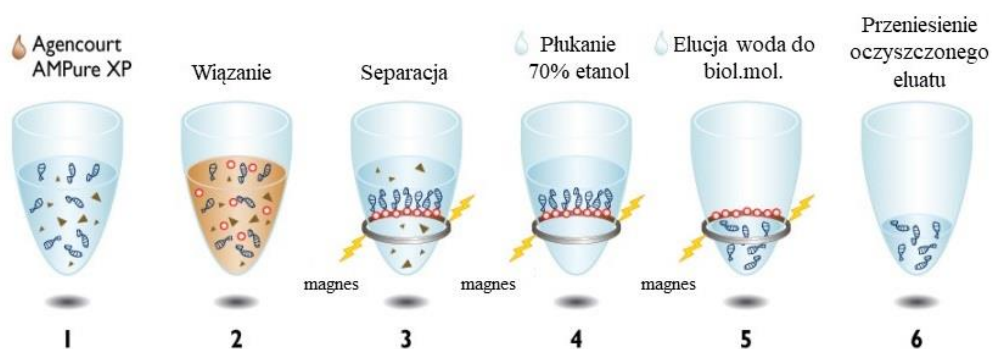
Reakcję przyłączania indeksów (barkodów DNA) prowadzono w termocyklerze Eppendorf Mastercycler nexus GX2. Jako matrycy użyto zamplifikowany materiał genetyczny bakteriofagów T7 pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji (procedura 4.13 & 4.14). DNA zidentyfikowanych bakteriofagów T7 z przyłączonymi indeksami (barkodami DNA) metodą PCR oczyszczono (procedura 4.15) i naniesiono na żel agarozowy. Przeprowadzono elektroforezę (procedura 4.4). Oznaczono stężenie otrzymanego produktu przeprowadzonej reakcji amplifikacji metodą PCR (procedura 4.17).

4.16 Oczyszczanie biblioteki dsDNA do sekwencjonowania metodą NGS (wg Beckman Coulter, zmodyfikowano)

Do płytki 96-dółkowej do PCR zawierającej bibliotekę dsDNA z przyłączonymi indeksami do sekwencjonowania metodą NGS (procedura 4.15) dodano do każdego dołka 36 μ l wymieszanych kulek paramagnetycznych Agencourt AMPure XP. Objętość kulek magnetycznych została wyznaczona na podstawie poniższego wzoru dostarczonego przez producenta:

$$V_{\text{Agencourt AMPure XP/reakcję}} = 1,8 \times V_{\text{reakcji}}$$

Powstałą mieszaninę zamieszano 10 razy przez pipetowanie. Płytkę 96-dołkową inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej a następnie umieszczono na statywie magnetycznym i inkubowano 2 minuty w celu separacji kulek z oczyszczonego roztworu. Kiedy roztwór został oczyszczony z kulek, które utworzyły pierścień na ścianie dołka, pozostały w dołku roztwór odciągnięto za pomocą pipety i wyrzucono. Na dnie dołka pozostawiono ok. 5 μ l roztworu, aby uniknąć wyschnięcia kulek magnetycznych z przyłączonym dsDNA znajdujących się na ścianie dołka. Trzymając dalej płytkę reakcyjną na statywie magnetycznym do każdego dołka dodano 200 μ l przygotowanego „na świeżo” 70% etanolu (roztwór przemywający). Płytkę wyciągnięto ze statywu magnetycznego i wymieszano zawartość dołków przez kilkakrotne pipetowanie i ponownie odstawiono płytkę na statyw magnetyczny. Inkubowano przez 5 min a następnie odebrano całą zawartość dołków, pozostawiając tylko pierścień utworzony z kulek magnetycznych. Płukanie powtórzono 3 razy. Po ostatnim kroku płukania odciągnięto z dołków resztki 70% etanolu. Następnie płytkę reakcyjną wyciągnięto ze statywu magnetycznego i do każdego dołka dodano 20 μ l wody do biologii molekularnej w celu elucji dsDNA z kulek magnetycznych. Zawartość dołków dokładnie wymieszano przez pipetowanie (min.10 razy). Płytkę reakcyjną inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej, a następnie umieszczono na statywie magnetycznym i pozostawiono na 5 minut w temperaturze pokojowej w celu separacji kulek magnetycznych z roztworu. Eluat z każdego dołka odciągnięto pipetą i przeniesiono do zbiorczej probówki typu Eppendorf Biopur (1,5 ml). Wykonano pomiar stężenia oczyszczonej biblioteki dsDNA do sekwencjonowania metodą NGS (procedura 4.17).



Rysunek 7. Etapy oczyszczania dsDNA z wykorzystaniem kulek magnetycznych Agencourt AMPure XP: 1) Dodanie do oczyszczanego roztworu dsDNA odpowiedniej ilości kulek magnetycznych Agencourt AMPure XP, 2) Związanie fragmentów dsDNA do paramagnetycznych kulek, 3) Separacja kulek magnetycznych z związanym dsDNA od zanieczyszczeń, 4) Trzykrotne płukanie dsDNA związanego z kulkami magnetycznymi 70% roztworem etanolu, 5) Elucja oczyszczonych fragmentów dsDNA z kulek magnetycznych, 6) Przeniesienie oczyszczonego eluatu do nowej probówki [zmodyfikowane na podstawie instrukcji Beckman Coulter].

4.17 Pomiar stężenia biblioteki dsDNA do sekwencjonowania metodą NGS (wg Promega)

W probówce typu Eppendorf (1,5 ml) rozcieńczono dołączony do zestawu bufor TE (20x) w wodzie wolnej od nukleaz. Przygotowano QuantiFluor® Dye working solution (probówka typu Eppendorf 1,5 ml) poprzez zmieszanie QuantiFluor® Dye z rozcieńczonym buforem TE w stosunku 1:400 i delikatnie zamieszano na wytrząsarce typu *vortex*. Następnie do probówki PCR 0,5 ml dedykowanej do zestawu przeniesiono 200 μ l QuantiFluor® Dye working solution i dodano 2 μ l oczyszczonej biblioteki dsDNA (procedura 4.16) lub 2 μ l standardu dsDNA dołączonego do zestawu. Mieszaninę zamieszano 3 razy poprzez powolne pipetowanie a następnie umieszczono na wytrząsarce typu *vortex* i bardzo ostrożnie mieszano przez ok. 10 sekund. W celu zerowania aparatu pomiarowego przygotowano 200 μ l QuantiFluor® Dye working solution w 0,5 ml probówce PCR. Probówki PCR 0,5 ml inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut chroniąc przed dostępem światła. Pomiar fluorescencji wykonano zgodnie z instrukcją dołączoną do fluorymetru Quantus (Promega).

4.18 Sekwencjonowanie DNA metodą NGS (wg Illumina, zmodyfikowano i Genomed)

Sekwencjonowanie DNA metodą NGS wykonano w celu określenia sekwencji DNA immunoprecypitowanych epitopów bakteriofagów. Do wyizolowanego i namnożonego DNA w reakcji PCR (procedura 4.13) przyłączono pary indeksowanych adapterów do sekwencjonowania DNA metodą NGS (Załącznik nr 4, procedura 4.15). Każdy oligonukleotyd biblioteki DNA został obustronnie znakowany sekwencją indeksu o długości 10 par zasad. Stężenie przygotowanej do sekwencjonowania wyjściowej biblioteki DNA oceniono zgodnie z procedurą 4.16. Sekwencjonowanie prób częściowo przeprowadzono samodzielnie w Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki IITD PAN, a częściowo wykorzystując serwis komercyjny Genomed.

Sekwencjonowanie DNA metodą NGS w Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki IITD PAN wykonano na sekwenatorze II generacji NextSEQ (Illumina) zgodnie z instrukcją producenta. Reagent Cartridge dołączony do zestawu został przełożony do 8°C dzień przed wykonywaniem sekwencjonowania metodą NGS. Przeliczenie stężenia otrzymanej do sekwencjonowania biblioteki DNA (z ng/μl zgodnie z procedurą 4.17) do nM wykonano zgodnie z poniższym wzorem zawartym w instrukcji dostarczonej przez producenta urządzenia:

$$\frac{\text{stężenie biblioteki DNA w } \frac{ng}{\mu l}}{660 \frac{g}{mol} \times \text{średni rozmiar biblioteki w pz}} \times 10^6 = \text{stężenie w nM}$$

Średni rozmiar biblioteki DNA poddanej sekwencjonowaniu metodą NGS wynosił 300 pz.

Przygotowano serię rozcieńczeń roztworu NaOH w wodzie do biologii molekularnej (2 M, 1 M, 0,2 M). Wyjściową bibliotekę do sekwencjonowania rozcieńczono w dołączonym do zestawu odczynnika RSB do stężenia 4 nM. Następnie w celu denaturacji biblioteki DNA do 1,5 ml probówki typu Eppendorf biopur dodano 5 μl biblioteki DNA o stężeniu 4 nM oraz 5 μl 0,2 M

NaOH. Probówkę umieszczono na kilka sekund na wytrząsarce typu *vortex*. Wirowano przez 1 minutę przy $280 \times g$. Inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Następnie do próbówki reakcyjnej dodano 5 μ l 200 mM Tris-HCl o pH 7,0. W celu przygotowania 200 mM Tris-HCl 1 M Tris-HCl rozstał rozcieńczony 5 razy w wodzie do biologii molekularnej. Probówkę z mieszaniną reakcyjną umieszczono na kilka sekund na wytrząsarce typu *vortex*. Wirowano przez 1 minutę przy $280 \times g$. Zdenaturowaną bibliotekę DNA rozcieńczono do 20 pM poprzez dodanie 985 μ l dołączonego do zestawu odczynnika HT1. Probówkę z rozcieńczoną zdenaturowaną biblioteką DNA umieszczono na kilka sekund na wytrząsarce typu *vortex*. Wirowano przez 1 minutę przy $280 \times g$. Probówkę umieszczono na lodzie do czasu przygotowania ostatecznych rozcieńczeń. Zgodnie z wytycznymi używanych do sekwencjonowania zestawów (Mid Output Kits) zdenaturowaną bibliotekę DNA o stężeniu 20 pM rozcieńczono do 1,5 pM. W tym celu zmieszano 97 μ l zdenaturowanej biblioteki DNA o stężeniu 20 pM z 1203 μ l odczynnika HT1. Mieszaninę pomieszano poprzez inwersję próbówki a następnie krótko (kilka sekund) wirowano przy $280 \times g$. Probówkę z 1,5 pM zdenaturowaną biblioteką DNA do sekwencjonowania umieszczono na lodzie. Przygotowano dołączoną do zestawu bibliotekę PhiX, która stanowiła kontrolę sekwencjonowania DNA. W próbówce typu Eppendorf Biopur zmieszano 2,5 μ l 10 nM biblioteki PhiX z 3,75 μ l dołączonego do zestawu odczynnika RSB, otrzymując rozcieńczenie 4 nM. Probówkę z mieszaniną reakcyjną umieszczono na kilka sekund na wytrząsarce typu *vortex*. Wirowano kilka sekund przy $280 \times g$. W celu zdenaturowania kontrolnej biblioteki w próbówce typu Eppendorf Biopur zmieszano 5 μ l 4nM PhiX z 5 μ l przygotowanego wcześniej 0,2 M NaOH. Probówkę z mieszaniną reakcyjną umieszczono na kilka sekund na wytrząsarce typu *vortex*. Wirowano kilka sekund przy $280 \times g$. Inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie do próbówki reakcyjnej dodano 5 μ l 200 mM Tris-HCl o pH 7,0. Probówkę umieszczono na kilka sekund na wytrząsarce typu *vortex*. Wirowano 1 minutę przy $280 \times g$. Zdenaturowaną kontrolną bibliotekę PhiX rozcieńczono do 20 pM poprzez dodanie 985 μ l dołączonego do zestawu odczynnika HT1. Probówkę z rozcieńczoną zdenaturowaną kontrolną biblioteką umieszczono na kilka sekund na wytrząsarce typu *vortex*. Wirowano przez 1 minutę przy $280 \times g$. Probówkę umieszczono na lodzie do czasu przygotowania ostatecznych rozcieńczeń. Zgodnie z wytycznymi używanych do sekwencjonowania zestawów (Mid Output Kits) zdenaturowaną kontrolną bibliotekę PhiX o stężeniu 20 pM rozcieńczono do 1,5 pM. W tym celu zmieszano 97 μ l zdenaturowanej kontrolnej biblioteki PhiX o stężeniu 20 pM

z 1203 μ l odczynnika HT1. Mieszaninę pomieszano poprzez inwersję próbki a następnie wirowano przez 1 minutę przy $280 \times g$. Do próbki typu Eppendorf Biopur przeniesiono otrzymane biblioteki mieszając je ze sobą w odpowiedniej ilości: 130 μ l 1,5 pM kontrolnej biblioteki PhiX (10%) z 1170 μ l 1,5 pM biblioteki DNA badanych próbek (90%). Probówkę umieszczono na kilka sekund na wyrzășarce typu *vortex*. Wirowano 1 minutę przy $280 \times g$. Tak przygotowana mieszanina (1,3 ml) została nałóŜona za pomocą pipety na Reagent Cartridge w miejscu wyznaczonym przez producenta. Flow Cella, Reagents Container oraz Buffer Cartridge zostały przygotowane zgodnie z informacjami wyświetlonymi na ekranie urzãdzenia NextSEQ. Reagent Cartridge z nałóŜoną mieszaniną do sekwencjonowania został włóŜony do urzãdzenia NextSEQ zgodnie z komunikatami wyświetlonymi na urzãdzeniu. Sekwencjonowano w trybie sparowanych koŃców w dwóch odczytach po 149 zasad. Urzãdzenie uruchomiono po zaplanowaniu procesu wpisujãc 10 jako dłuŜość pz uŜytych indeksów (barkodów) oraz 149 jako liczbę zasad w oczekiwanych odczytach.

Sekwencjonowanie w serwisie Genomed (Warszawa). Pozostała część prób została zsekwencjonowana metodą NGS na urzãdzeniu NovaSeq6000 (Illumina) w trybie sparowanych koŃców w dwóch odczytach po 150 zasad z gwarancją uzyskania 750 mln par odczytów na całą pulę dostarczonej biblioteki przez serwis Genomed. Wykonano kontrolę jakości sekwencjonowania, filtrowanie odczytów oraz kwantyfikację 1 puli dostarczonej biblioteki DNA. Wyniki sekwencjonowania DNA metodą NGS zostały udostępnione przez firmę Genomed w formie plików w formacie .fastq.

4.19 Analiza danych uzyskanych po sekwencjonowaniu DNA metodą NGS

Po zakoŃczonym sekwencjonowaniu DNA metodą NGS prowadzonego w pracowni IITD z serwera urzãdzenia NextSEQ (Illumina) pobrano pliki wynikowe w formacie .bcl. Przy uŜyciu programu bcl2fastq (Illumina) przekonwertowano pliki wynikowe w formacie .bcl do formatu .fastq.gz. Następnie rozpakowano pliki z formatu .fastq.gz do formatu .fastq z wykorzystaniem programu do dekompresji plików gunzip (wolne oprogramowanie). Zbiór uzyskanych plików wynikowych w formacie .fastq został połączony ze zbiorem plików uzyskanych z serwisu Genomed i dalej analizowany równolegle. Kolejnym krokiem analizy było połączenie odczytów (R1 i R2) dla badanej próbki. Etap ten został wykonany

z wykorzystaniem skryptu napisanego w języku programowania Python (autorem skryptu jest bioinformatyk mgr inż. Marek Harhala). Następnie sekwencje plików wynikowych w formacie .fasta (odczyty po sekwencjonowaniu metodą NGS) zostały zmapowane do oryginalnej biblioteki sekwencji nukleotydowych, które zostały wysłane w formacie FASTA do firmy Agilent i stanowiły wzór syntezy biblioteki oligonukleotydów (procedura 4.1). Zaindeksowanie oryginalnej biblioteki sekwencji nukleotydowych odpowiadających białkom bakteriofagowym oraz mapowanie do niej uzyskanych odczytów po sekwencjonowaniu metodą NGS zostało wykonane z wykorzystaniem oprogramowania bowtie2 (Johns Hopkins University). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej (autorem analizy jest bioinformatyk mgr inż. Marek Harhala). Sygnał (**S**) został obliczony dla każdego syntezowanego oligonukleotydu bakteriofagowego, każdej badanej surowicy i biblioteki kontrolnej osobno jak pokazano na poniższym równaniu:

$$S_{ijm} = \log_{10} \left(\frac{C_{ijm}}{\sum_i^I C_{ijm}} \right)$$

gdzie:

i – syntezowany oligonukleotyd w bibliotece wejściowej

j – próbka badana

m- powtórzenie techniczne

I – zbiór wszystkich oligonukleotydów zsyntezowanych w bibliotece wejściowej

S – sygnał oligonukleotydu *i* w próbce *j* i powtórzeniu technicznym *m*

Średni sygnał i jego odchylenie standardowe z grupy próbek kontrolnych dla każdego oligonukleotydu został osobno obliczony i przypisany do tego oligonukleotydu. Następnie oceniono statystyczną ważność sygnału z każdej badanej próbki (szansę, że sygnał odczytany jest przypadkowy) (*p*). Szansa ta została obliczona uwzględniając rozkład standardowy, średnią i SD z próbek kontrolnych oraz sygnał w próbce badanej dla każdego oligonukleotydu osobno. Za statystycznie wzbogacone oligonukleotydy (kodujące immunogenne oligopeptydy) uznawano oligopeptydy z $p < 0.0001$ w obu powtórzeniach technicznych próbki.

4.20 Opis zidentyfikowanych epitopów bakteriofagów (wg NCBI oraz BLAST)

Otrzymane w wyniku analizy statystycznej (procedura 4.19) zestawienie zidentyfikowanych epitopów bakteriofagowych najczęściej rozpoznanych przez przeciwciała w ludzkiej surowicy poddano analizie z wykorzystaniem bazy danych zawierającej sekwencje białkowe (NCBI) oraz narzędzia do analizy sekwencji (BLAST). Sekwencje aminokwasowe poszczególnych oligopeptydów zostały pobrane z bazy sekwencji białkowych (NCBI). W tym celu numer dostępu danego zidentyfikowanego białka bakteriofagowego został wpisany w wyszukiwarkę dla bazy białkowej NCBI i pobrana została sekwencja odpowiadającego mu zidentyfikowanego oligopeptydu, która rozpoczynała się od aminokwasu wyliczonego według następującego wzoru:

$$(n - 1) \times 28 + 1 = \textit{pierwszy aminokwas w danym oligopeptydzie}$$

gdzie: n – numer zidentyfikowanego peptydu epitopu bakteriofagowego

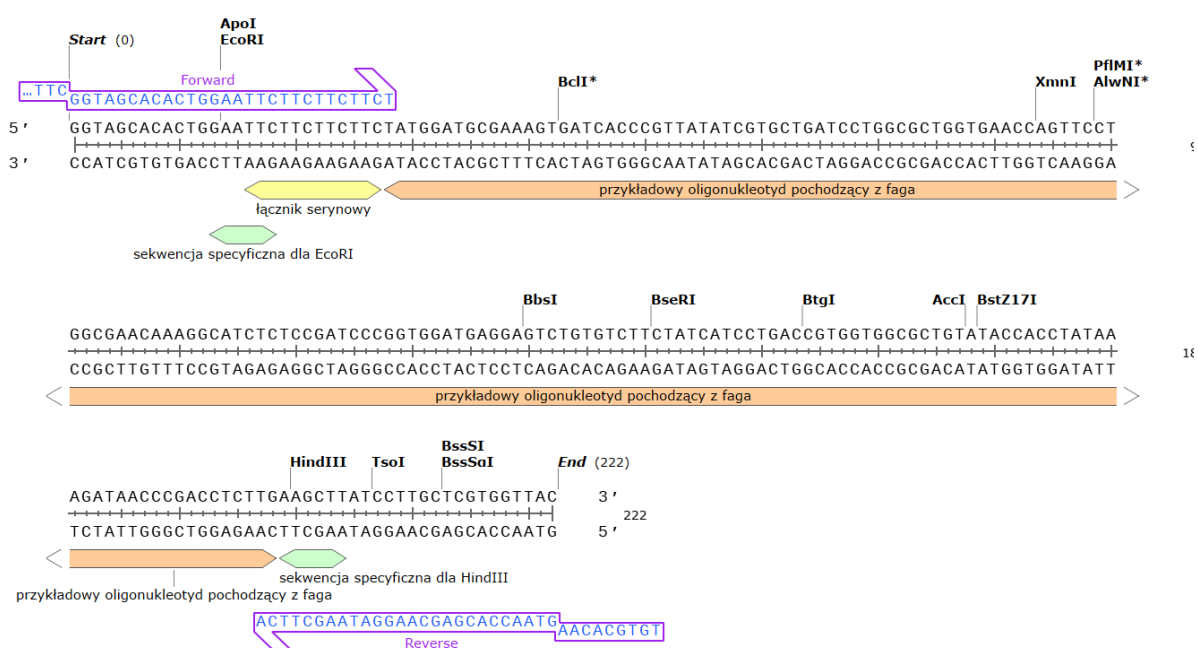
Wzór ten jest ściśle związany ze schematem przygotowania biblioteki oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych (procedura 4.1). Z wykorzystaniem tej samej bazy odczytano dla danego zidentyfikowanego oligopeptydu bakteriofagowego następujące informacje: nazwę gospodarza, gatunek oraz miejsce izolacji bakteriofaga, z którego pochodzi dany oligopeptyd, bibliografię oraz inne informacje. Informacje dotyczące cyklu życiowego danego bakteriofaga, z którego pochodzi dany zidentyfikowany oligopeptyd zostały zaczerpnięte z bibliografii dołączonej do danej zidentyfikowanej sekwencji białkowej bakteriofaga dostępnej w bazie białkowej NCBI. Sekwencje homologów dla zidentyfikowanych sekwencji oligopeptydów bakteriofagowych zostały zidentyfikowane przy pomocy narzędzia do analizy sekwencji BLAST. Podczas wyszukiwania zastosowano wykluczenie, którym były sekwencje białek eukariotycznych. Za sekwencje homologiczne do analizowanego oligopeptydu uznano sekwencje, których procent identyczności wynosił 90% i więcej. Bakteryjne sekwencje homologiczne do

zidentyfikowanych epitopów bakteriofagowych uznano za podobne, gdy procent identyczności obu sekwencji wyniósł 50% i więcej.

5. Wyniki

5.1. Zamplifikowana biblioteka oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych

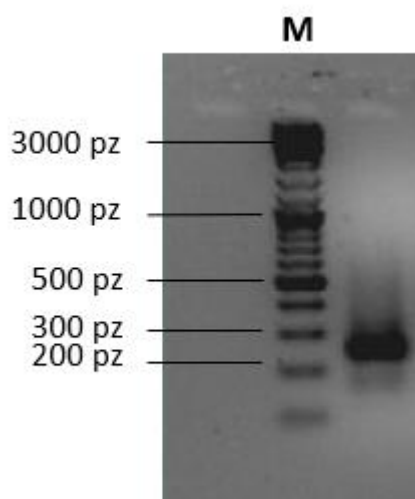
Zamplifikowano bibliotekę $2,8 \times 10^5$ oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych zgodnie z procedurą 4.2. Sekwencje wszystkich zaprojektowanych oligonukleotydów bakteriofagowych zostały przedstawione w Załączniku nr 3. Przykładowy oligonukleotyd przygotowany do klonowania do wektora faga T7 został przedstawiony na Rysunku 8.



Rysunek 8. Przykładowy oligonukleotyd przygotowany do klonowania do wektora T7Select415-1; wskazano miejsca przyłączenia starterów *forward* i *reverse* oraz sekwencje towarzyszące.

Przeprowadzona zgodnie z procedurą 4.4 elektroforeza DNA potwierdziła uzyskanie produktu po przeprowadzonym PCR (Rysunek 9). Na przedstawionym rysunku nr 9 widoczne

są prążki o wielkości około 300 pz (ocenione na podstawie wykorzystanego w procedurze markera masy DNA), które odpowiadają wielkością oligonukleotydom do klonowania do wektora faga T7. Produkt PCR oczyszczono zgodnie z procedurą 4.3. Stężenie otrzymanego produktu przeprowadzonej reakcji amplifikacji metodą PCR wynosiło 82,52 ng/μl.

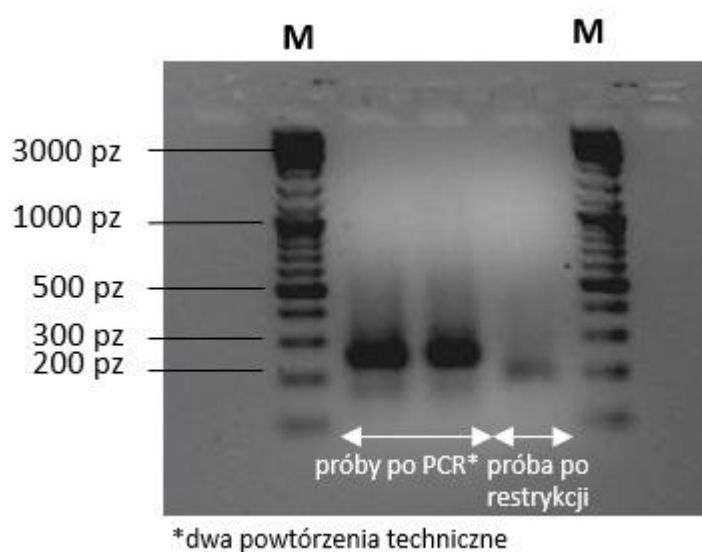


Rysunek 9. Obraz elektroforetyczny przedstawiający produkt reakcji amplifikacji biblioteki oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych.

5.2. Przygotowanie do klonowania biblioteki oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych

W celu przygotowania biblioteki oligonukleotydów bakteriofagowych do klonowania do wektora T7Select415-1 wykonano reakcję enzymatyczną z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych DNA (zgodnie z procedurą 4.6) w celu utworzenia „lepkich” końców amplifikowanej biblioteki oligonukleotydów. Otrzymane „lepkie” końce po restrykcji enzymami EcoRI oraz HindIII umożliwiły swobodne połączenie z „lepkimi” końcami wektora T7Select415-1 dostarczonego z zestawem T7Cloning (Novagen). Przeprowadzona zgodnie z procedurą 4.4 elektroforeza DNA potwierdziła uzyskanie pociętego produktu po przeprowadzonej reakcji restrykcji (Rysunek 10). Na przedstawionym rysunku nr 10 widoczne są prążki o wielkości nieco mniejszej niż produkty zamplifikowanej biblioteki oligonukleotydów bakteriofagowych o wielkości 222 pz (ocenione na podstawie wykorzystanego w procedurze markera masy DNA), które odpowiadają wielkością pociętym

oligonukleotydom do klonowania do wektora faga T7Select415-1. Różnica w wielkości fragmentów DNA odpowiadającej powstałym na żelu agarozowym prążkom jest nieznaczna, ponieważ po cięciu enzymami restrykcyjnymi sekwencje oligonukleotydów bakteriofagowych tracą nieduży fragment swojej sekwencji. Produkt reakcji restrykcji oczyszczono zgodnie z procedurą 4.3. Stężenie otrzymanego produktu reakcji enzymatycznej z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych DNA wynosiło 12,22 ng/μl.



Rysunek 10. Obraz elektroforetyczny przedstawiający przygotowaną do klonowania bibliotekę oligonukleotydów kodujących fragmenty białek bakteriofagowych (próba po restrykcji).

5.3. Klonowanie biblioteki oligonukleotydów do wektora T7Select415-1 i konstrukcja biblioteki rekombinowanych bakteriofagów T7 prezentujących na swojej powierzchni oligopeptydy bakteriofagowe

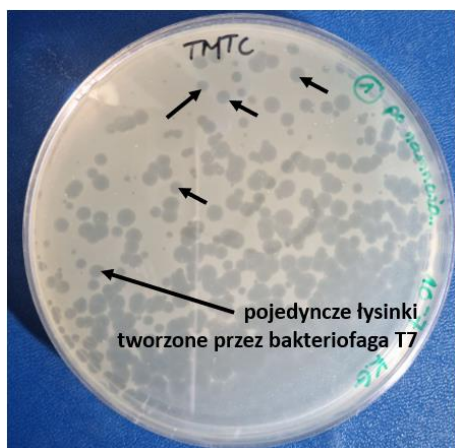
Zamplifikowana biblioteka oligonukleotydów po restrykcji enzymami *EcoRI* i *HindIII* została wklonowana podczas reakcji ligacji do wektora T7Select415-1, również pociętego enzymami restrykcyjnymi *EcoRI/HindIII* (procedura 4.7). Ze względu na wielkość produktu

reakcji ligacji nie wykonywano elektroforezy DNA po tym etapie. Miano biblioteki po etapie składania (procedura 4.9) i po etapie namnażania (4.10) wynosiło odpowiednio $1,66 \times 10^6$ PFU/ml i $5,5 \times 10^9$ PFU/ml.

5.4. Przygotowanie biblioteki zrekombinowanego bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagowych do immunoprecypitacji

Przygotowano 10 l płynnego lizatu zrekombinowanej biblioteki faga T7 zgodnie z procedurą 4.10, który został skoncentrowany do 800 ml lizatu (zgodnie z procedurą 14.11). Ilość biblioteki bakteriofaga T7 przed koncentracją wynosiła: $8,3 \times 10^9$ PFU/ml (obliczone zgodnie z procedurą 4.12). Po koncentracji miano biblioteki wynosiło $3,9 \times 10^{10}$ PFU/ml. Wygląd łysinek tworzonych przez bibliotekę bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagowych został przedstawiony na rysunku 11.

a)



b)



Rysunek 11. Wygląd łysinek tworzonych przez zrekombinowanego bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagowych (a). Posiew redukcyjny gospodarza (*E.coli*) dla bakteriofaga T7 (b).

5.5. Strącanie epitopów bakteriofagowych w wyniku reakcji immunoprecypitacji

Strącanie epitopów bakteriofagowych wykonano w wyniku reakcji immunoprecypitacji zgodnie z procedurą 4.13. Miana odpłukiwanych po każdym etapie oraz odzyskanych w etapie elucji bakteriofagów przedstawiono w tabeli nr 6.

Tabela 6. Miana odpłukiwanych po każdym etapie oraz odzyskanych w etapie elucji bakteriofagów.

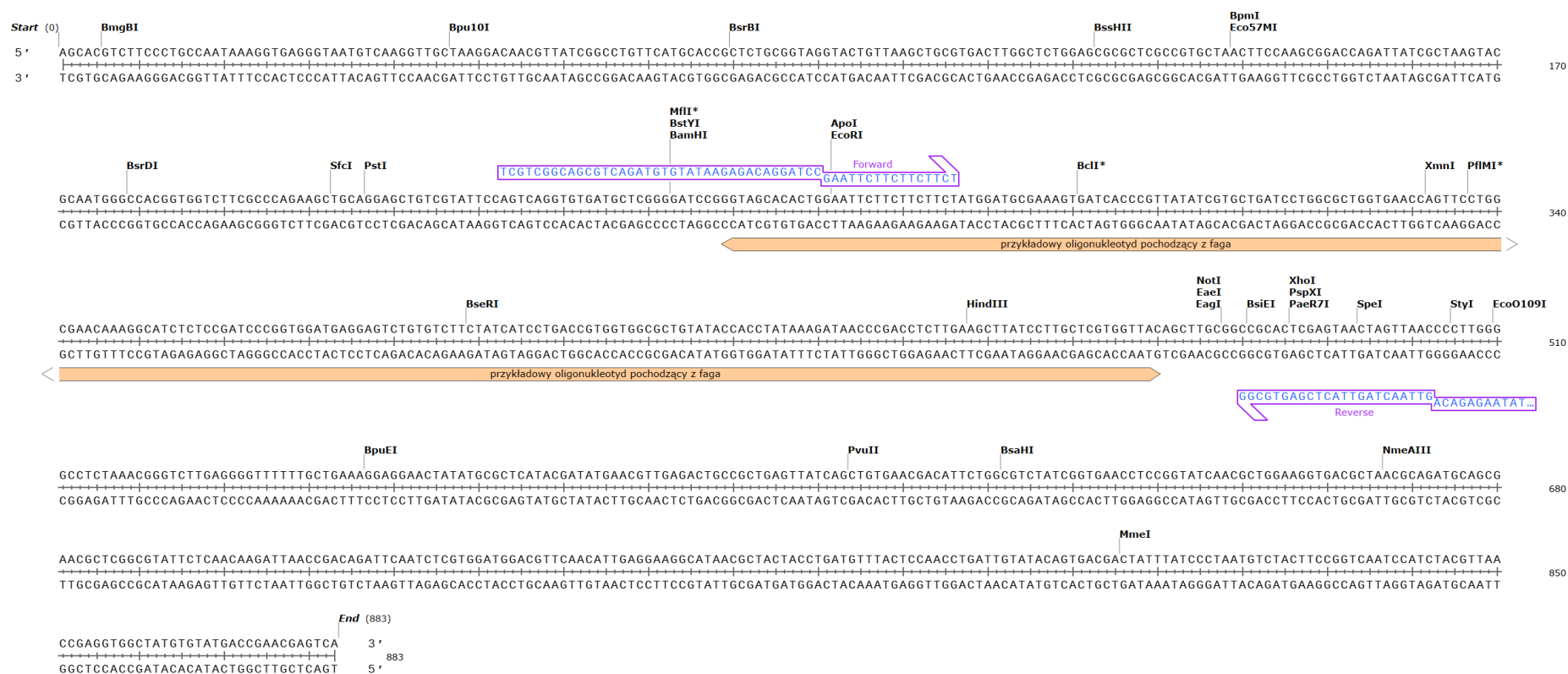
Etap immunoprecypitacji	Miano biblioteki bakteriofagów [PFU/ml]
<i>Start</i>	$8,4 \times 10^{10}$
<i>Phukanie nr 1</i>	$1,3 \times 10^9$
<i>Phukanie nr 2</i>	$7,8 \times 10^6$
<i>Phukanie nr 3</i>	$3,1 \times 10^6$
<i>Phukanie nr 4</i>	$4,3 \times 10^6$
<i>Phukanie nr 5</i>	$2,2 \times 10^6$
<i>Elucja</i>	$5,5 \times 10^7$

*Kontrola 1 [$4,5 \times 10^5$ PFU/ml], Kontrola 2 [$5,0 \times 10^4$ PFU/ml]

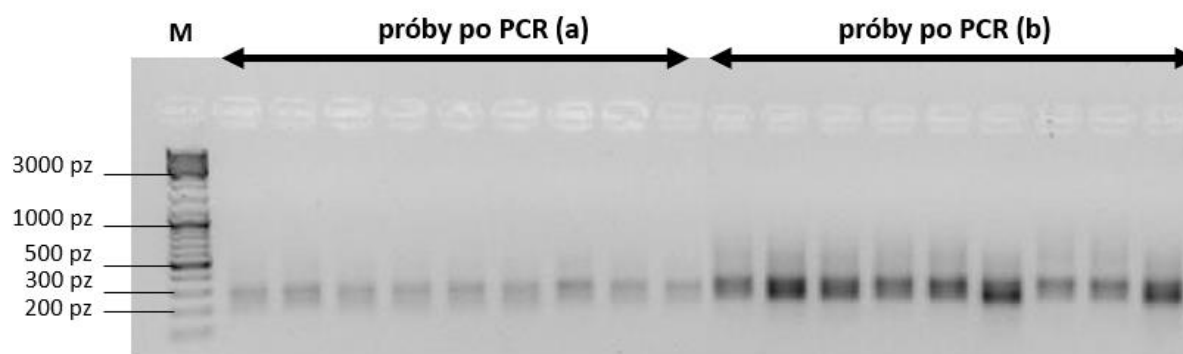
5.6. Izolacja materiału genetycznego z immunoprecypitowanej części biblioteki zrekombinowanego bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagowych i przygotowanie uzyskanego materiału do sekwencjonowania DNA metodą NGS.

Izolację materiału genetycznego z immunoprecypitowanej części biblioteki zrekombinowanych bakteriofagów T7 wykonano zgodnie z procedurą 4.16. Na rysunku 12 przedstawiono lokalizację przykładowego oligonukleotydu bakteriofagowego w sekwencji wektora T7Select415-1. Przeprowadzona zgodnie z procedurą 4.4 elektroforeza DNA potwierdziła uzyskanie produktu po wykonanej izolacji (Rysunek 13 (a)). Na przedstawionym rysunku nr 13 (a) widoczne są prążki o wielkości około 300 pz (ocenione na podstawie

wykorzystanego w procedurze markera masy DNA), które odpowiadają wielkością oligonukleotydom pochodzącym z bakteriofagów T7 prezentujących na swojej powierzchni strącone w wyniku immunoprecypitacji oligopeptydy. Na przedstawionym rysunku nr 13 (b) widoczne są prążki o wielkości również około 300 pz (ocenione na podstawie wykorzystanego w procedurze markera masy DNA), które odpowiadają wielkością oligonukleotydom pochodzącym z bakteriofagów T7 prezentujących na swojej powierzchni strącone w wyniku immunoprecypitacji oligopeptydy wraz z przyłączonymi barkodami (zgodnie z procedurą 4.15). Przyłączone barkody posiadają 10 pz dlatego też różnica w wielkości prążków na wykonanym żelu agarozowym jest niezauważalna. Produkt PCR oczyszczono zgodnie z procedurą 4.16.



Rysunek 12. Lokalizacja przykładowego oligonukleotydu bakteriofagowego w sekwencji wektora T7Select415-1, wskazano miejsca przyłączenia starterów *forward* i *reverse* oraz sekwencje towarzyszące. Ze względu na wielkość sekwencji wektora T7Select415-1 na powyższym rysunku przedstawiono jedynie fragment, w którym wprowadzane są sekwencje oligonukleotydów bakteriofagowych.



Rysunek 13. Obraz elektroforetyczny przedstawiający produkty reakcji amplifikacji materiału DNA bakteriofagów T7 pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji (a) oraz produkty reakcji przyłączenia indeksów (barkodów DNA) do zaplifikowanego materiału DNA bakteriofagów T7 pozyskanych w wyniku immunoprecypitacji (b).

5.7. Sekwencjonowanie immunoprecypitowanej części biblioteki zrekombinowanego bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagowych (metodą NGS)

Pomiar stężenia oczyszczonej biblioteki dsDNA do sekwencjonowania metodą NGS wykonano zgodnie z metodą 4.16. Otrzymane wyniki zamieszczono w tabeli nr 7.



Tabela 7. Stężenie biblioteki dsDNA poddanej sekwencjonowaniu metodą NGS.

Nazwa biblioteki	Stężenie	Stężenie
[ilość prób poddanych sekwencjonowaniu]		
Biblioteka dsDNA nr 1 [30]*	37,5 ng/μl	172,2 nM
Biblioteka dsDNA nr 2 [34]*	9,5 ng/μl	47,98 nM
Biblioteka dsDNA nr 3 [36]*	27,0 ng/μl	136,36 nM
Biblioteka dsDNA nr 4 [36]*	19,0 ng/μl	87,23 nM
Biblioteka dsDNA nr 5 [64]*	32,50 ng/μl	niewymagane

(Sekwencjonowane przez firmę Genomed)

*liczba ta nie zawiera powtórzeń technicznych i próbek kontrolnych

Przeliczono stężenie otrzymanej biblioteki DNA zgodnie ze wzorem zawartym w procedurze 4.18 w akapicie dotyczącym sekwencjonowania DNA metodą NGS w Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki IITD PAN. Otrzymane stężenie wyrażone w nM dla danej biblioteki zostało przedstawione w tabeli 7. Następnie wykonano kolejne kroki w procedurze 4.18 i zsekwencjonowano przygotowane biblioteki DNA metodą NGS. Zsekwencjonowano 200 prób po immunoprecypitacji, w tym 100 prób po immunoprecypitacji z surowicami pochodzącymi z populacji polskiej oraz 100 prób po immunoprecypitacji z surowicami pochodzącymi z populacji USA (liczba prób sekwencjonowanych w IITD PAN wynosiła 136, liczba prób sekwencjonowanych przez serwis Genomed wynosiła: 64. Kontrolę (referencję) stanowiła biblioteka zrekombinowanego bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni fragmenty białek bakteriofagowych przed immunoprecypitacją; referencję utworzono z 45 powtórzeń sekwencjonowanej biblioteki wyjściowej (w tym liczba prób biblioteki wyjściowej sekwencjonowanych przez serwis Genomed). Na etapie analizy wyników sekwencjonowania DNA metodą NGS odrzuconych zostało 40 prób (pochodzących z populacji polskiej lub USA) i część powtórzeń biblioteki wyjściowej ze względu na niską jakość uzyskanych odczytów lub niezgodności w powtórzeniach technicznych dla tych prób. Przykładowy plik wynikowy z podsumowaniem sekwencjonowania DNA metodą NGS generowany z serwera urządzenia NextSeq (Illumina) dla sekwencjonowania biblioteki DNA nr 1 wyglądał następująco (Rysunek 14):

Instrument NextSeq-simulator	 61.04 AVG %Q30	 79.18 %PF	Created 2021-03-03 11:57	Instrument Type NextSeq
Run Status Complete	Lane QC Status QcPassed	Flow Cell Status QcPassed	File Count/Size 3826 files (19 GB)	File Status Active
Latest Analysis FASTQ Generation 2...	Cycles 149 10 10 149	Yield 34.11 Gbp	Owner Katarzyna Gembara	User Marek Harhala
			Flow Cell ID --	Run ID --

Per Read Metrics

READ	CYCLES	YIELD	PROJECTED YIELD	ALIGNED (%)	ERROR RATE (%)	INTENSITY CYCLE 1	%>Q30
Read 1	149	16.09 Gbp	16.09 Gbp	7.01	2.92	2999.92	55.89
Read 2 (I)	10	977.28 Mbp	977.28 Mbp	0.00	0.00	7726.18	78.25
Read 3 (I)	10	978.71 Mbp	978.71 Mbp	0.00	0.00	6137.49	77.91
Read 4	149	16.06 Gbp	16.06 Gbp	6.37	2.27	4930.68	64.12
Non-index Reads Total	298	32.15 Gbp	32.15 Gbp	6.69	2.60	3965.30	60.00
Total	318	34.11 Gbp	34.11 Gbp	6.69	2.60	5448.56	61.04

Per Lane Metrics

LANE	STATUS	READ	CLUSTER PF(%)	%>Q30	YIELD	ERROR RATE(%)	READS PF	DENSITY	TILES	LEGACY PHAS / PREPHAS(%)	COMMENTS	INTENSITY
<input type="checkbox"/> 1	<u>QC Passed</u>	Read 1	79.81±2.64	53.75	3.99 Gbp	<u>3.83 ±1.30</u>	<u>27 001 514</u>	156 ±9	72	0.456 / 0.107		3086±434
		Read 2 (I)		78.39	0.24 Gbp	<u>0.00 ±0.00</u>				0.000 / 0.000		8210±532
		Read 3 (I)		77.80	0.24 Gbp	<u>0.00 ±0.00</u>				0.000 / 0.000		6423±402
		Read 4		60.96	3.98 Gbp	<u>2.76 ±0.81</u>				0.126 / 0.004		4238±2539
<input type="checkbox"/> 2	<u>QC Passed</u>	Read 1	79.63±2.63	57.51	3.93 Gbp	<u>2.67 ±0.83</u>	<u>26 618 722</u>	154 ±6	72	0.346 / 0.138		3033±403
		Read 2 (I)		77.96	0.24 Gbp	<u>0.00 ±0.00</u>				0.000 / 0.000		7870±228
		Read 3 (I)		78.33	0.24 Gbp	<u>0.00 ±0.00</u>				0.000 / 0.000		6281±320
		Read 4		66.08	3.93 Gbp	<u>1.99 ±0.45</u>				0.145 / 0.000		5493±1250
<input type="checkbox"/> 3	<u>QC Passed</u>	Read 1	79.92±2.69	56.36	4.08 Gbp	<u>2.79 ±1.02</u>	<u>27 588 800</u>	159 ±7	72	0.361 / 0.089		2893±425
		Read 2 (I)		78.50	0.25 Gbp	<u>0.00 ±0.00</u>				0.000 / 0.000		7537±337
		Read 3 (I)		77.57	0.25 Gbp	<u>0.00 ±0.00</u>				0.000 / 0.000		5956±256
		Read 4		64.51	4.07 Gbp	<u>2.35 ±0.77</u>				0.110 / 0.001		4635±2046
<input type="checkbox"/> 4	<u>QC Passed</u>	Read 1	77.73±3.09	55.96	4.09 Gbp	<u>2.41 ±0.80</u>	<u>27 658 862</u>	164 ±5	72	0.385 / 0.169		2988±477
		Read 2 (I)		78.16	0.25 Gbp	<u>0.00 ±0.00</u>				0.000 / 0.000		7287±448
		Read 3 (I)		77.96	0.25 Gbp	<u>0.00 ±0.00</u>				0.000 / 0.000		5890±419
		Read 4		64.92	4.09 Gbp	<u>2.03 ±0.42</u>				0.091 / 0.000		5357±877

Rysunek 14. Przykładowy raport wygenerowany na serwerze urządzenia NextSeq (Illumina) po sekwencjonowaniu DNA metodą NGS.

5.8 Charakterystyka zidentyfikowanych reaktywnych oligopeptydów bakteriofagów

„Reaktywne epitopy bakteriofagowe” – przyjęto, że dany obszar białka fagowego (oligopeptyd) zawiera epitop „reaktywny”, jeśli obserwowano jego statystycznie istotne wzbogacenie po reakcji immunoprecypitacji u co najmniej 5% badanej populacji. Wzbogacenie było obliczane w odniesieniu do wyjściowego, rzeczywistego składu sklonowanej biblioteki, który został oznaczony metodą sekwencjonowania NGS i został wykorzystany jako kontrola (referencja). W wyniku tej analizy statystycznej w próbkach kontrolnych (biblioteka zrekombinowanego bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni fragmenty oligopeptydów pochodzących z bakteriofagów) zidentyfikowano 37 oligopeptydów z oryginalnej biblioteki, które po etapie konstrukcji biblioteki okazały się być nadreprezentowane w i dlatego zostały usunięte z dalszej analizy (z tych 37 oligonukleotydów tylko 6 zostało zidentyfikowane jako wzbogacone w ponad 5% badanych surowicach). Lista zidentyfikowanych 245 najczęstszych epitopów bakteriofagowych została przedstawiona w Załączniku nr 5.

Ze względu na ilość uzyskanych danych do dalszej charakterystyki zostało wybranych 67 pierwszych najczęściej rozpoznanych oligopeptydów bakteriofagowych przez przeciwciała IgG obecne w badanych surowicach (najsilniej „reaktywne”). Dalsza analiza dotyczy 67 oligopeptydów bakteriofagowych zidentyfikowanych jako najczęściej rozpoznawane wśród badanych surowic (łącznie dla populacji polskiej oraz USA). Obszerna charakterystyka 67 zidentyfikowanych epitopów bakteriofagowych została przedstawiona w Załączniku nr 6. Charakterystyka ta obejmuje: nazwę oraz sekwencję aminokwasową oligopeptydu, numer dostępu w bazie sekwencji białkowych (NCBI) oraz nazwą białka bakteriofagowego, z którego pochodzi dany oligopeptyd. Ponadto w charakterystyce zamieszczone zostały takie informacje jak: nazwa bakteriofaga, z którego pochodzi dane białko bakteriofagowe (będące źródłem oligopeptydu), specyficzność tego faga wobec gatunku bakterii oraz prezentowany cykl infekcyjny i miejsce izolacji bakteriofaga. W Załączniku nr 6 przedstawione zostały również wyniki obliczeń: procent występowania zidentyfikowanego oligopeptydu bakteriofagowego w badanych surowicach (osobno dla populacji polskiej i USA oraz dla wszystkich badanych prób bez względu na pochodzenie), procent występowania zidentyfikowanego oligopeptydu

bakteriofagowego wśród populacji żeńskiej oraz męskiej (bez podziału na przynależność geograficzną badanej surowicy).

5.8.1 Geograficzna analiza bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych rozpoznanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach

W Załączniku nr 6 do niniejszej rozprawy przedstawiona została m.in. lista 67 oligopeptydów bakteriofagowych najczęściej rozpoznanych przez przeciwciała IgG i procent przebadanych surowic, które były zdolne do reakcji z danym oligopeptydem. W kolumnie „H” (Ratio.nation [PL]) (Załącznik nr 6) został przedstawiony udział surowic pozytywnych względem obecności przeciwciał rozpoznających dany oligopeptyd w populacji polskiej a w kolumnie „I” (Ratio.nation [USA]) udział prób pozytywnych w populacji USA. Oligopeptydy, które zostały rozpoznane przez przeciwciała obecne w badanych surowicach w co najmniej 30% badanych prób przedstawia Tabela nr 8 (populacja polska) oraz Tabela nr 9 (populacja USA). Oligopeptyd bakteriofagowy, który został rozpoznany w największym procencie badanych prób, co ciekawe: zarówno wśród populacji polskiej jak i USA, to ASR85707.1_oligopeptide_4 pochodzący z scaffolding protein należącego do bakteriofaga Educator, którego gospodarzem jest *Mycobacterium smegmatis mc² 155*. Bakteriofag ten został wyizolowany z gleby. ASR85707.1_oligopeptide_4 rozpoznany był częściej przez przeciwciała obecne w surowicach osób płci żeńskiej [87,95%] niż męskiej [46,75%] niezależnie od przynależności geograficznej badanej próby. Przy pomocy programu BLAST dla badanego oligopeptydu ASR85707.1_oligopeptide_4 znaleziono dwie homologiczne sekwencje w białkach pochodzących z dwóch bakteriofagów *Mycobacterium InvictusManeo* (scaffolding protein o numerze dostępu UEM46404.1, procent identyczności sekwencji 96,30%) oraz *Mycobacterium Kratio* (scaffolding protein o numerze dostępu YP_009212755.1, procent identyczności sekwencji 96,30%). Dla obu wymienionych bakteriofagów gospodarzem jest *Mycobacterium smegmatis mc² 155*. Kolejnym najczęściej rozpoznany oligopeptydem przez przeciwciała obecne w surowicy osób należących do polskiej populacji był ANH51765.1_oligopeptide_8 pochodzący z *putative tail fiber protein* (hipotetyczne białko włókienka ogonkowego) należącego do bakteriofaga *Erwinia vB_EamM_Simmy50*, którego gospodarzem jest *Erwinia amylovora*. Bakteriofag ten został wyizolowany z kory drzew.

ANH51765.1_oligopeptide_8 rozpoznany był częściej przez przeciwciała obecne w surowicach osób płci żeńskiej [57,83%] niż męskiej [28,57%] niezależnie od przynależności geograficznej badanej próby. Dla oligopeptydu nr 8 pochodzącego z białka o numerze dostępu ANH51765.1 Następnym najczęściej rozpoznanym oligopeptydem przez przeciwciała obecne w surowicy osób należących do polskiej populacji był (bardzo podobny do poprzedniego) AHI60452.1_oligopeptide_8 pochodzący z *tail fiber protein* (białko włókienka ogonkowego) należącego do bakteriofaga Erwinia Ea35-70, którego gospodarzem jest *Erwinia amylovora* szczep Ea29-7. Bakteriofag ten został wyizolowany z gleby przylegającej do zainfekowanego drzewa. AHI60452.1_oligopeptide_8 rozpoznany był częściej przez przeciwciała obecne w surowicach osób płci żeńskiej [53,01%] niż męskiej [27,27%] niezależnie od przynależności geograficznej badanej próby.

Analiza wyników dla populacji USA przedstawiona w tabeli nr 9 wykazała, że nie obserwowano tak wysokiego procentu surowic pozytywnych wobec każdego ze zidentyfikowanych sekwencji oligopeptydów bakteriofagowych, a najczęściej rozpoznawane oligopeptydy fagowe poza wymienionym już ASR85707.1_oligopeptide_4 pochodzącym z bakteriofaga Edugator to YP_009304338.1_oligopeptide_5 pochodzący z *hypothetical protein SEA_YEEZY_7* (hipotetyczne białko SEA_YEEZY_7) należący do bakteriofaga Gordonia phage Yeezy, którego gospodarzem jest *Gordonia terrae* 3612. Bakteriofag ten został wyizolowany z gleby. YP_009304338.1_oligopeptide_5 rozpoznany był częściej przez przeciwciała obecne w surowicach osób płci żeńskiej [49,40%] niż męskiej [37,66%] niezależnie od przynależności geograficznej badanej próby. Dla oligopeptydu nr 5 pochodzącego z białka o numerze dostępu YP_009304338.1 wykryte zostały w programie BLAST następujące sekwencje homologiczne: *hypothetical protein SEA_OHGEEZY_7* o numerze dostępu QNJ56236.1 pochodzący z Gordonia phage Ohgeesy (procent identyczności sekwencji 100%), *hypothetical protein SEA_BAXTERFOX_7* o numerze dostępu YP_009300791.1 pochodzący z Gordonia phage BaxterFox (procent identyczności sekwencji 100%), *hypothetical protein PBI_HOWE_7* o numerze dostępu ALY07641.1 pochodzący z Gordonia phage Howe (procent identyczności sekwencji 94,74%). Wymienione bakteriofagi wykazują specyficzność dla szczepu *Gordonia terrae* szczep 3612. Ponadto wykryte zostały jeszcze następujące sekwencje homologiczne: *hypothetical protein* o numerze dostępu WP_258324916.1 z *Gordonia* sp. GONU (procent identyczności sekwencji 94,74%),

hypothetical protein o numerze dostępu WP_007625636.1 z *Gordonia soli* (procent identyczności sekwencji 68,57%), *hypothetical protein* o numerze dostępu WP_056446025.1 z niesklasyfikowanego *Rhodococcus* (procent identyczności sekwencji 64,86%), *hypothetical protein* o numerze dostępu WP_054246388.1 z *Rhodococcus opacus* (procent identyczności sekwencji 50%).

Następnym najczęściej rozpoznany oligopeptydem przez przeciwciała obecne w surowicy osób należących do populacji USA był YP_009200816.1_oligopeptide_10 pochodzący z *tail fiber protein* (białko włókienka ogonkowego) należące do *Escherichia phage vB_EcoM_AYO145A*, którego gospodarzem jest *Escherichia coli* szczep O145:NM. Bakteriofag ten został wyizolowany z przyczepy do transportu bydła (Kanada). YP_009200816.1_oligopeptide_10 rozpoznany był częściej przez przeciwciała obecne w surowicach osób płci żeńskiej [46,99%] niż męskiej [37,66%] niezależnie od przynależności geograficznej badanej próby. Dla oligopeptydu nr 10 pochodzącego z białka o numerze dostępu YP_009200816.1 zostało wykrytych w programie BLAST 17 sekwencji homologicznych; opis sekwencji homologicznych dostępny jest w Załączniku nr 7 (wiersz: 18-34). Warto podkreślić, że wykryte sekwencje homologiczne pochodzące z bakteriofagów dotyczyły głównie bakteriofagów wykazujących specyficzność do *Escherichia coli* (procent identyczności sekwencji 100%). Ponadto wykryte sekwencje homologiczne pochodzące z organizmów prokariotycznych dotyczyły *Shigella sonnei* (procent identyczności sekwencji 100%), *Escherichia coli* (procent identyczności sekwencji 100%), *Pseudomonas aeruginosa* (procent identyczności sekwencji 97,22%).

Tabela 8. Lista oligopeptydów bakteriofagowych rozpoznanych przez przeciwciała klasy IgG przynajmniej w 30% badanych surowic – populacja polska.

Lp	Nazwa oligopeptydu bakteriofagowego	Nazwa białka bakteriofagowego [Nazwa bakteriofaga] [Nazwa gospodarza]	Sekwencja aminokwasowa oligopeptydu bakteriofagowego	Surowice pozytywne [%]
1.	<u>ASR85707.1 oligopeptide 4</u>	scaffolding protein [Mycobacterium phage Edugator*] [<i>Mycobacterium smegmatis mc² 155</i>]	aeftalrdriasakgvpagsltgkteeelt asadsliawrdsnqnapkpepkprnp	95,16%
2.	<u>ANH51765.1 oligopeptide 8</u>	putative tail fiber protein [Erwinia phage vB_EamM_Simmy50] [<i>Erwinia amylovora</i>]	waenagtssfvklgavkgakgdkgd kgdkgdtgakgdagakgdagakgdk gdkgdk	79,03%
3.	<u>AHI60452.1 oligopeptide 8</u>	tail fiber protein [Erwinia phage Ea35-70*] [<i>Erwinia amylovora strain Ea29-7</i>]	waenagtssfvklgavkgakgdkgd kgdkgdtgpkgdtgakgdagakgdk gdkgdk	75,81%
4.	<u>YP_950528.1 oligopeptide 3</u>	virion RNA polymerase [Escherichia phage N4] [<i>Escherichia coli K-12</i>]	ganafepgtvqsdfmnltpmqimnk ygveqglqlinaradagnqvfnsvttr tpg	61,29%
5.	<u>YP_009200816.1 oligopeptide 10</u>	tail fiber protein [Escherichia phage vB_EcoM_AYO145A] [<i>Escherichia coli O145:NM</i>]	ygtkgtnttgnhthnvsgntstngthnh dvyprendgtgnavadsdgggartrsr t	53,23%
6.	<u>ASW31364.1 oligopeptide 2</u>	head-to-tail connector protein [Mycobacterium phage Lokk*] [<i>Mycobacterium smegmatis mc² 155</i>]	mkirstinglaevdddyaaeliagnn weaadapkparkprsprtpkpapeee pksee	53,23%

7.	<u>ASR86845.1_oligopeptide_4</u>	scaffolding protein [Mycobacterium phage Jeckyll*] [<i>Mycobacterium smegmatis mc² 155</i>]	veferlrdkvanregkrvpvaslvgkte aeliasadaliawrdenapkppeqpkq q	53,23%
8.	<u>AHZ95019.1_oligopeptide_2</u>	internal virion protein B [Pseudomonas phage phiPSA2] [<i>Pseudomonas syringae pv. Actinidiae</i>]	gaedaqrssareqvkqmnmananl nlnaqdkadearkqlaevnmqalrnq gtirt	51,61%
9.	<u>YP_009304338.1_oligopeptide_5</u>	hypothetical protein SEA_YEEZY_7 [Gordonia phage Yeezy*] [<i>Gordonia terrae 3612</i>]	kewedyaaalheasggkegfpradae amskaeliealq	45,16%
10.	<u>ADW01238.1_oligopeptide_26</u>	phage tail tape measure protein [Lactobacillus phage LF1] [<i>Lactobacillus sp.</i>]	rsnfnsefaqmerdakkhlqgveqae kgmstevtaaverqankerkyvntla daq	41,94%
11.	<u>YP_006299953.1_oligopeptide_3</u>	putative structural protein [Pseudomonas phage vB_Pae-TbilisiM32] [<i>Pseudomonas aeruginosa PA32</i>]	dltaenvaqvdlgamadatgtgtrrrrn qagtgvstlginy	37,10%
12.	<u>ASR84211.1_oligopeptide_24</u>	minor tail protein [Rhodococcus phage Hiro*] [<i>Rhodococcus erythropolis RIA 643</i>]	dsstftiarkgvmgadwddgtsvsam lylkagsrvragtnhngynpdvlgda wnrc	37,10%
13.	<u>ARM71100.1_oligopeptide_11</u>	virion-encapsulated RNA polymerase [Vibrio phage pVco-5] [<i>Vibrio corallilyticus</i>]	awsvgagaldrigdaslvksakkasqt gaqtlketlkglgksavtegateaaqtai	33,87%
14.	<u>AKU42946.1_oligopeptide_7</u>	tail tape measure protein [Staphylococcus phage vB_SauS_phi2] [<i>Staphylococcus aureus</i>]	nsnqattaqlkrasdavqkqsakhkal veqykqegnqvqklkvqndnlsksn dkie	33,87%
15.	<u>ASR76063.1_oligopeptide_9</u>	baseplate hub and lysozyme [Synechococcus phage Bellamy] [<i>Synechococcus str. WH8109</i>]	algyekgspeyedlkqrrvaegirnrk kaanspiapvqpgptlegvddvtvisa ad	33,87%

16.	AIX46509.1_oligopeptide_6	baseplate hub + tail lysozyme [Synechococcus phage ACG-2014a] [nieokreślono]	npatmhpmpnsvmagtkeegynr vkedntvvvpgtkkatasaaargspa nvgnql	33,87%
17.	YP_003344865.1_oligopeptide_14	minor structural protein [Streptococcus phage ALQ13.2] [<i>Streptococcus thermophilus</i>]	vqkntmklfttrkvgdtevlndngqa ggsqsvsefnasdanlgnrypads yiv	33,87%
18.	<u>AKP24406.1_oligopeptide_2</u>	putative structural protein [Pseudomonas phage vB_PaeM_CEB_DP1] [<i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i>]	gieawyrkqmkdmsklmiadyrsei enalsqpaaerffasdesvnlfkmltr slq	33,87%
19.	ALA45720.1_oligopeptide_9	tail fiber protein [Lambdavirus lambda] [<i>Escherichia coli K-12 CV601</i>]	aatkaseaatsardavaskeakssetn asssagraassataaensaraaktsetn	32,26%
20.	ASR77210.1_oligopeptide_1	head-to-tail connector protein [Mycobacterium phage Avocado*] [<i>Mycobacterium smegmatis mc² 155</i>]	mgvrltnkhgivctveedfadellatgn fkkestgrrakkddgstanqggdggq np	32,26%
21.	<u>ALY07248.1_oligopeptide_2</u>	baseplate hub subunit and tail lysozyme [Vibrio phage vB_VmeM-32] [<i>Vibrio metschnikovii DSM 29715</i>]	fyhtaqkskndmigipsdellwfhva gsvdgcisgigktpglkcgttvygefr dd	32,26%
22.	YP_009212755.1_oligopeptide_5	scaffolding protein [Mycobacterium phage Kratio*] [<i>Mycobacterium smegmatis mc² 155</i>]	pagsltgkteeltasadliawrdqng pkpepkprnpagsggglksgatga gg	30,65%
23.	<u>YP_004322906.1_oligopeptide_11</u>	baseplate tail tube cap [Synechococcus phage S-SM1] [<i>Synechococcus sp. WH6501</i>]	vrmpnpsnqfvtpsqaevdgqatnlh firmadtvcsqsvnytpdnqytsfksi rgd	30,65%

24.	<u>APD21423.1_oligopeptide_8</u>	tail-length tape measure protein [Staphylococcus phage P240] [<i>Staphylococcus aureus</i>]	qvqklkvqndnlksndkiessyaktntklkqtekefndlnntiknhsanvakae t	30,65%
25.	AKQ07495.1_oligopeptide_6	tail fiber [Klebsiella phage Sushi] [<i>Klebsiella pneumoniae</i>]	aasetaktsetnakasenkaktsetnakasetaktsetnakasetaktsetna	30,65%
26.	<u>ABR68774.1_oligopeptide_43</u>	putative tail fiber [Escherichia phage phiEcoM-GJ1] [<i>Escherichia coli O149:H10:F4 JG280</i>]	qsleegatgfrngmsyggqtvtvvnvk idakvnnqvasatvavpggqvtvqqm nmn	30,65%

Objaśnienia do tabeli:

Pojedyncze podkreślenie – Oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagów o litycznym cyklu życiowym

Podwójne podkreślenie – Oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagów, o lizogennym cyklu życiowym

Brak podkreślenia – Oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagów, których rodzaju cyklu życiowego nie udało się określić

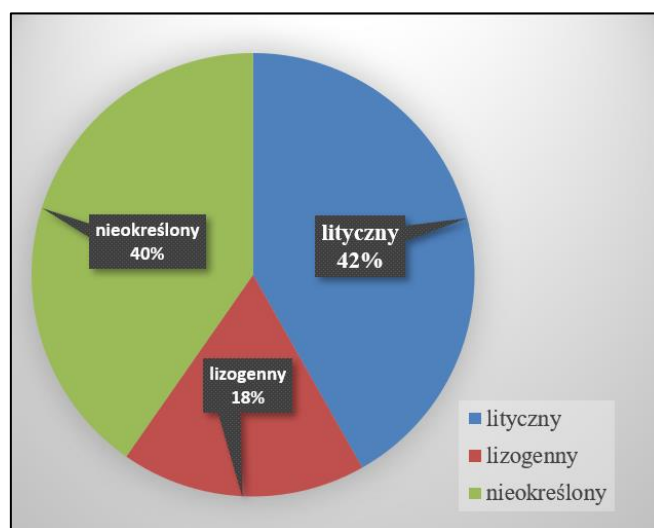
*bakteriofagi izolowane z gleby

Tabela 9. Lista oligopeptydów bakteriofagowych rozpoznanych przez przeciwciała klasy IgG przynajmniej w 30% badanych surowic – populacja USA.

Lp	Nazwa oligopeptydu bakteriofagowego	Nazwa białka bakteriofagowego [Nazwa bakteriofaga] [Nazwa gospodarza]	Sekwencja aminokwasowa oligopeptydu bakteriofagowego	Surowice pozytywne[%]
1.	<u>ASR85707.1 oligopeptide 4</u>	scaffolding protein [Mycobacterium phage Edugator*] [<i>Mycobacterium smegmatis mc² 155</i>]	aeftalrdriasakgvpagsltg kteeeltasadsliawrdsnqap kpepkpkprnp	51,02
2.	<u>YP_009304338.1 oligopeptide 5</u>	hypothetical protein SEA_YEEZY_7 [Gordonia phage Yeezy*] [<i>Gordonia terrae 3612</i>]	kewedyaaalheasggkegf pradaeamskaeliealq	42,86%
3.	<u>YP_009200816.1 oligopeptide 10</u>	tail fiber protein [Escherichia phage vB_EcoM_AYO145A] [<i>Escherichia coli O145:NM</i>]	ygtkgnttgnhthnvsntstn gthnhdvyprendgtgnavad sdgggartrst	35,71%
4.	<u>ASW31364.1 oligopeptide 2</u>	head-to-tail connector protein [Mycobacterium phage Lokk*] [<i>Mycobacterium smegmatis mc² 155</i>]	mkirstingglavdddyael iaggnweaadapkparkprsp rtpkpapeepksee	34,69%
5.	<u>AHZ95019.1 oligopeptide 2</u>	internal virion protein B [Pseudomonas phage phiPSA2] [<i>Pseudomonas syringae pv. Actinidiae</i>]	gaaedaqrarsareqvkqnm ananlnlnaqdkadearkqlae vnmqalrnqgtirt	30,61%
<p>Objaśnienia do tabeli: <u>Pojedyncze podkreślenie</u> – Oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagów o litycznym cyklu życiowym <u>Podwójne podkreślenie</u> – Oligopeptydy pochodzące z białek bakteriofagów, o lizogennym cyklu życiowym *bakteriofagi izolowane z gleby</p>				

5.8.2 Analiza bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych rozpoznanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach pod kątem cyklu infekcyjnego bakteriofaga, z którego pochodzi zidentyfikowany oligopeptyd

Na rysunku 15 przedstawiono procentowy udział zidentyfikowanych oligopeptydów bakteriofagowych pochodzących z bakteriofagów prezentujących określony cykl infekcyjny (lityczny lub lizogenny); 42% oligopeptydów zidentyfikowanych jako immunoreaktywne na poziomie populacji pochodziło z bakteriofagów charakteryzujących się litycznym cyklem infekcyjnym, natomiast 18% rozpoznanych oligopeptydów pochodziło z bakteriofagów prezentujących lizogenny cykl infekcyjny. Pozostałe pochodziły z fagów, dla których charakter cyklu rozwojowego nie został jednoznacznie określony. Warto podkreślić, że oligopeptyd pochodzący z bakteriofaga prezentującego lizogenny cykl infekcyjny, który został zidentyfikowany w największym procencie badanych prób to ASW31364.1_oligopeptide_2 pochodzący z *Mycobacterium phage Lokk*. Wykryty został w prawie 54% badanych prób w populacji polskiej (Tabela 8 poz. 6) oraz prawie 35% w populacji USA (Tabela 9 poz. 4). Oligopeptyd pochodzący z bakteriofaga prezentującego lityczny cykl infekcyjny, który został zidentyfikowany w największym procencie badanych prób to ASR85707.1_oligopeptide_4 pochodzący z *Mycobacterium phage Edugator*, który był jednocześnie najczęściej identyfikowanym fagiem w obu badanych populacjach. Wykryty został w prawie 96% badanych prób (w przypadku populacji polskiej) oraz 51% (w przypadku populacji USA) (Tabela 8 poz.1 i Tabela 9 poz. 1). Dla 40% zidentyfikowanych sekwencji oligopeptydowych nie można było jednoznacznie ustalić typu cyklu infekcyjnego danego bakteriofaga, z którego pochodzi zidentyfikowany oligopeptyd. Wynikało to z braku informacji w bazie NCBI lub wykluczających się informacji w publikacjach naukowych. Zidentyfikowane oligopeptydy pochodzące z bakteriofagów o lizogennym cyklu infekcyjnym wykazywały wysoki procent identyczności z sekwencjami pochodzącymi z organizmów bakteryjnych np.: ASW31364.1_oligopeptide_2, APD21423.1_oligopeptide_8, ATE85480.1_oligopeptide_21, YP_007173607.1_oligopeptide_12, YP_009204362.1_oligopeptide_26, ANO57318.1_oligopeptide_18, ARM67965.1_oligopeptide_10, co jest spójne z faktem, że fagi te mogą występować w formie profagów i być wykrywane jako zintegrowane części genomów bakteryjnych ich gospodarzy.

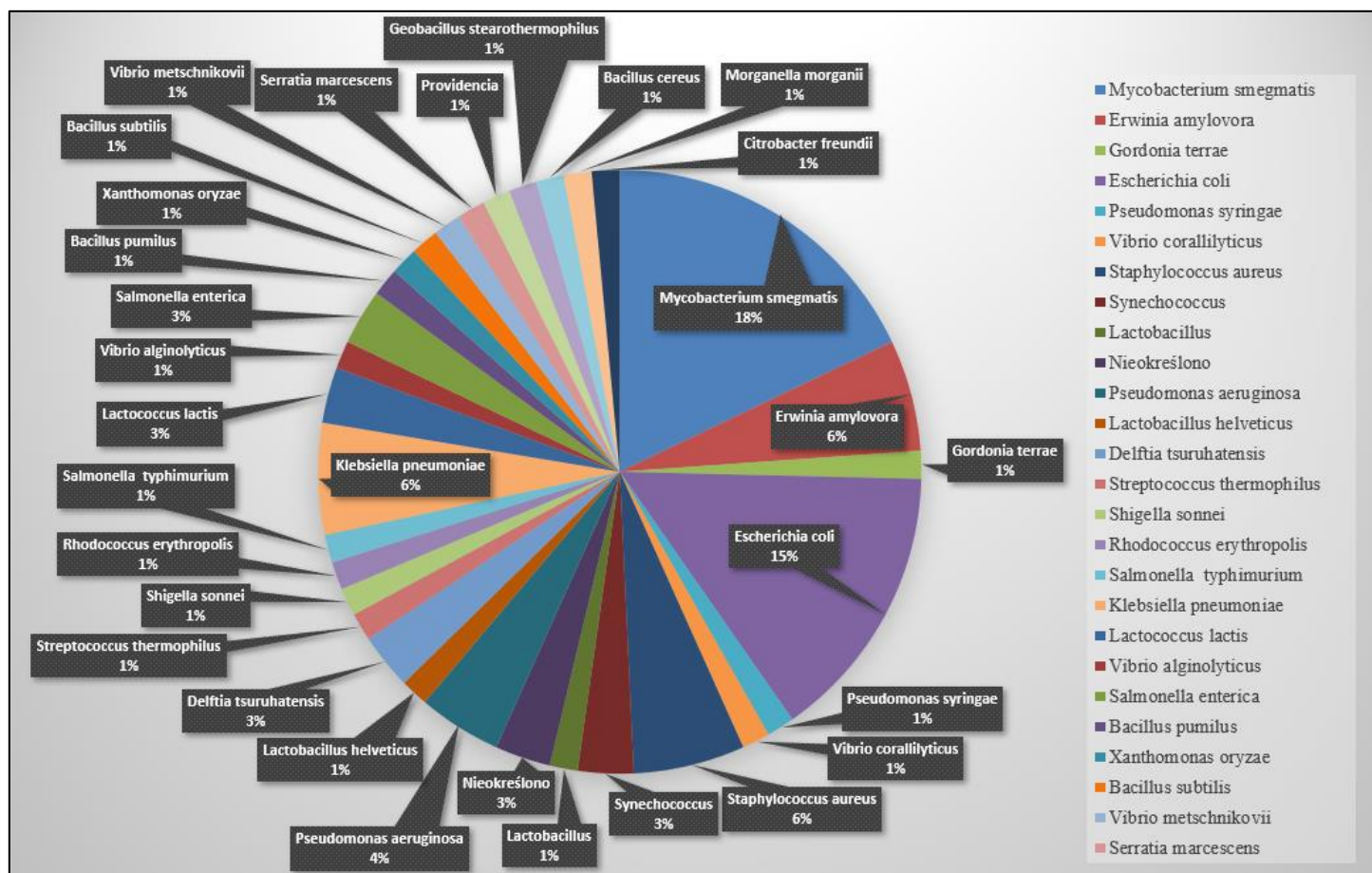


Rysunek 15. Procentowy udział zidentyfikowanych oligopeptydów bakteriofagowych pochodzących z bakteriofagów prezentujących lityczny lub lizogenny cykl infekcyjny.

5.8.3 Analiza bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych rozpoznanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach pod względem bakteryjnego gospodarza bakteriofaga, z którego pochodzi zidentyfikowany oligopeptyd

Rysunek 16 przedstawia specyficzność bakteriofagów z których pochodziły sekwencje oligopeptydowe najczęściej rozpoznawane przez przeciwciała obecne w badanych surowicach, bez względu na obszar geograficzny, z którego pochodziła badana surowica (w ujęciu globalnym). Wśród zidentyfikowanych bakteriofagowych oligonukleotydów największe dwie grupy stanowiły oligonukleotydy pochodzące z białek należących do bakteriofagów, dla których gospodarzami były gatunki: *Mycobacterium smegmatis* (18% gospodarzy bakteriofagów, z których pochodziły zidentyfikowane sekwencje oligopeptydowe) oraz *Escherichia coli* (15% gospodarzy bakteriofagów, z których pochodziły zidentyfikowane sekwencje oligopeptydowe). Kolejne, najczęściej występujące grupy gospodarzy dla zidentyfikowanych bakteriofagów (pochodzących z nich oligopeptydów) dotyczyły w pierwszej kolejności bakterii z gatunku *Erwinia amylovora*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (każdy z tych taksonów stanowił 6% gospodarzy bakteriofagów,

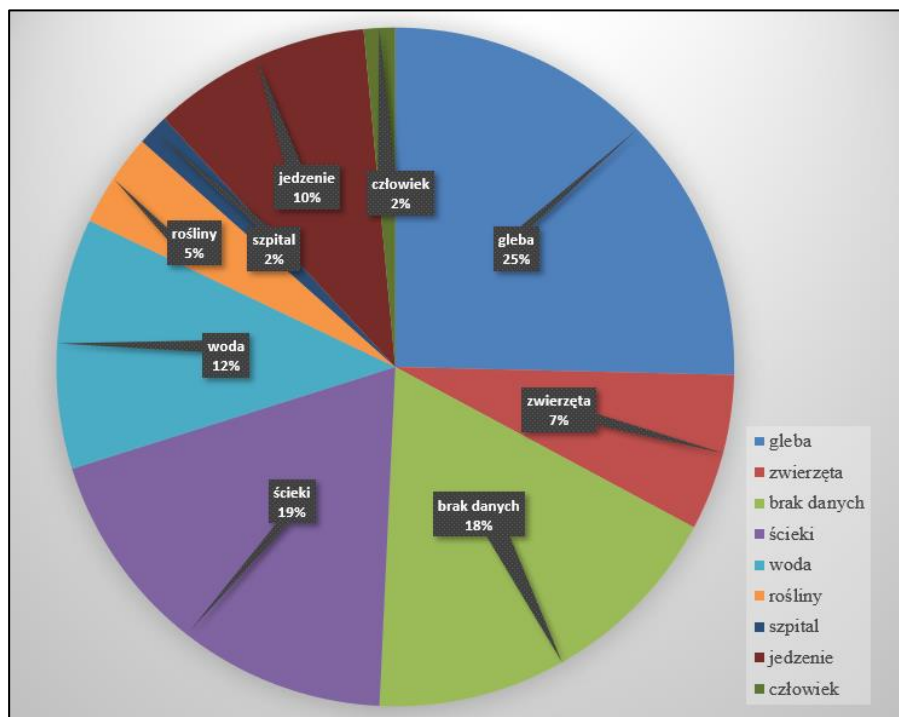
z których pochodziły zidentyfikowane sekwencje oligopeptydowe). Następnie był to gospodarz z gatunku *Pseudomonas aeruginosa* (takson stanowił 4% gospodarzy bakteriofagów, z których pochodziły zidentyfikowane sekwencje oligopeptydowe). Kolejnymi zidentyfikowanymi gatunkami gospodarzy były: *Delftia tsuruhatensis*, *Lactococcus lactis*, *Salmonella enterica* (każdy takson stanowił 3% gospodarzy bakteriofagów, z których pochodziły zidentyfikowane sekwencje oligopeptydowe). Kolejną grupę zidentyfikowanych oligopeptydów stanowiły oligopeptydy pochodzące z bakteriofagów dla których gospodarzami są bakterie z gatunku: *Gordonia terrae*, *Pseudomonas syringae*, *Vibrio corallilyticus*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Shigella sonnei*, *Rhodococcus erythropolis*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio alginolyticus*, *Salmonella enterica*, *Bacillus pumilus*, *Xanthomonas oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio metschnikovii*, *Serratia marcescens*, *Providencia*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii* (każdy takson stanowił 1% gospodarzy bakteriofagów, z których pochodziły zidentyfikowane sekwencje oligopeptydowe). Oligopeptydy bakteriofagowe, dla których nie znaleziono (w bazie danych NCBI zawierającej sekwencje białkowe) gospodarzy dla fagów, z którymi pochodziły stanowiły 3% i zostały przedstawione na rysunku 15 jako nieokreślone.



Rysunek 16. Specyficzność bakteriofagów z których pochodziły sekwencje oligopeptydowe najczęściej rozpoznawane przez badane surowice. Określono częstość procentową identyfikacji specyficzności fagów do poszczególnych gatunków bakterii (odczyt globalny-populacja polska i USA łącznie).

5.8.4 Analiza bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych rozpoznanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach pod względem źródła izolacji bakteriofaga, z którego pochodzi zidentyfikowany oligopeptyd

Rysunek 17 przedstawia źródła izolacji bakteriofagów, z których pochodziły zidentyfikowane sekwencje oligopeptydów rozpoznane przez swoiste przeciwciała występujące we wszystkich badanych surowicach bez względu na ich pochodzenie geograficzne. Najwięcej zidentyfikowanych oligopeptydów pochodzi z bakteriofagów, których źródłem izolacji jest gleba (25%), ścieki (19%) oraz woda (12%). Rozpoznane oligopeptydy pochodzące z bakteriofagów, których źródła izolacji nie były zamieszczone w bazie sekwencji białkowych (NCBI) stanowiły 18%. Do kategorii roślin zostały zaliczone bakteriofagi izolowane z: kory drzew, liści kiwi (*Actinidia deliciosa*) zainfekowanych przez *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), tkanek jabłek i gruszek zainfekowanych przez zarazę ogniową (wywołaną zakażeniem *Erwinia amylovora*). Do kategorii jedzenia zostały zaliczone bakteriofagi izolowane z: surowego mleka, serów, serwatki, kimchi (*Lactobacillus fermentum* typu dzikiego), środowiska mleczarskiego oraz paszy dla bydła mięsnego. Do kategorii zwierząt zostały zaliczone bakteriofagi izolowane z: przyczepy do transportu bydła wołowego, zbiornika wylęgarni ostryg, odchodów kaczek, świni oraz gnojowicy bydłowej. Do kategorii człowiek zostały zaliczone bakteriofagi izolowane z rany. Do kategorii szpital zostały zaliczone bakteriofagi izolowane ze środowiska szpitalnego.

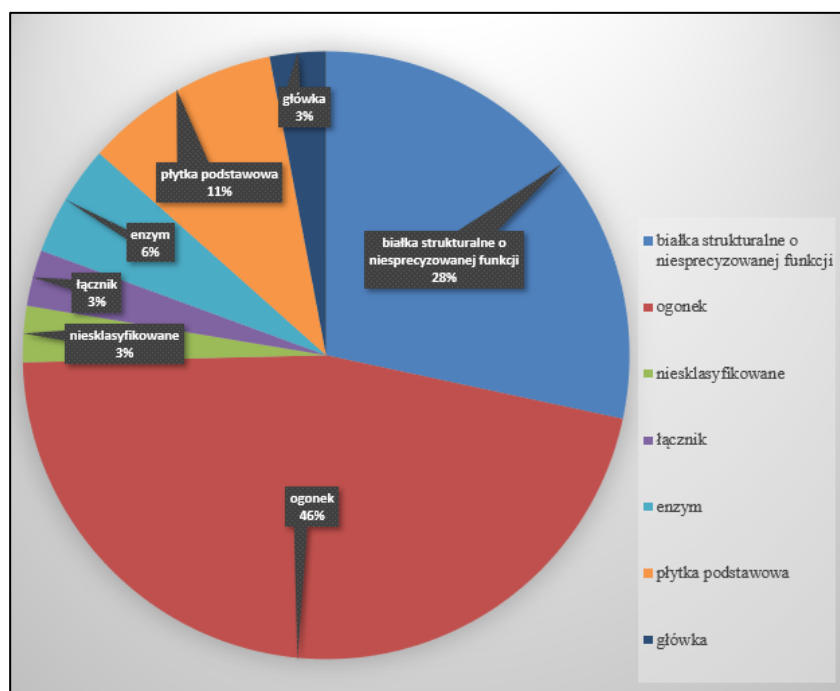


Rysunek 17. Źródła izolacji bakteriofagów, z których pochodziły zidentyfikowane sekwencje oligopeptydów rozpoznane przez swoiste przeciwciała występujące we wszystkich badanych surowicach bez względu na pochodzenie geograficzne.

5.8.5 Analiza bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych rozpoznanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach pod względem białek fagowych, z których pochodzi zidentyfikowany oligopeptyd

Rysunek 18 przedstawia białka bakteriofagowe, z których pochodziły zidentyfikowane sekwencje oligopeptydów rozpoznane przez swoiste przeciwciała występujące we wszystkich badanych surowicach bez względu na pochodzenie geograficzne. Najwięcej zidentyfikowanych oligopeptydów pochodzi z białek tworzących ogonek bakteriofagów (46%) oraz białek przypisanych do ogólnej kategorii białek strukturalnych o niesprecyzowanej funkcji (ang. *scaffold*, rusztowanie/szkielet) (28%). Jedenaście procent zidentyfikowanych oligopeptydów pochodzi z białek tworzących płytkę podstawową. Najmniej (po 3%) zidentyfikowanych oligopeptydów pochodzi z białek tworzących główkę oraz łącznik. Również 3% zidentyfikowanych oligopeptydów nie zostało przypisanych do żadnego białka ze względu na

niejednoznaczne nazwy białek, które dostępne były w bazie NCBI, np.: *hypothetical protein SEA_YEEZY_7* oraz *DUF2213 domain-containing protein*. W przypadku tych białek ich prawidłowe nazwy (zgodne z algorytmem słów kluczowych zastosowanych w procedurze 4.1) zostały zapisane w miejscu notatek przypisanych do każdej sekwencji wyszukiwanej w bazie sekwencji białkowych NCBI. Do grupy białek tworzących płytkę podstawową przypisane zostały oligopeptydy, które pochodzą z białek o następujących nazwach: *baseplate hub*, *baseplate hub and lysozyme*, *baseplate hub subunit tail length determinant*, *baseplate hub subunit and tail lysozyme*, *baseplate tail tube cap*, *baseplate hub + tail lysozyme*. Do grupy białek budujących główkę bakteriofagów przypisane zostały oligopeptydy które pochodzą z białek o następujących nazwach: *capsid protein* oraz *major capsid protein*. Do grupy enzymów bakteriofagowych przypisane zostały oligopeptydy które pochodzą z białek o następujących nazwach: *virion-encapsulated RNA polymerase*, *virion RNA polymerase*, *putative tail lysin 2*. Do grupy białek tworzących łącznik przypisane zostały oligopeptydy które pochodzą z białek o następującej nazwie: *head-to-tail connector protein*. Do grupy białek tworzących ogonek przypisane zostały oligopeptydy które pochodzą z białek o następującej nazwie: *tail fiber protein*, *tail tape measure protein*, *putative tail fiber protein*, *phage tail tape measure protein*, *minor tail protein*, *putative tail length tape measure protein*, *tail-length tape measure protein*, *tail length tape-measure protein 1*, *tail fiber*, *long tail fiber proximal subunit*. Do grupy białek tworzących białka strukturalne o niesprecyzowanej funkcji przypisane zostały oligopeptydy, które pochodzą z białek o następującej nazwie: *scaffolding protein*, *internal virion protein B*, *putative structural protein*, *minor structural protein*, *putative virion structural protein*, *internal virion protein*, *internal virion-like protein*, *virion protein*, *lysozyme-like domain virion structural protein*, *structural protein*, *internal virion protein C*.



Rysunek 18. Białka bakteriofagowe, z których pochodziły zidentyfikowane sekwencje oligopeptydów rozpoznane przez swoiste przeciwciała występujące we wszystkich badanych surowicach bez względu na pochodzenie geograficzne.

5.8.6 Analiza bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych rozpoznanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach pod względem zidentyfikowanych sekwencji homologicznych

Dla większości bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych rozpoznanych przez przeciwciała obecne w badanych surowicach było możliwe znalezienie sekwencji homologicznych przy pomocy narzędzia do przyrównywania sekwencji BLAST (w bazie NCBI). Pełna lista zidentyfikowanych sekwencji homologicznych dla każdego bakteriofagowego oligopeptydu (zaliczonego do 67 najczęściej identyfikowanych) została zamieszczona w kolejnych wierszach pod danym oligopeptydem (Załącznik nr 7). Zgodnie z procedurą 4.20 za sekwencje homologiczne do analizowanego oligopeptydu uznano sekwencje, których procent identyczności wynosił 90% i więcej. Bakteryjne sekwencje homologiczne do zidentyfikowanych epitopów bakteriofagowych uznano za podobne, gdy

procent identyczności obu sekwencji wyniósł 50% i więcej. Dla każdego zidentyfikowanego homologu w Załączniku nr 6 zamieszczono jego nazwę, numer dostępu w bazie sekwencji białkowych (NCBI), procent identyczności do zidentyfikowanych sekwencji oligopeptydów bakteriofagowych oraz nazwę gospodarza, jeśli znaleziony homolog pochodził z bakteriofaga. W większości przypadków wykryto kilka-kilkadziesiąt sekwencji homologicznych pochodzących z innych bakteriofagów, co oznacza, że wykrywana reaktywność surowic może być wynikiem ekspozycji poszczególnych osób nie tylko na jeden zdefiniowany, ale na grupę szczepów bakteriofagów o zbliżonej charakterystyce molekularnej. Podczas wyszukiwania zastosowano wykluczenie, którym były sekwencje białek eukariotycznych, dlatego też sekwencje homologiczne pochodzące z organizmów eukariotycznych nie zostały przedstawione. Zidentyfikowanymi oligopeptydami bakteriofagowymi, dla których nie znaleziono żadnych sekwencji homologicznych były: ANH51765.1_oligopeptide_8 (putative tail fiber protein [Erwinia phage vB_EamM_Simmy50]), AHI60452.1_oligopeptide_8 (tail fiber protein [Erwinia phage Ea35-70]), ASR76063.1_oligopeptide_9 (baseplate hub and lysozyme [Synechococcus phage Bellamy]), AIX46509.1_oligopeptide_6 (baseplate hub + tail lysozyme [Synechococcus phage ACG-2014a]), APC43971.1_oligopeptide_32 (minor tail protein [Mycobacterium phage Tuco]), YP_006299953.1_oligopeptide_3 (putative structural protein [Pseudomonas phage vB_Pae-TbilisiM32]), AIU44322.1_oligopeptide_6 (virion RNA polymerase [Delftia phage RG-2014]), ALA45720.1_oligopeptide_9 (tail fiber protein [Lambdavirus lambda]), APU02851.1_oligopeptide_32 (minor tail protein [Mycobacterium phage CrystalP]), AHC94073.1_oligopeptide_12 (internal virion protein [Vibrio phage AS51]), YP_007349185.1_oligopeptide_43 (putative tail lysin 2 [Bacillus phage phiAGATE]), AIX44930.1_oligopeptide_6 (putative base plate hub subunit and tail lysozyme [Synechococcus phage ACG-2014e]), ALY07248.1_oligopeptide_2 (baseplate hub subunit and tail lysozyme [Vibrio phage vB_VmeM-32]), IU44323.1_oligopeptide_21 (lysozyme-like domain vision structural protein [Delftia phage RG-2014]), AQT25208.1_oligopeptide_2 (tail fiber protein [Providencia phage vB_PreS_PR1]).

6. Dyskusja

W niniejszej pracy metodą *phage display* uzyskano bibliotekę bakteriofaga T7 prezentującego na swojej powierzchni fragmenty białek bakteriofagowych, reprezentujących wszystkie znane strukturalne białka bakteriofagów wg stanu bazy NCBI w dniu 01.06.2018 r. Poprawność biblioteki została potwierdzona m.in. poprzez bezpośrednie sekwencjonowanie gotowej biblioteki. Tak wykonaną bibliotekę użyto do badań reaktywności surowic ludzkich pozyskanych z populacji polskiej oraz USA. Do tego celu zastosowano zamplifikowaną, zagęszczoną i oczyszczoną bibliotekę. Zagęszczanie i oczyszczanie przeprowadzono dzięki systemowi do zagęszczania preparatów fagowych z membraną typu *hollow-fiber* udało się zagęścić namnożoną bibliotekę bakteriofagów prezentujących na swojej powierzchni oligopeptydy bakteriofagowe, jednocześnie przeprowadzając zagęszczaną bibliotekę do odpowiedniego buforu, przewidzianego jako środowisko dla reakcji immunoprecypitacji.

Reakcja immunoprecypitacji w tym wypadku opierała się na reakcji kulek magnetycznych (2,8 μm) z kowalentnie związanym na ich powierzchni zrekombinowanym białkiem G (~ 17 kDa) lub białkiem A (~ 17 kDa), które wykazują silne powinowactwo do regionu stałego przeciwciała [Yanaka i in., 2019; Antibody Fc, 2014]. Siła specyficznego wiązania zależy od klasy i podklasy Ig. Dynabeads® białko A i Dynabeads® białko G mają zdolność wiązania 250 μg ludzkiego IgG na mililitr zastosowanych kulek magnetycznych [Invitrogen]. Zastosowane w reakcji immunoprecypitacji kulki magnetyczne pozwoliły na utworzenie kompleksu faga T7 prezentującego dany oligopeptyd bakteriofagowy na swojej powierzchni, który został rozpoznany i związany przez specyficzne do oligopeptydu przeciwciało (region zmienny przeciwciała), a to rozpoznane przeciwciało związane było (w części stałej przeciwciała) z białkiem G lub białkiem A, którymi opłaszczone są zastosowane w doświadczeniu kulki magnetyczne (Rysunek 1). Reakcja immunoprecypitacji biblioteki *phage display* oligopeptydów reprezentujących strukturalne białka fagowe z surowicami ludzkimi pozwoliła na strącenie reaktywnych epitopów bakteriofagowych rozpoznanych przez przeciwciała IgG znajdujące się w ludzkiej surowicy. Potwierdzeniem tego jest ilość bakteriofagów T7 pochodzących z biblioteki po etapie elucji, czyli odpłukaniu z powierzchni kulek magnetycznych przeciwciał z badanej surowicy związanych z rozpoznanymi reaktywnymi epitopami, która przewyższała ilość bakteriofagów w poprzedzających elucję etapach płukania o około 1 rząd wielkości (Tabela 6).

Analiza jakościowa uzyskanych wyników wysokoprzepustowego sekwencjonowania NGS (w technologii Illumina) biblioteki T7 prezentującej na swojej powierzchni reaktywne oligopeptydy pozwoliła na wytypowanie 160 prób surowicy, które przeszły pozytywnie kontrolę jakości i mogły być poddawane dalszej analizie statystycznej a następnie merytorycznej. Analiza ta polegała na statystycznej ocenie, czy dany oligopeptyd po immunoprecypitacji z próbą surowicy został statystycznie znamienne wzbogacony w porównaniu do jego częstości występowania w wyjściowej, nieimmunoprecypitowanej jeszcze bibliotece (także poddanej sekwencjonowaniu jako kontrola/referencja; wykonano 45 prób referencyjnych). Na podstawie analizy statystycznej wyników sekwencjonowania w 160 zakwalifikowanych próbach, otrzymano 245 oligopeptydów będących „reaktywnymi oligopeptydami bakteriofagowymi” (Tabela 5), przyjęto, że oligopeptyd jest „reaktywny”, jeśli obserwowano jego statystycznie istotne wzbogacenie po reakcji immunoprecypitacji u co najmniej w 5% badanej populacji. Założenie to przyjęto w oparciu o analizę częstości tzw. publicznych epitopów wirusów eukariotycznych (*public epitopes*), na które Xu i in. (2015) identyfikowali odpowiedź IgG u ludzi w technologii VirScan stanowiącej inspirację dla niniejszej pracy (zmodyfikowano).

Do szczegółowej charakterystyki wybrano 67 najczęściej występujących zidentyfikowanych oligopeptydów bakteriofagowych (Tabela 6). Charakterystyka ta obejmowała: nazwę, oraz sekwencję aminokwasową zidentyfikowanego oligopeptydu wraz z numerem dostępu w bazie sekwencji białkowych (NCBI) oraz nazwą białka bakteriofagowego, z którego pochodzi dany oligopeptyd. Ponadto w charakterystyce zamieszczone zostały takie informacje jak: nazwa bakteriofaga, z którego pochodzi dane białko bakteriofagowe, specyficzność wobec gatunku bakterii oraz prezentowany cykl infekcyjny i miejsce izolacji bakteriofaga. W charakterystyce przedstawione zostały również wyniki obliczeń: częstość występowania zidentyfikowanego oligonukleotydu bakteriofagowego w badanych surowicach (osobno dla populacji polskiej i USA oraz dla wszystkich badanych prób bez względu na pochodzenie), procent występowania zidentyfikowanego oligonukleotydu bakteriofagowego wśród populacji żeńskiej oraz męskiej (bez podziału na przynależność geograficzną badanej surowicy). Podjęto również próbę znalezienia sekwencji homologicznych dla danych rozpoznanych epitopów bakteriofagowych, w oparciu o analizę bazy danych NCBI (stan bazy w dniu 14.09.2022 r.) (Załącznik nr 7).

Wykazano, że wśród populacji USA występuje szerokie zróżnicowanie w obrębie rozpoznanych sekwencji oligopeptydów bakteriofagowych w porównaniu do populacji polskiej, ponieważ znacznie mniej oligopeptydów fagowych zostało rozpoznane przez istotną większość surowic z populacji USA niż populacji polskiej (porównanie Tabeli 8 i Tabeli 9). Sugeruje to większe „rozproszenie” specyficzności odpowiedzi pomiędzy różne rodzaje fagów i większą trudność z osiągnięciem założonego progu odcięcia (tu: 30%). Być może fakt ten jest związany z większą różnorodnością populacji USA, a także jej rozproszeniem na bardziej zróżnicowanych geograficznie i klimatycznie terenie [Hurrell i in., 2012], a tym samym możliwościami kontaktu z większą gamą bakteriofagów występujących w środowisku. Gupta i in. (2017) omówili różnice w strukturze mikrobiomu między zdrowymi osobami z różnych ras i grup etnicznych w zależności od położenia geograficznego. Na podstawie opublikowanych danych scharakteryzowali mikrobiotę rdzeniową — zbiór rodzajów powszechnie występujących we wszystkich populacjach, niezależnie od ich położenia geograficznego, pochodzenia etnicznego czy sposobu bytowania. Różnice etniczne lub specyficzne dla populacji w składzie ludzkiego mikrobiomu omówione przez Gupta i in. (2017) kwestionują uniwersalność strategii terapeutycznych opartych na mikrobiomie i zalecają dostosowane geograficznie podejście do inżynierii mikrobiomu danej populacji. Tematyka różnic w składzie ludzkiego mikrobiomu w zależności od pochodzenia geograficznego i różnych stref klimatycznych jest przedmiotem wielu badań [Suzuki i Worobey, 2014; Li i in., 2014; Porras i in., 2021]. Różnice w składzie organizmów bakteryjnych zasiedlających mikrobiomy w zależności od pochodzenia geograficznego korelują tym samym z różnorodnością w składzie bakteriofagów zasiedlających ten mikrobiom co wydaje się korelować z szerokim zróżnicowaniem w obrębie rozpoznanych sekwencji oligopeptydów bakteriofagowych wśród populacji USA w porównaniu do populacji polskiej.

Bardzo ciekawą obserwacją jest to, że mimo różnic w na poziomie zmienności, najczęściej rozpoznany oligopeptydem bakteriofagowym zarówno wśród populacji polskiej jak i USA był oligopeptyd nr 4 z białka szkieletowego faga Edugator [<https://phagesdb.org/phages/Edugator/>, dostęp w dniu 24.11.2022 r.; King i in., 2017] wykazującego specyficzność do *Mycobacterium smegmatis mc² 155* (Tabela 8 i 9). Gatunek tej bakterii jest powszechnie występującym gatunkiem w środowisku. Występuje często w glebie, wodzie i roślinach [Li i in., 2016], co znajduje potwierdzenie w uzyskanych przeze mnie

wynikach. *Mycobacterium* jest bardzo ważnym rodzajem drobnoustrojów składającym się z gatunków saprofitycznych i chorobotwórczych (*Mycobacterium tuberculosis*) [Long i in., 2012]. Kilka reprezentatywnych cech genomowych dla stylu życia saprofitów, takich jak wysoka odporność na sól oraz krótki czas generacji, zostało odkrytych dla *Mycobacterium smegmatis* w analizie ontologii genów [Long i in., 2012]. *Mycobacterium smegmatis* zostało wyizolowane po raz pierwszy w 1885 roku z ludzkich narządów płciowych [Long i in., 2012; <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000000757>, dostęp w dniu 24.11.2022 r.] Warto podkreślić, że *Mycobacterium smegmatis* charakteryzuje się brakiem zdolności przechodzenia przez komórki nabłonkowe [Long i in., 2012]. *Mycobacterium smegmatis* posiada system toksyna-antytoksyna (z ang. toxin-antitoxin (TA) systems) pozwalający bakterii na adaptację do zmieniających się warunków środowiska [Zhang i in., 2022]. Informacja ta może mieć kluczowe znaczenie w uzyskanych przeze mnie wynikach, gdzie najczęściej rozpoznany oligopeptydem bakteriofagowym zarówno wśród populacji polskiej jak i USA był oligopeptyd nr 4 z białka szkieletowego faga Edugator wykazującego specyficzność do *Mycobacterium smegmatis*. To dlatego, że może wskazywać na duże rozpowszechnienie tej bakterii i potencjalnie wysoką częstość kontaktu ludzi zarówno z tym szczepem bakteryjnym, jak i z bakteriofagiem specyficznym do niego.

Bakteriofagi mogą do swojego rozwoju i namnażania w komórkach bakterii wykorzystywać dwa zupełnie różne typy cykli rozwojowych: lityczny lub lizogenny. Cykl lityczny polega na zakażeniu bakterii (gospodarza), produkcji nowych cząstek fagowych, rozpadzie gospodarza i uwolnieniu nowych kompletnych cząstek bakteriofagowych [Campbell, 2003]. Cykl lizogenny polega na wnikaniu materiału genetycznego wirusa do komórki gospodarza i jego replikacji wraz z DNA gospodarza (w formie profaga). Replikacja ta nie prowadzi do lizy komórki gospodarza. [Howard-Varona i in., 2017]. Analiza wykonana w niniejszej pracy pozwoliła stwierdzić, że udział immunoreaktywnych sekwencji oligopeptydowych pochodzących z bakteriofagów prezentujących lizogenny cykl infekcyjny był znacznie mniejszy niż sekwencji z fagów litycznych (odpowiednio 18 i 42%) (Rysunek 15). Tymczasem bakteriofagi o lizogennym cyklu infekcyjnym obserwowane są jako stałe składniki fageomu człowieka, uważane za bardzo powszechne w bakteriach zasiedlających np. jelito człowieka [Townsend i in., 2021]. Bakteriofagi o lizogennym cyklu infekcyjnym obserwowane są również jako stałe składniki mysiego fageomu [Kim i Bae, 2018]. Wydaje się zatem, że

człowiek może być znacznie częściej wystawiony na kontakt z fagami lizogennymi, stale obecnymi jako składnik ludzkiego mikrobiomu, niż z fagami litycznymi, które mają w mikrobiomie raczej charakter przejściowy. Z drugiej strony jednak, uzyskane wyniki mogą sugerować, że fagi jelitowe (w dużej części lizogenne) być może korzystają z mechanizmów tolerancji immunologicznej, która dotyczy jelitowego mikrobiomu bakteryjnego, a także antygenów pochodzenia pokarmowego [Christiakov i in., 2015; Descamps i Thaiss, 2018; Ma i in., 2019]. W takim wypadku stała obecność tych fagów w stosunkowo niedużych stężeniach promowałaby tolerancję, w przeciwieństwie do raczej masowego i krótkotrwałego występowania fagów litycznych, które w populacjach bakteryjnych powodują raczej „masowe infekcje” niż „zakażenia chroniczne”. Zagadnienie tolerancji fagowych składników mikrobiomu nie zostało jednak do tej pory właściwie wcale zbadane, a niniejsza obserwacja jest prawdopodobnie pierwszą sugerującą, że zjawisko tolerancji może mieć związek z rodzajem faga, jakiego dotyczy.

Ciekawą obserwacją jest ta, że rozpoznanie bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych przez przeciwciała obecne w surowicy ludzkiej znacznie częściej miało miejsce w przypadku surowic płci żeńskiej (to znaczy: w immunoprecypitacji z surowicami pochodzącymi od kobiet identyfikowano więcej istotnie wzbogaconych oligopeptydów fagowych; takie zjawisko wystąpiło zarówno w populacji polskiej jak i USA) (Załącznik nr 6, kolumna J [Ratio.gender [F]). To może nasuwać hipotezę, iż kobiety mają bogatszy fageom. Różnice w składzie bakteryjnego mikrobiomu pomiędzy płcią żeńską a męską są tematem zainteresowania wielu grup badawczych [Wang i in., 2022; Kim i Benayoun, 2020; Koliada i in., 2021]. Wykazano, że bakteryjna część mikrobiomu kobiet charakteryzuje się większą różnorodnością w porównaniu do bakteryjnej części mikrobiomu mężczyzn [de la Cuesta-Zuluaga i in., 2019]. Co ważne, bakteriofagi są bezpośrednio związane z bakteriami jako gospodarzami bakteriofagowymi, bogaty mikrobiom bakteryjny może pociągać za sobą większą szansę na bogaty fageom. Fakt ten wiąże się z możliwością częstszego rozpoznania bakteriofagowych sekwencji oligopeptydowych przez przeciwciała obecne w surowicy ludzkiej, co potwierdzają uzyskane przeze mnie wyniki w niniejszej pracy. Jednocześnie jednak pojawiają się doniesienia sugerujące brak związku większej bioróżnorodności w składzie bakteryjnym mikrobiomu z płcią [Ma i Li, 2019], zatem kwestia ta pozostaje do wyjaśnienia w dalszych badaniach nad fageomem.

Otrzymane w pracy wyniki wskazują również, że najczęściej rozpoznanymi oligopeptydami bakteriofagowymi są oligopetydy tworzące złożoną strukturę ogonka bakteriofagowego lub płytki podstawowej (Rysunek nr 18). Można zauważyć, że np. struktura główki bakteriofagowej jest strukturą najczęściej zbudowaną z jednego lub dwóch (maksymalnie kilku) białek, a struktura ogonka i płytki to często wielobiałkowa struktura, złożona nawet z kilkunastu-kilkudziesięciu białek [Fokine i in., 2004; Yap i in., 2016; Leiman i in., 2010]. Zatem możliwość generowania różnorodnych, potencjalnie immunogennych epitopów wydaje się większa w obszarze ogonka bakteriofagowego niż w obszarze główki. Co więcej, to ogonek i płytka skupiają białka stanowiące bardzo precyzyjny aparat infekcyjny, zaangażowany w rozpoznanie, wiązanie, a następnie infekcję fagowym DNA komórki bakteryjnej. Główka fagowa nie jest zaangażowana w procesy, które wymagałyby przestrzennych rearanżacji i przekazywania sygnału pomiędzy białkami odpowiedzialnymi za przeprowadzenie infekcji. Główka stanowi stabilne „opakowanie” dla DNA, a jednocześnie jej powierzchnia jest najsilniej eksponowaną na interakcje z układem odpornościowym częścią faga [Dąbrowska i in., 2014; Van Belleghem i in., 2018; Kaźmierczak i in., 2021]. Nasuwa to hipotezę, że być może w trakcie ewolucji fagowej białka główki miały większą szansę na zaadoptowanie się w ten sposób, aby zawierały jak najmniej silnie immunogennych epitopów, co dawałoby tak zaadaptowanym fagom lepsze szanse na unikanie neutralizacji i zniszczenia w warunkach *in vivo*, czyli w organizmach ludzi i zwierząt (szczególnie ssaków).

Istotne dla krytycznej analizy przedstawionych wyników jest wskazanie najważniejszych ograniczeń zastosowanej metody. Mimo, że jest to analiza wysokoprzepustowa, to charakter zastosowanej technologii pozwala na identyfikowanie epitopów o charakterze liniowym. Tymczasem ludzkie przeciwciała poza epitopami liniowymi są zdolne do rozpoznawania pewnej puli epitopów konformacyjnych [Forsström i in., 2015]. Liniowe epitopy są rozpoznawane przez limfocyty T. Często te epitopy są wewnętrznymi hydrofobowymi sekwencjami aminokwasowymi przetwarzanymi przez makrofagi i prezentowanymi komórkom T w kontekście cząsteczek ludzkiego antygen leukocytarnego (HLA z ang. Human leukocyte Antigen) klasy I i klasy II [Flaherty, 2012]. Epitopy konformacyjne stanowią grupę aminokwasów składających się na antygen, które wchodzą w bezpośredni kontakt z receptorem układu odpornościowego, ale w łańcuchu białka, w którym się znajdują, nie leżą obok siebie, lecz w różnych jego częściach. Dopiero uzyskanie przez

białko struktury II- i III-rzędowej powoduje, że aminokwasy te zajmują miejsce obok siebie i mogą utworzyć epitop. Conformational Epitope Database [CEB; <http://immunet.cn/ced/>, dostęp w dniu 28.11.2022 r.] to baza danych, w której przechowywane są ręcznie wybierane informacje na temat epitopów konformacyjnych komórek B i powiązane informacje, w tym skład i położenie epitopu, właściwości immunologiczne epitopu, źródłowy antygen i odpowiednie związane cząsteczki Ig [Flower, 2013]. W niniejszej pracy badane były epitopy liniowe, ponieważ tylko takie mogły się znaleźć w krótkich odcinkach oligopeptydowych możliwych do ekspresji w systemie *phage display*. Warto także podkreślić, że różne populacje, szczególnie te z różnych regionów geograficznych mogą mieć inne profile produkowanych przeciwciał. Profil ten może być różny w zależności od wieku oraz stanu zdrowia i przebytych chorób w ciągu życia. W niniejszej pracy zostały przebadane osoby dorosłe, bez stwierdzonych istotnych chorób, farmakoterapii, charakterystycznej diety, lub innych czynników, które mogą profilować mikrobiom oraz fageom człowieka.

Takie podejście było jednak podyktowane próbą zdobycia możliwie uniwersalnych danych, reprezentujących przeciętną populację. Powodem takiego podejścia jest strategiczny cel pracy, czyli zdobycie informacji mogących przyczynić się do rozwoju terapii fagowej. Bakteriofagi są skutecznie stosowane w rozwijającej się od XX wieku terapii fagowej (fagoterapii). Dzięki swojej zdolności do niszczenia bakterii, w tym również bakterii antybiotykoopornych, są przedmiotem wielu badań, w tym również badań klinicznych. Uzyskane przeze mnie w niniejszej pracy wyniki miały na celu odpowiedź na aktualne problemy i pytania pojawiające się podczas badań prowadzonych w zakresie oddziaływania bakteriofagów z układem odpornościowym człowieka. Stworzona przeze mnie baza immunoreaktywnych bakteriofagowych sekwencji oligopetydowych (potencjalnych epitopów bakteriofagowych) jest ważna ze względu na to, jak niewiele ciągle wiadomo o przeciwciałach neutralizujących faga [Gembara i Dąbrowska, 2021]. Terapie fagowe i ich skuteczność zależą od unikania negatywnych, neutralizujących efektów odpowiedzi ze strony układu odpornościowego. Przygotowana przeze mnie lista to pierwszy taki spis istotnych populacyjnie epitopów. Umożliwi ona na przykład sprawdzenie, czy identyczne lub bardzo podobne oligopeptydy są obecne w innych bakteriofagach, jeśli są one kandydatami do fagoterapii. Pozwoliłoby to od razu i bez badań laboratoryjnych każdego faga ocenić prawdopodobieństwo jego neutralizacji przez przeciwciała obecne w surowicy statystycznego pacjenta.

Identyfikacja bakteriofagowych sekwencji oligopeptydów (potencjalnych epitopów) rozpoznanych przez przeciwciała ludzkie może też dostarczyć kluczowych informacji dla rozwijającej się inżynierii genetycznej i stanowić potencjalny cel planowych modyfikacji. Epitopy zidentyfikowane jako wysoce reaktywne mogłyby być zmieniane np. poprzez mutagenezę lub "ukrywane" poprzez dołączenie innych, niereaktywnych elementów. Byłoby to szczególnie korzystne w fagach, które miałyby unikalne, pożądane cechy terapeutyczne (np. unikalną specyficzność, wysoką stabilność), ale zawierałyby epitopy z wysokim prawdopodobieństwem narażające je na szybką neutralizację i przez to byłyby mniej użyteczne terapeutycznie. Planowe modyfikacje dawałyby szansę na „deimmunizację” użytecznych szczepów fagowych, lub na ograniczenie skali neutralizacji takich fagów używanych *in vivo*. Jako takie, fagi „wysoce widoczne” dla układu odpornościowego mogą nie być optymalne do użytku terapeutycznego, a zamiast tego fagi „niewidoczne” (te bez wysoce immunogennych epitopów) mogą być wybrane do leczenia zakażeń u ludzi i zwierząt. Takie dane mogłyby być wykorzystane np. w Ośrodku Terapii Fagowej działającym przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczanej PAN we Wrocławiu, gdzie pacjentom podaje się preparaty fagowe, zwłaszcza w przypadku infekcji wywołanych przez bakterie wielolekooporne.

W przyszłości chciałabym wykorzystać zoptymalizowaną przeze mnie metodę PhageScan do przebadania większej liczby surowic pochodzących od pacjentów reprezentujących inne populacje (inna grupa wiekowa, inny obszar geograficzny, pacjenci z różnymi stanami chorobowymi). Planuję znaleźć i porównać w innych populacjach główne epitopy fagowe, które sprawiają, że fagi są „widoczne” dla układu odpornościowego i neutralizowane.

W literaturze opisanych jest wiele stanów chorobowych, w których zaobserwowano inny skład fageomu niż obserwowany u osób zdrowych. Inny skład fageomu osób chorych koreluje również z obecnością przeciwciał neutralizujących fagi, które to mogą przyczynić się do mniejszej skuteczności terapii fagowej zastosowanej u osoby obciążonej chorobami współistniejącymi w porównaniu do osoby nie posiadającej takich chorób. W bliskiej przyszłości planuję wykorzystanie mojej dobrze ugruntowanej metodologii do wykrywania epitopów do przewidywania mutacji, które umożliwiają bakteriofagom ucieczkę spod kontroli immunologicznej. Prowadzę już prace nad przygotowaniem biblioteki zidentyfikowanych epitopów z możliwymi mutacjami (podstawieniem aminokwasów), immunoprecypitacją

a następnie identyfikacją przez sekwencjonowanie metodą NGS sekwencji kodujących oligopeptydy reaktywne i niereaktywne.

Wyniki uzyskane dzięki powyższym badaniom oraz badaniom planowanym w najbliższej przyszłości mogą przyczynić się do rozwoju spersonalizowanej terapii fagowej. Terapie personalizowane, czyli takie, gdzie zarówno lek jak i strategia terapeutyczna są dopasowywane do indywidualnej charakterystyki pacjenta, są obecnie uważane za jeden z kierunków przyszłości w medycynie. W zakresie terapii fagowych jest to bardzo ważne ze względu na narastający problem antybiotykooporności bakterii oraz pojawianie się nowych szczepów zagrażających zdrowiu i życiu człowieka. Z informacji uzyskanych z przeprowadzonych badań mogłyby skorzystać również osoby zajmujące się wprowadzaniem preparatów fagowych na rynek medyczny, ale także osoby badające fageomy różnych organizmów i ich interakcje z komórkami układu odpornościowego człowieka.

7. Wnioski

1. Ludzie posiadają szeroki repertuar przeciwciał rozpoznających epitopy bakteriofagowe, rozpoznawanych analogicznie do epitopów wirusów eukariotycznych, co udało się scharakteryzować dzięki zastosowanej w niniejszych badaniach technologii PhageScan.

2. Zróżnicowanie osobnicze w specyficznym rozpoznawaniu epitopów bakteriofagowych (profil serologiczny) związane jest z badaną populacją i obszarem geograficznym na którym występuje badana populacja. Mimo to istnieją elementy uniwersalne, czego przykładem jest bakteriofag Edugator specyficzny do gatunku *Mycobacterium* rozpoznawany najczęściej wśród wszystkich szczepów fagowych, zarówno przez populację polską jak i USA

3. Wysoki procent rozpoznanych epitopów pochodzi od fagów charakteryzujących się litycznym cyklem infekcyjnym, co prawdopodobnie związane jest przejściowym i masowym charakterem ich obecności w fageomie ludzkim, w porównaniu do stale obecnych fagów lizogennych, co może sugerować, że te drugie korzystają z mechanizmów tolerancji immunologicznej, podobnie jak bakteryjne składniki mikrobiomu.

4. Najczęściej rozpoznane epitopy bakteriofagowe pochodzą z białek budujących strukturę ogonka bakteriofagowego, charakteryzujących się złożoną strukturą w porównaniu np. do główki bakteriofaga tworzonej ze znacznie mniejszej liczby rodzajów białek, niezaangażowanych w precyzyjnie regulowany mechanizm infekowania komórki bakteryjnej, a jednocześnie silnie ekspozowanych na interakcje z układem odpornościowym. Może to sugerować, że presja selekcyjna w organizmach ludzi i zwierząt promuje fagi, których białka główki tracą immunogenne epitopy.

8. Streszczenie

Jak już wiadomo, bakteriofagi są czynnikami immunogennymi i indukują swoistą odpowiedź immunologiczną, w tym przeciwciała swoiste dla faga. Dotyczy to zarówno fagów obecnych w organizmie człowieka (fageomu), jak i fagów dostarczanych różnymi drogami w terapii fagowej. Aby skutecznie i bezpiecznie prowadzić terapię fagową, niezbędne jest zrozumienie naturalnych interakcji bakteriofagów z układem immunologicznym człowieka. Jak dotąd nie ma danych ani nie jest znana metodologia śledzenia historii ekspozycji na fagi w naszym życiu, a w szczególności nie są znane typowe epitopy fagowe, które są najczęściej rozpoznawane przez ludzki układ odpornościowy. Fagi składają się z wielu białek prezentujących wiele epitopów, tak więc przeciwciała specyficzne dla faga są w rzeczywistości sumą odpowiedzi na różne białka faga.

Celem niniejszej pracy była identyfikacja najczęściej rozpoznawanych przez IgG epitopów bakteriofagowych na poziomie populacji, z użyciem prób pochodzących od zdrowych dawców reprezentujących populację polską oraz USA. W wykonanych badaniach zastosowano wysokoprzepustową metodę analizy łączącą wiele technik badawczych (klonowanie w systemie phage display, immunoprecypitacja, masowe sekwencjonowanie DNA metodą NGS).

Efektem zrealizowanego projektu jest pierwsza baza zidentyfikowanych epitopów bakteriofagowych (immunogennych grup fagowych i immunogennych białek bakteriofagowych) w kontekście całych puli fagowych (fageomów) występujących w organizmach ludzkich. Pozwoliło to określić na jakie fagi i białka szczególnie często występuje specyficzna odpowiedź immunologiczna u ludzi. Analiza statystyczna i identyfikacja korelacji pomiędzy populacjami w aspekcie geograficznym oraz płci pozwoliła na identyfikację epitopów częściej rozpoznawanych w badanych subpopulacjach oraz na analizę zbiorczą populacji. Otrzymane dane pozwalają na zarysowanie historii ekspozycji na fagi u badanych populacji, w zakresie w jakim te przeciwciała pozostają wykrywalne oraz dostarczenie kluczowych informacji do spersonalizowanej terapii fagowej, m.in. wybieranie do terapii tylko tych fagów, które nie są neutralizowane przez przeciwciała pacjenta. Było to możliwe dzięki zidentyfikowaniu powszechnych epitopów bakteriofagowych, zwłaszcza tych,

które są wysoce immunogenne i predysponują faga do tego, aby był on wysoce widoczny dla komórek układu odpornościowego.

9. Summary

As already known, bacteriophages are immunogenic agents and induce a specific immune response, including phage-specific antibodies. This applies both to phages present in the human body (phageome) and to phages delivered in various ways in phage therapy. In order to conduct phage therapy effectively and safely, it is necessary to understand the natural interactions of bacteriophages with the human immune system. So far, there is no data or known methodology to track the history of phage exposure in our lives, and in particular, the common phage epitopes that are most commonly recognized by the human immune system are not known. Phages are composed of multiple proteins displaying multiple epitopes, so phage-specific antibodies are actually the sum of responses to various phage proteins.

The aim of this study was to identify the most frequently recognized bacteriophage epitopes by IgG at the population level, using samples from healthy donors representing the population of Poland and the USA. In the performed studies, a high-throughput analysis method was used, combining many research techniques (cloning in the phage display system, immunoprecipitation, mass DNA sequencing using the NGS method).

The result of the completed project is the first database of identified bacteriophage epitopes (immunogenic phage groups and immunogenic bacteriophage proteins) in the context of entire phage pools (phageomes) found in human organisms. This made it possible to determine to which phages and proteins a specific immune response in humans is particularly common. Statistical analysis and identification of correlations between populations in terms of geography and gender allowed for the identification of epitopes more frequently recognized in the studied subpopulations and for the collective analysis of the population. The obtained data allow to outline the history of exposure to phages in the studied populations, to the extent to which these antibodies remain detectable, and provide key information for personalized phage therapy, e.g. selecting for therapy only those phages that are not neutralized by the patient's antibodies. This was made possible by identifying common bacteriophage epitopes, especially those that are highly immunogenic and predispose the phage to be highly visible to cells of the immune system

10. Załączniki

Załącznik nr 1

Spis wyników eksperymentów badawczych z użyciem bakteriofagów, skupiających się na produkcji przeciwciał po podaniu fagów (*systematic review data extration*) [opublikowano w: Gembara & Dąbrowska, 2021; plik w formacie .xlsx dołączony w wersji elektronicznej do niniejszej pracy]

Załącznik nr 2

Zgoda Komisji Bioetycznej na wykorzystanie ludzkich surowic do badań naukowych

KOMISJA BIOETYCZNA
przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym
we Wrocławiu
ul. H. Kamińskiego 73a
51-124 WROCLAW

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ

przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu
Ośrodek Badawczo-Rozwojowy
51-124 Wrocław ul. Kamińskiego 73A tel. (071) 32 70 196

KB/ nr 2/rok 2017

Działając na podstawie art. 29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodzie lekarza (Dz. U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 wraz ze zm.), Zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1990 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i funkcjonowania oraz trybu działania Komisji Bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz. 480) oraz zgodnie z zasadami zawartymi w GCP (Good Clinical Practice) oraz w Deklaracji Helsińskiej.

Komisja Bioetyczna przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu Ośrodek Badawczo-Rozwojowy na posiedzeniu w dniu **20.06.2017 r.** przeanalizowała wniosek złożony przez **dr. n. med. Andrzeja Koniecznego** oraz **dr hab. Krystynę Dąbrowską** w sprawie badania pt.: **„Profilowanie serologiczne oraz aktywność niespecyficznych elementów układu odpornościowego względem wybranych składników mikrobiomu człowieka ze szczególnym uwzględnieniem wirusów bakteryjnych oraz ich białek, w populacji osób zdrowych”.**

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz tajnego głosowania, Komisja Bioetyczna podjęła uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres 20 lat od chwili zakończenia badania.

Od niniejszej uchwały można się odwołać do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu Ośrodka Badawczo-Rozwojowym w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej opinii.

Przewodniczącą Komisji Bioetycznej

Prof. dr hab. Zdzisława Bem

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej
przy Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym
we Wrocławiu

prof. dr hab. Zdzisława Bem

Otrzymują:

1. Wnioskodawca projektu
2. Kierownik jednostki organizacyjnej, w której projekt będzie realizowany.

Załącznik nr 3

Sekwencje zaprojektowanych oligonukleotydów bakteriofagowych syntetyzowanych przez firmę Agilent [plik w formacie .xlsx dołączony w wersji elektronicznej do niniejszej pracy]

Załącznik nr 4

Indeksy (barkody DNA) do sekwencjonowania DNA metodą NGS (Set A, B, C, D, Illumina)

```
[Header],,,,,,,,,,
Date,6/1/2018,,,,,,,,,
Workflow,GenerateFASTQ,,,,,,,,,
Assay,IDT-ILMN Nextera DNA UD Indexes (384) - Nextera DNA Flex,,,,,,,,,
Index Kit,IDT-ILMN Nextera DNA UD Indexes (384),,,,,,,,,,
Description,,,,,,,,,
Chemistry,Amplicon,,,,,,,,,

,,,,,,,,,
[Reads],,,,,,,,,,
149,,,,,,,,,
149,,,,,,,,,

,,,,,,,,,
[Settings],,,,,,,,,,
Adapter,CTGTCTCTTATACACATCT,,,,,,,,,

,,,,,,,,,
[Data],,,,,,,,,,
Lane,Sample_ID,Sample_Name,Index_Plate,Index_Plate_Well,I7_Index_ID,index,I5_Index_ID,index2,
Sample_Project,Description
1,1,,A,A01,UDP0001,GAACTGAGCG,UDP0001,TCGTGGAGCG,Project,Description
1,2,,A,B01,UDP0002,AGGTCAGATA,UDP0002,CTACAAGATA,Project,Description
1,3,,A,C01,UDP0003,CGTCTCATAT,UDP0003,TATAGTAGCT,Project,Description
1,4,,A,D01,UDP0004,ATTCCATAAG,UDP0004,TGCCTGGTGG,Project,Description
1,5,,A,E01,UDP0005,GACGAGATTA,UDP0005,ACATTATCCT,Project,Description
1,6,,A,F01,UDP0006,AACATCGCGC,UDP0006,GTCCACTTGT,Project,Description
1,7,,A,G01,UDP0007,CTAGTGCTCT,UDP0007,TGGAACAGTA,Project,Description
1,8,,A,H01,UDP0008,GATCAAGGCA,UDP0008,CCTTGTTAAT,Project,Description
1,9,,A,A02,UDP0009,GACTGAGTAG,UDP0009,GTTGATAGTG,Project,Description
1,10,,A,B02,UDP0010,AGTCAGACGA,UDP0010,ACCAGCGACA,Project,Description
1,11,,A,C02,UDP0011,CCGTATGTTC,UDP0011,CATACACTGT,Project,Description
1,12,,A,D02,UDP0012,GAGTCATAGG,UDP0012,GTGTGGCGCT,Project,Description
1,13,,A,E02,UDP0013,CTTGCCATTA,UDP0013,ATCACGAAGG,Project,Description
1,14,,A,F02,UDP0014,GAAGCGGCAC,UDP0014,CGGCTCTACT,Project,Description
1,15,,A,G02,UDP0015,TCCATTGCCG,UDP0015,GAATGCACGA,Project,Description
```

1,16,,A,H02,UDP0016,CGGTTACGGC,UDP0016,AAGACTATAG,Project,Description
1,17,,A,A03,UDP0017,GAGAATGGTT,UDP0017,TCGGCAGCAA,Project,Description
1,18,,A,B03,UDP0018,AGAGGCAACC,UDP0018,CTAATGATGG,Project,Description
1,19,,A,C03,UDP0019,CCATCATTAG,UDP0019,GGTTGCCTCT,Project,Description
1,20,,A,D03,UDP0020,GATAGGCCGA,UDP0020,CGCACATGGC,Project,Description
1,21,,A,E03,UDP0021,ATGGTTGACT,UDP0021,GGCCTGTCCT,Project,Description
1,22,,A,F03,UDP0022,TATTGCGCTC,UDP0022,CTGTGTTAGG,Project,Description
1,23,,A,G03,UDP0023,ACGCCTTGTT,UDP0023,TAAGGAACGT,Project,Description
1,24,,A,H03,UDP0024,TTCTACATAC,UDP0024,CTAACTGTAA,Project,Description
1,25,,A,A04,UDP0025,AACCATAGAA,UDP0025,GGCGAGATGG,Project,Description
1,26,,A,B04,UDP0026,GGTTGCGAGG,UDP0026,AATAGAGCAA,Project,Description
1,27,,A,C04,UDP0027,TAAGCATCCA,UDP0027,TCAATCCATT,Project,Description
1,28,,A,D04,UDP0028,ACCACGACAT,UDP0028,TCGTATGCGG,Project,Description
1,29,,A,E04,UDP0029,GCCGCACTCT,UDP0029,TCCGACCTCG,Project,Description
1,30,,A,F04,UDP0030,CCACCAGGCA,UDP0030,CTTATGGAAT,Project,Description
1,31,,A,G04,UDP0031,GTGACACGCA,UDP0031,GCTTACGGAC,Project,Description
1,32,,A,H04,UDP0032,ACAGTGTATG,UDP0032,GAACATACGG,Project,Description
1,33,,A,A05,UDP0033,TGATTATACG,UDP0033,GTGATTACA,Project,Description
1,34,,A,B05,UDP0034,CAGCCGCGTA,UDP0034,ACTAGCCGTG,Project,Description
1,35,,A,C05,UDP0035,GGTAACTCGC,UDP0035,AAGTTGGTGA,Project,Description
1,36,,A,D05,UDP0036,ACCGGCCGTA,UDP0036,TGGCAATATT,Project,Description
1,37,,A,E05,UDP0037,TGTAATCGAC,UDP0037,GATCACCGCG,Project,Description
1,38,,A,F05,UDP0038,GTGCAGACAG,UDP0038,TACCATCCGT,Project,Description
1,39,,A,G05,UDP0039,CAATCGGCTG,UDP0039,GCTGTAGGAA,Project,Description
1,40,,A,H05,UDP0040,TATGTAGTCA,UDP0040,CGCACTAATG,Project,Description
1,41,,A,A06,UDP0041,ACTCGGCAAT,UDP0041,GACAACTGAA,Project,Description
1,42,,A,B06,UDP0042,GTCTAATGGC,UDP0042,AGTGGTCAGG,Project,Description
1,43,,A,C06,UDP0043,CCATCTCGCC,UDP0043,TTCTATGGTT,Project,Description
1,44,,A,D06,UDP0044,CTGCGAGCCA,UDP0044,AATCCGGCCA,Project,Description
1,45,,A,E06,UDP0045,CGTTATTCTA,UDP0045,CCATAAGGTT,Project,Description
1,46,,A,F06,UDP0046,AGATCCATTA,UDP0046,ATCTCTACCA,Project,Description
1,47,,A,G06,UDP0047,GTCCTGGATA,UDP0047,CGGTGGCGAA,Project,Description
1,48,,A,H06,UDP0048,CAGTGGCACT,UDP0048,TAACAATAGG,Project,Description
1,49,,A,A07,UDP0049,AGTGTGCAC,UDP0049,CTGGTACACG,Project,Description
1,50,,A,B07,UDP0050,GACACCATGT,UDP0050,TCAACGTGTA,Project,Description
1,51,,A,C07,UDP0051,CCTGTCTGTC,UDP0051,ACTGTTGTGA,Project,Description
1,52,,A,D07,UDP0052,TGATGTAAGA,UDP0052,GTGCGTCCTT,Project,Description
1,53,,A,E07,UDP0053,GGAATTGTAA,UDP0053,AGCACATCCT,Project,Description
1,54,,A,F07,UDP0054,GCATAAGCTT,UDP0054,TTCCGTCGCA,Project,Description
1,55,,A,G07,UDP0055,CTGAGGAATA,UDP0055,CTTAACCACT,Project,Description
1,56,,A,H07,UDP0056,AACGCACGAG,UDP0056,GCCTCGGATA,Project,Description
1,57,,A,A08,UDP0057,TCTATCCTAA,UDP0057,CGTCGACTGG,Project,Description
1,58,,A,B08,UDP0058,CTCGCTTCGG,UDP0058,TACTAGTCAA,Project,Description
1,59,,A,C08,UDP0059,CTGTTGGTCC,UDP0059,ATAGACCGTT,Project,Description

1,60,,A,D08,UDP0060,TTACCTGGAA,UDP0060,ACAGTTCCAG,Project,Description
1,61,,A,E08,UDP0061,TGGCTAATCA,UDP0061,AGGCATGTAG,Project,Description
1,62,,A,F08,UDP0062,AACTGTGTTA,UDP0062,GCAAGTCTCA,Project,Description
1,63,,A,G08,UDP0063,ATTGCGCGGT,UDP0063,TTGGCTCCGC,Project,Description
1,64,,A,H08,UDP0064,TGGCGCGAAC,UDP0064,AACTGATACT,Project,Description
1,65,,A,A09,UDP0065,TAATGTGTCT,UDP0065,GTAAGGCATA,Project,Description
1,66,,A,B09,UDP0066,ATACCAACGC,UDP0066,AATTGCTGCG,Project,Description
1,67,,A,C09,UDP0067,AGGATGTGCT,UDP0067,TTACAATTCC,Project,Description
1,68,,A,D09,UDP0068,CACGGAACAA,UDP0068,AACCTAGCAC,Project,Description
1,69,,A,E09,UDP0069,TGGAGTACTT,UDP0069,TCTGTGTGGA,Project,Description
1,70,,A,F09,UDP0070,GTATTGACGT,UDP0070,GGAATTCCAA,Project,Description
1,71,,A,G09,UDP0071,CTTGTACACC,UDP0071,AAGCGCGCTT,Project,Description
1,72,,A,H09,UDP0072,ACACAGGTGG,UDP0072,TGAGCGTTGT,Project,Description
1,73,,A,A10,UDP0073,CCTGCGGAAC,UDP0073,ATCATAGGCT,Project,Description
1,74,,A,B10,UDP0074,TTCATAAGGT,UDP0074,TGTTAGAAGG,Project,Description
1,75,,A,C10,UDP0075,CTCTGCAGCG,UDP0075,GATGGATGTA,Project,Description
1,76,,A,D10,UDP0076,CTGACTCTAC,UDP0076,ACGGCCGTCA,Project,Description
1,77,,A,E10,UDP0077,TCTGGTATCC,UDP0077,CGTTGCTTAC,Project,Description
1,78,,A,F10,UDP0078,CATTAGTGCG,UDP0078,TGACTACATA,Project,Description
1,79,,A,G10,UDP0079,ACGGTCAGGA,UDP0079,CGGCCTCGTT,Project,Description
1,80,,A,H10,UDP0080,GGCAAGCCAG,UDP0080,CAAGCATCCG,Project,Description
1,81,,A,A11,UDP0081,TGTCGCTGGT,UDP0081,TCGTCTGACT,Project,Description
1,82,,A,B11,UDP0082,ACCGTTACAA,UDP0082,CTCATAGCGA,Project,Description
1,83,,A,C11,UDP0083,TATGCCTTAC,UDP0083,AGACACATTA,Project,Description
1,84,,A,D11,UDP0084,ACAAGTGGAC,UDP0084,GCGCGATGTT,Project,Description
1,85,,A,E11,UDP0085,TGGTACCTAA,UDP0085,CATGAGTACT,Project,Description
1,86,,A,F11,UDP0086,TTGGAATTCC,UDP0086,ACGTCAATAC,Project,Description
1,87,,A,G11,UDP0087,CCTCTACATG,UDP0087,GATACCTCCT,Project,Description
1,88,,A,H11,UDP0088,GGAGCGTGTA,UDP0088,ATCCGTAAGT,Project,Description
1,89,,A,A12,UDP0089,GTCCGTAAGC,UDP0089,CGTGTATCTT,Project,Description
1,90,,A,B12,UDP0090,ACTTCAAGCG,UDP0090,GAACCATGAA,Project,Description
1,91,,A,C12,UDP0091,TCAGAAGGCG,UDP0091,GGCCATCATA,Project,Description
1,92,,A,D12,UDP0092,GCGTTGGTAT,UDP0092,ACATACTTCC,Project,Description
1,93,,A,E12,UDP0093,ACATATCCAG,UDP0093,TATGTGCAAT,Project,Description
1,94,,A,F12,UDP0094,TCATAGATTG,UDP0094,GATTAAGGTG,Project,Description
1,95,,A,G12,UDP0095,GTATTCCACC,UDP0095,ATGTAGACAA,Project,Description
1,96,,A,H12,UDP0096,CCTCCGTCCA,UDP0096,CACATCGGTG,Project,Description
1,97,,B,A01,UDP0097,TGCCGGTCAG,UDP0097,CCTGATACAA,Project,Description
1,98,,B,B01,UDP0098,CACTCAATTC,UDP0098,TTAAGTTGTG,Project,Description
1,99,,B,C01,UDP0099,TCTCACACGC,UDP0099,CGGACAGTGA,Project,Description
1,100,,B,D01,UDP0100,TCAATGGAGA,UDP0100,GCACTACAAC,Project,Description
1,101,,B,E01,UDP0101,ATATGCATGT,UDP0101,TGGTGCCTGG,Project,Description
1,102,,B,F01,UDP0102,ATGGCGCCTG,UDP0102,TCCACGGCCT,Project,Description
1,103,,B,G01,UDP0103,TCCGTTATGT,UDP0103,TTGTAGTGTA,Project,Description

1,104,,B,H01,UDP0104,GGTCTATTAA,UDP0104,CCACGACACG,Project,Description
1,105,,B,A02,UDP0105,CAGCAATCGT,UDP0105,TGTGATGTAT,Project,Description
1,106,,B,B02,UDP0106,TTCTGTAGAA,UDP0106,GAGCGCAATA,Project,Description
1,107,,B,C02,UDP0107,GAACGCAATA,UDP0107,ATCTTACTGT,Project,Description
1,108,,B,D02,UDP0108,AGTACTCATG,UDP0108,ATGTCGTGGT,Project,Description
1,109,,B,E02,UDP0109,GGTAGAATTA,UDP0109,GTAGCCATCA,Project,Description
1,110,,B,F02,UDP0110,TAATTAGCGT,UDP0110,TGGTTAAGAA,Project,Description
1,111,,B,G02,UDP0111,ATTAACAAGG,UDP0111,TGTTGTTTCGT,Project,Description
1,112,,B,H02,UDP0112,TGATGGCTAC,UDP0112,CCAACAACAT,Project,Description
1,113,,B,A03,UDP0113,GAATTACAAG,UDP0113,ACCGGCTCAG,Project,Description
1,114,,B,B03,UDP0114,TAGAATTGGA,UDP0114,GTTAATCTGA,Project,Description
1,115,,B,C03,UDP0115,AGGCAGCTCT,UDP0115,CGGCTAACGT,Project,Description
1,116,,B,D03,UDP0116,ATCGGCGAAG,UDP0116,TCCAAGAATT,Project,Description
1,117,,B,E03,UDP0117,CCGTGACCGA,UDP0117,CCGAACGTTG,Project,Description
1,118,,B,F03,UDP0118,ATACTTG TTC,UDP0118,TAACCGCCGA,Project,Description
1,119,,B,G03,UDP0119,TCCGCCAATT,UDP0119,CTCCGTGCTG,Project,Description
1,120,,B,H03,UDP0120,AGGACAGGCC,UDP0120,CATTCCAGCT,Project,Description
1,121,,B,A04,UDP0121,AGAGAACCTA,UDP0121,GGTTATGCTA,Project,Description
1,122,,B,B04,UDP0122,GATATTGTGT,UDP0122,ACCACACGGT,Project,Description
1,123,,B,C04,UDP0123,CGTACAGGAA,UDP0123,TAGGTTCTCT,Project,Description
1,124,,B,D04,UDP0124,CTGCGTTACC,UDP0124,TATGGCTCGA,Project,Description
1,125,,B,E04,UDP0125,AGGCCGTGGA,UDP0125,CTCGTGCGTT,Project,Description
1,126,,B,F04,UDP0126,AGGAGGTATC,UDP0126,CCAGTTGGCA,Project,Description
1,127,,B,G04,UDP0127,GCTGACGTTG,UDP0127,TGTTTCGCATT,Project,Description
1,128,,B,H04,UDP0128,CTAATAACCG,UDP0128,AACCGCATCG,Project,Description
1,129,,B,A05,UDP0129,TCTAGGCGCG,UDP0129,CGAAGGTTAA,Project,Description
1,130,,B,B05,UDP0130,ATAGCCAAGA,UDP0130,AGTGCCACTG,Project,Description
1,131,,B,C05,UDP0131,TTCGGTGTGA,UDP0131,GAACAAGTAT,Project,Description
1,132,,B,D05,UDP0132,ATGTAACGTT,UDP0132,ACGATTGCTG,Project,Description
1,133,,B,E05,UDP0133,AACGAGGCCG,UDP0133,ATACCTGGAT,Project,Description
1,134,,B,F05,UDP0134,TGGTGTTATG,UDP0134,TCCAATTCTA,Project,Description
1,135,,B,G05,UDP0135,TGGCCTCTGT,UDP0135,TGAGACAGCG,Project,Description
1,136,,B,H05,UDP0136,CCAGGCACCA,UDP0136,ACGCTAATTA,Project,Description
1,137,,B,A06,UDP0137,CCGGTTCCTA,UDP0137,TATATTTCGAG,Project,Description
1,138,,B,B06,UDP0138,GGCCAATATT,UDP0138,CGGTCCGATA,Project,Description
1,139,,B,C06,UDP0139,GAATACCTAT,UDP0139,ACAATAGAGT,Project,Description
1,140,,B,D06,UDP0140,TACGTGAAGG,UDP0140,CGGTTATTAG,Project,Description
1,141,,B,E06,UDP0141,CTTATTGGCC,UDP0141,GATAACAAGT,Project,Description
1,142,,B,F06,UDP0142,ACAATACTG,UDP0142,AGTTATCACA,Project,Description
1,143,,B,G06,UDP0143,GTTGGATGAA,UDP0143,TTCCAGGTAA,Project,Description
1,144,,B,H06,UDP0144,AATCCAATTG,UDP0144,CATGTAGAGG,Project,Description
1,145,,B,A07,UDP0145,TATGATGGCC,UDP0145,GATTGTCATA,Project,Description
1,146,,B,B07,UDP0146,CGCAGCAATT,UDP0146,ATTCCGCTAT,Project,Description
1,147,,B,C07,UDP0147,ACGTTCCCTTA,UDP0147,GACCGCTGTG,Project,Description

1,148,,B,D07,UDP0148,CCGCGTATAG,UDP0148,TAGGAACCGG,Project,Description
1,149,,B,E07,UDP0149,GATTCTGAAT,UDP0149,AGCGGTGGAC,Project,Description
1,150,,B,F07,UDP0150,TAGAGAATAC,UDP0150,TATAGATTCTG,Project,Description
1,151,,B,G07,UDP0151,TTGTATCAGG,UDP0151,ACAGAGGCCA,Project,Description
1,152,,B,H07,UDP0152,CACAGCGGTC,UDP0152,ATTCCTATTG,Project,Description
1,153,,B,A08,UDP0153,CCACGCTGAA,UDP0153,TATTCCTCAG,Project,Description
1,154,,B,B08,UDP0154,GTTCGGAGTT,UDP0154,CGCCTTCTGA,Project,Description
1,155,,B,C08,UDP0155,ATAGCGGAAT,UDP0155,GCGCAGAGTA,Project,Description
1,156,,B,D08,UDP0156,GCAATATTCA,UDP0156,GGCGCCAATT,Project,Description
1,157,,B,E08,UDP0157,CTAGATTGCG,UDP0157,AGATATGGCG,Project,Description
1,158,,B,F08,UDP0158,CGATGCGGTT,UDP0158,CCTGCTTGGT,Project,Description
1,159,,B,G08,UDP0159,TCCGGACTAG,UDP0159,GACGAACAAT,Project,Description
1,160,,B,H08,UDP0160,GTGACGGAGC,UDP0160,TGGCGGTCCA,Project,Description
1,161,,B,A09,UDP0161,AATTCATCT,UDP0161,CTTCAGTTAC,Project,Description
1,162,,B,B09,UDP0162,TTAACGGTGT,UDP0162,TCCTGACCGT,Project,Description
1,163,,B,C09,UDP0163,ACTTGTTATC,UDP0163,CGCGCCTAGA,Project,Description
1,164,,B,D09,UDP0164,CGTGTACCAG,UDP0164,AGGATAAGTT,Project,Description
1,165,,B,E09,UDP0165,TTAACCTTCG,UDP0165,AGGCCAGACA,Project,Description
1,166,,B,F09,UDP0166,CATATGCGAT,UDP0166,CCTTGAACGG,Project,Description
1,167,,B,G09,UDP0167,AGCCTATGAT,UDP0167,CACCACCTAC,Project,Description
1,168,,B,H09,UDP0168,TATGACAATC,UDP0168,TTGCTTGTAT,Project,Description
1,169,,B,A10,UDP0169,ATGTTGTTGG,UDP0169,CAATCTATGA,Project,Description
1,170,,B,B10,UDP0170,GCACCACCAA,UDP0170,TGGTACTGAT,Project,Description
1,171,,B,C10,UDP0171,AGGCGTTCGC,UDP0171,TTCATCCAAC,Project,Description
1,172,,B,D10,UDP0172,CCTCCGGTTG,UDP0172,CATAACACCA,Project,Description
1,173,,B,E10,UDP0173,GTCCACCGCT,UDP0173,TCCTATTAGC,Project,Description
1,174,,B,F10,UDP0174,ATTGTTCTGC,UDP0174,TCTCTAGATT,Project,Description
1,175,,B,G10,UDP0175,GGACCAGTGG,UDP0175,CGCGAGCCTA,Project,Description
1,176,,B,H10,UDP0176,CCTTCTAACA,UDP0176,GATAAGCTCT,Project,Description
1,177,,B,A11,UDP0177,CTCGAATATA,UDP0177,GAGATGTCTGA,Project,Description
1,178,,B,B11,UDP0178,GATCGTCGCG,UDP0178,CTGGATATGT,Project,Description
1,179,,B,C11,UDP0179,TATCCGAGGC,UDP0179,GGCCAATAAG,Project,Description
1,180,,B,D11,UDP0180,CGCTGTCTCA,UDP0180,ATTACTCACC,Project,Description
1,181,,B,E11,UDP0181,AATGCGAACA,UDP0181,AATTGGCGGA,Project,Description
1,182,,B,F11,UDP0182,AATTCTTGGA,UDP0182,TTGTCAACTT,Project,Description
1,183,,B,G11,UDP0183,TTCTACAGC,UDP0183,GGCGAATTCT,Project,Description
1,184,,B,H11,UDP0184,ATCCAGGTAT,UDP0184,CAACGTCAGC,Project,Description
1,185,,B,A12,UDP0185,ACGGTCCAAC,UDP0185,TCTTACATCA,Project,Description
1,186,,B,B12,UDP0186,GTAACCTGGT,UDP0186,CGCCATACCT,Project,Description
1,187,,B,C12,UDP0187,AGCGCCACAC,UDP0187,CTAATGTCTT,Project,Description
1,188,,B,D12,UDP0188,TGCTACTGCC,UDP0188,CAACCGGAGG,Project,Description
1,189,,B,E12,UDP0189,CAACACCGCA,UDP0189,GGCAGTAGCA,Project,Description
1,190,,B,F12,UDP0190,CACCTTAATC,UDP0190,TTAGGATAGA,Project,Description
1,191,,B,G12,UDP0191,TTGAATGTTG,UDP0191,CGCAATCTAG,Project,Description

1,192,,B,H12,UDP0192,CCGGTAACAC,UDP0192,GAGTTGTA CT,Project,Description
1,193,,C,A01,UDP0193,TCTCATGATA,UDP0193,AACACGTGGA,Project,Description
1,194,,C,B01,UDP0194,CGAGGCCAAG,UDP0194,GTGTTACCGG,Project,Description
1,195,,C,C01,UDP0195, TTCACGAGAC,UDP0195,AGATTGTTAC,Project,Description
1,196,,C,D01,UDP0196,GCGTGGATGG,UDP0196,TTGACCAATG,Project,Description
1,197,,C,E01,UDP0197,TCCTGGTGT,UDP0197,CTGACCGGCA,Project,Description
1,198,,C,F01,UDP0198,TAATTCTGCT,UDP0198,TCTCATCAAT,Project,Description
1,199,,C,G01,UDP0199,CGCACGACTG,UDP0199,GGACCAACAG,Project,Description
1,200,,C,H01,UDP0200,GAGGTTAGAC,UDP0200,AATGTATTGC,Project,Description
1,201,,C,A02,UDP0201,AACCGAGTTC,UDP0201,GATCTCTGGA,Project,Description
1,202,,C,B02,UDP0202,TGTGATAACT,UDP0202,CAGGCGCCAT,Project,Description
1,203,,C,C02,UDP0203,AGTATGCTAC,UDP0203,TTAATAGACC,Project,Description
1,204,,C,D02,UDP0204,GTA ACTGAAG,UDP0204,GGAGTCGCGA,Project,Description
1,205,,C,E02,UDP0205,TCCTCGGACT,UDP0205,AACGCCAGAG,Project,Description
1,206,,C,F02,UDP0206,CTGGA ACTGT,UDP0206,CGTAATTAAC,Project,Description
1,207,,C,G02,UDP0207,GAATATGCGG,UDP0207,ACGAGACTGA,Project,Description
1,208,,C,H02,UDP0208,GATCGGATAA,UDP0208,GTATCGGCCG,Project,Description
1,209,,C,A03,UDP0209,GCTAGACTAT,UDP0209,AATACGACAT,Project,Description
1,210,,C,B03,UDP0210,AGCTACTATA,UDP0210,GTTATATGGC,Project,Description
1,211,,C,C03,UDP0211,CCACCGGAGT,UDP0211,GCCTGCCATG,Project,Description
1,212,,C,D03,UDP0212,CTTACCGCAC,UDP0212,TAAGACCTAT,Project,Description
1,213,,C,E03,UDP0213,TTAGGATATC,UDP0213,TATACCATGG,Project,Description
1,214,,C,F03,UDP0214,TTATACGCGA,UDP0214,GCCGTCTGTT,Project,Description
1,215,,C,G03,UDP0215,CGCTTAGAAT,UDP0215,CAGAGTGATA,Project,Description
1,216,,C,H03,UDP0216,CCGAAGCGCT,UDP0216,TGCTAACTAT,Project,Description
1,217,,C,A04,UDP0217,CACTATCAAC,UDP0217,TCAGTTAATG,Project,Description
1,218,,C,B04,UDP0218,TTGCTCTATT,UDP0218,GTGACCTTGA,Project,Description
1,219,,C,C04,UDP0219,TTACAGTTAG,UDP0219,ACATGCATAT,Project,Description
1,220,,C,D04,UDP0220,CTAAGTACGC,UDP0220,AACATACCTA,Project,Description
1,221,,C,E04,UDP0221,TAGTTCGGTA,UDP0221,CCATGTGTAG,Project,Description
1,222,,C,F04,UDP0222,CTATTACTAC,UDP0222,GAGTCTCTCC,Project,Description
1,223,,C,G04,UDP0223,TAGCATAACC,UDP0223,GCTATGCGCA,Project,Description
1,224,,C,H04,UDP0224,ACTCTATTGT,UDP0224,ATCGCATATG,Project,Description
1,225,,C,A05,UDP0225,TAGTGAAGC,UDP0225,AGTACCTATA,Project,Description
1,226,,C,B05,UDP0226,CGCCATATCT,UDP0226,GACCGGAGAT,Project,Description
1,227,,C,C05,UDP0227,GCTTCATATT,UDP0227,CGTTCAGCCT,Project,Description
1,228,,C,D05,UDP0228,ACTAGCGCTA,UDP0228,TTACTTCCTC,Project,Description
1,229,,C,E05,UDP0229,GCTCTTAACT,UDP0229,CACGTCCACC,Project,Description
1,230,,C,F05,UDP0230,GTGGTATCTG,UDP0230,GCTACTATCT,Project,Description
1,231,,C,G05,UDP0231,TGACGGCCGT,UDP0231,AGTCAACCAT,Project,Description
1,232,,C,H05,UDP0232,CAGTAATTAC,UDP0232,CGAGGCGGTA,Project,Description
1,233,,C,A06,UDP0233,TACAAGACTT,UDP0233,CAGGTGTTCA,Project,Description
1,234,,C,B06,UDP0234,CTGTGGTGAC,UDP0234,GACAGACAGG,Project,Description
1,235,,C,C06,UDP0235,CTCCACTAAT,UDP0235,TGTACTTGTT,Project,Description

1,236,,C,D06,UDP0236,ATAGTTAGCA,UDP0236,CTCTAAGTAG,Project,Description
1,237,,C,E06,UDP0237,ATAGGTCTTA,UDP0237,GTCACCACAG,Project,Description
1,238,,C,F06,UDP0238,TTCTTAACCA,UDP0238,TCTACATACC,Project,Description
1,239,,C,G06,UDP0239,AAGGAAGAGT,UDP0239,CACGTTAGGC,Project,Description
1,240,,C,H06,UDP0240,GGAAGGAGAC,UDP0240,TGGTGAGTCT,Project,Description
1,241,,C,A07,UDP0241,TGAACGCGGA,UDP0241,CTTCGAAGGA,Project,Description
1,242,,C,B07,UDP0242,CCTGCAACCT,UDP0242,GTAGAGTCAG,Project,Description
1,243,,C,C07,UDP0243,TTTCATGGTTC,UDP0243,GACATTGTCA,Project,Description
1,244,,C,D07,UDP0244,ATCCTCTCAA,UDP0244,TCCGCAAGGC,Project,Description
1,245,,C,E07,UDP0245,CACTAGACCA,UDP0245,ACTGCCTTAT,Project,Description
1,246,,C,F07,UDP0246,ATTATCCACT,UDP0246,TACGCACGTA,Project,Description
1,247,,C,G07,UDP0247,ATGGCGTGCC,UDP0247,CGCTTGAAGT,Project,Description
1,248,,C,H07,UDP0248,TCCAGAGATC,UDP0248,CTGCACTTCA,Project,Description
1,249,,C,A08,UDP0249,ATGTCCAGCA,UDP0249,CAGCGGACAA,Project,Description
1,250,,C,B08,UDP0250,CAACGTTCGG,UDP0250,GGATCCGCAT,Project,Description
1,251,,C,C08,UDP0251,GCGTATTAAT,UDP0251,TGCGGTGTTG,Project,Description
1,252,,C,D08,UDP0252,GTTGTGACTA,UDP0252,ACATAACGGA,Project,Description
1,253,,C,E08,UDP0253,TCTCAATACC,UDP0253,GACGTTTCGCG,Project,Description
1,254,,C,F08,UDP0254,AAGCATCTTG,UDP0254,CATTCAACAA,Project,Description
1,255,,C,G08,UDP0255,TCAGTCTCGT,UDP0255,CACGGATTAT,Project,Description
1,256,,C,H08,UDP0256,TGCAAGATAA,UDP0256,TTGAGGACGG,Project,Description
1,257,,C,A09,UDP0257,GTAACAATCT,UDP0257,CTCTGTATAC,Project,Description
1,258,,C,B09,UDP0258,CAGCGGTAGA,UDP0258,GCAACAGGTG,Project,Description
1,259,,C,C09,UDP0259,TCATACCGTT,UDP0259,GGTAACGCAG,Project,Description
1,260,,C,D09,UDP0260,GGCGCCATTG,UDP0260,ACCGCGCAAT,Project,Description
1,261,,C,E09,UDP0261,AGCGAATTAG,UDP0261,AGCCGGAACA,Project,Description
1,262,,C,F09,UDP0262,TTAGACCATG,UDP0262,TCCTAGGAAG,Project,Description
1,263,,C,G09,UDP0263,CACACAGTAT,UDP0263,TTGAGCCTAA,Project,Description
1,264,,C,H09,UDP0264,TCTTGTCGGC,UDP0264,CCACCTGTGT,Project,Description
1,265,,C,A10,UDP0265,TACCGCCTCG,UDP0265,CCTCGCAACC,Project,Description
1,266,,C,B10,UDP0266,CTGTTATATC,UDP0266,GTATAGCTGT,Project,Description
1,267,,C,C10,UDP0267,TAACCGGCGA,UDP0267,GCTACATTAG,Project,Description
1,268,,C,D10,UDP0268,AAGAGAGTCT,UDP0268,TACGAATCTT,Project,Description
1,269,,C,E10,UDP0269,GTAGGCGAGC,UDP0269,TAGGAGCGCA,Project,Description
1,270,,C,F10,UDP0270,AACTTATCCT,UDP0270,GTACTGGCGT,Project,Description
1,271,,C,G10,UDP0271,ATTATGTCTC,UDP0271,AGTTAAGAGC,Project,Description
1,272,,C,H10,UDP0272,TATAACAGCT,UDP0272,TCGCGTATAA,Project,Description
1,273,,C,A11,UDP0273,CCAATGATAC,UDP0273,GAGTGTGCCG,Project,Description
1,274,,C,B11,UDP0274,GAGGCCTATT,UDP0274,CTAGTCCGGA,Project,Description
1,275,,C,C11,UDP0275,AGCTAAGCGG,UDP0275,ATTAATACGC,Project,Description
1,276,,C,D11,UDP0276,CTTCCTAGGA,UDP0276,CCTAGAGTAT,Project,Description
1,277,,C,E11,UDP0277,CGATCTGTGA,UDP0277,TAGGAAGACT,Project,Description
1,278,,C,F11,UDP0278,GTGGACAAGT,UDP0278,CCGTGGCCTT,Project,Description
1,279,,C,G11,UDP0279,AACAAGTACA,UDP0279,GGATATATCC,Project,Description

1,280,,C,H11,UDP0280,AGATTAAGTG,UDP0280,CACCTCTTGG,Project,Description
1,281,,C,A12,UDP0281,TATCACTCTG,UDP0281,AACGTTACAT,Project,Description
1,282,,C,B12,UDP0282,AGAATTCGCC,UDP0282,CGGCAAGCTC,Project,Description
1,283,,C,C12,UDP0283,CCTGACCACT,UDP0283,TCTTGGCTAT,Project,Description
1,284,,C,D12,UDP0284,AGCTGGAATG,UDP0284,ACGGAATGCG,Project,Description
1,285,,C,E12,UDP0285,TGATAACGAG,UDP0285,GTTCCGCAGG,Project,Description
1,286,,C,F12,UDP0286,CATAGTAAGG,UDP0286,ACCAAGTTAC,Project,Description
1,287,,C,G12,UDP0287,ATTGGCTTCT,UDP0287,TGGCTCGCAG,Project,Description
1,288,,C,H12,UDP0288,GTACCGATTA,UDP0288,AACTAACGTT,Project,Description
1,289,,D,A01,UDP0289,GAACAATTCC,UDP0289,TAGAGTTGGA,Project,Description
1,290,,D,B01,UDP0290,TGTGGTCCGG,UDP0290,AGAGCACTAG,Project,Description
1,291,,D,C01,UDP0291,CTTCTAAGTC,UDP0291,ACTCTACAGG,Project,Description
1,292,,D,D01,UDP0292,AATATTGCCA,UDP0292,CGGTGACACC,Project,Description
1,293,,D,E01,UDP0293,TCGTGCATTC,UDP0293,GCGTTGGTAT,Project,Description
1,294,,D,F01,UDP0294,AAGATACACG,UDP0294,TGTGCTAACA,Project,Description
1,295,,D,G01,UDP0295,TGCAATGAAT,UDP0295,CCAGAAGTAA,Project,Description
1,296,,D,H01,UDP0296,CTATGAAGGA,UDP0296,CTTATACCTG,Project,Description
1,297,,D,A02,UDP0297,GAAGACTAGA,UDP0297,ACTAGAACTT,Project,Description
1,298,,D,B02,UDP0298,AGGAGTCGAG,UDP0298,TTAGGCTTAC,Project,Description
1,299,,D,C02,UDP0299,TTCACTCACT,UDP0299,TATCATGAGA,Project,Description
1,300,,D,D02,UDP0300,GGTCCGCTTC,UDP0300,CTCACACAAG,Project,Description
1,301,,D,E02,UDP0301,CAACGAGAGC,UDP0301,GAATTGAGTG,Project,Description
1,302,,D,F02,UDP0302,ATTGAGGTCC,UDP0302,CGGATTATAT,Project,Description
1,303,,D,G02,UDP0303,GGAGAGACTC,UDP0303,TTGAAGCAGA,Project,Description
1,304,,D,H02,UDP0304,CCGCTCCGTT,UDP0304,TACGGCGAAG,Project,Description
1,305,,D,A03,UDP0305,ATACATCACA,UDP0305,TCTCCATTGA,Project,Description
1,306,,D,B03,UDP0306,TAGGTATGTT,UDP0306,CGAGACCAAG,Project,Description
1,307,,D,C03,UDP0307,CACCTAGCAC,UDP0307,TGCTGGACAT,Project,Description
1,308,,D,D03,UDP0308,TTCAAGTATG,UDP0308,GATGGTATCG,Project,Description
1,309,,D,E03,UDP0309,TTAAGACAAG,UDP0309,GGCTTAATTG,Project,Description
1,310,,D,F03,UDP0310,CACCTCTCTT,UDP0310,CTCGACTCCT,Project,Description
1,311,,D,G03,UDP0311,TTCTCGTGCA,UDP0311,ATACACAGAG,Project,Description
1,312,,D,H03,UDP0312,GCTAGGAAGT,UDP0312,TCTCGGACGA,Project,Description
1,313,,D,A04,UDP0313,TTAATAGCAC,UDP0313,ACCACGTCTG,Project,Description
1,314,,D,B04,UDP0314,CATTCACGCT,UDP0314,GTTGTACTCA,Project,Description
1,315,,D,C04,UDP0315,GGCACTAAGG,UDP0315,TCAGGTCAAC,Project,Description
1,316,,D,D04,UDP0316,ATTCGGTACA,UDP0316,AGTCCGAGGA,Project,Description
1,317,,D,E04,UDP0317,ACTAATCTCC,UDP0317,CACTTAATCT,Project,Description
1,318,,D,F04,UDP0318,TGTGTTAGTA,UDP0318,TACTCTGTTA,Project,Description
1,319,,D,G04,UDP0319,CAACGACCTA,UDP0319,GCGACTCGAT,Project,Description
1,320,,D,H04,UDP0320,CGGTCGGCAT,UDP0320,CTAGGCAAGG,Project,Description
1,321,,D,A05,UDP0321,TCGACGCTAG,UDP0321,CCTCTTCGAA,Project,Description
1,322,,D,B05,UDP0322,CTCGTAGGCA,UDP0322,TCATCCTCTT,Project,Description
1,323,,D,C05,UDP0323,AAGTTCTAGT,UDP0323,GGTAAGATAA,Project,Description

1,324,,D,D05,UDP0324,CCAAGAGGTG,UDP0324,AACGAGCCAG,Project,Description
1,325,,D,E05,UDP0325,ATATCTGCTT,UDP0325,TAGACAATCT,Project,Description
1,326,,D,F05,UDP0326,TGGATCTGGC,UDP0326,CAATGCTGAA,Project,Description
1,327,,D,G05,UDP0327,TTGAATCCAA,UDP0327,GTCACGGTGT,Project,Description
1,328,,D,H05,UDP0328,CACGGCTAGT,UDP0328,GGTGTACAAG,Project,Description
1,329,,D,A06,UDP0329,GAGCTTGCCG,UDP0329,AGGTTGCAGG,Project,Description
1,330,,D,B06,UDP0330,AGCTAGCTTC,UDP0330,TAATACGGAG,Project,Description
1,331,,D,C06,UDP0331,CAATCCTTGT,UDP0331,CGAAGACGCA,Project,Description
1,332,,D,D06,UDP0332,CACCTGTTGC,UDP0332,ATTGACACAT,Project,Description
1,333,,D,E06,UDP0333,CGTCACCTTG,UDP0333,CAGCCGATTG,Project,Description
1,334,,D,F06,UDP0334,AATGACTGGT,UDP0334,TCTCACGCGT,Project,Description
1,335,,D,G06,UDP0335,ATGATTCCGG,UDP0335,CTCTGACGTG,Project,Description
1,336,,D,H06,UDP0336,TTAGGCTCAA,UDP0336,TCGAATGGAA,Project,Description
1,337,,D,A07,UDP0337,TGTAAGGTGG,UDP0337,AAGGCCTTGG,Project,Description
1,338,,D,B07,UDP0338,CAACTGCAAC,UDP0338,TGAACGCAAC,Project,Description
1,339,,D,C07,UDP0339,ACATGAGTGA,UDP0339,CCGCTTAGCT,Project,Description
1,340,,D,D07,UDP0340,GCAACCAGTC,UDP0340,CACCGAGGAA,Project,Description
1,341,,D,E07,UDP0341,GAGCGACGAT,UDP0341,CGTATAATCA,Project,Description
1,342,,D,F07,UDP0342,CGAACGCACC,UDP0342,ATGACAGAAC,Project,Description
1,343,,D,G07,UDP0343,TCTTACGCCG,UDP0343,ATTCATTGCA,Project,Description
1,344,,D,H07,UDP0344,AGCTGATGTC,UDP0344,TCATGTCCTG,Project,Description
1,345,,D,A08,UDP0345,CTGAATTAGT,UDP0345,AATTCGATCG,Project,Description
1,346,,D,B08,UDP0346,TAAGGAGGAA,UDP0346,TTCCGACATT,Project,Description
1,347,,D,C08,UDP0347,AGCTTACACA,UDP0347,TGGCACGACC,Project,Description
1,348,,D,D08,UDP0348,AACCAGCCAC,UDP0348,GCCACAGCAC,Project,Description
1,349,,D,E08,UDP0349,CTTAAGTCGA,UDP0349,CAGTAGTTGT,Project,Description
1,350,,D,F08,UDP0350,GCCTAACGTG,UDP0350,AGCTCTCAAG,Project,Description
1,351,,D,G08,UDP0351,ACTTACTTCA,UDP0351,TCTGGAATTA,Project,Description
1,352,,D,H08,UDP0352,CGCATTCGGT,UDP0352,ATTAGTGGAG,Project,Description
1,353,,D,A09,UDP0353,GATATCACAC,UDP0353,GACTATATGT,Project,Description
1,354,,D,B09,UDP0354,AGCGCTGTGT,UDP0354,CGTTCGGAAC,Project,Description
1,355,,D,C09,UDP0355,TCACCGCGCT,UDP0355,TCGATACTAG,Project,Description
1,356,,D,D09,UDP0356,GATAGCCTTG,UDP0356,TACCACAATG,Project,Description
1,357,,D,E09,UDP0357,CCTGGACGCA,UDP0357,TGGTATACCA,Project,Description
1,358,,D,F09,UDP0358,TTACGCACCT,UDP0358,GCTCTCGTTG,Project,Description
1,359,,D,G09,UDP0359,TCGTTGCTGC,UDP0359,GTCTCGTGAA,Project,Description
1,360,,D,H09,UDP0360,CGACAAGGAT,UDP0360,AAGGCCACCT,Project,Description
1,361,,D,A10,UDP0361,GTGTACCTTC,UDP0361,CTGTGAGCTA,Project,Description
1,362,,D,B10,UDP0362,ACCTGGCCAA,UDP0362,TCACAGATCG,Project,Description
1,363,,D,C10,UDP0363,TGTCTGGCCT,UDP0363,AGAAGCCAAT,Project,Description
1,364,,D,D10,UDP0364,AGTTAATGCT,UDP0364,ACTGCAGCCG,Project,Description
1,365,,D,E10,UDP0365,GGTGAGTAAT,UDP0365,AACATCTAGT,Project,Description
1,366,,D,F10,UDP0366,TACTCTGCGC,UDP0366,CCTTACTATG,Project,Description
1,367,,D,G10,UDP0367,AGGTATGGCG,UDP0367,GTGGCGAGAC,Project,Description

1,368,,D,H10,UDP0368,TCCAGCCTGC,UDP0368,GCCAGATCCA,Project,Description
1,369,,D,A11,UDP0369,GCCATATAAC,UDP0369,ACACAATATC,Project,Description
1,370,,D,B11,UDP0370,AGTGCGAGTG,UDP0370,TGGAGGTAAT,Project,Description
1,371,,D,C11,UDP0371,CTGAGCCGGT,UDP0371,CCTTCACGTA,Project,Description
1,372,,D,D11,UDP0372,AACGGTCTAT,UDP0372,CTATACGCGG,Project,Description
1,373,,D,E11,UDP0373,GTTGCGTTCA,UDP0373,GTTGCAGTTG,Project,Description
1,374,,D,F11,UDP0374,CTTCAACCAC,UDP0374,TTATGCGCCT,Project,Description
1,375,,D,G11,UDP0375,TCTATTCAGT,UDP0375,TCTCAGTACA,Project,Description
1,376,,D,H11,UDP0376,CAAGACGTCC,UDP0376,AGTATACGGA,Project,Description
1,377,,D,A12,UDP0377,TGAGTACAAC,UDP0377,ACGCTTGGAC,Project,Description
1,378,,D,B12,UDP0378,CCGCGGTTCT,UDP0378,GGAGTAGATT,Project,Description
1,379,,D,C12,UDP0379,ATTGATACTG,UDP0379,TACACGCTCC,Project,Description
1,380,,D,D12,UDP0380,GGATTATGGA,UDP0380,TCCGATAGAG,Project,Description
1,381,,D,E12,UDP0381,TGGTTCTCAT,UDP0381,CTCAAGGCCG,Project,Description
1,382,,D,F12,UDP0382,TCAACCACGA,UDP0382,CAAGTTCATA,Project,Description
1,383,,D,G12,UDP0383,TATGAACTTG,UDP0383,AATCCTTAGG,Project,Description
1,384,,D,H12,UDP0384,AGTGGTTAAG,UDP0384,GGTGAATAC,Project,Description

Załącznik nr 5

Lista zidentyfikowanych reaktywnych epitopów bakteriofagów [plik w formacie .xlsx dołączony w wersji elektronicznej do niniejszej pracy]

Załącznik nr 6

Wieloaspektowa charakterystyka zidentyfikowanych reaktywnych epitopów bakteriofagów [plik w formacie .xlsx dołączony w wersji elektronicznej do niniejszej pracy]

Załącznik nr 7

Wieloaspektowa charakterystyka zidentyfikowanych reaktywnych epitopów bakteriofagów wraz z ich sekwencjami homologicznymi [plik w formacie .xlsx dołączony w wersji elektronicznej do niniejszej pracy]

11. Literatura

- Anand, T., Virmani, N., Bera, B. C., Vaid, R. K., Vashisth, M., Bardajaty, P., Kumar, A., & Tripathi, B. N. (2021). Phage Display Technique as a Tool for Diagnosis and Antibody Selection for Coronaviruses. *Current Microbiology*, 78(4), 1124–1134.
- Arap MA. Phage display technology: applications and innovations. *Genet Mol Biol* 2005;28.
- Barderas, R., & Benito-Peña, E. (2019). The 2018 Nobel Prize in Chemistry: phage display of peptides and antibodies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(12), 2475–2479.
- Barfoot R, Denham S, Gyure LA, Hall JG, Hobbs SM, Jackson LE, Robertson D: Some properties of dendritic macrophages from peripheral lymph. *Immunology* 1989, 68:233-239.
- Bender Ignacio, R. A., Dasgupta, S., Stevens-Ayers, T., Kula, T., Hill, J. A., Lee, S. J., Mielcarek, M., Duerr, A., Elledge, S. J., & Boeckh, M. (2019). Comprehensive viromewide antibody responses by systematic epitope scanning after hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 134(6), 503–514.
- Bikel, S., López-Leal, G., Cornejo-Granados, F., Gallardo-Becerra, L., García-López, R., Sánchez, F., Equihua-Medina, E., Ochoa-Romo, J. P., López-Contreras, B. E., Canizales-Quinteros, S., Hernández-Reyna, A., Mendoza-Vargas, A., & Ochoa-Leyva, A. (2021). Gut dsDNA virome shows diversity and richness alterations associated with childhood obesity and metabolic syndrome. *iScience*, 24(8), 102900.
- Bikel, S., Valdez-Lara, A., Cornejo-Granados, F., Rico, K., Canizales-Quinteros, S., Soberón, X., Del Pozo-Yauner, L., & Ochoa-Leyva, A. (2015). Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. *Computational and structural biotechnology journal*, 13, 390–401.
- Bochkareva SS, Karaulov AV, Aleshkin AV, Novikova II, Fedorova IM, Blayaher MS, Koteleva SI, Kapustin IV: [Approaches to the estimation of some parameters of humoral and cellular immune response to bacteriophages.]. *Klin Lab Diagn* 2019, 64:237-242.

- Brown-Jaque, M., Muniesa, M., & Navarro, F. (2016). Bacteriophages in clinical samples can interfere with microbiological diagnostic tools. *Scientific reports*, 6, 33000.
- Bruttin A, Brussow H: Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49:2874-2878.
- Burgener, E. B., Sweere, J. M., Bach, M. S., Secor, P. R., Haddock, N., Jennings, L. K., Marvig, R. L., Johansen, H. K., Rossi, E., Cao, X., Tian, L., Nedelec, L., Molin, S., Bollyky, P. L., & Milla, C. E. (2019). Filamentous bacteriophages are associated with chronic *Pseudomonas* lung infections and antibiotic resistance in cystic fibrosis. *Science translational medicine*, 11(488), eaau9748.
- Burnham, C. A. D., & McAdam, A. J. (2016). Your viral past: A comprehensive method for serological profiling to explore the human virome. *Clinical Chemistry*, 62(3), 426–427.
- Burnham, C. A., & McAdam, A. J. (2016). Your Viral Past: A Comprehensive Method for Serological Profiling to Explore the Human Virome. *Clinical chemistry*, 62(3), 426–427.
- Campbell, A. (2003). *41576_2003_Article_BFnrg1089*. 4(June), 1–7.
- Cha K, Oh HK, Jang JY, Jo Y, Kim WK, Ha GU, Ko KS, Myung H: Characterization of two novel bacteriophages infecting multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* and evaluation of their therapeutic efficacy in vivo. *Front Microbiol* 2018, 9:696
- Chen, Q., Ma, X., Li, C., Shen, Y., Zhu, W., Zhang, Y., Guo, X., Zhou, J., & Liu, C. (2021). Enteric Phageome Alterations in Patients With Type 2 Diabetes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(January), 1–15.
- Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V., Kozarov, E., Sobenin, I. A., & Orekhov, A. N. (2014). Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC).
- Clark L, Greenbaum C, Jiang J, Lernmark A, Ochs H: The antibody response to bacteriophage is linked to the lymphopenia gene in congenic BioBreeding rats. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002, 32:205-209.

- Dabrowska K, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Hodyra K, Owczarek B, Lecion D, Kazmierczak Z, Letarov A, Gorski A: Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. *J Virol* 2014, 88:12551-12557.
- Dabrowska K: Phage therapy: what factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. *Med Res Rev* 2019, 39:2000-2025 Extensive review on diverse factors that determine phage concentrations in vivo.
- Dabrowska, K., Miernikiewicz, P., Piotrowicz, A., Hodyra, K., Owczarek, B., Lecion, D., Kazmierczak, Z., Letarov, A., & Gorski, A. (2014). Immunogenicity Studies of Proteins Forming the T4 Phage Head Surface. *Journal of Virology*, 88(21), 12551–12557.
- Danner, S., & Belasco, J. G. (2001). T7 phage display: A novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 12954–12959.
- de la Cuesta-Zuluaga, J., Kelley, S. T., Chen, Y., Escobar, J. S., Mueller, N. T., Ley, R. E., McDonald, D., Huang, S., Swafford, A. D., Knight, R., & Thackray, V. G. (2019). Age- and Sex-Dependent Patterns of Gut Microbial Diversity in Human Adults. *MSystems*, 4(4).
- Deng, X., Wang, L., You, X., Dai, P., & Zeng, Y. (2018). Advances in the T7 phage display system (Review). *Molecular Medicine Reports*, 17(1), 714–720.
- Deng, X., Wang, L., You, X., Dai, P., & Zeng, Y. (2018). Advances in the T7 phage display system (Review). *Molecular medicine reports*, 17(1), 714–720.
- Denou E, Bruttin A, Barretto C, Ngom-Bru C, Brussow H, Zuber S: T4 phages against Escherichia coli diarrhea: potential and problems. *Virology* 2009, 388:21-30.
- Descamps, H., & Thaïss, C. A. (2018). Intestinal Tolerance, with a Little Help from Our Microbial Friends. *Immunity*, 49(1), 4–6.
- Deutscher S. (2019). Phage Display to Detect and Identify Autoantibodies in Disease. *The New England journal of medicine*, 381(1), 89–91.
- Dickerson, F., Severance, E., & Yolken, R. (2017). The microbiome, immunity, and schizophrenia and bipolar disorder. *Brain, behavior, and immunity*, 62, 46–52.

- Dinh, D. M., Volpe, G. E., Duffalo, C., Bhalchandra, S., Tai, A. K., Kane, A. V., Wanke, C. A., & Ward, H. D. (2015). Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *The Journal of infectious diseases*, *211*(1), 19–27.
- Fernandes, M. A., Verstraete, S. G., Phan, T. G., Deng, X., Stekol, E., LaMere, B., Lynch, S. V., Heyman, M. B., & Delwart, E. (2019). Enteric Virome and Bacterial Microbiota in Children With Ulcerative Colitis and Crohn Disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *68*(1), 30–36.
- Fernández, L., Duarte, A. C., Rodríguez, A., & García, P. (2021). The relationship between the phageome and human health: are bacteriophages beneficial or harmful microbes?. *Beneficial microbes*, *12*(2), 107–120.
- Fitzgerald, C. B., Shkoporov, A. N., Upadrastra, A., Khokhlova, E. V., Ross, R. P., & Hill, C. (2021). Probing the “Dark Matter” of the Human Gut Phageome: Culture Assisted Metagenomics Enables Rapid Discovery and Host-Linking for Novel Bacteriophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*(March), 1–9.
- Flaherty D., *Immunology for Pharmacy*, Elsevier, 2012.
- Flower D. (2013). Computer-Aided Vaccine Design. *Human vaccines & immunotherapeutics*, *10*(2), 241–243. Advance online publication.
- Fokine, A., Chipman, P. R., Leiman, P. G., Mesyanzhinov, V. V., Rao, V. B., & Rossmann, M. G. (2004). Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(16), 6003–6008.
- Forsström, B., Axnäs, B. B., Rockberg, J., Danielsson, H., Bohlin, A., & Uhlen, M. (2015). Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PloS one*, *10*(3), e0121673.
- Gembara, K., & Dąbrowska, K. (2021). Phage-specific antibodies. *Current opinion in biotechnology*, *68*, 186–192.

- Gogokhia, L., Buhrke, K., Bell, R., Hoffman, B., Brown, D. G., Hanke-Gogokhia, C., Ajami, N. J., Wong, M. C., Ghazaryan, A., Valentine, J. F., Porter, N., Martens, E., O'Connell, R., Jacob, V., Scherl, E., Crawford, C., Stephens, W. Z., Casjens, S. R., Longman, R. S., & Round, J. L. (2019). Expansion of Bacteriophages Is Linked to Aggravated Intestinal Inflammation and Colitis. *Cell Host and Microbe*, 25(2), 285-299.e8.
- Gregory, A. C., Sullivan, M. B., Segal, L. N., & Keller, B. C. (2018). Smoking is associated with quantifiable differences in the human lung DNA virome and metabolome. *Respiratory research*, 19(1), 174.
- Gruenheid S, Finlay BB: Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* 2003, 422:775-781.
- Gupta, V. K., Paul, S., & Dutta, C. (2017). Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN).
- Hajek P, Mandel L: Antibody response of young animals to bacteriophages of different immunological behaviour: phi X 174 and T2. *Folia Microbiol (Praha)* 1966, 11:282-289.
- Hajek P: Neutralization of bacterial viruses by antibodies of young animals. I. Dependence of neutralizing activity of 19 S and 7 S antibodies on complement in the course of the primary and secondary response of young rabbits immunized with T2 phage. *Folia Microbiol (Praha)* 1969, 14:165-170.
- Hajek P: Properties of natural 19S antibodies in normal pig serum against the phi x 174 and T2 phages. *Folia Microbiol (Praha)* 1967, 12:551-556.
- Han, M., Yang, P., Zhong, C., & Ning, K. (2018). The Human Gut Virome in Hypertension. *Frontiers in microbiology*, 9, 3150.
- Handley, S. A., & Devkota, S. (2019). Going Viral: a Novel Role for Bacteriophage in Colorectal Cancer. *mBio*, 10(1), e02626-18.
- Hannigan, G. D., Duhaime, M. B., Ruffin, M. T., 4th, Koumpouras, C. C., & Schloss, P. D. (2018). Diagnostic Potential and Interactive Dynamics of the Colorectal Cancer Virome. *mBio*, 9(6), e02248-18.

- Hasan, M. R., Rahman, M., Khan, T., Saeed, A., Sundararaju, S., Flores, A., Hawken, P., Rawat, A., Elkum, N., Hussain, K., Tan, R., Tang, P., & Marr, N. (2021). Virome-wide serological profiling reveals association of herpesviruses with obesity. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–10.
- Hashemi, H., Pouyanfard, S., Bandehpour, M., Noroozbabaei, Z., Kazemi, B., Saelens, X., & Mokhtari-Azad, T. (2012). Immunization with M2e-displaying T7 bacteriophage nanoparticles protects against influenza A virus challenge. *PloS one*, *7*(9), e45765.
- Hodyra-Stefaniak K, Kazmierczak Z, Majewska Z, Sillankorva S, Miernikiewicz P, Miedzybrodzki R, Gorski A, Azeredo J, Lavigne R, Lecion D et al.: Natural and induced antibodies against phages in humans: induction kinetics and immunogenicity for structural proteins of PB1-related phages. *PHAGE: Ther Appl Res* 2020, 1:91-99.
- Hodyra-Stefaniak K, Miernikiewicz P, Drapala J, Drab M, JonczykMatysiak E, Lecion D, Kazmierczak Z, Beta W, Majewska J, Harhala M et al.: Mammalian host-versus-phage immune response determines phage fate in vivo. *Sci Rep* 2015, 5:14802.
- Howard-Varona, C., Hargreaves, K. R., Abedon, S. T., & Sullivan, M. B. (2017). Lysogeny in nature: Mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME Journal*, *11*(7), 1511–1520.
- Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM: Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an Escherichia coli respiratory infection. *Poult Sci* 2003, 82:1108-1112.
- Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM: Prevention of Escherichia coli infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. *Poult Sci* 2002, 81:1486-1491.
- Hurrell, J. M., Genta, R. M., & Dellon, E. S. (2012). Prevalence of esophageal eosinophilia varies by climate zone in the United States. *American Journal of Gastroenterology*, *107*(5), 698–706.
- Isnard, P., Kula, T., Fenoel, V. A., Anglicheau, D., Terzi, F., Legendre, C., Elledge, S. J., & Canaud, G. (2019). Temporal virus serological profiling of kidney graft recipients using

- VirScan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 166(22), 10899–10904.
- Jakobsen, R. R., Haahr, T., Humaidan, P., Jensen, J. S., Kot, W. P., Castro-Mejia, J. L., Deng, L., Leser, T. D., & Nielsen, D. S. (2020). Characterization of the Vaginal DNA Virome in Health and Dysbiosis. *Viruses*, 12(10), 1143.
- Jaroszewicz, W., Morcinek-Orłowska, J., Pierzynowska, K., Gaffke, L., & Węgrzyn, G. (2022). Phage display and other peptide display technologies. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(2), 1–25.
- Jerne NK, Avegno P: The development of the phageinactivating properties of serum during the course of specific immunization of an animal: reversible and irreversible inactivation. *J Immunol* 1956, 76:200-208.
- Jie, Z., Xia, H., Zhong, S. L., Feng, Q., Li, S., Liang, S., Zhong, H., Liu, Z., Gao, Y., Zhao, H., Zhang, D., Su, Z., Fang, Z., Lan, Z., Li, J., Xiao, L., Li, J., Li, R., Li, X., Li, F., ... Kristiansen, K. (2017). The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature communications*, 8(1), 845.
- Johnson, T. P., Larman, H. B., Lee, M. H., Whitehead, S. S., Kowalak, J., Toro, C., Lau, C. C., Kim, J., Johnson, K. R., Reoma, L. B., Faustin, A., Pardo, C. A., Kottapalli, S., Howard, J., Monaco, D., Weisfeld-Adams, J., Blackstone, C., Galetta, S., Snuderl, M., Gahl, W. A., ... Nath, A. (2019). Chronic Dengue Virus Panencephalitis in a Patient with Progressive Dementia with Extrapryamidal Features. *Annals of neurology*, 86(5), 695–703.
- Kammers, K., Chen, A., Monaco, D. R., Hudelson, S. E., Grant-McAuley, W., Moore, R. D., Alter, G., Deeks, S. G., Morrison, C. S., Eller, L. A., Blankson, J. N., Laeyendecker, O., Ruczinski, I., Eshleman, S. H., & Larman, H. B. (2021). HIV Antibody Profiles in HIV Controllers and Persons With Treatment-Induced Viral Suppression. *Frontiers in immunology*, 12, 740395.
- Kaźmierczak, Z., Majewska, J., Miernikiewicz, P., Międzybrodzki, R., Nowak, S., Harhala, M., Lecion, D., Kęska, W., Owczarek, B., Ciekot, J., Drab, M., Kędzierski, P., Mazurkiewicz-Kania, M., Górski, A., & Dąbrowska, K. (2021). Immune Response to Therapeutic

- Staphylococcal Bacteriophages in Mammals: Kinetics of Induction, Immunogenic Structural Proteins, Natural and Induced Antibodies. *Frontiers in Immunology*, 12(June), 1–15.
- Kim, M. S., & Bae, J. W. (2018). Lysogeny is prevalent and widely distributed in the murine gut microbiota. *ISME Journal*, 12(4), 1127–1141.
- Kim, M., & Benayoun, B. A. (2020). The microbiome: an emerging key player in aging and longevity. *Translational medicine of aging*, 4, 103–116.
- King, R. A., Slowan-Pomeroy, T. M., Thomas, J. E., Ahmed, T., Alexander, K. L., Biddle, J. M., Daniels, M. K., Rowlett, J. R., Senay, T. E., Rinehart, C. A., Staples, A. K., Rowland, N. S., Gaffney, B. L., Emmons, C. B., Hauk, M. D., Nguyen, R. L., Naegele, L., Strickland, S. S., Briggs, L. A., Rush, A. N., ... Hatfull, G. F. (2017). Genome Sequences of Subcluster K5 Mycobacteriophages AlleyCat, Edugator, and Guillsminger. *Genome announcements*, 5(45), e01122-17.
- Koliada, A., Moseiko, V., Romanenko, M., Lushchak, O., Kryzhanovska, N., Guryanov, V., & Vaiserman, A. (2021). Sex differences in the phylum-level human gut microbiota composition. *BMC Microbiology*, 21(1), 1–9.
- Kucharewicz-Krukowska A, Slopek S: Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1987, 35:553-561.
- Kurochkina LP, Vishnevskiy AY, Zhemaeva LV, Sykilinda NN, Strelkov SV, Mesyanzhinov VV: Structure, stability, and biological activity of bacteriophage T4 gene product 9 probed with mutagenesis and monoclonal antibodies. *J Struct Biol* 2006, 154:122-129.
- Langer, V., Vivi, E., Regensburger, D., Winkler, T. H., Waldner, M. J., Rath, T., Schmid, B., Skottke, L., Lee, S., Jeon, N. L., Wohlfahrt, T., Kramer, V., Tripal, P., Schumann, M., Kersting, S., Handtrack, C., Geppert, C. I., Suchowski, K., Adams, R. H., Becker, C., ... Stürzl, M. (2019). IFN- γ drives inflammatory bowel disease pathogenesis through VE-cadherin-directed vascular barrier disruption. *The Journal of clinical investigation*, 129(11), 4691–4707.
- Lawrence, D., Baldridge, M. T., & Handley, S. A. (2019). Phages and human health: More than idle hitchhikers. *Viruses*, 11(7), 1–16.

- Ledeboer AM, Bezemer S, de Haard JJ, Schaffers IM, Verrips CT, van Vliet C, Dusterhoft EM, Zoon P, Moineau S, Frenken LG: Preventing phage lysis of *Lactococcus lactis* in cheese production using a neutralizing heavy-chain antibody fragment from llama. *J Dairy Sci* 2002, 85:1376-1382.
- Leiman, P. G., Arisaka, F., Van Raaij, M. J., Kostyuchenko, V. A., Aksyuk, A. A., Kanamaru, S., & Rossmann, M. G. (2010). Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. *Virology Journal*, 7, 1–28.
- Leon, K. E., Schubert, R. D., Casas-Alba, D., Hawes, I. A., Ramachandran, P. S., Ramesh, A., Pak, J. E., Wu, W., Cheung, C. K., Crawford, E. D., Khan, L. M., Launes, C., Sample, H. A., Zorn, K. C., Cabrerizo, M., Valero-Rello, A., Langelier, C., Muñoz-Almagro, C., DeRisi, J. L., & Wilson, M. R. (2020). Genomic and serologic characterization of enterovirus A71 brainstem encephalitis. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*, 7(3), e703.
- Lepage, P., Colombet, J., Marteau, P., Sime-Ngando, T., Doré, J., & Leclerc, M. (2008). Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages?. *Gut*, 57(3), 424–425.
- Li, Q., Ge, F., Tan, Y., Zhang, G., & Li, W. (2016). Genome-wide transcriptome profiling of *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 cultivated in minimal media supplemented with cholesterol, androstenedione or glycerol. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5).
- Li, S. K., Leung, R. K., Guo, H. X., Wei, J. F., Wang, J. H., Kwong, K. T., Lee, S. S., Zhang, C., & Tsui, S. K. (2012). Detection and identification of plasma bacterial and viral elements in HIV/AIDS patients in comparison to healthy adults. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(11), 1126–1133.
- Lim, E. S., Wang, D., & Holtz, L. R. (2016). The Bacterial Microbiome and Virome Milestones of Infant Development. *Trends in microbiology*, 24(10), 801–810.
- Liu, J., Tang, W., Budhu, A., Forgues, M., Hernandez, M. O., Candia, J., Kim, Y., Bowman, E. D., Ambs, S., Zhao, Y., Tran, B., Wu, X., Koh, C., Surana, P., Liang, T. J., Guarnera, M.,

- Mann, D., Rajaure, M., Greten, T. F., ... Wang, X. W. (2020). A Viral Exposure Signature Defines Early Onset of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*, 182(2), 317-328.e10.
- Liu, J., Tang, W., Budhu, A., Forgues, M., Hernandez, M. O., Candia, J., Kim, Y., Bowman, E. D., Ambs, S., Zhao, Y., Tran, B., Wu, X., Koh, C., Surana, P., Liang, T. J., Guarnera, M., Mann, D., Rajaure, M., Greten, T. F., Wang, Z., ... Wang, X. W. (2020). A Viral Exposure Signature Defines Early Onset of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*, 182(2), 317–328.e10.
- Long, Q., Zhou, Q., Ji, L., Wu, J., Wang, W., & Xie, J. (2012). Mycobacterium smegmatis genomic characteristics associated with its saprophyte lifestyle. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(10), 3051–3055.
- Lusiak-Szelachowska M, Zaczek M, Weber-Dabrowska B, Miedzybrodzki R, Letkiewicz S, Fortuna W, Rogoz P, Szufnarowski K, Jonczyk-Matysiak E, Olchawa E et al.: Antiphage activity of sera during phage therapy in relation to its outcome. *Future Microbiol* 2017, 12:109-117.
- Ma, H., Tao, W., & Zhu, S. (2019). T lymphocytes in the intestinal mucosa: defense and tolerance. *Cellular and Molecular Immunology*, 16(3), 216–224.
- Ma, Z., & Li, W. (2019). How and Why Men and Women Differ in Their Microbiomes: Medical Ecology and Network Analyses of the Microgenderome. *Advanced Science*, 6(23).
- Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Klopot A, Kazmierczak Z, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, Ciekot J, Owczarek B et al.: Oral application of T4 phage induces weak antibody production in the gut and in the blood. *Viruses* 2015, 7:4783-4799.
- Majewska J, Kazmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapala J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jedruchniewicz N et al.: Induction of phage-specific antibodies by two therapeutic staphylococcal bacteriophages administered per os. *Front Immunol* 2019, 10:2607.
- Maloney BE, Perera KD, Saunders DRD, Shadipeni N, Fleming SD: Interactions of viruses and the humoral innate immune response. *Clin Immunol* 2020, 212 108351
- Marintcheva B. *Harnessing the Power of Viruses*. London: Academic Press, 2017

- Mina, M. J., Kula, T., Leng, Y., Li, M., de Vries, R. D., Knip, M., Siljander, H., Rewers, M., Choy, D. F., Wilson, M. S., Larman, H. B., Nelson, A. N., Griffin, D. E., de Swart, R. L., & Elledge, S. J. (2019). Measles virus infection diminishes preexisting antibodies that offer protection from other pathogens. *Science (New York, N.Y.)*, *366*(6465), 599–606.
- Monaco, C. L., Gootenberg, D. B., Zhao, G., Handley, S. A., Ghebremichael, M. S., Lim, E. S., Lankowski, A., Baldrige, M. T., Wilen, C. B., Flagg, M., Norman, J. M., Keller, B. C., Luévano, J. M., Wang, D., Boum, Y., Martin, J. N., Hunt, P. W., Bangsberg, D. R., Siedner, M. J., Kwon, D. S., ... Virgin, H. W. (2016). Altered Virome and Bacterial Microbiome in Human Immunodeficiency Virus-Associated Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Cell host & microbe*, *19*(3), 311–322.
- Monaco, D. R., Kottapalli, S. V., Breitwieser, F. P., Anderson, D. E., Wijaya, L., Tan, K., Chia, W. N., Kammers, K., Caturegli, P., Waugh, K., Roederer, M., Petri, M., Goldman, D. W., Rewers, M., Wang, L. F., & Larman, H. B. (2022). Deconvoluting virome-wide antibody epitope reactivity profiles. *EBioMedicine*, *75*, 103747.
- Navarro, F., & Muniesa, M. (2017). Phages in the Human Body. *Frontiers in microbiology*, *8*, 566.
- Nelstrop AE, Taylor G, Collard P: Studies on phagocytosis. II. In vitro phagocytosis by macrophages. *Immunology* 1968, 14:339- 346.
- Nguyen, S., Baker, K., Padman, B. S., Patwa, R., Dunstan, R. A., Weston, T. A., Schlosser, K., Bailey, B., Lithgow, T., Lazarou, M., Luque, A., Rohwer, F., Blumberg, R. S., & Barr, J. J. (2017). Bacteriophage Transcytosis Provides a Mechanism To Cross Epithelial Cell Layers. *mBio*, *8*(6), e01874-17.
- Nonoyama S, Hollenbaugh D, Aruffo A, Ledbetter JA, Ochs HD: B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells. *J Exp Med* 1993, 178:1097-1102.
- Norman, J. M., Handley, S. A., Baldrige, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., Kambal, A., Monaco, C. L., Zhao, G., Fleshner, P., Stappenbeck, T. S., McGovern, D. P., Keshavarzian, A., Mutlu, E. A., Sauk, J., Gevers, D., Xavier, R. J., Wang, D., Parkes, M.,

- & Virgin, H. W. (2015). Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*, *160*(3), 447–460.
- O’Neil KM, Ochs HD, Heller SR, Cork LC, Morris JM, Winkelstein JA: Role of C3 in humoral immunity. Defective antibody production in C3-deficient dogs. *J Immunol* 1988, *140*:1939-1945.
- Ochs HD, Davis SD, Wedgwood RJ: Immunologic responses to bacteriophage phi-X 174 in immunodeficiency diseases. *J Clin Invest* 1971, *50*:2559-2568.
- Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Odermatt B, Carroll MC, Hengartner H, Zinkernagel RM: Protective T cell-independent antiviral antibody responses are dependent on complement. *J Exp Med* 1999, *190*:1165-1174.
- Pérez-Brocal, V., García-López, R., Nos, P., Beltrán, B., Moret, I., & Moya, A. (2015). Metagenomic Analysis of Crohn's Disease Patients Identifies Changes in the Virome and Microbiome Related to Disease Status and Therapy, and Detects Potential Interactions and Biomarkers. *Inflammatory bowel diseases*, *21*(11), 2515–2532.
- Pescovitz MD, Torgerson TR, Ochs HD, Ocheltree E, McGee P, Krause-Steinrauf H, Lachin JM, Canniff J, Greenbaum C, Herold KC, Skyler JS, Weinberg A et al.: Effect of rituximab on human in vivo antibody immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2011, *128*:1295-1302 e1295.
- Piggott, A. M., & Karuso, P. (2016). Identifying the cellular targets of natural products using T7 phage display. *Natural Product Reports*, *33*(5), 626–636.
- Porras, A. M., Shi, Q., Zhou, H., Callahan, R., Montenegro-Bethancourt, G., Solomons, N., & Brito, I. L. (2021). Geographic differences in gut microbiota composition impact susceptibility to enteric infection. *Cell Reports*, *36*(4), 109457.
- Pou, C., Nkulikiyimfura, D., Henckel, E., Olin, A., Lakshmikanth, T., Mikes, J., Wang, J., Chen, Y., Bernhardsson, A. K., Gustafsson, A., Bohlin, K., & Brodin, P. (2019). The repertoire of maternal anti-viral antibodies in human newborns. *Nature Medicine*, *25*(4), 591–596.

- Pouyanfard, S., Bamdad, T., Hashemi, H., Bandehpour, M., & Kazemi, B. (2012). Induction of protective anti-CTL epitope responses against HER-2-positive breast cancer based on multivalent T7 phage nanoparticles. *PloS one*, 7(11), e49539.
- Pyun KH, Ochs HD, Wedgwood RJ, Yang XQ, Heller SR, Reimer CB: Human antibody responses to bacteriophage phi X 174: sequential induction of IgM and IgG subclass antibody. *Clin Immunol Immunopathol* 1989, 51:252-263.
- Reyes A, Semenkovich NP, Whiteson K, Rohwer F, Gordon JI: Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nat Rev Microbiol* 2012, 10:607- 617.
- Rouse MD, Stanbro J, Roman JA, Lipinski MA, Jacobs A, Biswas B, Regeimbal J, Henry M, Stockelman MG, Simons MP: Impact of frequent administration of bacteriophage on therapeutic efficacy in an *A. baumannii* mouse wound infection model. *Front Microbiol* 2020, 11:414.
- Rubinstein A, Mizrachi Y, Bernstein L, Shliozberg J, Golodner M, Liu GQ, Ochs HD: Progressive specific immune attrition after primary, secondary and tertiary immunizations with bacteriophage phi X174 in asymptomatic HIV-1 infected patients. *AIDS* 2000, 14:F55-F62.
- Santiago-Rodriguez, T. M., & Hollister, E. B. (2019). Human Virome and Disease : High-Throughput Phage-Bacteria Dysbiosis and Development of Human Gut. *Viruses*, 11(7), 656.
- Schubert, R. D., Hawes, I. A., Ramachandran, P. S., Ramesh, A., Crawford, E. D., Pak, J. E., Wu, W., Cheung, C. K., O'Donovan, B. D., Tato, C. M., Lyden, A., Tan, M., Sit, R., Sowa, G. M., Sample, H. A., Zorn, K. C., Banerji, D., Khan, L. M., Bove, R., Hauser, S. L., ... Wilson, M. R. (2019). Pan-viral serology implicates enteroviruses in acute flaccid myelitis. *Nature medicine*, 25(11), 1748–1752.
- Serwer, P., Wright, E. T., Hakala, K. W., & Weintraub, S. T. (2008). Evidence for bacteriophage T7 tail extension during DNA injection. *BMC research notes*, 1, 36.
- Shadidi, M., Sørensen, D., Dybwad, A., Furset, G., & Sioud, M. (2008). Mucosal vaccination with phage-displayed tumour antigens identified through proteomics-based strategy

- inhibits the growth and metastasis of 4T1 breast adenocarcinoma. *International journal of oncology*, 32(1), 241–247.
- Shearer WT, Lugg DJ, Rosenblatt HM, Nickolls PM, Sharp RM, Reuben JM, Ochs HD: Antibody responses to bacteriophage phi X-174 in human subjects exposed to the antarctic winterover model of spaceflight. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107:160- 164.
- Sherwin, E., Rea, K., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2016). A gut (microbiome) feeling about the brain. *Current opinion in gastroenterology*, 32(2), 96–102.
- Shrock, E., Fujimura, E., Kula, T., Timms, R. T., Lee, I. H., Leng, Y., Robinson, M. L., Sie, B. M., Li, M. Z., Chen, Y., Logue, J., Zuiani, A., McCulloch, D., Lelis, F. J. N., Henson, S., Monaco, D. R., Travers, M., Habibi, S., Clarke, W. A., ... Elledge, S. J. (2020). Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity. *Science*, 370(6520).
- Sioud, M. (2019). Phage Display Libraries: From Binders to Targeted Drug Delivery and Human Therapeutics. *Molecular Biotechnology*, 61(4), 286–303.
- Smith LL, Buckley R, Lugar P: Diagnostic immunization with bacteriophage PhiX 174 in patients with common variable immunodeficiency/hypogammaglobulinemia. *Front Immunol* 2014, 5:410.
- Snippe H, de Reuver MJ, Belder M, Willers JM: Bacteriophage MS-2 in the immune response. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1976, 50:111-122.
- Sokoloff AV, Bock I, Zhang G, Sebestyen MG, Wolff JA: The interactions of peptides with the innate immune system studied with use of T7 phage peptide display. *Mol Ther* 2000, 2:131-139.
- Sokullu, E., Gauthier, M. S., & Coulombe, B. (2021). Discovery of antivirals using phage display. *Viruses*, 13(6), 1–26.
- Srivastava, A. S., Chauhan, D. P., & Carrier, E. (2004). In utero detection of T7 phage after systemic administration to pregnant mice. *BioTechniques*, 37(1), 81–83.
- Suzuki, T. A., & Worobey, M. (2014). Geographical variation of human gut microbial composition. *Biology Letters*, 10(2).

- Talwar, H., Rosati, R., Li, J., Kissner, D., Ghosh, S., Fernández-Madrid, F., & Samavati, L. (2015). Development of a T7 Phage Display Library to Detect Sarcoidosis and Tuberculosis by a Panel of Novel Antigens. *EBioMedicine*, 2(4), 341–350.
- Tan, Y., Tian, T., Liu, W., Zhu, Z., & J. Yang, C. (2016). Advance in phage display technology for bioanalysis. *Biotechnology Journal*, 11(6), 732–745.
- Tetz, G., Brown, S. M., Hao, Y., & Tetz, V. (2019). Type 1 Diabetes: an Association Between Autoimmunity, the Dynamics of Gut Amyloid-producing *E. coli* and Their Phages. *Scientific reports*, 9(1), 9685.
- Townsend, E. M., Kelly, L., Muscatt, G., Box, J. D., Hargraves, N., Lilley, D., & Jameson, E. (2021). The Human Gut Phageome: Origins and Roles in the Human Gut Microbiome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(June), 1–27.
- Turner JS, Benet ZL, Grigorova IL: Signals 1, 2 and B cell fate or: where, when and for how long? *Immunol Rev* 2020.
- Uhr JW, Finkelstein MS, Baumann JB: Antibody formation. III. The primary and secondary antibody response to bacteriophage phi X 174 in guinea pigs. *J Exp Med* 1962, 115:655-670.
- Van Belleghem, J. D., Dąbrowska, K., Vaneechoutte, M., Barr, J. J., & Bollyky, P. L. (2019). Interactions between bacteriophage, bacteria, and the mammalian immune system. *Viruses*, 11(1).
- Venkataraman, T., Valencia, C., Mangino, M., Morgenlander, W., Clipman, S. J., Liechti, T., Valencia, A., Christofidou, P., Spector, T., Roederer, M., Duggal, P., & Larman, H. B. (2022). Analysis of antibody binding specificities in twin and SNP-genotyped cohorts reveals that antiviral antibody epitope selection is a heritable trait. *Immunity*, 55(1), 174–184.e5.
- Wagner, J., Maksimovic, J., Farries, G., Sim, W. H., Bishop, R. F., Cameron, D. J., Catto-Smith, A. G., & Kirkwood, C. D. (2013). Bacteriophages in gut samples from pediatric Crohn's disease patients: metagenomic analysis using 454 pyrosequencing. *Inflammatory bowel diseases*, 19(8), 1598–1608.

- Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, Sun Z, Reed E, Ding L, Gong J, Li QQ, Hu J: Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Med* 2006, 17:309-317.
- Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, Sun Z, Tao D, Ding L, Reed E et al.: Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. *Int J Mol Med* 2006, 17:347-355.
- Wang, S., Song, F., Gu, H., Shu, Z., Wei, X., Zhang, K., Zhou, Y., Jiang, L., Wang, Z., Li, J., Luo, H., & Liang, W. (2022). Assess the diversity of gut microbiota among healthy adults for forensic application. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 1–12.
- Witherspoon RP, Storb R, Ochs HD, Fluornoy N, Kopecky KJ, Sullivan KM, Deeg JH, Sosa R, Noel DR, Atkinson K et al.: Recovery of antibody production in human allogeneic marrow graft recipients: influence of time posttransplantation, the presence or absence of chronic graft-versus-host disease, and antithymocyte globulin treatment. *Blood* 1981, 58:360-368.
- Wojtyna K, Kazmierczak Z, Majewska J, Lecion D, Kłopot A, Miernikiewicz P, Owczarek B, Harhala M, Zielonka K, Gorski A, Dabrowska K: Hypersensitivity to phages is a rare phenomenon. 22th Biennial Evergreen International Phage Meeting, Evergreen State College, Olympia; Washington, U.S.A, 07-11.08.: 2017.
- Wong, C. L., Sieo, C. C., & Tan, W. S. (2013). Display of the VP1 epitope of foot-and-mouth disease virus on bacteriophage T7 and its application in diagnosis. *Journal of Virological Methods*, 193(2), 611–619.
- Xu, G. J., Kula, T., Xu, Q., Li, M. Z., Vernon, S. D., Ndung'u, T., Ruxrungtham, K., Sanchez, J., Brander, C., Chung, R. T., O'Connor, K. C., Walker, B., Larman, H. B., & Elledge, S. J. (2015). Viral immunology. Comprehensive serological profiling of human populations using a synthetic human virome. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6239), aaa0698.
- Yanaka, S., Yogo, R., Inoue, R., Sugiyama, M., Itoh, S. G., Okumura, H., Miyanoiri, Y., Yagi, H., Satoh, T., Yamaguchi, T., & Kato, K. (2019). Dynamic views of the fc region of immunoglobulin g provided by experimental and computational observations. *Antibodies*, 8(3), 1–13.

- Yang, J., Fuller, P. J., Morgan, J., Shibata, H., McDonnell, D. P., Clyne, C. D., & Young, M. J. (2014). Use of phage display to identify novel mineralocorticoid receptor-interacting proteins. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 28(9), 1571–1584.
- Yap, M. L., Klose, T., Arisaka, F., Speir, J. A., Veessler, D., Fokine, A., & Rossmann, M. G. (2016). Role of bacteriophage T4 baseplate in regulating assembly and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(10), 2654–2659.
- Yue, H., Li, Y., Yang, M., & Mao, C. (2022). T7 Phage as an Emerging Nanobiomaterial with Genetically Tunable Target Specificity. *Advanced Science*, 9(4), 1–25.
- Zaczek M, Lusiak-Szelachowska M, Jonczyk-Matysiak E, WeberDabrowska B, Miedzybrodzki R, Owczarek B, Kopciuch A, Fortuna W, Rogoz P, Gorski A: Antibody production in response to staphylococcal MS-1 phage cocktail in patients undergoing phage therapy. *Front Microbiol* 2016, 7:1681.
- Zhang, L.-Y., Wang, C.-L., Yan, M.-Y., Geng, Y.-M., Yin, H., Jia, H.-Y., Zhu, C.-Z., Li, Z.-H., Ren, G.-X., Pan, L.-P., Sun, Y.-C., & Zhang, Z.-D. (2022). Toxin-Antitoxin Systems Alter Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to Environmental Stress. *Microbiology Spectrum*.
- Zilberman-Schapira, G., Zmora, N., Itav, S., Bashiardes, S., Elinav, H., & Elinav, E. (2016). The gut microbiome in human immunodeficiency virus infection. *BMC medicine*, 14(1), 83.
- Zuo, T., Lu, X. J., Zhang, Y., Cheung, C. P., Lam, S., Zhang, F., Tang, W., Ching, J. Y. L., Zhao, R., Chan, P. K. S., Sung, J. J. Y., Yu, J., Chan, F. K. L., Cao, Q., Sheng, J. Q., & Ng, S. C. (2019). Gut mucosal virome alterations in ulcerative colitis. *Gut*, 68(7), 1169–1179.

Strony internetowe:

- <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000000757>, dostęp w dniu 24.11.2022 r.
- <http://immunet.cn/ced/>, dostęp w dniu 28.11.2022 r.
- <https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>, dostęp w dniu 03.02.2019 r.
- <https://phagesdb.org/phages/Edugator/>, dostęp w dniu 24.11.2022 r.

